



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“Evaluación de especies de Agave sobre los procesos
fisiopatológicos asociados al Alzheimer.”**

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

P R E S E N T A

M. en C. Nayeli Monterrosas Brisson

Directora de Tesis: **Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo**
Directora de Tesis: **Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz**



Yautepec, Morelos

Octubre del 2013

Instituto Politécnico Nacional

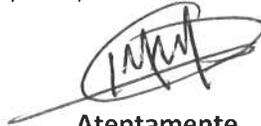
Presente

Bajo protesta de decir verdad, el que suscribe (**Nayeli Monterrosas Brisson**) (se anexa copia simple de identificación oficial), manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada (**Evaluación de especies de Agave sobre los procesos fisiopatológicos asociados al Alzheimer**), en adelante “La Tesis” y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante “El IPN”, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente, total ó parcialmente en medios digitales “La Tesis” por un periodo de dos años, contando a partir de la fecha de la presente autorización. Dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a “El IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, “El IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “La Tesis”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de “La Tesis”, manifiesto que la misma es original, y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de “La Tesis”, por lo que deslindo de toda responsabilidad a “El IPN” en caso de que el contenido de “La Tesis” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general, cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 4 de Noviembre del 2013



Atentamente



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 10 horas del día 14 del mes de Octubre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI para examinar la tesis titulada:
Evaluación de especies de Agave sobre los procesos fisiopatológicos asociados al Alzheimer

Presentada por el alumno:

MONTERROSAS
Apellido paterno

BRISSON
Apellido materno

NAYELI
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	4	3	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Martha Lucía Arenas
Ocampo

Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz

Dr. Antonio Ruperto Jiménez
Aparicio

Dra. Gabriela Trejo Tapia

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Dr. Angel René Arzuffi Barrera

Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



SEP IPN
CENTRO DE DESARROLLO
DE PRODUCTOS BIÓTICOS
YAUTEPEC, MOR.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Yauatepec, Morelos el día 4 del mes de Noviembre del año 2013, el (la) que suscribe **Nayeli Monterrosas Brisson** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos**, con número de registro **B091438**, adscrita al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo de dirección de la **Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo** (CeProBi-IPN) y de la **Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz** (CIBIS-IMSS). Y cede los derechos del trabajo titulado “**Evaluación de especies de Agave sobre los procesos fisiopatológicos asociados al Alzheimer**”, al Instituto Politécnico Nacional 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 el permiso expreso de la autora y/o directoras del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones:

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi-IPN), carretera Yauatepec-Jojutla, Km. 8.5, Col. San Isidro, C.P. 62731, Yauatepec, Morelos, (México). Teléfonos 01(55) 57296000 etx. 82500 y 01 (735) 3941896.

Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur (CIBIS-IMSS), Argentina No. 1, C.P.62790, Xochitepec, Morelos, (México). Teléfonos 01 (777) 3612155 y 01 (777) 3612194. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ATENTAMENTE

M. en C. Nayeli Monterrosas Brisson.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

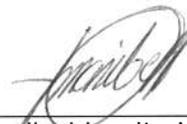
Con base en el artículo 57, fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis **“Evaluación de especies de Agave sobre los procesos fisiopatológicos asociados al Alzheimer”** es responsabilidad de la Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo, de la Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz y de la M. en C. Nayeli Monterrosas Brisson, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos; a 4 de Noviembre de 2013

ATENTAMENTE



Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo
Directora de tesis



Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz
Directora de tesis



M. en C. Nayeli Monterrosas Brisson
Alumna

EL TRABAJO DE TESIS “**EVALUACIÓN DE ESPECIES DE AGAVE SOBRE LOS PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS ASOCIADOS AL ALZHEIMER**” FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DEL SUR (CIBIS) DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS), Y EN EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DEL CEPROBI-IPN, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA **DRA. MARTHA LUCÍA ARENAS OCAMPO** DEL CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS (CEPROBI) DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (IPN) Y LA **DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ** DEL CIBIS.

LA SUSTENTANTE, RECIBIÓ UNA BECA DE ESTUDIOS DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON NÚMERO DE REGISTRO 209315 Y UNA BECA COMPLEMENTARIA DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS) MATRICULA NUMERO 99183988. ASI MISMO, EL PRESENTE ESTUDIO RECIBIÓ RECURSOS DEL IMSS (FIS/IMSS/PROT/G10/848).

AGRADECIMIENTOS.

A mis directoras de tesis: Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo y Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz, por la asesoría y dirección de esta tesis, por su gran apoyo y comprensión en todo momento, gracias por haberme acompañado con paciencia en este proceso de crecimiento académico y personal.

A la Dra. Gabriela Trejo Tapia, Dr. Enrique Jiménez Ferrer, Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio y Dr. Angel René Arzuffi Barrera, por el tiempo dedicado en la revisión del documento y sus pertinentes observaciones, que sin lugar a dudas enriquecieron el presente trabajo.... Mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez y al Dr. Manases González Cortazar por el gran apoyo, asesoría, y el tiempo dedicado durante el desarrollo experimental de esta tesis.

Al Centro de Investigaciones Biomedicas del Sur, por las facilidades otorgadas en mi estancia en el laboratorio de Farmacología y Fitoquímica.

A Jonathan Orduño y Arturo Pérez por las aportaciones y el apoyo en la parte técnica de este trabajo de tesis.

DEDICATORIAS

A mis hijas, Fernanda y Ximena. Ustedes han traído esa energía a mi vida que me mueve a ser mejor ser humano cada día, para que crezcan con mi ejemplo. Cada minuto invertido en este trayecto, estuvieron conmigo porque este logro es también para ustedes. Las amo hijas mías...

El andar en estos años durante el Doctorado no fue fácil, pero en el camino no estuve sola, a mi lado estuvieron personas que han marcado mi vida y hoy siguen a mi lado. Por eso los invito a que compartamos mi crecimiento personal, que me ha enseñado a caminar con confianza en cualquier tipo de sendero para alcanzar la meta que yo me proponga, y en esta ocasión, la meta es este logro profesional, el cual ha sido una labor en equipo y lo dedico a:

A *ti Mamá*, nunca soltaste mi mano...*Michelle*, a tu lado he aprendido que caer no es malo, pero que levantarse no es una opción, es lo único!... *Ricardo*, me mostraste la importancia del amor propio ...*Ramón*, quien se sumó a mi camino aún cuando había poco a nuestro favor, enseñándome que la vida hay que tomarla por los cuernos, tu amor ha sacado lo mejor de mí... *a todos ustedes, mil gracias!*

I. INDICE GENERAL

II. INDICE DE CUADROS	III
III. INDICE DE FIGURAS	III
VI. SIMBOLOGIA UTILIZADA	V
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Género Agave	7
2.2 Descripción botánica	8
2.2.1 <i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber	8
2.2.3 <i>Agave angustifolia</i> Haw	9
2.2.4 <i>Agave americana</i> L. Marginata Hort	9
2.3 Usos medicinales del género Agave	10
2.4 Química y farmacología del género Agave	11
2.5 Enfermedad de Alzheimer	14
2.6 Aspectos fisiopatológicos asociados al Alzheimer	16
2.6.1 Inflamación en la EA mediada por citocinas	17
2.6.2 Participación de la neuroglia durante la EA	21
2.6.2.1 Microglia	21
2.6.2.2 Astrocitos	22
2.7 Barrera Hematoencefálica (BHE): función y participación en la EA	24
2.8 Estrés oxidante y radicales libres en la EA	28
2.9 Inflamación sistémica inducida por LPS	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
4. JUSTIFICACIÓN	35
5. HIPÓTESIS	37
6. OBJETIVO GENERAL	38
6.1 Objetivos particulares	38
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1 Material vegetal y obtención del extracto	39
7.2 Animales	40
7.3 Material de laboratorio y reactivos	41
7.4 Evaluación anti-inflamatoria: Inflamación inducida con TPA (12-orto- tetra,decanoil forbol-13 acetato)	41
7.5 Análisis químico-biodirigido	42
7.6 Inducción de la EA experimental con Lipopolisacárido	43
7.7 Preparación de tejido para las pruebas de inhibición de AChE y de actividad antioxidante	45
7.7.1 Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE)	45
7.7.2 Evaluación de la actividad antioxidante	45
7.7.2.1 Glutation Reductasa (GR)	46
7.7.2.2 NADPH oxidasa	46
7.8 Evaluación inmunomoduladora: Cuantificación de citocinas mediante el método de ELISA	46
7.9 Evaluación sobre el deterioro cognitivo inducido por Escopolamina: Diseño experimental	47

7.9.1 Evaluación sobre el deterioro cognitivo inducido por Escopolamina: Paradigma de evitación pasiva	47
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
9. RESULTADOS	50
9.1 Obtención del extracto	50
9.2 Evaluación anti-inflamatoria: Inflamación inducida con TPA (12-orto- tetra,decanoil forbol-13 acetato)	50
9.3 Análisis químico-bio-dirigido	52
9.4 Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE)	55
9.5 Evaluación del efecto antioxidante	57
9.6 Evaluación inmunomoduladora: Cuantificación de citocinas mediante el método de ELISA	58
9.7 Evaluación sobre el deterioro cognitivo inducido por Escopolamina: Paradigma de evitación pasiva	61
10. DISCUSIÓN	63
11. CONCLUSIONES	81
12. PERSPECTIVAS	82
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
14. ANEXOS	108

II. INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Rendimientos obtenidos de la extracción acetónica de las especies de Agave	50
Cuadro 2	¹ H(400 MHz) y ¹³ C-NMR (100MHz) datos de cantalasaponina-1 peracetato derivative	54
Cuadro 3	Efecto del tratamiento de diferentes especies de Agave sobre la actividad enzimática de AChE (Km y Vmax)	57
Cuadro 4	Representación gráfica del efecto de los distintos tratamientos sobre la actividad enzimática de NADPH oxidasa (NOX) y Glutación Reductasa (GR).	58

III. INDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Agave tequilana</i> F.A.C. Weber. Imágenes tomadas del área de colecta y del jardín botánico de Chapultepec.	8
Figura 2	<i>Agave angustifolia</i> Haw. Imágenes tomadas del área de colecta	9
Figura 3	<i>Agave americana</i> L. Marginata Hort. Imágenes tomadas del área de colecta	10
Figura 4	Clasificación de las saponinas	11
Figura 5	Estructura de espirostano (a), furostano (b) y furoespirostano (c)	12
Figura 6	Proceso de la deposición extracelular neurítica de placas seniles constituidas por el β A (A) imagen tomada de http://noticiasbiociencias.blogspot.mx/2012/08/bloqueando-el-efecto-del-beta-amiloide.html . Formación de los ovillos neurofibrilares intracelulares (B) imagen tomada de http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/Alzheimer.htm	15
Figura 7	Proceso de activación de los astrocitos y la microglia en presencia de las placas seniles β A Etapa temprana (A) y en etapa avanzada (B).	23
Figura 8	Constitución de la Barrera Hematoencefálica en condiciones normales y en la enfermedad de Alzheimer	26

Figura 9	Mecanismo de acción del Lipopolisacárido sobre la Barrera Hematoencefálica	32
Figura 10	Diagrama experimental	39
Figura 11	Dispositivo empleado en el paradigma de Evitación pasiva.	48
Figura 12	Evaluación anti-inflamatoria. <i>A. tequilana</i> (At 6 mg/o), <i>A. americana</i> (Aam 6 mg/o), <i>A. angustifolia</i> (Aan 6 mg/o), Indometacina (Indo 1 mg/o). ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni. *Significativamente diferente $p < .05$ respecto al control negativo TPA (Veh).	51
Figura 13	Evaluación anti-inflamatoria de fracciones de menor (AaF1) a mayor polaridad (AaF6) a una concentración de 2 mg/o. Control positivo (INDO, 1mg/o). ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni. *Significativamente diferente $p < .05$ respecto al control negativo (Veh).	53
Figura 14	Estructura química de Cantalasonina1	55
Figura 15	Efecto de diferentes tratamientos (Agave) sobre la actividad de AChE en homogenados de cerebro de ratones con neuroinflamación inducida con LPS	56
Figura 16	Efecto de diferentes tratamientos: Indometacina (Indo), <i>A. tequilana</i> (Ateq), <i>A. americana</i> (Aame), <i>A. angustifolia</i> (Aang) sobre el incremento en la concentración de interleucinas (a , IL-1 β e IL-6) y de TNF- α e IFN- γ (b), en cerebro de ratones que recibieron LPS (25 μ g/kg). <i>T-student</i> * $p < 0.05$ respecto al grupo con vehículo (Veh).	60
Figura 17	Evaluación sobre el deterioro cognitivo inducido con Escopolamina de los extractos de <i>A. tequilana</i> , <i>A. americana</i> y <i>A. angustifolia</i> . Control positivo (Galantamina) y Control negativo (Vehículo). ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni. *Significativamente diferente $p < .05$ respecto al control negativo (Veh).	62

IV.-SIMBOLOGIA UTILIZADA.

Símbolo	Significado
EA	Enfermedad de Alzheimer
AChl	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
β A	Beta amiloide
PPA	Proteína Precursora Amiloide
SNC	Sistema nervioso Central
TGB	Factor del Crecimiento Transformate- β
IL	Interleucina
MIP-1 α	Proteína inhibidora de macrófago-1 α
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intraventricular
v.o.	Vía oral
LPS	Lipopolisacáridos
CSF	Fluido espinal cerebro vascular
FN- κ B	Factor Nuclear kappa B
COX1-2	Ciclooxigenasa 1 y 2
TNF α	Factor de necrosis tumoral alpha
TNFR-1 y 2	Receptor del Factor de necrosis tumoral alpha 1 y 2
SNP	Sistema Nervioso Periférico
iNOS	Oxido Nítrico Sintasa inducible
BHE	Barrera Hematoencefálica
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial

RESUMEN:

Las especies del género *Agave* como *Agave tequilana*, *Agave angustifolia* y *Agave americana*, son usadas en la medicina tradicional Mexicana para tratar padecimientos asociados a la inflamación, entre los que se incluyen los neurodegenerativos. Las pencas de estas plantas poseen compuestos del grupo de las saponinas, a las cuales se les han identificado propiedades anti-inflamatorias en diferentes modelos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de *Agave tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L. sobre los aspectos fisiopatológicos asociados al Alzheimer. Se hizo una extracción acetónica de pencas de dichas especies, se analizó el efecto anti-inflamatorio *in vivo* a través de la inducción de edema auricular con TPA (25 µg/ml) en ratones. Después, se continuó con un fraccionamiento bio-dirigido con el mismo modelo, para elucidar el compuesto activo. El extracto acetónico de todas las especies estudiadas, disminuyó la inflamación siendo el de *A. americana* el más activo, con un 81% de inhibición de edema (i.e.), a partir de éste se obtuvieron 6 fracciones, de las cuales la F5 fue más activa con un 85.6% de i. e. y mediante el fraccionamiento cromatográfico de ésta, se obtuvo un compuesto identificado por RMN DEPT, COSY, HSQC y HMBC como (25R)-5 alpha-spirostan-3 beta, 6 alpha, 23 alpha-triol-3, 6-di-O-beta-D-glucopyranoside (Cantallasaponina-1), la cual presentó un efecto dependiente de la dosis, de hasta el 90 % de i.e. auricular a la dosis mayor. El efecto de los Agaves sobre los aspectos fisiopatológicos asociados al Alzheimer, se evaluó usando el modelo de neuroinflamación inducida por la administración i.p. de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*. Estos animales fueron tratados con el extracto acetónico de la especie de *Agave* correspondiente (via oral v.o.), ó vehículo. Al grupo control no se le suministró LPS. Los animales fueron sacrificados, se disecaron los cerebros. Los homogenados de éstos sirvieron para evaluar la actividad sobre las enzimas Acetilcolinesterasa (AChE),

Glutación Reductasa (GR) y NADPH-oxidasa *in vitro*. El extracto de *A. angustifolia* provocó una inhibición a-competitiva sobre la actividad de AChE, mientras que *A. tequilana* y *A. americana* no inhibieron la actividad de dicha enzima, aunque si lograron inhibir el daño causado por el LPS. La actividad de la enzima GR, observa un incremento significativo en su actividad y NADPH-oxidasa disminuyó significativamente con la administración de los extractos en comparación al grupo control. El efecto inmunomodulador sobre los homogenados de cerebro se evaluó mediante la cuantificación de citocinas pro-inflamatorias (INF- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6) por la técnica de ELISA. La IL-6- y la IL-1 β se incrementaron con respecto al control y *A. americana* L. mostró mayor concentración de IL-1 β .

Se observó una reducción en las citocinas TNF α e INF γ comparadas con el control Basal, el valor menor se obtuvo con *A. tequilana* (0.28 pg/mg) y para INF γ , el valor menor correspondió a *A. americana* (1.21 pg/mg). Con relación al daño cognitivo inducido con Escopolamina a través del paradigma de Evitación Pasiva, *A. tequilana* y *A. americana* mejoran el proceso de aprendizaje y sus tiempos de retención fueron estadísticamente semejantes con respecto al control Basal (256.28, 259.57 y 270 seg, respectivamente).

ABSTRACT:

Species of Agave genus as *Agave tequilana* Weber, *Agave angustifolia* Haw and *Agave Americana* L, are used in Mexican traditional folk to treat diseases associated with inflammation, including neurodegenerative disorders. The leaves of these plants have compounds from the group of saponins, which have been identified with anti-inflammatory properties in different models. The aim of this study was to evaluate the effect of *Agave tequilana* Weber, *Agave angustifolia* Haw and *Agave Americana* L. over the pathophysiological aspects associated with Alzheimer. An acetone extraction was made from the Agave leaves, the *in vivo* anti-inflammatory effect was analyzed through the TPA induced ear edema in mice. A bio-guided fractionation was followed from the one with the highest activity, under the same model, which allowed the elucidation of the active compound. The acetonic extract of all the Agave species evaluated caused a reduction of inflammation, however, the most active was *A. americana* L (81% inhibition of edema). Thus was chosen for chemical separation and 6 fractions were obtained, being the most active F5 with edema inhibition rate of 85.6%. Chromatographic fractionation of the latter, allowed the isolation of a compound which was identified by NMR DEPT, COSY, HSQC and HMBC as (25R) -5 alpha-beta Spirostan-3, 6 alpha, 23 alpha-triol-3 , 6-di-O-beta-D-glucoopyranoside (Cantallasaponin-1), this saponin showed a dose dependent effect, up to 90% ear edema inhibition at the highest dose. In order to assess the effect of the three Agave species, on the pathophysiological aspects associated with Alzheimer's disease a neuroinflammation model induced by administration i.p. of lipopolysaccharide (LPS) of *E. coli* was used. These animals were subsequently treated with acetone extract of Agave species corresponding (v.o. orally), or vehicle. The control group was not provided with LPS. The animals were sacrificed and the brains used to make homogenates which were used to evaluate the effect on

enzyme activity of acetylcholinesterase (AChE), glutathione reductase (GR) and NADPH oxidase (NOX) *in vitro*. The acetone extract of *A. angustifolia* Haw caused an a-competitive inhibition of the AChE activity, while *A. tequilana* Weber and *A. Americana* L, apparently exert some kind of inhibition of this enzyme, however, they inhibited the damage induced by LPS. The GR enzyme activity, presented a significant increase and NADPH oxidase decreased significantly with extracts administration compared with the control group. Immunomodulatory effect was evaluated on the brain homogenates by quantifying pro-inflammatory cytokine (INF- γ , TNF- α , IL-1 β and IL-6) by ELISA. IL-6, and IL-1 β showed an increase with respect to the basal group. And *A. americana* L. showed higher concentration of IL-1 β with respect to the highest value (11.57 pg / mg) obtained from the negative control. TNF α and INF γ cytokines showed a reduction in concentration with respect to the basal control group. The lowest value observed for TNF α was that of *A. tequilana* Weber (0.28 pg/mg) and *A. americana* L. showed the lower value of INF γ (1.21 pg/mg).

Regarding the scopolamine-induced cognitive impairment through passive avoidance paradigm, *A. tequilana* Weber and *A. Americana* L enhanced the learning process and their retention times were statistically similar to the control baseline (256.28, 259.57 y 270 seg respectively).

1.- INTRODUCCIÓN:

El daño celular asociado a la Enfermedad de Alzheimer, es consecuencia de los múltiples procesos fisiopatológicos asociados a este trastorno, incluyendo alteración en la neurotransmisión colinérgica, acumulación de conglomerados intracelulares neurofibrilares y placas de la proteína β -amiloide extracelulares, muerte celular, modificación en el equilibrio oxido-reducción cerebral e inflamación. Todos ellos en conjunto originan finalmente deterioro cognitivo, síntoma de mayor significancia en los pacientes con Alzheimer, lo que lleva a un detrimento en la calidad de vida no sólo de las personas que la padecen, sino también de quienes están a su alrededor.

El control terapéutico en el tratamiento de esta enfermedad, está basado en la administración de sustancias con actividad inhibidora de la enzima acetilcolinesterasa, principalmente. Aunque también se administran anti-inflamatorios y antioxidantes. Esta polifarmacia resulta en beneficio de los pacientes, sin embargo la consecuencia del tratamiento prolongado lleva a efectos colaterales indeseables que cada uno de los fármacos provoca.

Existe evidencia clínica preliminar en la que se muestra que algunas plantas medicinales pueden disminuir la pérdida de la memoria en pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer (media-moderada). Los potenciales farmacológicos benéficos que ofrece el tratamiento con las especies vegetales, no sólo se limita a la inhibición de la acetilcolinesterasa, también incluyen propiedades antioxidantes, disminución de la apoptosis, anti-inflamatorios y mejoradores de la memoria. Los fitomedicamentos derivados de las plantas, pueden constituir una alternativa de gran relevancia en el tratamiento del daño causado por esta enfermedad, con menos problemas colaterales en comparación de las sustancias de síntesis. Por ejemplo, los inhibidores de AChE, que llegan a causar bradicardia, úlcera péptica, asma o epilepsia.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la evaluación del extracto acetónico de las especies *Agave tequilana* F. A.C. Weber, *Agave angustifolia* Haw y *Agave americana* L. Marginata Hort., sobre procesos de daño celular asociado a inflamación, oxidación y finalmente deterioro cognitivo, utilizando un modelo de Alzheimer experimental inducido con LPS.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Género Agave.

El agave representa uno de los principales cultivos industriales de importancia económica en México. La familia Agavaceae se distribuye desde Dakota del Norte, Estados Unidos, hasta Paraguay, y tiene alrededor de 300 especies. En México se pueden encontrar 205, de las cuales 151 son endémicas, lo que representa el 58% del total de las especies de este género (García, 1995). Entre las especies que se industrializan en nuestro país se encuentra el *Agave angustifolia* Haw, utilizada para la obtención de mezcal en Oaxaca y el *Agave tequilana* Weber var. azul que es materia prima del tequila que se produce en Jalisco, Michoacán y Nayarit.

La coexistencia del hombre mesoamericano y el Maguey (nombre común) o *Agave* (nombre botánico o científico) data de 10 000 a 8 000 años a. C. muestra de ello son los restos de hojas mascadas y fibras encontradas en cuevas ubicadas en Coahuila y el Valle de Tehuacán (Granados, 1999). Durante los años 2 000 al 200 a. C., el Agave era cultivado por las culturas de Tula, Tulancingo y Teotihuacán, tal como lo indican restos arqueológicos de “raspadores de piedra” empleados para la obtención de agua miel (González y Rodríguez, 2000).

Durante la conquista española en 1570, Francisco Hernández, protomédico del Nuevo Mundo, en su obra “Historia de las plantas de Nueva España”, reporta los diferentes usos del Agave y sus nombres más comunes (Mendoza, 1992). Adicionalmente, reportes en los cuales se hace referencia del uso de algunas especies de Agave por parte de los indígenas de la época prehispánica para la elaboración de papel, construcción de techos a partir de las pencas, obtención de telas y cuerdas resistentes a partir de las fibras, además de que era utilizado como combustible (Granados, 1999).

En la actualidad, se señalan más de 70 formas de uso para especies de *Agave*, siendo la más común la elaboración de fibras y la obtención de bebidas fermentadas y destiladas.

En menor escala se utilizan diferentes partes de la planta para la construcción, como alimento, ornato y diversos artículos domésticos.

Sin embargo, el uso de materiales sintéticos trajo la disminución del cultivo de *Agave* y por tanto también sus usos, haciendo especial énfasis en el uso medicinal (Granados, 1999).

2.2 Descripción botánica

2.2.1 *Agave tequilana* F.A.C. Weber:

Son plantas xerófilas (que crecen en zonas áridas y cálidas). Sus hojas son color azul-verdoso, delgadas y casi planas; mide aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho, con una espina terminal rojo oscuro de 2 cm de longitud. Dependiendo del clima, alcanzan su madurez entre los 5 y los 10 años (Granados, 1999).

Se cultiva en el centro y sur de México, principalmente en tierras altas. Cuando las plantas tienen de 8 a 10 años se cortan sus hojas, dejando tallo en forma esférica, que luego se cocina y desmenuza. El líquido que se extrae se fermenta y destila para obtener el tequila (León, 2000).



Fig. 1 *Agave tequilana* F.A.C. Weber.

Imágenes tomadas del área de colecta y del jardín botánico de Chapultepec.

2.2.2 *Agave angustifolia* Haw.

El nombre común de esta especie es Maguey (en Morelos, Fig. 2), maguey espadín y su sinónimo científico es *A. vivipara* var. *vivipara*. Es una planta arrosetada con tallo grueso, corto, simple o ramificado; hojas carnosas, desde muy gruesas hasta delgadas, fibrosas. Florece una vez y muere después de producir frutos. La savia de esta planta facilita la digestión (Monroy y Castillo, 2007).

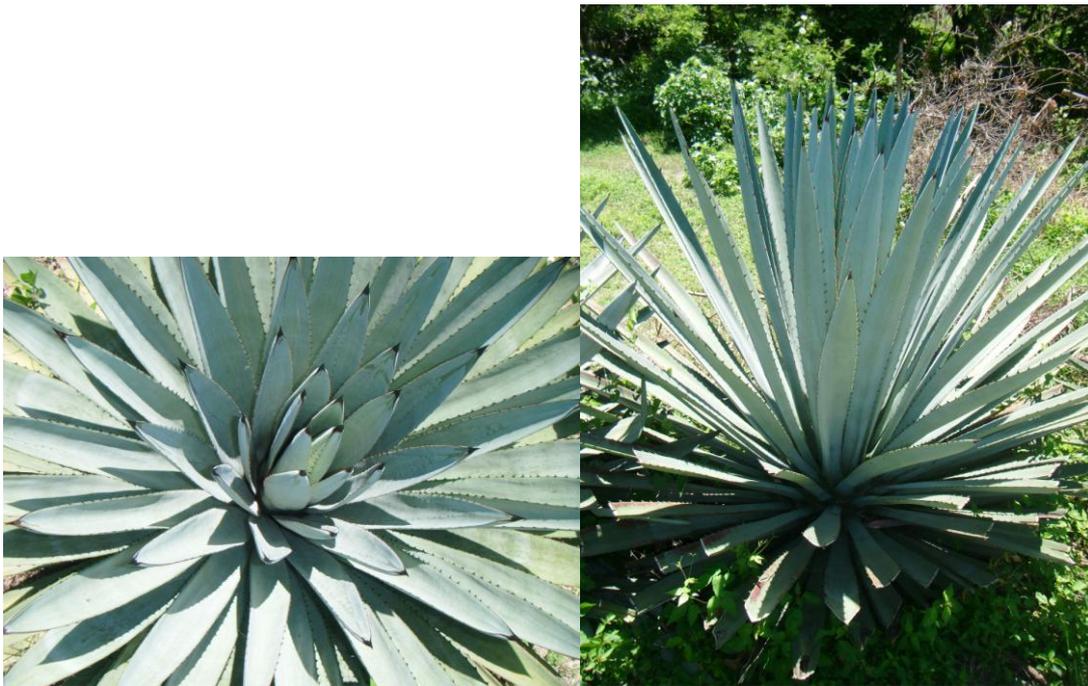


Fig. 2. *Agave angustifolia* Haw. Imágenes tomadas del área de colecta.

2.2.3 *Agave americana* L. *Marginata* Hort.

Su nombre común es Maguey pinto, maguey pulquero o mezcal. Es una planta muy grande de hojas en forma de roseta que nacen desde la base del tallo y llegan hasta 2m de largo, color verde-grisáceo, gruesas y carnosas, con punta en curva hacia arriba y una espina. Las flores son amarillo-verdoso, brillantes y se encuentran en la punta de un pedúnculo de 5 a 8 m de altura, sus frutos son morado-negruscos y tienen 3 semillas. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. D.R. 2009.).



Fig. 3. *Agave americana* L. *Marginata* Hort. Imágenes tomadas del área de colecta

2.3 Usos medicinales del género *Agave*.

Con respecto al uso medicinal de estas especies, existen reportes en los que se refiere al jugo caliente del agave para tratar heridas, llagas y mordidas de víbora (Blomberg, 2000) o para aliviar la falta de movimiento de las extremidades corporales, fortalecer a las mujeres y disminuir la inflamación del vientre durante el posparto y tratar el escorbuto (Del Campo, 1938).

Si bien, estas especies son materia prima para elaborar bebidas fermentadas, también la utilidad medicinal de la familia Agavaceae está ampliamente reportada en textos de herbolaria mexicana (Aguilar, *et al.*, 1994). *A. americana* L., es una de las quinientas plantas medicinales más ampliamente utilizadas en diversos países (Lozoya y Lozoya, 1982). En México, se usa como diurético, laxante, para tratar la sífilis, escorbuto, heridas, llagas, cáncer, combatir la falta de movimiento de alguna extremidad (López *et al.*, 2003). La savia de *A. angustifolia* Haw se utiliza para mejorar los problemas de digestión, como remedio para torceduras o huesos rotos, tanto en animales como en personas. El uso principal que se le da al *Agave tequilana* Weber azul es para la producción de la bebida fermentada, el Tequila (denominación de origen) (Pérez y Gallardo, 1997).

2.4 Química y farmacología del género *Agave*

Recientemente, ha surgido el interés por realizar estudios químicos sobre las especies de este género, ya que en sus hojas o pencas se encuentran una gran variedad de metabolitos secundarios como saponinas triterpénicas y esteroidales, fructanas (principalmente en *A. tequilana*) (López *et al.*, 2003) y flavononas (Mancilla y López, 2006) a los cuales se les ha adjudicado utilidad medicinal (Gentry, 1982).

Los saponósidos, también conocidos como saponinas, son heterósidos que constan de una parte glucídica con uno o más azúcares siendo más frecuentes la glucosa, xilosa, arabinosa, rhamnosa ó ácido glucurónico que se unen a la sapogenina (también denominada aglicona ó genina) a través de enlace glucosídico. Dependiendo de su naturaleza química, la sapogenina puede ser glicoalcaloide esteroideal, esteroide o triterpénica (Fig. 4).

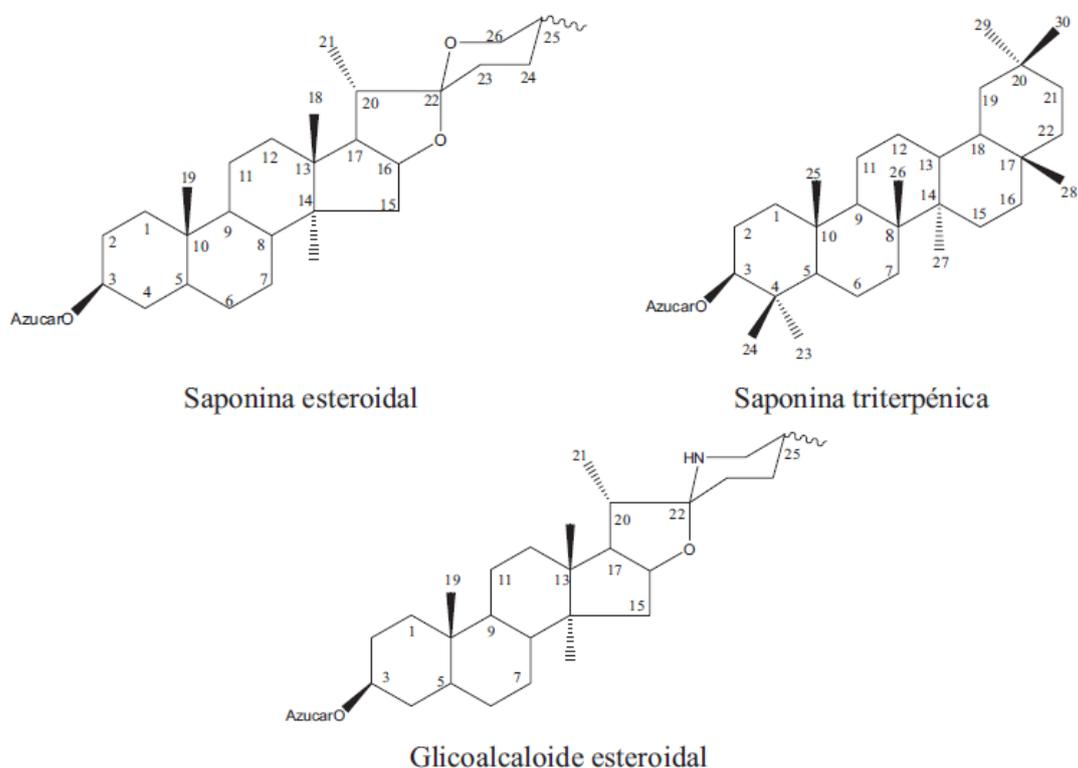


Fig. 4. Clasificación de las saponinas.

Los dos últimos tipos de saponinas tienen su origen biogénico en la vía del ácido mevalónico y unidades isoprenoides teniendo como intermediario al escualeno (Yokosuka y Mimaki 2007).

Se pueden encontrar en diferentes partes de las plantas, como la raíz, tubérculos, corteza, semillas, frutos y hojas. Generalmente, las saponinas se encuentran en aquellos tejidos más vulnerables al ataque de bacterias u hongos o a la predación de insectos, razón por la cual se ha demostrado que una de sus funciones principales es la de actuar como barrera química ó escudo dentro del sistema de defensa de la planta (Osbourne, 2003).

Las saponinas esteroidales están compuestas por una aglicona que está formada por un esqueleto tetracíclico, denominado ciclopentanoperhidrofenantreno, a la cual se unen los azúcares a través de enlace interglucosídico. Además, presenta dos anillos adicionales E y F que se originan a partir de del C-17 del esqueleto base. De acuerdo a la estructura de estos anillos adicionales, las agliconas pueden clasificarse en espirostanos, furostanos y furoespirostanos, siendo más abundantes las del primer grupo (Fig. 5).

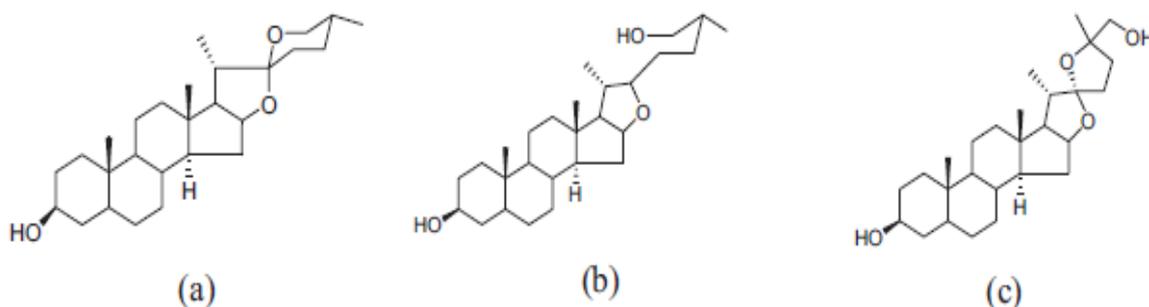


Fig. 5. Estructura de espirostanos (a), furostanos (b) y furoespirostanos (c)

Aquellas de naturaleza triterpénica se encuentran principalmente en las dicotiledóneas y las esteroidales en monocotiledóneas, como la familia Agavaceae (Hernández *et al.*, 2005). En el género *Agave* se han identificado varias saponinas como: hecogenina,

manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsasapogenina, texogenina, esmilagenina, gitogenina, tigogenina y clorogenina (Marker *et al.*, 1943; Marker y López, 1947). En *Agave lechugilla* se detectó la presencia de esmilagenina (sapogenina esteroideal la cual es precursora de ocho sapogeninas más) y gitogenina (Blunden *et al.*, 1980). Así mismo, a partir de cultivo de callos de *Agave amaniensis*, se pudo aislar manogenina y kamogenina, las cuales se cuantificaron por medio de cromatografía de capa fina (Indrayanto *et al.*, 1994). De igual manera, se han identificado y aislado saponinas esteroidales de otras especies de *Agave* como: *A. lechuguilla* (Blunden *et al.*, 1980); *A. sisalana* (Ding *et al.*, 1993); *A. americana* L. (Yokosuka *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2004); *A. decipiens* B. (Abdel *et al.*, 2002); *Agave attenuata*; *A. shrevei* (da Silva *et al.*, 2002; da Silva y Parente, 2005) y *A. utahensis* (Yokosuka y Mimaki, 2007). Datos en la literatura indican que las especies del género *Agave* poseen efecto anti-inflamatorio, por ejemplo el extracto acuoso de *A. intermixta* disminuye el edema plantar inducido por carragenina (García *et al.*, 2000). Saponinas esteroidales aisladas de *A. attenuata* Salm-Dyck y *A. shrevei* Gentry, presentan actividad anti-inflamatoria en un ensayo de permeabilidad de membrana inducida con ácido acético (da Silva *et al.*, 2002; da Silva y Parente, 2005). La Hecogenina y Tigogenina, aisladas de *A. americana* L., inducen mayor actividad anti-inflamatoria que el extracto acuoso del cual provienen, e incluso que el anti-inflamatorio esteroideal dexamentasona, en el ensayo de edema sub-plantar inducido con Carragenina (Peana *et al.*, 1997).

La clasificación taxonómica de las especies: *Agave tequilana* Weber, *Agave Americana*, y *Agave angustifolia* Haw es (Granados, 1999):

Reino *Plantae*

División *Magnoliophyta*

Clase *Liliopsida*

Subclase *Liliade*Orden *Asparagales*Familia *Agavaceae***2.5 Enfermedad de Alzheimer.**

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo que representa una de las causas más comunes de deterioro mental afectando a 30 millones de personas en el mundo (Ferri *et al.*, 2005). Se considera el principal tipo de demencia en países desarrollados. Mientras el promedio de esperanza de vida incrementa, se proyecta que el número de pacientes con la EA incrementará a un 27% en 2020, 70% para el 2030, y cerca del 300% para el 2050, a menos que se encuentren tratamientos efectivos que disminuyan la progresión de la enfermedad (Yesavage, *et al.*, 2002) es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de memoria, deterioro cognitivo, destruye la habilidad de aprendizaje, de hacer juicios, y de efectuar actividades cotidianas, todo esto relacionado con la edad. Son varios los mecanismos fisiopatológicos asociados a la EA, inicialmente la memoria a corto plazo se ve afectada debido a la disfunción y degeneración de neuronas colinérgicas cuya neurotransmisión esta mediada por la molécula acetilcolina (AChl) en el hipocampo. De tal forma, que la muerte celular va acompañada por una disminución en la transmisión de AChl. Conforme el trastorno progresa, la muerte neural avanza en otras regiones corticales del cerebro produciendo cambios dramáticos en la personalidad y conducta como la ansiedad, alucinaciones y depresión (Dubois, 2010). Este trastorno se favorece debido al aumento en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), enzima que degrada a AChl, neurotransmisor involucrado en los procesos de memoria y aprendizaje) (Tanovic y Alfaro, 2006).

La EA se caracteriza por dos depósitos proteicos neuropatológicos principales, La primera es la deposición extracelular neurítica de placas seniles constituidas por el

péptido β -amiloide (β A) en regiones corticales del cerebro e hipocampo producidas por la actividad de la enzima β -secretasa que al degradar a la proteína precursora amiloide (PPA), produce fragmentos extracelulares insolubles (Fig. 6a) y la segunda es la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares que ocupan gran parte de las neuronas en el dominio intracelular causado por la hiperfosforilación de la proteína Tau, la cual se encarga de mantener la estabilidad del citoesqueleto de la neurona (Fig. 6b) (Braak y Braak, 1995).

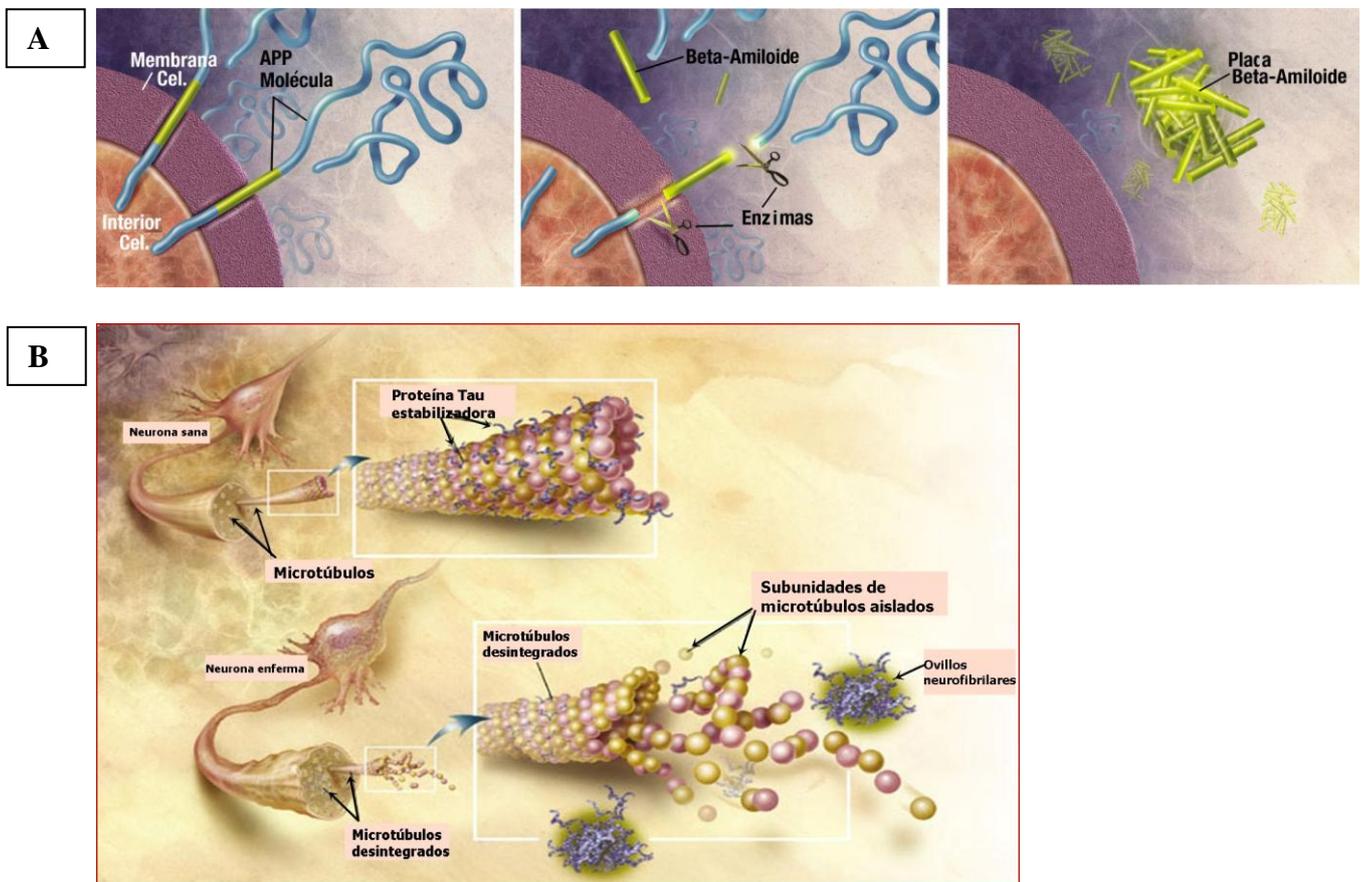


Fig. 6. Proceso de la deposición extracelular neurítica de placas seniles constituidas por el β A (A) imagen tomada de <http://noticiasbiociencias.blogspot.mx/2012/08/bloqueando-el-efecto-del-beta-amiloide.html>. Formación de los ovillos neurofibrilares intracelulares (B) imagen tomada de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/Alzheimer.htm>

Los altos niveles β A en la EA se atribuyen a la incapacidad del cerebro para eliminarla y no debido a la sobreexpresión de la PPA, de hecho existen varios estudios enfocados en evaluar la alteración de la actividad de la enzima β -secretasa como causante de la formación incapacidad de eliminación del β A, entre otras (Selkoe y

Wolfe, 2007). Además, se pueden presentar componentes inductores de trastornos cerebro vasculares que promueven la progresión de la EA. La consecuencia final es la profunda pérdida de la memoria, acompañada de una disminución funcional y problemas conductuales que llevan a trastornos psiquiátricos que en conjunto, afectan la calidad de vida de los pacientes con la EA (Gazulla y Cavero, 2006).

El tratamiento de la EA involucra principalmente la administración de inhibidores de la AChE, junto con antioxidantes e incluso en algunos casos es necesario el uso combinado de ansiolíticos y/o antidepresivos y fármacos anti-inflamatorios (Perry *et al.*, 2003) como la Indometacina, porque revierte la activación de la microglia inducida por β A (Netland *et al.*, 1998) y además, la administración crónica de este fármaco en cerebro, reduce la formación de placas β A (Yang *et al.*, 2004).

La mayoría de los fármacos utilizados, si bien son efectivos, producen efectos secundarios indeseables como hepatotoxicidad, cefaleas intensas, náuseas, vómito, diarrea, mareos y letargo, principalmente (Jellinger, 2007). La aparición de todos estos síntomas adversos han favorecido los estudios encaminados a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para la EA a partir de plantas medicinales.

2.6 Aspectos fisiopatológicos asociados al Alzheimer.

El envejecimiento es un proceso irreversible que afecta de forma heterogénea a las células que conforman los seres vivos, ya que se ven sometidas a un deterioro morfo-funcional que puede conducir las a la muerte (Tyagi *et al.*, 2007).

Se sabe que los factores que sostienen este proceso involutivo son tanto de carácter genético como ambiental. Se ha determinado que algunos genes están mutados en familias que padecen enfermedades degenerativas como la progeria (tipo de vejez prematuro) o la EA (Pérez, 2000).

Existen evidencias experimentales que apuntan hacia una cierta capacidad regenerativa del tejido nervioso; así, cuando alguna neurona se pierde, las situadas en la vecindad se activan, sufren un proceso de hipertrofia por el que aumenta su árbol dendrítico, y finalmente restauran la conectividad. Sin embargo, esta capacidad está disminuida en los ancianos y en los individuos que padecen algún trastorno neurodegenerativo, como se observa en pacientes con la EA (Reubinoff *et al.*, 2001).

2.6.1 Inflamación en la EA mediada por citocinas

La inflamación está involucrada en múltiples mecanismos patológicos (Lukiw y Bazan, 2000; Von Bernhardt *et al.*, 2007), y se asocia con diferentes grupos celulares del sistema inmune (macrófagos, linfocitos B, T y células dendríticas) y células del SNC (microglia, astrocitos y neuronas), moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas, entre otros componentes proteicos (Chavarría y Alcocer, 2004).

Estudios clínico-patológicos y de neuroimagen muestran que la inflamación y activación microglial preceden al daño neuronal (Eikelenboom y Van Gool, 2004), y que el estrés oxidante ocurre previo a la citopatología característica en la neurodegeneración. Si bien la inflamación puede ser neuroprotectora en sus estadios tempranos (Wyss-Coray *et al.*, 2002), la incapacidad de resolver el estímulo desencadenante puede resultar en una respuesta inflamatoria crónica (neurodegeneración) (Luterman *et al.*, 2000; Hanisch, 2002).

Las citocinas son glucoproteínas solubles liberadas por células de un hospedero, cuya actividad no es de tipo no enzimática y se realiza aún en bajas concentraciones para regular las funciones de las células que las producen (Koj, 1996). La mayoría de las citocinas son multifuncionales y presentan efectos pleiotrópicos y redundantes, posiblemente debido a que varias comparten receptores u otros elementos dentro de su

patrón de señalización (Koj, 1996). Pero de manera general, fomentan la respuesta inflamatoria y se sintetizan en una gran variedad de células como: linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos/macrófagos activados, natural killer (NK), astrocitos, mastocitos, endoteliales, de músculo liso, sinoviales, endodiales y microglia. (Schleifer *et al.*, 1996), las cuales están relacionadas con la EA (Black, 2003).

En la microcirculación cerebral de pacientes con EA se ha observado una sobrerregulación de citocinas entre las que se incluyen el Factor de Necrosis Tumoral Alpha (TNF α), Factor del crecimiento transformante- β (TGF β), Interleucinas (IL) como IL1 β , IL-6 e IL-8, así como la Proteína inhibidora de macrófago-1 α (MIP-1 α) (Grammas y Ovase, 2002).

La IL-1 es una citocina inmunoregulatoria que es sobre-expresada tempranamente por células de la microglia activada dentro de regiones corticales cerebrales dañadas por la EA en presencia de placas β A. De hecho, existen estudios que sugieren una participación directa de IL-1 en la producción de placas β A debido a que se sabe que promueve la síntesis y procesamiento de PPA, la cual es constitutiva de las membranas de las neuronas, y produce fragmentos insolubles extracelulares (por medio de la acción de la enzima β -secretasa) que se agregan y forman las placas seniles β A (Zuliani *et al.*, 2007). IL-1 tiene la capacidad de influenciar en las neuronas la expresión y la actividad de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE). Cuando se secreta por medio de la microglia activa, IL-1 puede inducir la expresión de AChE, su RNAm así como su actividad enzimática (Li *et al.*, 2000).

Por otro lado, el grupo de Citocinas tipo Interleucina-6, entre las que se incluyen a IL-6, IL-11, Factor Inhibidor de Leucemia y Oncostatina, entre otras, pueden tener funciones biológicas redundantes debido a que todas comparten a gp130, una subunidad receptora responsable de la señal de transducción (Koj, 1996).

IL-6 es una citocina mediadora de respuestas inmunes y reacciones inflamatorias asociadas a la respuesta de fase aguda que alteran el crecimiento y diferenciación de células del SNC a través de interacciones de unión a receptores específicos solubles o de membrana, produciéndose el complejo receptor IL-6 biológicamente activo (Spooren *et al.*, 2011).

Se expresa de forma constitutiva durante el desarrollo del sistema nervioso, generalmente a concentraciones escasamente detectables, pero bajo condiciones patológicas es altamente inducida por la microglia, astrocitos, neuronas y células endoteliales (Vallieres y Rivest, 1997). Se considera una citocina destructiva, pro-inflamatoria que induce la síntesis de proteínas inflamatorias de la fase aguda, actúa como pirógeno, incrementa la permeabilidad vascular y activa a los linfocitos, por lo tanto el incremento en su concentración causa daños significativos en el SNC (Licastro, *et al.*, 2003).

Además de ser producida por células sistémicas linfoides y no linfoides, se ha encontrado IL-6 y su ARNm en poblaciones específicas de células en el SNC durante diferentes condiciones experimentales. Un ejemplo es el estímulo por medio de la administración intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.) de lipopolisacárido (LPS) lo cual induce una profunda activación transcripcional del gen que codifica a IL-6 en plexos coroides y en órganos circunventriculares. Esto demuestra que IL-6 puede ser secretada en el fluido espinal cerebro vascular (CSF) y unirse a su receptor localizado en tejido neural para modificar diversas funciones neurofisiológicas (Schleifer *et al.*, 1996).

La citocina TNF α , pertenece al grupo de citocinas pro-inflamatorias, en la EA su concentración es elevada y se asocia con actividades citotóxicas, pero también juega un

papel trófico en neuronas y se reportó que presenta efecto protector contra la toxicidad producida por glutamato, radicales libres, y β A en cultivos primarios neurales (Barger y Harmon, 1997) sugiriendo que la activación de neuronas con $\text{TNF}\alpha$ promueve la expresión de moléculas protectoras.

Sin embargo, como citocina pro-inflamatoria, es un potente estimulador del Factor Nuclear κ B (FN- κ B), que es un factor de transcripción que promueve la expresión de genes blanco (Grammas y Ovase, 2002) lo cual estimula la síntesis de proteínas de fase aguda, activa las vías de la coagulación y el sistema del complemento (Batti y O'Connor, 2010), eleva la expresión de factores inflamatorios entre los que destaca la COX-2 así como factores de sobrevivencia como la proteína antiapoptótica Bcl2 (Calvello *et al.*, 2012).

La dualidad en la actividad biológica de $\text{TNF}\alpha$, puede deberse en parte a que los efectos biológicos que produce los efectúa a través de la activación de dos receptores diferentes, el receptor p55 tipo I (TNFR-1) y el receptor p65 tipo II (TNFR-II). El receptor p55 posee un dominio intracelular que induce la señalización de muerte celular, mientras que el p65 juega un papel trófico o protector en la sobrevivencia neural (Antel *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que las citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6, $\text{TNF}\alpha$, TGB- β , aumentan la expresión de la PPA y la formación de β A (Sastre *et al.*, 2003). También se ha reportado que son capaces de sobre regular a nivel transcripcional, el mRNA de β -secretasa, y su actividad enzimática, lo cual es importante en la EA, ya que es una de las encargadas de la formación de A β , y por lo tanto, de la aparición de depósitos insolubles extracelulares (Shie y Woltjer, 2007).

2.6.2 Participación de la neuroglia durante la EA.

2.6.2.1 Microglia

La microglia son células del SNC que forman parte del conjunto denominado neuroglia, y en condiciones normales realizan funciones neurotróficas e inmunitarias, ya que se les relaciona con macrófagos periféricos (Liu y Hong, 2003).

Este conjunto de células se activan en respuesta a diversas condiciones neuropatológicas y durante esta activación alteran su morfología para adquirir actividad fagocítica, incrementan la expresión de moléculas como las citocinas, quimiocinas y aquellas del sistema del complemento (Streit *et al.*, 1999).

Después de su activación estas células se agrupan en los sitios en donde se agrega β A lo cual induce a la producción microglial de IL-1, IL-6, TNF α y radicales libres de superóxido (Fig. 7) (McDonald *et al.*, 1997). También se activa la enzima oxidativa NADPH oxidasa, la síntesis de receptores para quimiocinas (Réaux *et al.*, 2013), Oxido Nítrico (Tocharus *et al.*, 2008), así como la liberación de exitotoxinas como el glutamato, aminoácido excitatorio que en grandes concentraciones afecta las regiones sinápticas neurales.

Además, la interacción entre β A sobre la membrana de la microglia, induce a la activación de enzimas kinasas que promueven las cascadas de señalización mediadas por las MAP kinasas (ERKs y p38 MAP kinasas) caspasas (Soria *et al.*, 2011) así como RAGE molécula que emplea β A como ligando (Srikanth *et al.*, 2011). Estas evidencias sugieren que la exposición de la microglia al β A puede ser considerado como el paso inicial de la inflamación observada en la EA.

De manera alternativa, se producen proteínas del sistema inmunológico a partir de neuronas lo cual estimula a la microglia y se amplifica el proceso inflamatorio (Akiyama *et al.*, 2000). Se sabe que dicha activación está orientada inicialmente a

contrarrestar el daño tisular, sin embargo la microglia activa puede excederse en sus funciones y acabar induciendo un proceso patológico (Streit, 2002). Así, este proceso de activación no sólo cambia la morfología de dichas células, sino que además, secreta moléculas programadas inicialmente para restaurar la homeostasis del tejido y desencadenar la respuesta inmune más adecuada (neuroprotección) sin embargo, también pueden llegar a activar cascadas metabólicas que producen la muerte de neuronas mediante distintos mecanismos (Streit *et al.*, 1999; Laduzek *et al.*, 2005) ya que la pérdida de comunicación específica entre las neuronas dañadas y las células microgliales, puede promover una activación inmunológica excesiva que conlleva a un estado de inflamación persistente (proceso en el cual tienen un papel crucial las citocinas) y en consecuencia inducir y/o exacerbar la neurodegeneración. En la EA, la activación fagocítica de la microglia activada tiene el objetivo de eliminar los depósitos de β -amiloide (Akiyama *et al.*, 2000; Streit 2002; Rogers *et al.*, 2002).

Los astrocitos y células endoteliales en Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP) son fuente importante de citocinas y quimiocinas, durante la EA (Fig. 7) (Shie y Woltjer, 2007; Nair *et al.*, 2008).

2.6.2.2 Astrocitos.

Los astrocitos, constituyen una red distribuida entre vasos sanguíneos y neuronas, y desarrollan funciones fundamentales durante el proceso del envejecimiento (Chen y Swanson, 2003). Se encargan de suministrar glucosa a las neuronas junto a una gran cantidad de factores de crecimiento que son de utilidad para la supervivencia neuronal. Contribuyen a la formación y preservación de una barrera hematoencefálica segura, son un reservorio de glucógeno, el cual dependiendo del grado de actividad neural es degradado a lactato que está disponible para la actividad de éstas células (De Keyser *et al.*, 2008).

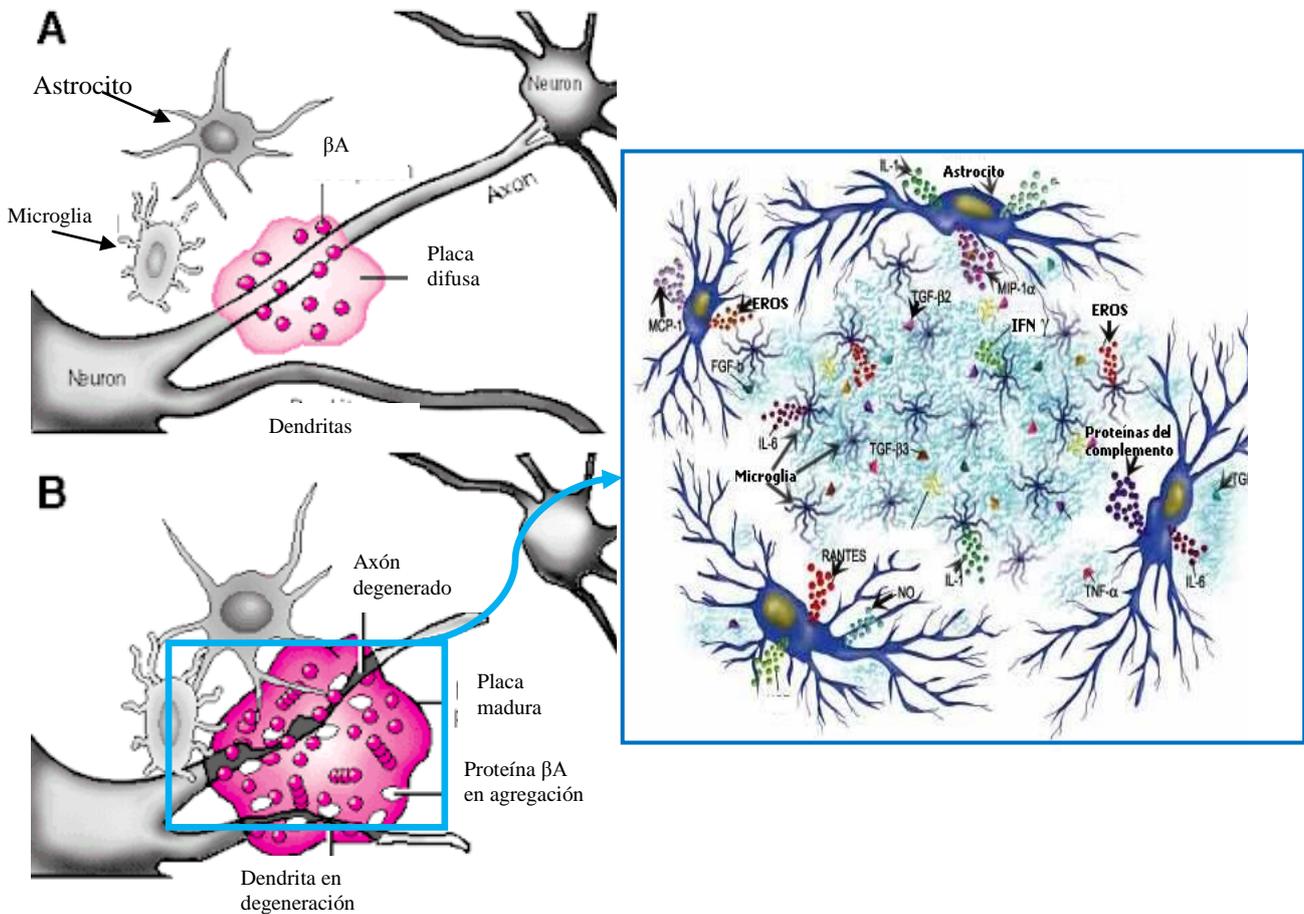


Fig. 7. Proceso de activación de los astrocitos y la microglia en presencia de las placas seniles βA. Etapa temprana (A) y en etapa avanzada (B). Imagen tomada de <http://brainmind.com/BrainLecture6.html>

La exposición de estas células a la βA promueve que se agreguen para formar una barrera densa alrededor de las placas seniles con el objetivo de limpiar los depósitos βA (Dewitt *et al.*, 1998). Los astrocitos remueven neurotransmisores como glutamato, ácido γ-aminobutírico, norepinefrina, dopamina, serotonina y acetilcolina (ACh) de la hendidura sináptica, los cuales de permanecer en el espacio extracelular tendrían un efecto tóxico sobre las neuronas, esto les confiere reactividad en procesos de lesión y, aunque en menor escala, durante el envejecimiento (Brown *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando el daño persiste, producen una gran variedad de mediadores inflamatorios entre

los que se incluyen las IL-1, IL-6, prostaglandinas, ciclooxigenasa-2 (COX-2) y Oxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS).

En contraste, el papel de las neuronas como recurso de dichas proteínas, ha sido poco estudiado, pero se sabe que al lesionarse la médula espinal, las neuronas que ahí residen sintetizan y segregan citocinas, sugiriendo que las neuronas también podrían representar un recurso importante de proteínas inflamatorias asociadas a lesiones del SNC (Miao *et al.*, 2008).

2.7 Barrera Hematoencefálica (BHE): función y participación en la EA.

Con el objetivo de funcionar apropiadamente, el SNC y en particular las neuronas, requieren mantener dentro de un margen estrecho las concentraciones iónicas (Na, K y Ca). Además, la función neural es muy sensible a los efectos de una gran variedad de sustancias circulantes que no afectan la función de órganos periféricos.

La separación estricta entre el medio neural y el espacio circulatorio se adquiere mediante las propiedades de una estructura biológica especial, compuesta esencialmente de células capilares endoteliales, lámina basal, pericitos y astrocitos que actúa como una barrera difusora bidireccional, la BHE. Los pericitos rodean a las células endoteliales y son capaces de contraer los capilares cerebrales y cambiar el flujo sanguíneo (Fig. 8) (Abbot *et al.*, 2006).

La peculiaridad que posee la BHE está dada en parte debido a un fenotipo específico de las células endoteliales, que tienen una baja actividad pinocítica y poseen un gran número de moléculas de adhesión que promueven las interacciones célula-célula estabilizadoras, así como uniones estrechas que limitan el flujo de agua, iones y de otras moléculas hacia el cerebro (Kniesel y Wolburg, 2000). Lo cual hace de la BHE una barrera impermeable debido a que las células endoteliales que la constituyen

expresan proteínas de unión transmembranales como la occludina y claudina que se anclan al citoesqueleto por medio de proteínas accesorias (Martin *et al.*, 1998), lo cual la hace más efectiva para limitar el flujo paracelular de iones en comparación de aquellos capilares periféricos.

El tráfico de las moléculas a través de la BHE se efectúa entonces por medio de actividad transcelular y los gases como el O₂ y CO₂ que difunden a través de la bicapa lipídica, mientras que la afluencia de aminoácidos y glucosa se regula a través de transportadores específicos. En este sentido, las moléculas de mayor tamaño como leptina e insulina se transportan por transcitosis endotelial mediada por receptores. Cabe mencionar que el peso molecular es considerado un criterio de restricción ya que aquellas que pesan más de 500 Da son incapaces de cruzar la BHE (Persidsky *et al.*, 2006).

Algunas moléculas de transporte para el flujo de salida del endotelio son por ejemplo la glucoproteína-P (Thuerauf y Fromm, 2006), Acuaporina-4, que regula el flujo de agua hacia y desde el cerebro y se expresa en los astrocitos (Nielsen *et al.*, 1997), sin embargo, el fenotipo endotelial de la BHE depende de los astrocitos, se ha demostrado que la diferenciación, expresión y distribución proteica en el endotelio se induce por medio de señales derivadas de astrocitos, por ejemplo, el Factor Transformante del Crecimiento β1 (TGFβ1 por sus siglas en inglés), así como otros factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF por sus siglas en inglés), Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos (bFGF) y el Factor Neurotrófico Derivado de la Línea Celular Glial (GDNF por sus siglas en inglés) las cuales se involucran en la modulación de la permeabilidad de la BHE (Su, *et al.*, 2006; Kose *et al.*, 2007) (Fig. 8).

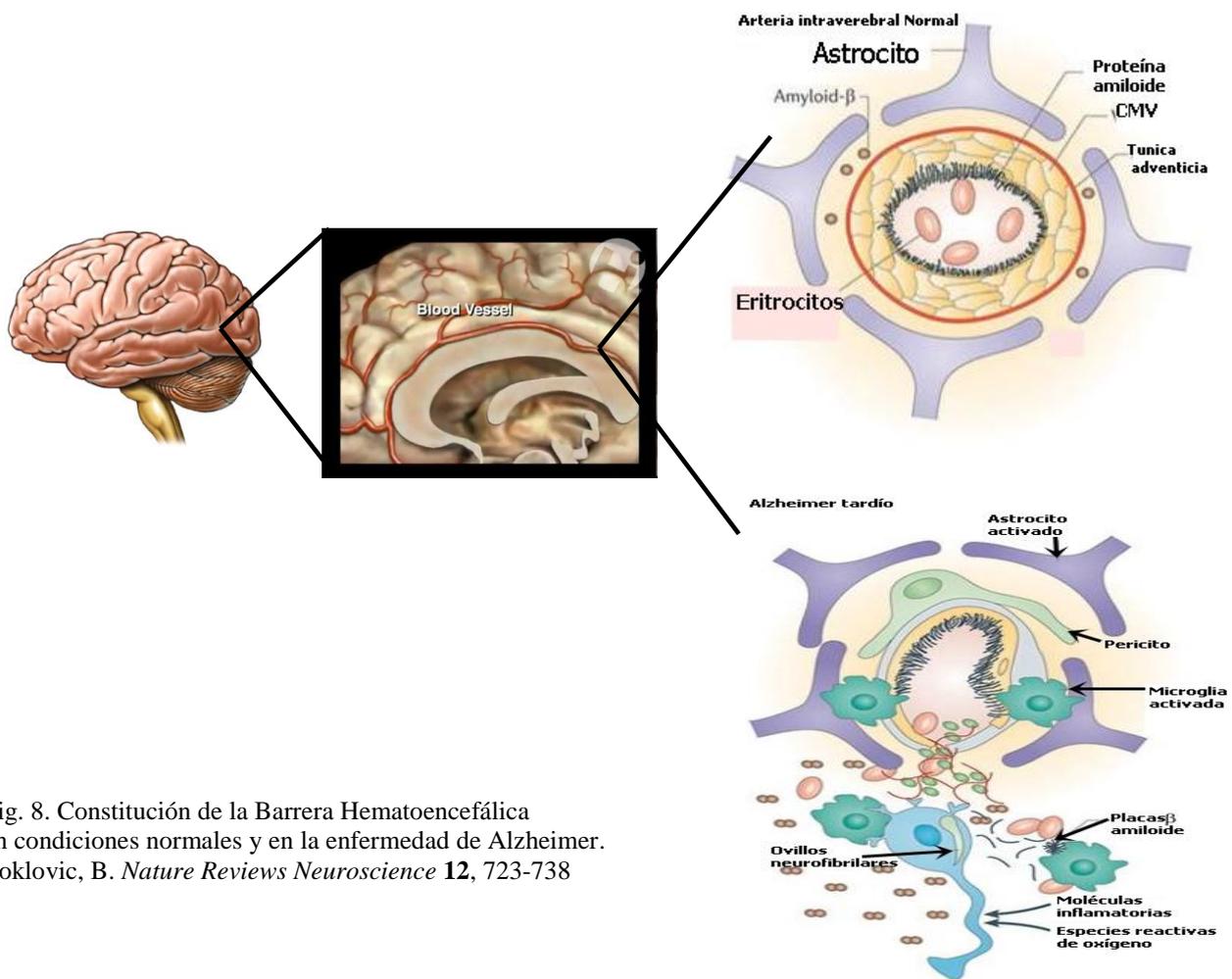


Fig. 8. Constitución de la Barrera Hematoencefálica en condiciones normales y en la enfermedad de Alzheimer. Zoklovic, B. *Nature Reviews Neuroscience* **12**, 723-738

Sin embargo, tales funciones se ven alteradas, ya que se ha observado que hay una correlación entre el envejecimiento en personas sanas y el aumento en la permeabilidad de la BHE (Popescu *et al.*, 2009), lo cual es importante destacar debido a que la edad es el principal detonante de la EA. El deterioro se produce en respuesta a diferentes patrones patológicos como por ejemplo, la disminución de los niveles de la enzima antioxidante Superóxido dismutasa (Alvarez *et al.*, 2006) y Glutacion peroxidasa (Okatani *et al.*, 2002). Asimismo, aumenta la expresión de PPA sin la aparición de placas, lo anterior se ha asociado a la activación de la microglia (Chan *et al.*, 2007), neuronas y endotelio.

La microglia activa en respuesta al aumento de la permeabilidad de la BHE puede permitir el paso de moléculas extrañas hacia el cerebro, lo cual produce la liberación de radicales libres. Más aún, se ha observado que existe un cambio asociado a la senescencia porque la BHE permite el paso de factores neuroinmunológicos ya que TNF α es capaz de atravesar con más eficiencia hacia el cerebro con la edad (Banks *et al.*, 2001) mientras que el transporte de IL-1 β disminuye (McLay *et al.*, 2000).

También se ha sugerido que la BHE envejecida no es capaz de transferir adecuadamente la glucosa hacia el cerebro debido a que se reduce la expresión de la molécula transportadora de la glucosa GLUT-1 (Vorbrodt *et al.*, 1999), pero también existen evidencias que señalan un diferente mecanismo de disfunción de la BHE en ancianos, en quienes disminuye la actividad de la glucoproteína-P transportadora de eflujo, y reduce la eliminación de toxinas desde el cerebro hacia los capilares (Toornvliet *et al.*, 2006).

Actualmente, ya se sabe que la alteración de la BHE asociada a la edad, comparte características con la EA (Desai *et al.*, 2007), ya que este trastorno se acompaña con procesos inflamatorios, factores vasculares y estrés oxidante (Deane *et al.*, 2004). En primer lugar, en ambos casos, la pérdida de estabilidad de la BHE aumenta la concentración de β A ya que ésta se produce tanto en el cerebro como en la periferia, promoviendo su transporte desde los capilares hacia el cerebro. Más aún, se ha establecido la sobreexpresión del Receptor de glucolización avanzada de productos finales (RAGE), molécula que transfiere a β A al cerebro a través del endotelio (Zlokovic, 2004), así como la reducción en la extrusión de la misma desde el cerebro debido a una disminución en la transición de β A endotelial mediada por la proteína receptora relacionada a Lipoproteína de baja densidad (LPR por sus siglas en inglés) (Deane *et al.*, 2005).

De hecho, existen estudios que han sugerido que LPR y Glucoproteína-P participan en la eliminación de β A (Cirrito *et al.*, 2005). Por lo tanto, la acumulación excesiva de β A que altera a la BHE podría ser un punto de intersección entre la edad avanzada y la EA, ya que se sabe que la ruptura de la BHE sucede antes de la aparición de los depósitos β A (Ujiie *et al.*, 2003).

Sumado a esto, también se ha observado que en la microglia activada, aumenta la expresión de proteínas inflamatorias debido al incremento en la concentración de β A (Popescu *et al.*, 2009).

2.8. Estrés oxidante y radicales libres en la EA

El estado de estrés oxidante juega un papel crucial en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha observado un incremento de marcadores de daño oxidante, los cuales involucran oxidación de proteínas, lípidos y DNA entre otros.

Existen evidencias que indican que el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, un déficit en las defensas antioxidantes Catalasa (CAT), Citrato Sintasa (CS), Glutación Reductasa (GR), Superóxido Dismutasa (SOD), la disminución en la eficiencia de los mecanismos de reparación del DNA, y la pérdida de regulación del sistema inmune, son factores que contribuyen de forma importante al aumento de estrés oxidante dando como resultado un daño cerebral progresivo.

En la EA, existe un daño oxidante elevado en RNA citoplasmático, nuclear y también en el ADN mitocondrial (Gabbita *et al.*, 1998). Más aún, las proteínas reparadoras del ADN p80 y p89 se sobre-expresan en regiones cerebrales de pacientes con la EA, lo cual pone en evidencia los mecanismos compensatorios posibles

efectuados por las células del SNC en respuesta a los estímulos característicos de este trastorno (Hermon *et al.*, 1998).

Sin embargo, por otro lado también se refleja una alteración en estos mecanismos compensatorios ya que Shao *et al.* (2008) reportaron el incremento en la concentración del marcador de daño del ADN 8-hidroxi-2' desoxiguanosina (8-OHdG) en fluido cerebral con la EA.

Los mecanismos involucrados en la toxicidad mediada por β A todavía no son claros, pero existen evidencias que sugieren que el estrés oxidante juega un papel importante, Huang *et al.*, (1999), demostraron que β A produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por medio de reacciones en las que se reducen metales iónicos, y que dicho proceso se acompaña de la producción de radicales libres como el hidroxilo (OH).

Los radicales libres producen una peroxidación lipídica en membranas celulares (Butterfield *et al.*, 1997) y oxidan proteínas lo cual produce cambios importantes y comprometen las funciones neurales e incluso inducen a la muerte de las mismas.

En la actualidad, existen algunas evidencias acerca de que la citotoxicidad de las placas β A en el dominio extracelular en el SNC, está regulada a través del daño que producen los radicales libres, como por ejemplo:

Se requieren concentraciones μ molares de β A para elevar la concentración del H_2O_2 en cultivos celulares, el cual potencia la actividad tóxica de β A (Fang *et al.*, 2010).

La Catalasa, enzima que degrada H_2O_2 en O_2 y H_2O , bloquea la toxicidad de β A y además, aquellas células que muestran resistencia a la toxicidad de β A, también lo son al daño que induce H_2O_2 (Behl *et al.*, 1994).

En condiciones normales la actividad de la enzima antioxidante SOD ejerce un efecto protector ante la la agregación de β A, sin embargo durante la EA esta agregación

proteica produce daño en las células endoteliales al inhibir a dicha enzima. Lo cual sugiere que el radical libre superóxido (sustrato de dicha enzima), juega un papel importante en la toxicidad que produce β A, y por otro lado también en estas condiciones se sobre-expresa la enzima oxidante NADPH-oxidasa en células de la microglia (Miranda *et al.*, 2000).

El β A también participa en los procesos apoptóticos, ya que el daño oxidante del ADN relacionado con la apoptosis se requiere concentraciones micromolares de éste para inducir la muerte en cultivos neurales (Tamagno *et al.*, 2003). De hecho, el β A disminuye la regulación de las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y sobre regula por otro lado a Bax, proteína pro-apoptótica (Clementi *et al.*, 2006). El daño oxidante y la subsecuente alteración al ADN se observa con más intensidad en células viejas (Miranda *et al.*, 2000).

Cuando las células del SNC responden a los estímulos mencionados en los capítulos anteriores, desencadenan finalmente un estrés que involucra la respuesta inmune, produciendo la activación de diversas rutas inflamatorias y prooxidativas.

2.9. Inflamación sistémica inducida por LPS

La neuroinflamación juega un importante papel en la progresión de la EA, los modelos experimentales asociados a este proceso, confirman tales hallazgos. La exposición a agentes que producen un estrés crónico como por ejemplo, la administración de Lipopolisacárido (LPS un agente infeccioso), activan las cascadas de señalización proinflamatorias. Se ha demostrado, además que la administración i.p. de LPS induce daño cognitivo, uno de los principales síntomas asociados a la EA (Tyagi, 2007; Tyagi, 2010).

Los LPS son glucolípidos de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Estos compuestos tienen la capacidad de ejercer su efecto a través de la unión con el receptor CD14, una proteína de membrana presente en las células de la microglia. El complejo LPS-CD14, junto con otras proteínas adaptadoras, se unen a otro receptor conocido como *toll-like receptor4* (TLR-4, el cual se expresa en células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos y tiene la capacidad de reconocer y unirse a LPS) desencadenando una cascada regulatoria que da como resultado la activación del FN- $\kappa\beta$ que finalmente, promueve la transcripción de genes relacionados a la respuesta inmune e inflamatoria, como aquellos que promueven la síntesis de las citocinas (Aid *et al.*, 2008).

Las citocinas juegan un papel crucial ya que regulan la respuesta inflamatoria luego de una infección viral o bacteriana, alterando procesos cognitivos importantes como lo es la memoria ya que la estabilidad de la BHE se altera (Fig. 9) (Terrando *et al.*, 2010).

Las elevadas concentraciones del β A en la EA, es un proceso regulado por la actividad enzimática de secretasas (Selkoe y Wolfe, 2007) y por la BHE ya que en este trastorno aumenta la permeabilidad de β A a través de la BHE (Deane *et al.*, 2004) e incrementa el flujo sanguíneo hacia el cerebro (La Rue *et al.*, 2004).

La relación entre la aparición de dichos depósitos y la BHE todavía no se conoce, una posible explicación podría ser la neuroinflamación, que como ya se mencionó, se induce por la administración de LPS, incluyendo la activación de la microglia y los elevados niveles de citocinas pro-inflamatorias en el cerebro, lo cual podría estar comprometiendo la estabilidad de la BHE permitiendo la entrada de moléculas que alteran el SNC e inducen a la muerte de neuronas (Jaeger *et al.*, 2009).

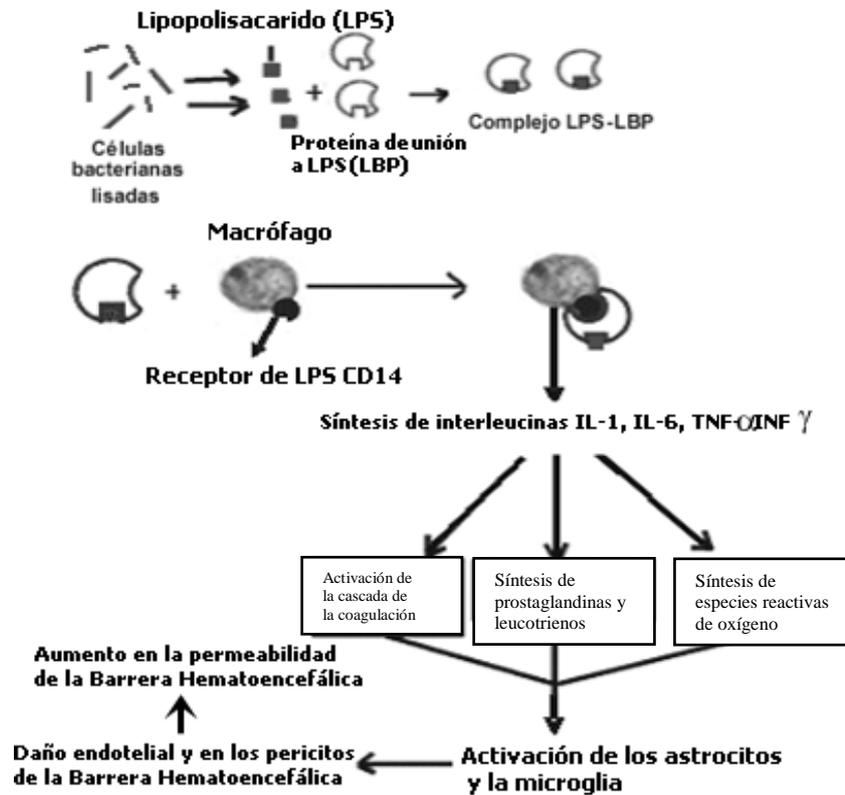


Fig. 9. Mecanismo de acción del Lipopolisacárido sobre la Barrera Hematoencefálica. Imagen tomada y modificada de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802006000300014

La infección sistémica produce cambios fisiológicos y conductuales caracterizados por el decaimiento de la función cognitiva, fiebre, disminución en la ingesta de comida, somnolencia y fatiga en general (Dantzer, 2004). Muchos de estos síntomas causados por una infección, pueden ser correlacionados a la neuroinflamación en diferentes regiones cerebrales incluyendo el hipocampo (Annane, 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mundo se está manifestando un importante cambio en la estructura de la población. Fundamentalmente, el incremento de la esperanza de vida ha determinado que la proporción de personas ancianas haya aumentado considerablemente. Ello condiciona que la prevalencia de enfermedades ligadas a la edad también se eleve y, entre ellas, las demencias constituyen un grupo de especial importancia. Los mecanismos neuropatológicos de la EA, involucran deterioro en la disponibilidad sináptica de ACh debido a la pérdida neuronal por la acumulación de placas neuríticas de β A y conglomerados neurofibrilares, lo que lleva a procesos de inflamación y producción dañina de radicales libres, lo cual produce como resultado final el deterioro cognitivo, con la subsecuente pérdida de memoria, sin descartar otros eventos como la depresión y psicosis, entre otros.

El tratamiento farmacológico sintético que se emplea actualmente en pacientes diagnosticados con la EA se enfoca en evitar el déficit colinérgico asociado con la disfunción cognitiva y se basan en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), la cual degrada al neurotransmisor ACh, que desempeña un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria (Jellinger, 2007).

Otros tratamientos farmacológicos incluyen vitamina E, prednisona, estrógenos, anti-inflamatorios no-esteroides y estatinas, entre otros. Sin embargo, aunque la gran mayoría de estos fármacos ayudan, también producen efectos secundarios no deseables tales como hepatotoxicidad, cefaleas intensas, náuseas, vómito, diarrea, mareos, ansiedad, depresión y letargo, principalmente (Giacobini *et al.*, 2002), que afecta la calidad de vida del paciente y la falta de apego al tratamiento, lo cual compromete el éxito del mismo.

Debido a lo anterior, actualmente se recurre a terapias alternas con el objetivo de disminuir los aspectos fisiopatológicos asociados a determinado trastorno, como el caso de EA, que mejoran la calidad de vida de los pacientes. Dichas terapias se basan en plantas medicinales, ya que estas poseen una mezcla de principios activos, que tienen propiedades biológicas importantes (Gurib, 2006).

Las especies del género *Agave* tienen metabolitos secundarios como las saponinas terpénicas y esteroidales ambos grupos de compuestos tienen importante actividad farmacológica como anti-inflamatorios, inhibidores de la AChE, antioxidantes y también sobre algunas condiciones psiquiátricas como ansiedad y depresión (Hernández *et al.*, 2005; Marker *et al.*, 1943; Marker y López, 1947; Blunden *et al.*, 1980 Indrayanto *et al.*, 1994; da Silva *et al.*, 2002 Abdel *et al.*, 1999 Yokosuka *et al.*, 2000).

4. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de Salud estimó que en el año 2005, 30 millones de personas a nivel mundial tenían demencia y que la prevalencia aumentaría un 45% en 2015 y a 56 millones en el 2030 (Ferri *et al.*, 2005; OMS, 2006). En países como Estados Unidos en donde existen estudios muy específicos acerca de la prevalencia de esta enfermedad, se estima que 5.3 millones de personas tienen EA de las cuales, 5.1 millones tienen 65 años o más. Se calcula que cada 70 segundos, algún estadounidense desarrolla EA y se predice que para el 2050, este tiempo se reducirá a sólo 33 segundos (Alzheimer's Association, 2009). En México, el 6% de las personas que tienen más de 65 años sufren de pérdida de memoria, relacionada a la EA (INEGI, 2000). La tasa de incidencia indica que la mitad de todos los casos nuevos de demencia cada año, son pacientes con la EA, tomando en cuenta que la edad avanzada es el principal factor de riesgo y además que la expectativa de vida se alarga, se observa un aumento de la prevalencia de la enfermedad (Bermejo *et al.*, 2008). Cabe destacar que en el caso de EA las consecuencias no solamente son para el paciente, sino también para la familia. Esto nos indica que nos encontramos ante una demencia epidémica (BFMA, 2009; OMS, 2009). Los datos epidemiológicos en el mundo muestran que la EA es un problema global de salud mental, que repercute seriamente en la economía de los países, se calcula en Estados Unidos que el costo asociado a las demencias principalmente EA incluyen alrededor 148 billones anuales de dólares en cuidado médico directo e indirecto (disminución en la productividad, por ejemplo), sin incluir 94 billones de servicios por cuidadores de estos pacientes (Alzheimer's Association, 2009).

Los tratamientos actuales no son del todo adecuados para disminuir la sintomatología asociada a la EA, por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos se ha intensificado y una fuente de estudio en esta de exploración son las plantas medicinales en todo el

mundo. En el presente trabajo se propone evaluar farmacológicamente el efecto de *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw, y *A. americana* L. sobre parámetros inmunológicos (citocinas e inflamación), conductuales (memoria) y enzimáticos (actividad Acetilcolinesterasa, citrato sintasa, glutatión reductasa y NADPH oxidasa) en un modelo de Alzheimer experimental inducido por LPS.

5. HIPOTESIS:

Por los antecedentes farmacológicos y químicos del género *Agave*, *A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. americana* L. poseen actividad:

- Anti-inflamatoria *in vivo* a través del modelo de edema auricular en ratón inducido con TPA.
- Antiacetilcolinesterasa en cerebro de ratones con neuroinflamación inducida con LPS.
- Antioxidante al influir sobre la actividad de enzimas GR y NADPH oxidasa en el cerebro de ratones con neuroinflamación inducida con LPS.
- Inmunomoduladora a través de la regulación de los niveles de citocinas pro-inflamatorias en el cerebro de ratones con neuroinflamación inducida con LPS.
- Nootrópica debido a que disminuirán el daño cognitivo inducido con escopolamina en ratones.

6. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de *Agave tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L. sobre los aspectos fisiopatológicos asociados al Alzheimer, en diferentes modelos biológicos.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Evaluar el efecto anti-inflamatorio del extracto de *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L *in vivo* utilizando el modelo de edema auricular en ratón inducido con TPA.
2. Efectuar un análisis químico-biodirigido de la especie que tenga el mayor efecto anti-inflamatorio, utilizando el modelo de edema auricular en ratón inducido con TPA.
3. Medir el efecto *in vitro* del extracto de *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L sobre la actividad de las enzimas GR, NOX y AChE provenientes del cerebro de ratones con inflamación sistémica inducida con LPS.
4. Evaluar el efecto inmunomodulador del extracto de *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L a través de la cuantificación de las citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ mediante la técnica de ELISA en cerebro de ratones con inflamación sistémica inducida con LPS.
5. Evaluar el efecto de la administración a ratones del extracto de *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L sobre el deterioro cognitivo inducido con Escopolamina utilizando el paradigma de evitación pasiva.

7. MATERIALES Y MÉTODOS:

A continuación se muestra el diagrama experimental que se siguió en el transcurso del presente proyecto de investigación (Fig. 10).

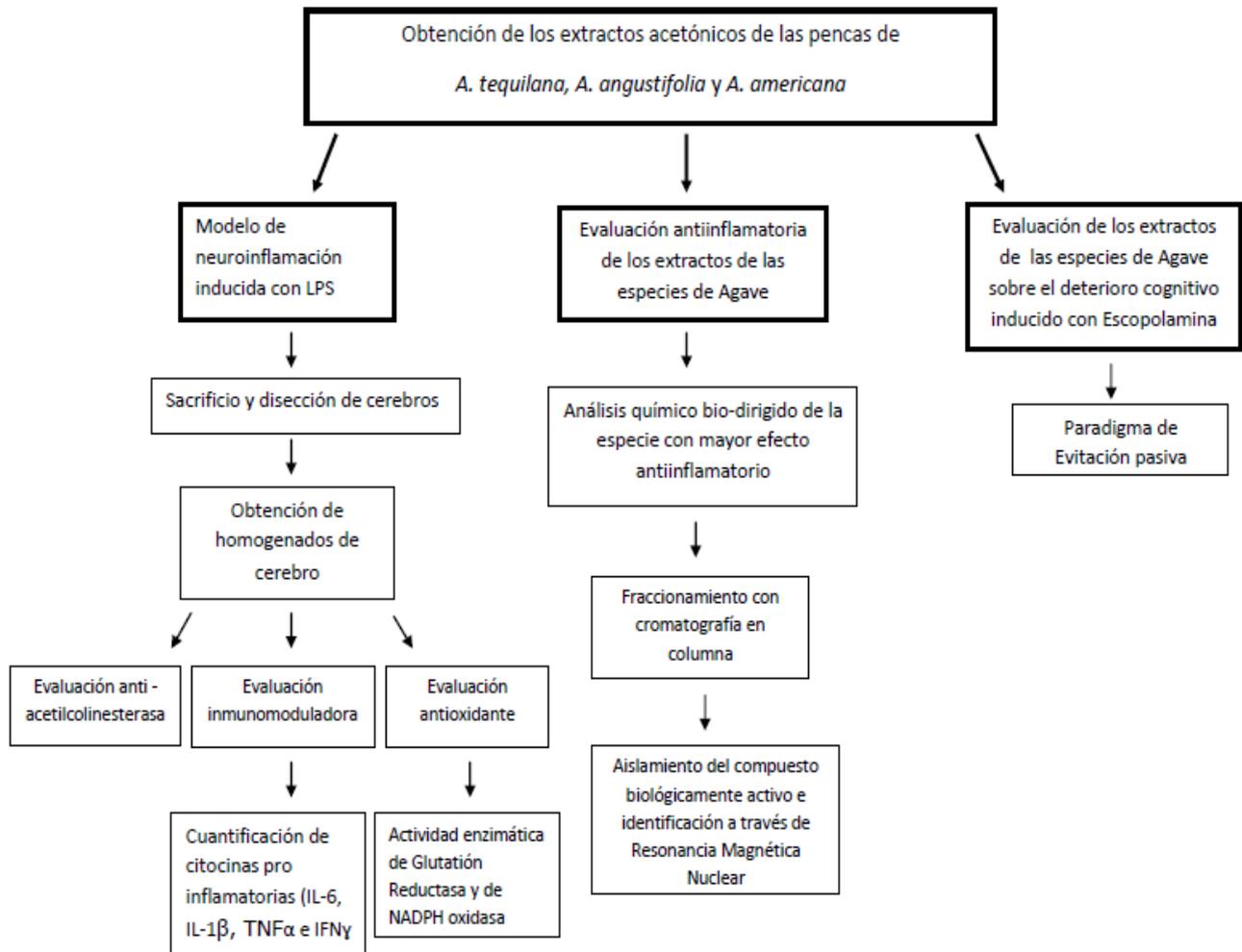


Fig. 10. Diagrama experimental

7.1 Material vegetal y obtención del extracto.

Las pencas pertenecientes a las diferentes especies de Agave fueron identificadas en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el Dr. Abisai Josue García Mendoza como *Agave tequilana* F. A.C. Weber, *Agave angustifolia* Haw y *Agave americana* L. Marginata Hort. Las pencas de *A. tequilana* y

A. angustifolia de 5 años de edad se obtuvieron de un cultivo tradicional controlado en el municipio de Tlaquiltenango, Morelos (18°37'48''N, 99°10'00''W). Las pencas pertenecientes a *A. americana*, se consiguieron en Toluca de Lerdo, Estado de México (19°17'29''N, 99°39'38''W).

El material vegetal fue pesado, picado en trozos y secado en una liofilizadora (Marca Heto Drywinner, modelo DW3, EUA). Una vez seco, el material vegetal fue molido (Molino marca Pulve plastic, EUA) después, se pusieron a macerar con acetona, se concentraron a presión reducida en un Rotavapor (Marca Heildolph Laborota, Modelo 4000, Alemania), los extractos obtenidos de este proceso se denominaron At-Ace (*A. tequilana*), Aan-Ace (*A. angustifolia*) y Aam-Ace (*A. americana*). Cada extracto se liofilizó y ya secos se refrigeraron a 4°C hasta su posterior uso en las pruebas biológicas.

7.2 Animales.

Para los ensayos anti-inflamatorios de inducción de edema auricular con TPS, se emplearon ratones machos con un promedio de 35 gr de peso y para el paradigma de Evitación pasiva, se emplearon hembras con un peso aproximado de 35 gr. Todos fueron comprados en Harlan, México y permanecieron en cajas plásticas transparentes en el Bioterio del CIBIS-IMSS con un ciclo de 12 h de luz por 12 h de oscuridad y libre acceso a alimento (Pellets, Harlan). Tres días antes del inicio de los ensayos, los animales se condicionaron al ambiente del laboratorio, así como al investigador. Todos los ensayos se efectuaron de acuerdo a las Norma Oficial Mexicana acerca del cuidado y Manejo de los Animales (NOM-062-ZOO-1999, Mexico). Los protocolos experimentales empleados en el presente estudio fueron aprobados por el comité de

investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro R-2010-1701-21.

7.3 Material de laboratorio y reactivos.

Se utilizó el material de vidrio y equipo común de laboratorio; los modelos y marcas de los equipos se especifican en la metodología correspondiente.

Las sustancias empleadas fueron de grado reactivo de las marcas Sigma, Aldrich.

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, (PMFS $\geq 99\%$ (GC) de pureza), LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4 (purified by phenol extraction), Acetilcolinesterasa (Acetylcholinesterase type V-S, lyophilized powder $\geq 1,000$ unidades/mg de proteína), Acetiltiocolina (Acetylthiocholine iodide powder $\geq 98\%$ (TLC) de pureza), 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB: $\geq 98\%$, de pureza), 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, $4\beta,9\alpha,12\beta,13\alpha,20$ -Pentahydroxytiglic-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoate 13-acetate (TPA, $\geq 99\%$ (TLC) de pureza), Indometacina (Indo $\geq 99\%$ (TLC) de pureza) (St. Louis , MO, USA), Escopolamina (Scopolamine hydrobromide trihydrate $\geq 98\%$ (HPLC) de pureza y Galantamina (Galanthamine hydrobromide United States Pharmacopeia Reference Standard).

7.4 Evaluación anti-inflamatoria: Inflamación inducida con TPA (12-orto-tetra, decanoil forbol-13 acetato).

Cada grupo experimental consistió de 7 animales, los cuales fueron anestesiados con Pentobarbital Sódico (60 mg/kg i.p.) y se procedió de la siguiente forma (Rabadanal *et al.*, 2005):

La oreja derecha (control) 20 μ l de etanol al 70%. Todos los tratamientos se aplicaron en oreja izquierda, en un volumen total de 20 μ l (10 en la parte externa y 10

en la interna): extracto de *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L (6.0 mg/oreja, disueltos en acetona). Al grupo control positivo se le administró Indometacina a 1.0 mg/oreja (disuelto etanol al 70%); aquellos animales del grupo control negativo se les administró etanol al 70 %. Transcurridos 15 minutos se aplicó sobre la oreja izquierda una solución de TPA (0.25 µg/Kg).

Después de 240 minutos (4 horas), los animales se sacrificaron por sobre exposición a anestésico, enseguida se tomaron secciones centrales de 6 mm de diámetro del pabellón auricular de las orejas izquierda y derecha y se calculó la diferencial de peso como parámetro del nivel de inflamación. Se construyó una gráfica del diferencial de peso y del porcentaje de inhibición que se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{diferencial de peso del control negativo (mg)} - \text{el grupo de tratamiento (mg)}}{\text{diferencial de peso del control negativo (mg)}} \times 100$$

7.5 Análisis químico-biodirigido.

Se seleccionó el extracto que indujo una mayor actividad biológica en la prueba de inflamación local inducida con TPA. Este fue sujeto a una partición en una mezcla inmisible de Agua/Acetato de Etilo (500/500 ml tres veces). La fracción orgánica (F-EtOAc 10 g) se concentró bajo una destilación a baja presión y separada en una columna cromatográfica abierta (50 × 500 mm, silica gel 70–230, 100g, Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil estuvo constituida por una mezcla con un gradiente de *n*-hexano/Acetato de Etilo/MeOH (las colectas fueron de 250 mL).

Las fracciones concentradas fueron evaluadas en el modelo de inflamación auricular inducida con TPA.

Se escogieron las fracciones activas y se compararon químicamente mediante CCF en un sistema 95:5 Diclorometano (CH₂Cl₂)-MeOH para el estándar ácido ursólico y β- sitosterol en 7:3 Hex-AcoEt. Se determinó la fracción que tuvo mejor

actividad anti-inflamatoria, la cual proporcionó un precipitado de color blanco (0.5 g) que fue separado empleando un papel filtro Whatman y se sometió a evaluación anti-inflamatoria bajo el mismo modelo experimental empleado anteriormente.

Con el objetivo de facilitar la elucidación estructural del compuesto aislado, se pesaron 100 mg de dicho precipitado y fue sujeto a un proceso de acetilación (pyridina: Ac₂O 1:2, 3 h), previamente descrito por Zamilpa *et al.*, (2002). El producto crudo de dicha reacción fue dividido empleando una mezcla de Acetato de Etilo/Agua y la fracción orgánica se concentró hasta la sequedad. La cristalización lograda a partir de *n*-hexano/Acetato de Etilo proporcionó el derivado de peracetato (25 mg).

Mediante los análisis ¹H- y ¹³C-NMR se asignó el desplazamiento químico de cada protón y carbono. Los experimentos dimensionales empleados nos permitieron establecer la correlación de núcleos de la misma especie proton-proton (COSY), así como la correlación heteronuclear (carbono-hidrógeno) a uno (HSQC) dos y tres enlaces de distancia (HMBC). Para elucidar la estructura química del compuesto analizado.

Todos los espectros de RMN se registraron a través de Varian INOVA-400 MHz para ¹H NMR, NOESY, ¹H-¹H COSY, HSQC y HMBC. Y a 100 MHz para ¹³C NMR en CDC₁₃. Los cambios químicos fueron reportados en partes por millón (ppm).

7.6 Inducción de la EA experimental con Lipopolisacárido.

El modelo de Alzheimer experimental seleccionado para este protocolo, fue el de la administración sistémica (i.p.) de LPS de *E. coli* (Lee *et al.*, 2008). De manera general todos los ratones, a excepción del grupo basal, recibieron una dosis diaria de LPS (0.25 µg/Kg) vía intraperitoneal (i.p.) durante 7 días. Después, durante otros 7 días cada animal recibió el tratamiento correspondiente. En el día último (día 14) del

experimento los ratones fueron administrados por octava y última ocasión con LPS i.p. cuatro horas antes del sacrificio. Cada grupo experimental consistió de 10 ratones:

- 1.- Grupo Control Basal: Animales a los que se les administró vehículo i.p. durante 7 días, seguido de la administración via oral (v.o.) de vehículo durante el mismo tiempo.
- 2.- Grupo control Positivo: Animales a los que se les administró LPS (0.25µg/Kg) i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. de Indometacina (5 mg/ml) por 7 días.
- 3.- Grupo Control Negativo: Animales a los que se les administró LPS (0.25µg/Kg) i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. de vehículo (7 días).
- 4.- Grupo Experimental *A. tequilana* Weber: Animales a los que se les administró LPS (0.25µg/Kg) i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. de extracto de *A. tequilana* (125 mg/kg) durante 7 días.
- 5.- Grupo Experimental *A. americana* L: Animales a los que se les administró LPS (0.25µg/Kg) i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. de extracto de *A. americana* (125 mg/kg) durante 7 días.
- 6.- Grupo Experimental *A. angustifolia* Haw: Animales a los que se les administró LPS (0.25µg/Kg) i.p. durante 7 días, seguido de la administración v.o. de extracto de *A. angustifolia* (125 mg/kg) durante 7 días (Lee *et al.*, 2008).

Una vez concluida esta etapa experimental, los animales fueron sacrificados con sobredosis de anestesia, y se hizo la disección cerebral. El homogenizado de este tejido fue el que se empleó en la determinación de la actividad de la enzima AChE, de las enzimas antioxidantes GR y NADPH oxidasa; así como la cuantificación de citocinas.

7.7 Preparación de tejido para las pruebas de inhibición de AChE y de actividad antioxidante.

Para este fin, el tejido se disgregó en amortiguador de fosfatos (100 mM pH 8), se sonicó por 1 minuto y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se empleó como extracto enzimático y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

7.7.1 Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE).

Para la evaluación de inhibición AChE, se empleó el extracto enzimático de cerebro a través del siguiente ensayo: en un volumen total de 360 µl de los cuales 300 µl fueron de amortiguador (100 mM de fosfatos pH 8.0), 20 µl de solución enzimática con AChE (extracto homogenizado de cerebro), 20 µl de DTNB (10 mM de dithio-bis-nitro-benzoato y 1.5 mg/ml de NaHCO₃), se incubaron a 37°C por 1 minuto y para iniciar la reacción enzimática, se adicionó 20 µl de Ioduro de acetilcolina (AChI) (5, 10,25, 50 y 75 mM). Finalmente, se determinó el incremento de la densidad óptica (D.O.) a 412 nm, la actividad fue reportada en unidades. La unidad internacional (UI) se define como 1 mmol de AChI por µg de proteína transformada por minuto, para lo cual se construyó una curva estándar de tiocolina que reaccionó con DTNB formando un compuesto colorido amarillo.

7.7.2 Evaluación de la actividad antioxidante.

El extracto enzimático empleado para esta evaluación, fue aquel mencionado en la sección de Inflamación inducida con LPS y para cumplir este objetivo se utilizaron kits enzimáticos comerciales siguiendo el procedimiento que establecía cada uno.

7.7.2.1 Glutación reductasa (GR).

La actividad de GR se determinó empleando una solución que contenía 100 μ L de extracto enzimático en 0.2 M de buffer de fosfatos (pH 7.0) conteniendo 2 mM de EDTA, 01 mM de NADPH y 0.75 mM de DTNB en un volumen total de 500 μ l. La reacción se inició con la adición de 1 mM de glutación disulfuro y la reacción se leyó a 412 nm por 3 min. La actividad se expresó en UI por mg de proteína.

7.7.2.2 NADPH oxidasa.

Para la evaluación de ésta enzima, se empleó una mezcla que contenía 100 μ L de extracto enzimático, 550 μ L de buffer de fosfatos 50mM ph 7.4, Ferricitocromo C 21 μ M (50 μ L), NADPH 100 μ M (50 μ L). Se incubó durante tres minutos a 25 °C. La reacción se inició con la adición de 50 μ L de SDS (90 μ M) sumando un volumen total de 800 μ L y se leyó a 340 nm durante 45 minutos. La actividad se expresó en UI por mg de proteína.

7.8 Evaluación inmunomoduladora: Cuantificación de citocinas mediante el método de ELISA.

Los cerebros disectados y congelados derivados de ratones con neuroinflamación inducida con LPS fueron disgregados en buffer de fosfatos Ph7 con inhibidor de proteasas (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo, PMFS), después se centrifugaron por 5 min a 10000 rpm, y se colectó el sobrenadante que fue almacenado a -70°C para su posterior análisis con el método de ELISA. En estas muestras se cuantificaron las citocinas IL-6, IL-1 β , INF γ y TNF- α , la técnica de medición se llevó a cabo utilizando un kit (Thermo scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.9 Evaluación sobre el deterioro cognitivo inducido por Escopolamina: Diseño experimental.

Los ratones se expusieron a un periodo de entrenamiento con el objetivo de adquirir memoria espacial. Posteriormente se les administró consecutivamente los tratamientos durante una semana y 30 minutos antes de la prueba final se les administró i.p. Escopolamina (2.0 mg/kg) para provocar el deterioro de la memoria. Se establecieron los siguientes grupos de experimentación:

Grupo 1 (control basal): Animales sin deterioro cognitivo y 100 μ l/10 g de peso de vehículo v.o. (8 días; n=7).

Grupo 2 (control negativo): Animales con deterioro cognitivo (Escopolamina 2mg/Kg) y 100 μ l/10 g de peso de vehículo v.o. por 1 semana. (n=7).

Grupo 3 (control positivo): Animales con deterioro cognitivo (Escopolamina 2mg/Kg) y 10 mg/kg v.o. por una semana de tratamiento con Galantamina (1 mg/Kg), (inhibidor selectivo, competitivo y reversible de la acetilcolinesterasa) (n=7).

Grupo 4 (Experimental): Animales con deterioro cognitivo (Escopolamina 2mg/Kg) y 250 mg/kg v.o. por una semana del tratamiento correspondiente: *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L (n=7).

7.9.1 Evaluación sobre el deterioro cognitivo inducido por Escopolamina: Paradigma de evitación pasiva.

El dispositivo empleado en este ensayo está constituido por dos cámaras, una iluminada y otra oscura, separadas por una puerta de guillotina. La base de la cámara oscura tiene una base metálica, la cual se conecta a una fuente eléctrica controlada manualmente. Este paradigma emplea la tendencia natural de los ratones de estar en

ambientes oscuros. Es unidireccional, debido a que el ratón se mueve de la cámara iluminada a la oscura (Fig. 11).

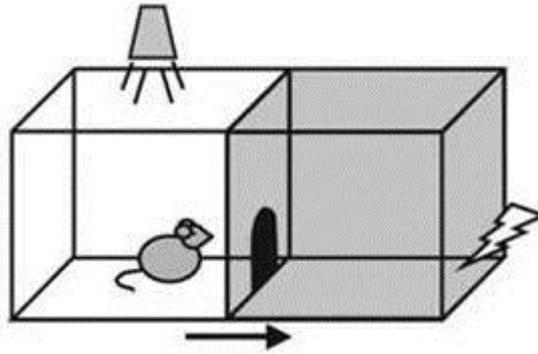


Fig. 11. Dispositivo empleado en el paradigma de Evitación pasiva.
Imagen tomada de <http://psicolebon.wordpress.com/2013/05/22/conducta-de-evitacion-1/>

Los animales fueron sometidos a un periodo de entrenamiento para lo cual cada ratón se colocó en la cámara iluminada del dispositivo, orientado de frente a la puerta. Después de 30 seg. se abrió la compuerta que separa las cámaras (iluminada y oscura), y se midió el tiempo que le tomó a cada individuo cruzar a la cámara oscura. Una vez que cruzó, la puerta se cerró automáticamente y se liberaron descargas eléctricas (0.2 mA, por 2 seg) dirigidas a las patas de los ratones. Después de 24 horas el ensayo se repitió pero en esta ocasión sin descargas eléctricas, y el tiempo que se registró se consideró como latencia inicial (Li). En caso de que transcurrieran 300 segundos sin que el individuo cruzara, la prueba se daba por terminada entendiendo que el individuo había aprendido. Posteriormente, se administraron v.o. los diferentes tratamientos durante una semana. El último día de administración de cada tratamiento se indujo el daño cognitivo al administrar Escopolamina i.p.30 minutos antes de repetir el ensayo. El tiempo registrado en esta ocasión se consideró como latencia de retención (Lr), si el individuo no cruzaba tras 300 segundos, la prueba se finalizaba y se registraba ese dato como Lr. Finalmente, se compararon los parámetros de Li y Lr.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se analizaron con el programa de estadística SPSS versión 11.0, a través de un Análisis de varianza (ANOVA) y una post-prueba de *Bonferroni* para los ensayos de memoria e inflamación inducida con TPA; mientras que para los ensayos de actividad enzimática (AChE y antioxidante) y ELISA se uso una *t*-student. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativamente diferente.

9. RESULTADOS.

En la actualidad no existen datos que indiquen que las especies del género *Agave* puedan ejercer un efecto en algún modelo experimental relacionado con enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la EA.

9.1 Obtención del extracto.

En el cuadro 1 se puede observar el rendimiento obtenido del extracto acetónico de las especies de *Agave* evaluadas.

Cuadro 1. Rendimientos obtenidos de la extracción acetónica de las especies de *Agave*.

Especie	Rendimiento (%) por cada 100 gr de material fresco
<i>A. tequilana</i> Weber	7.4
<i>A. angustifolia</i> Haw	7.1
<i>A. americana</i> L	6.8

9.2 Evaluación anti-inflamatoria: Inflamación inducida con TPA (12-orto-tetra, decanoil forbol-13 acetato).

En la Fig. 12 se puede observar la relación entre los diferentes tratamientos con respecto al peso de las orejas (mg). La concentración de los extractos evaluados fue de 300 mg/ml. El peso máximo fue de 12 mg observado en el control negativo (Veh) con base en esto, los demás tratamientos fueron estadísticamente diferentes, siendo *A. americana* L (Aam) el tratamiento que mostró un mínimo de peso (2.3 mg), seguido de *A. tequilana* Weber (At) con un promedio de peso de (3.8 mg) dato menor aún que aquel observado en el control positivo (Indo, 50 mg/ml), con un peso promedio de 4.3 mg. La especie *A. angustifolia* Haw tuvo un promedio de 5.8 mg de peso (* $p < 0.05$ F (2.69)= 43.162; gl 4:30).

De acuerdo con los resultados de la actividad anti-inflamatoria, se propuso fraccionar el extracto de *A. americana* L, además de que al efectuar una comparación cromatográfica en capa fina, se pudo confirmar que poseía mayor concentración de terpenos.

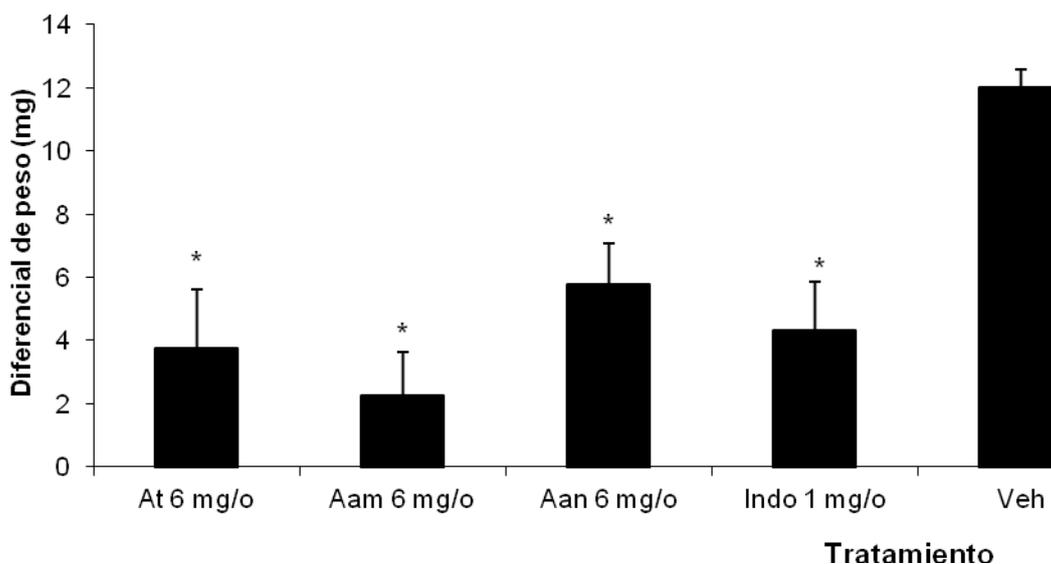


Fig. 12. Evaluación anti-inflamatoria. *A. tequilana* (At 6 mg/o), *A. americana* (Aam 6 mg/o), *A. angustifolia* (Aan 6 mg/o), Indometacina (Indo 1 mg/o). ANOVA *post hoc* Bonferroni.
*Significativamente diferente $p < .05$ respecto al control negativo TPA (Veh).

El porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos fue calculado con base en la fórmula mencionada en el capítulo de material y métodos. El grupo que indujo un mayor porcentaje de inhibición fue aquel de *A. americana* L con un 81.02%. *A. tequilana* Weber mostró un 68.64%, ambos tratamientos fueron mayores aún que el control positivo (Indo) que indujo un 63.85% de inhibición. El grupo con menor porcentaje de inhibición fue aquel de *A. angustifolia* Haw con 51.89%, sin embargo, los tres extractos mostraron una actividad anti-inflamatoria significativa.

9.3 Análisis químico-bio-dirigido.

El extracto de la especie *A. americana* L que fue aquel que presentó el mejor efecto de inhibición de edema auricular inducido con TPA, debido a esto, fue sometido a un fraccionamiento. Se propuso evaluar la actividad anti-inflamatoria a las siguientes fracciones, las cuales van de menor a mayor polaridad (sistema de elución hexano: diclorometano: metanol): **F1** (que correspondía a la fracción 3-6; 100:0:0, 0.32 g), **F2** (22-23; 80:20:0, 0.45 g), **F3** (35;50:50:0, 0.6 g), **F4** (77-82; 45:45:10, 2.1 g), **F5** (87-88; 40:40:20, 3.8 g) y **F6** (93-95; 0:0:100, 2.3 g).

Las fracciones de mayor actividad y que fueron estadísticamente diferentes al control negativo fueron F4, F5 y F6 (Fig. 13 $*p < 0.05$; $F(2.46) = 8.736$; gl 6:27), la comparación química a través de CCF indicó que F5 (la más activa) comparte compuestos menos polares con F6, así como otro compuesto mayoritario y más polar en F4, siendo esta la razón por la cual tuvo mejor actividad anti-inflamatoria. Además de que se pudo descartar a través de CCF la posibilidad de que dicho efecto fuera atribuido a compuestos conocidos por su actividad anti-inflamatoria como el AU y β -sitosterol, ya que a pesar de estar presentes, su concentración fue mínima.

De las fracciones más activas se seleccionó F5, debido a que su perfil cromatográfico indicó una menor complejidad química. El empleo de CC permitió el aislamiento de un compuesto, (F5b) de baja polaridad, el cual se identificó como saponina esteroideal al emplear CCF y revelar con reactivo de Liebermann- Burchard.

Se estableció la actividad anti-inflamatoria con diferentes dosis de este compuesto, con el ensayo de inflamación inducida con TPA y los resultados mostraron un efecto dependiente de la dosis. A 2 mg/o, el porcentaje de inhibición de edema fue de 89.57%, el cual es mayor aun que el obtenido con todo el extracto a 6 mg/o (81.02%). A 1.5 mg/o la actividad disminuye a 88.68% y el porcentaje más bajo se observa a 1 mg/o

(72.95%) y a la misma dosis, Indometacina presenta un de 79.23% de inhibición de edema.

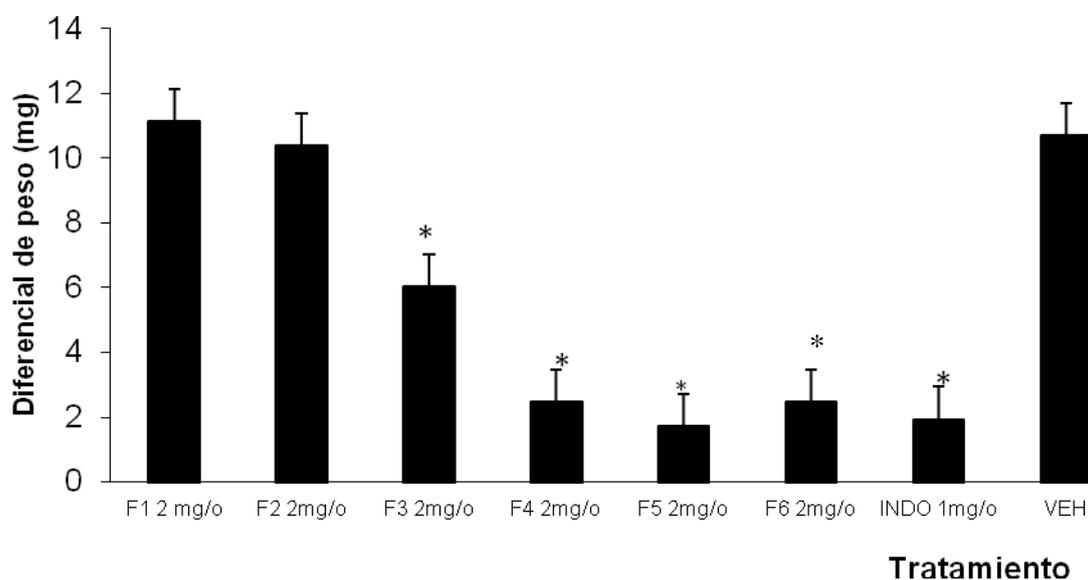


Fig.13.- Evaluación anti-inflamatoria de fracciones de menor (AaF1) a mayor polaridad (AaF6) a una concentración de 2 mg/o. Control positivo (INDO, 1mg/o). ANOVA *post hoc* Bonferroni.

*Significativamente diferente $p < .05$ respecto al control negativo (Veh).

El experimento de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C mostró 57 señales, de las cuales 29 fueron asignadas a un esqueleto tipo espirostanol acetilado, y 28 señales correspondientes a la porción sacárida.

El análisis de los experimentos de correlación nuclear COSY, HSQC y HMBC indicó que la porción de azúcar correspondía a una glucosa unida en el hidroxilo 3 del espirostanol. Y otra unidad de glucosa unida en su C-6. Además se pudo establecer que el C-23 de la sapogenina se encuentra hidroxilado. Llegando a la conclusión de que esta saponina corresponde a un espirostanol bidesmosido e hidroxilado en C-23.

La revisión bibliográfica de la especie permitió caracterizar el compuesto activo mayoritario como (25R)-5 α -spirostan-3 β , 6 α , 23 α -triol-3, 6-di-O- β -D-glucopyranoside (Cantalasaponina **1**) (Cuadro 2 y Fig. 14).

Cuadro 2. ^1H (400 MHz) y ^{13}C -NMR (100MHz) datos de cantalasaponina-1 peracetato derivative

No		δC	δH
1	CH2	39.6	
2	CH2	27.8	
3	CH	78.6	3.499 (m)
4	CH2	28.9	
5	CH	49.3	
6	CH	81.12	3.26 (m)
7	CH2	37.1	
8	CH	33.8	
9	CH	53.5	
10	C	36.6	
11	CH2	20.77	
12	CH2	39.69	
13	C	41.1	
14	CH	56.0	
15	CH2	31.8	
16	CH	81.17	4.411 (m)
17	CH	61.7	0.75 (s)
18	CH3	13.5	0.77 (s)
19	CH3	16.2	
20	CH	36.1	
21	CH3	14.2	0.90 (d, 608)
22	C	108.6	
23	CH	68.5	4.802 dd J=11.6
24	CH	34.1	1.46 m
25	CH	30.8	
26	CH2	65	3.37 ^a m; 3.29 ^b m
27	CH3	16.5	0.78 d J=6
3-O-glc			
1'	CH	98.7	4.62 d J=8
2'	CH	71.4	4.925 J=8;9.6
3'	CH	72.8	5.142 dd J=9.2;10
4'	CH	68.5	5.042 J=9.6
5'	CH	71.8	3.629 dddd J=2;.4.8;7.6;12
6'	CH2	62.2	4.051 ^a J=2;12; 4.222 ^b J=4.8;12dd
6-O-glc			
1''	CH	101.7	4.46 d J=8
2''	CH	71.6	4.925 J=8;9.6
3''	CH	73.2	5.142 dd J=9.2;10
4''	CH	68.6	5.042 J=9.6
5''	CH	71.8	3.629 dddd J=2;.4.8;7.6;12
6''	CH2	62.3	4.051 ^a J=2;12; 4.222 ^b ddJ=4.8;12

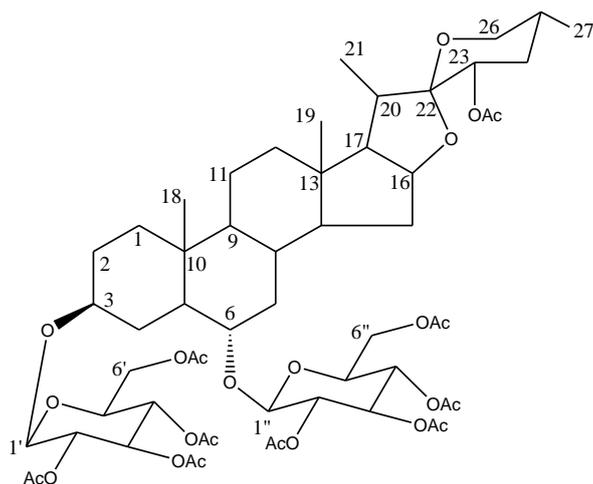


Fig 14. Estructura química de Cantalasonina1

9.4 Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa (AChE).

En el presente trabajo se midió la actividad de AChE, para lo cual se construyó una curva de las diferentes concentraciones de AChI. A 75 Mm (* $p < 0.05$; $F(3.06) = 13.95$; 50 Mm $F(3.06) = 96.216$; 25 Mm $F(3.06) = 23.614$; 10 Mm $F(3.06) = 35.479$ y 5 Mm $F(3.06) = 84.841$; gl 4:15. Y se observó que la actividad de la AChE medida *in vitro* en muestras de homogenados de cerebro de ratón con neuroinflamación inducida con LPS y sin algún tratamiento (control negativo), indujo una inhibición importante y significativa de la enzima AChE (---■---, Fig. 15).

En esta representación gráfica, los valores de transformación del sustrato (AchSH) se dan en densidad óptica por minuto (DO/min). Para poder observar un efecto inhibitorio sobre dicha enzima, los valores deben ser menores que aquellos que se observan en el control basal (---▲---). En esta misma gráfica el control positivo anti-inflamatorio, la Indometacina (---■---) a la dosis de 5mg/Kg, provoca un aumento en la actividad enzimática respecto al basal.

Por otro lado, la evaluación *in vitro* de la actividad enzimática en el homogenado de cerebro de ratones que recibieron *A. angustifolia* Haw (---▲---) indican una inhibición tipo acompetitiva. Para el caso de *A. tequilana* Weber (---■---) y *A. americana*

L (---■---, Fig. 15) los valores muestran que la actividad de la AChE no se modifica, lo que aparentemente indica que sus extractos no tienen efecto en este parámetro. Sin embargo, se resalta el hecho de que ambas plantas están bloqueando el efecto tóxico que provoca el LPS en el cerebro, por lo que se considera que los Agaves están ejerciendo un efecto neuroprotector contra el daño que induce la administración del LPS.

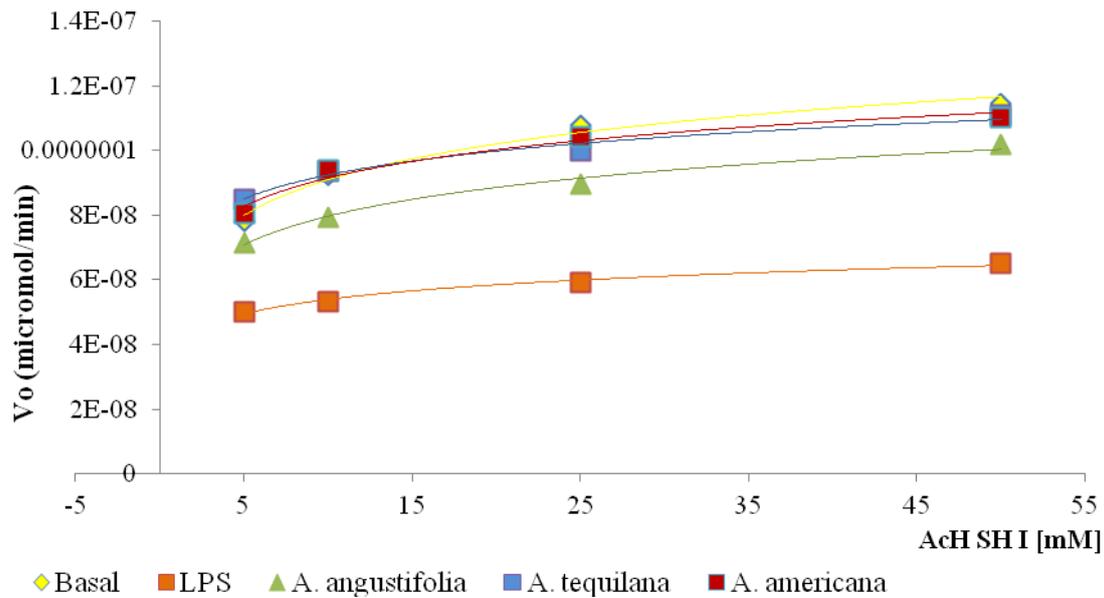


Fig. 15.- Efecto de diferentes tratamientos (Agave) sobre la actividad de AChE en homogenados de cerebro de ratones con neuroinflamación inducida con LPS.

Para establecer el tipo de inhibición enzimática, se tomaron en cuenta los valores obtenidos de V_{max} y de K_m (Cuadro 3). El tratamiento con LPS indujo una inhibición de tipo acompetitiva sobre la enzima AChE ya que las dobles recíprocas entre el grupo control Basal y el LPS, fueron paralelas entre sí (no se altera la pendiente), y mostraron diferencias entre los valores de K_m y aquellos de V_{max} , característica esencial en este tipo de inhibición.

Cuando se administró el LPS como estímulo de daño y *A. angustifolia* Haw como tratamiento, se pudo observar que disminuye la inhibición sobre AChE, pero mantiene las características de un inhibidor acompetitivo. Los tratamientos de *A.*

tequilana Weber y *A. americana* L mostraron valores semejantes de V_{max} y K_m que aquellos del grupo control Basal, lo cual supone que se revirtió la inhibición inducida por el LPS sobre la enzima.

Cuadro 3.- Efecto del tratamiento de diferentes especies de Agave sobre la actividad enzimática de AChE (K_m y V_{max}).

Basal	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
LPS	1.62	0.00085
<i>A. angustifolia</i>	2.53	0.00137
<i>A. tequilana</i>	2.6	0.00154
<i>A. americana</i>	2.47	0.00158
Indometacina	10.55	0.002

9.5 Evaluación del efecto antioxidante.

Los cerebros de animales con daño inducido con LPS, en comparación con el grupo Basal (animales sanos), así como los individuos de los grupos de Agave empleados, incrementaron significativamente la actividad de la enzima GR. Sin embargo, el grupo control negativo (animales con daño y sin tratamiento), mostró un comportamiento no esperado, ya que este tuvo mayor actividad que el grupo control Basal (Cuadro 4) y como ya se ha mencionado antes, en este modelo dicho grupo representa el comportamiento de la enzima en un individuo sano. La enzima GR tiene función antioxidante y el tratamiento con LPS genera un ambiente oxidante.

En el Cuadro 4 se muestra el efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de NADPH oxidasa. En comparación con el grupo control Basal,

el tratamiento que mostró mayor actividad de NADPH oxidasa, fue el control positivo (Indometacina). Cabe mencionar que los resultados observados en el grupo control basal son de especial interés ya que fueron por mucho, más altos que aquellos encontrados en los tres grupos experimentales y el grupo control negativo, tomando en cuenta que son considerados los valores en los que se encuentra normalmente la actividad de NADPH oxidasa en individuos sanos.

Los tratamientos de *A. americana* L y *A. tequilana* Weber, se comportaron de forma semejante al observado en el grupo control negativo y están por debajo del grupo control Basal.

Cuadro 4.- Representación gráfica del efecto de los distintos tratamientos sobre la actividad enzimática de NADPH oxidasa (NOX) y Glutación Reductasa (GR).

Tratamiento (mg/kg)	GSH ($\mu\text{Mol/mg}$)	NOX ($\mu\text{Mol/mg}$)
Basal	0.443 \pm 0.0002	4.246 \pm 0
Veh	0.173 \pm 0.003*	0.621 \pm 0.008*
Indo (5.0)	0.032 \pm 0.001*	1.843 \pm 0.004*
Ateq (125)	0.642 \pm 0.002*	0.513 \pm 0.002*
Aame (125)	0.508 \pm 0.007*	0.606 \pm 0.003*
Aang (125)	0.480 \pm 0.004*	0.917 \pm 0.002*

Los datos representan la media \pm DS (n=10), con una prueba de *t-student*.

*Significativamente diferente $p < 0.05$.

9.6 Evaluación inmunomoduladora: Cuantificación de citocinas mediante el método de ELISA.

Los resultados del análisis en la concentración de citocinas pro-inflamatorias en las muestras de cerebro de ratón expuestos a LPS (ya sea con o sin tratamiento), fueron

expresados como el número de veces que se incrementa la concentración de estas proteínas respecto de aquella en los animales sanos (grupo basal).

El cerebro de ratones con daño, que recibieron sólo LPS y vehículo, presentó un aumento significativo ($p < 0.05$, Figura 16a y 16b) en la concentración de las citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF γ .

El tratamiento de los ratones con Indometacina (Indo), un anti-inflamatorio no-esteroidal, provocó una disminución significativa respecto al grupo de daño en la concentración de las interleucinas IL-1 β e IL-6 ($*p < 0.05$; $F(2.77) = 54.89$ y $(2.77) = 19.248$ respectivamente, Figura 16a), es decir el incremento de estas proteínas respecto al basal fue menor que en el grupo con vehículo (Veh).

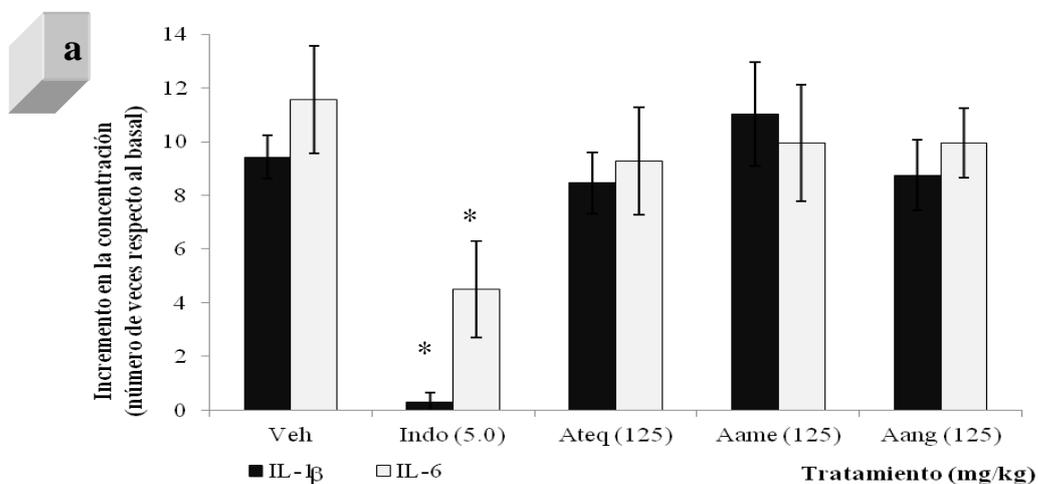
En el caso de los grupos de animales que recibieron alguno de los tratamientos provenientes de los diferentes Agaves, se observó una tendencia a la disminución respecto al grupo con daño en la concentración de estas interleucinas pro-inflamatorias. Para IL-1 β , *A. tequilana* Weber induce un incremento respecto al basal de 8.46 veces, con *A. americana* L de 9.42 veces y con *A. angustifolia* de 8.75 veces; y para IL-6 de 9.26, 9.95 y 9.95 veces, respectivamente. Sin embargo, los datos no son estadísticamente diferentes ($p > 0.50$, Figura 16a) a los del grupo con Veh el cual induce una elevación de 11.02 veces para IL-1 β y de 11.57 veces para IL-6. Como se puede observar ninguno de los Agaves fue capaz de modificar el efecto del LPS sobre la concentración en cerebro de estas moléculas pro-inflamatorias.

En la evaluación del modelo, se pudo observar que el LPS administrado diariamente por 7 días induce un incremento significativo (respecto al basal) en la concentración de TNF- α ($*p < 0.05$; $F(2.77) = 91.97$) con un incremento de 1.56 veces sobre el valor del grupo de animales sanos (Figura 16b). En el grupo de animales que

recibieron Indo la elevación en la concentración de esta proteína fue sólo de 0.41 veces, es decir este fármaco es capaz de inhibir la elevación de TNF- α .

El tratamiento con el extracto acetónico de los diferentes Agaves, induce una disminución importante y significativa en las veces en que el TNF- α se incrementa, así por ejemplo con *A. tequilana* Weber el incremento sólo fue de 0.28 veces, mientras que para *A. americana* L fue de 0.40 veces (valor estadísticamente igual que el del grupo con Indo) y para *A. angustifolia* Haw fue mayor con un incremento de 0.91 veces; todos estos valores fueron estadísticamente menores que el del grupo con sólo vehículo (* $p < 0.05$, Figura 16b).

El incremento en la concentración de INF- γ para los animales que sólo recibieron LPS fue de 4.59 veces respecto al grupo basal. El tratamiento con Indo, induce una disminución en la concentración de esta citocina con un valor de 3.36, sin embargo este valor no fue estadísticamente diferente al grupo con vehículo (* $p < 0.05$; $F(2.77) = 21.592$ Figura 16b). Mientras que los animales que recibieron *A. americana* L muestran un incremento de tan sólo 1.21 veces; los de *A. tequilana* Weber de 2.26 y los de *A. angustifolia* Haw de 2.62 veces, lo cual es significativamente menor que el del vehículo ($p < 0.05$, Figura 16b).



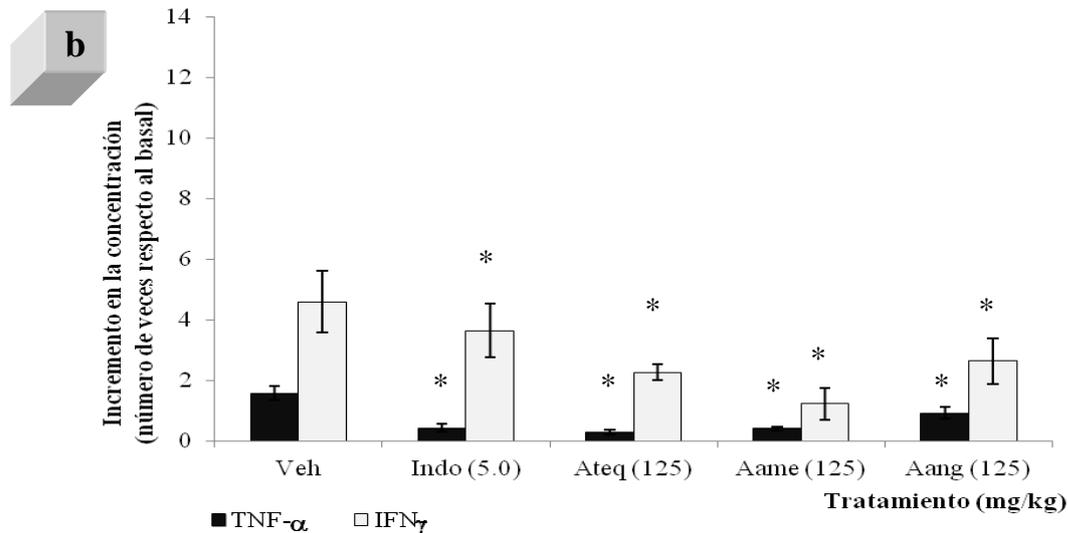


Figura 16. Efecto de diferentes tratamientos: Indometacina (Indo), *A. tequilana* (Ateq), *A. americana* (Aame), *A. angustifolia* (Aang) sobre el incremento en la concentración de interleucinas (a, IL-1 β e IL-6) y de TNF- α e IFN- γ (b), en cerebro de ratones que recibieron LPS (25 μ g/kg). *T-student* * p < 0.05 respecto al grupo con vehiculo (Veh).

9.7 Evaluación sobre el deterioro cognitivo inducido por Escopolamina:

Paradigma de evitación pasiva.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17. En esta gráfica se compara el tratamiento con respecto al tiempo que le toma en cada fase al individuo cruzar de un lado a otro del dispositivo.

Durante la fase de entrenamiento, el grupo control positivo fue aquel que mostró diferencia estadística (* p < 0.05; $F(2.45) = 4.291$, gl 5/36) siendo los que más tiempo les tomó cruzar de la cámara iluminada a aquella oscura (28 s) sin embargo, el resto de los tratamientos mostraron un comportamiento semejante con un promedio aproximado de 10 segundos.

Durante la fase de Li, todos los grupos mostraron un comportamiento semejante al tomarles más tiempo cruzar con un promedio de 270 segundos, pudiendo establecer que el aprendizaje estuvo presente (* p < 0.05; $F(2.45) = 1.444$; gl 5/36).

La latencia de retención, después de los tratamientos y de la inducción del daño, nos muestra que el grupo control basal (animales sin daño) fueron aquellos que tuvieron mayor tiempo, incluso no atravesaron hacia la cámara oscura, observando entonces la retención del aprendizaje tras una semana. Las especies *A. tequilana* Weber y *A. americana* L tuvieron un comportamiento semejante al mostrar un promedio de Lr de 260 segundos, tiempo aun mayor que Galantamina, fármaco empleado para combatir el deterioro cognitivo que promueve la sinapsis colinérgica, cuya Lr fue de 239 s. *A. angustifolia* Haw tuvo menor efecto de protección contra el deterioro cognitivo con un promedio de Lr de 180 s. El grupo control negativo fue aquel que tuvo menor tiempo de retención con 44 segundos, lo cual era lo esperado ($*p < 0.05$; F (2.53) 50.572; gl 5/34).

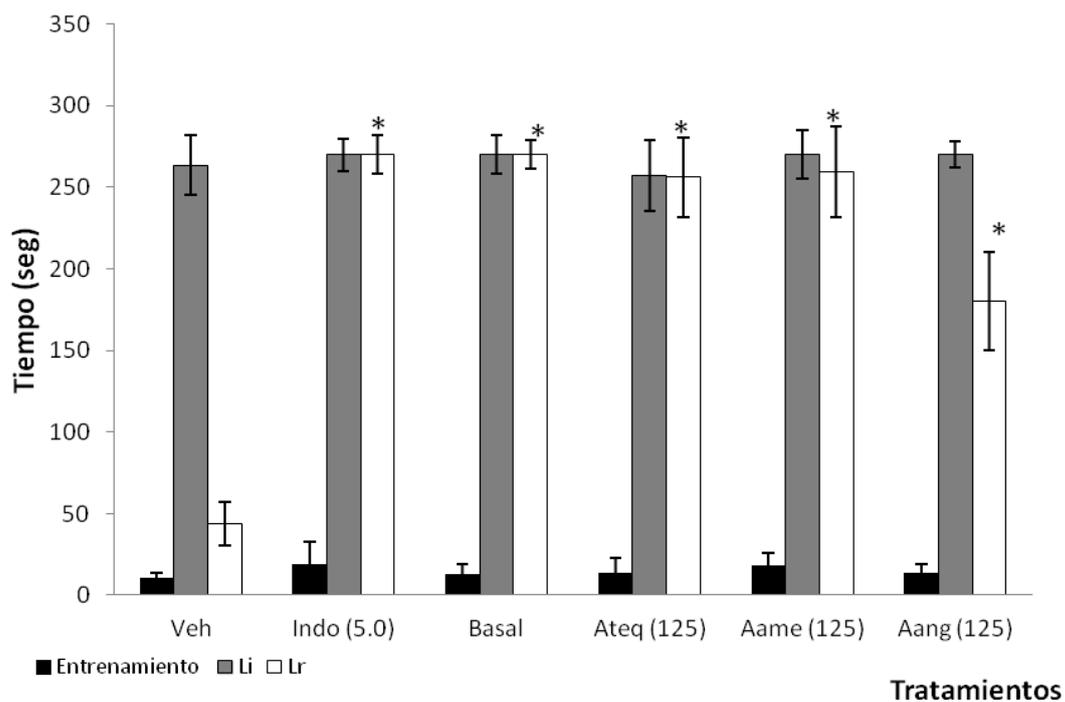


Fig. 17.- Evaluación sobre el deterioro cognitivo inducido con Escopolamina de los extractos de *A. tequilana*, *A. americana* y *A. angustifolia*. Control positivo (Galantamina) y Control negativo (Vehículo). ANOVA *post hoc* Bonferroni. *Significativamente diferente $p < .05$ respecto al control negativo (Veh).

10. DISCUSIÓN.

En la literatura no existen datos que hayan mostrado algún efecto neurofarmacológico o de protección en SNC de algún Agave en el mundo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, demostraron por primera vez dicho efecto para las especies de *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L.

Las especies del género Agave se caracterizan porque almacenan en sus pencas una gran variedad de saponinas, metabolitos secundarios conocidos por presentar diversas actividades biológicas, como por ejemplo, la anti-inflamatoria. Lo cual es de especial interés, ya que en las enfermedades crónicas y neurodegenerativas, como la EA, el proceso inflamatorio es un aspecto fisiopatológico común.

En este estudio, se pudo establecer que el extracto acetónico proveniente de las pencas de *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L. presentan actividad anti-inflamatoria significativa. Lo anterior es consistente con la literatura que reporta efecto anti-inflamatorio en especies de Agave, particularmente en el caso de *A. americana* L. (Peana *et al.*, 1997) que a través del ensayo de inducción de edema en pata de ratas inducido con Carragenina, establecieron tal actividad biológica al evaluar el extracto acuoso y saponinas aisladas de esta especie; para *A. intermixta*, mediante el mismo ensayo empleado en el presente trabajo (García *et al.*, 2000), así como para otras especies como *A. shevrei* (da Silva *et al.*, 2002) a través del ensayo de aumento de permeabilidad de membrana con ácido acético.

Del fraccionamiento del extracto acetónico de la especie *A. americana* L. que resultó ser la más activa, el sistema de elución empleado permitió detectar la presencia de terpenos al emplear 4 hidroxibenzaldehído para revelar los cromatogramas de la CCF. Esto es consistente con lo que han reportado Navarro *et al.*, (2001); da Silva *et al.*,

(2002) y Kwak *et al.*, (2003), ya que ellos mencionan que las especies de este género presentan en sus pencas una gran variedad de compuestos triterpénicos como el ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO), así como saponinas triterpénicas.

En este sentido, mediante el ensayo bio-dirigido efectuado a dicha especie, se aisló a Cantalasonina-1, saponina esteroidal que fue descrita por primera vez en 1985 en la especie *A. cantala* (Sati y Pant, 1985) y posteriormente también fue identificada en *A. americana* (Jin *et al.*, 2003; Tinto *et al.*, 2005). Este compuesto se presenta en algunos miembros de la familia Agavaceae y podría actuar como un marcador, ya que en el 2004 fue reportado su aislamiento en la especie *Furcraea selloa* la cual también pertenece a dicha familia (Simmons *et al.*, 2004).

Es importante resaltar que no hay muchos datos de alguna actividad biológica para este compuesto. Solo se sabe que posee actividad citotóxica contra células JTC-26 inductoras carcinoma cervical humano (Sati y Pant, 1985). Wang *et al.*, (2010) evaluaron la misma actividad contra células humanas inductoras de leucemia promielocítica HL-60, sin embargo no resultó activa en dicho experimento. Recientemente, esta saponina fue aislada de *A. sisalana* y también fue evaluada en ensayos de citotoxicidad pero sobre las líneas celulares Human MCF-7 breast cáncer y NCI-H460 non-small cell lung cancer, y tampoco mostró alguna actividad significativa (Chen *et al.*, 2011).

El presente reporte es el primero que demuestra la actividad anti-inflamatoria de cantalasonina 1 y que dicho efecto además de ser dependiente de la dosis, presenta una potencia similar a la observada para la indometacina.

Se ha mostrado la riqueza metabólica de *A. americana* L. en cuanto a su contenido de saponinas esteroidales y triterpénicas en diferentes partes de la planta, pero principalmente en sus pencas. Se hace mención del aislamiento e identificación de

Clorogenina en la flor, (Sankara y Nair, 1970), Hecogenina (Hegnauer, 1963), Rocogenina (Serova y Madaeva, 1958), Agavasaponina E y Agavasaponina H (Wilkomiski *et al.*, 1975), Agamenosidos A y B (Jin *et al.*, 2002), Agamenosido C, Hongguangenina y Cantalasaponina 1 (Jin *et al.*, 2002) y Agamenosidos H, I y J además de Agavegenina D (Jin *et al.*, 2004) en sus pencas.

De los compuestos mencionados anteriormente en la especie *A. americana* L., la Tigogenina ha mostrado tener actividad anticancerígena (Aswal *et al.*, 1984), anti-inflamatoria (Peana *et al.*, 1997), anticolesterolémica (Hardwood *et al.*, 1993) e hipoglucemiante (Nasri y Salem, 2012). Además, también promueve la unión del FN κ B al DNA, lo cual promueve el efecto antiproliferativo asociado al cáncer (Corbiere *et al.*, 2003). La clorogenina, otra saponina esteroideal induce toxicidad contra células leucémicas promielocíticas humanas HL-60 (Yokosuka y Mimaki, 2009), y la β -clorogenina posee actividad anti-inflamatoria (Rodrigues *et al.*, 2011).

En lo que se refiere a las especies *A. tequilana* Weber y *A. angustifolia* Haw, es la primera vez que se reporta la actividad antiinflamatoria del extracto acetónico de dichas especies. En la actualidad sólo existen contados estudios que hacen referencia a cerca de alguna actividad farmacológica de estas plantas. Por ejemplo, se demostró que *A. angustifolia* ssp. *tequilana* disminuye los niveles de colesterol y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) séricas y también la esteatosis hepática, sin embargo estos efectos se atribuyen a los fructanos de la planta (Rendón *et al.*, 2012).

Por lo tanto, es probable que la capacidad anti-inflamatoria de estos dos Agaves este también en función de su contenido de saponinas, ya que los datos en la literatura mencionan que los miembros pertenecientes a este género poseen una variedad de saponinas esteroidales como hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina,

sarsasapogenina, texogenina, esmilagenina, gitogenina, tigogenina y clorogenina (Hernández *et al.*, 2005). Agavesido C (Girish *et al.*, 1991) entre otras.

Uno de los parámetros fuertemente asociados a la EA es la neurodegeneración de células colinérgicas, lo cual favorece la progresiva pérdida de memoria, ya que como se mencionó anteriormente, la neurotransmisión colinérgica es necesaria para los procesos de memoria y aprendizaje. De aquí que parte de la terapéutica aceptada para esta enfermedad, se basa en la administración de fármacos que intentan mejorar la neurotransmisión de este sistema, tal es el caso de los Inhibidores de la enzima AChE, cuya función principal es degradar rápidamente a la AChI, bloqueando la neurotransmisión colinérgica.

Se ha demostrado que extractos y fracciones de plantas medicinales son capaces de inhibir la actividad de esta enzima, lo cual promueve un incremento en la transmisión colinérgica que en la EA se encuentra sumamente deteriorada. Además, limitan la inflamación asociada y mejoran la memoria, síntoma cardinal en la enfermedad.

Se sabe que en pacientes con la EA la actividad de esta enzima se incrementa, lo cual constituye un factor de deterioro del sistema colinérgico. Sin embargo, aparentemente nuestros resultados no concuerdan con los parámetros fisiopatológicos de la EA, debido a que el LPS está bloqueando la actividad.

Se ha observado en diferentes ensayos de neuroinflamación inducida con LPS que la actividad de AChE aumenta (Tyagi *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2010), la incongruencia entre nuestros resultados y los reportados se puede explicar por la estrategia experimental empleada, los autores de dichos trabajos emplearon un modelo que no fue crónico y la administración del LPS fue vía intracerebroventricular (icv) en rata por lo tanto, la inflamación se encontraba localizada en el cerebro; mientras que

nosotros realizamos una aplicación crónica i.p. la cual activa múltiples vías de inflamación en todo el organismo.

Por otro lado, cabe mencionar que la administración del LPS altera la BHE, y por lo tanto, pudo haber producido inflamación cerebral, de tal manera que la neurodegeneración generada fue de tal nivel, que ocasionó la muerte de neuronas colinérgicas así como también un deterioro de los mecanismos de neurotransmisión incluyendo la concentración y/o actividad de la AChE.

En nuestro ensayo, la Indometacina no indujo algún tipo de inhibición sobre AChE, en congruencia con estos resultados, existe un estudio de 1997, en el que se evaluó la actividad de la enzima AChE sobre bronquios y homogenados de células epiteliales bronquiales de cerdo. Cuando se incubaron estos tipos de muestra con Indometacina, la actividad de AChE aumentó en un 21 y 54 %, respectivamente (Taisne *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que la administración de LPS activa la síntesis de óxido nítrico tanto en la periferia como en el sistema nervioso central, y el estrés oxidante es un importante mediador del daño cerebral durante la inflamación sistémica (la cual ocurre con la administración de LPS), entonces el resultado es la oxidación cerebral, inflamación y neurodegeneración. En el presente trabajo uno de los objetivos fue evaluar la actividad oxidante en homogenado de cerebro de aquellos animales que recibieron LPS y de los tratamientos, por lo que se midió la actividad de la enzima antioxidante Glutathion Reductasa y la enzima pro oxidativa NADPH oxidasa.

Los resultados de GR mostraron una mayor actividad de dicha enzima en el grupo de daño (control negativo) que aquellos del grupo control basal. Lo anterior puede ser debido a que si bien se sabe que el cerebro en la EA se encuentra bajo un estrés oxidativo, las células de la microglia, astrogliya y neurales responden a dicho

estado de forma dual, es decir, se sintetizan y segregan moléculas moduladoras que favorecen el estrés oxidativo pero también durante dicho proceso, responden enzimas de defensa antioxidantes con el fin de disminuir EROS producidos durante dicho proceso, entre ellas GR (Markesbery, 1997). Existen reportes que establecen que la actividad de Glutación Peroxidasa (GP) y GR se incrementa significativamente en hipocampo y corteza temporal en la EA (Lovell *et al.*, 1995).

Por otro lado, Hashimoto *et al.*, (2002) reportan que en la corteza cerebral de ratas con estrés oxidante inducido con β A 1-40 y tratadas v.o. con 300 mg/Kg de DHA, ácido graso del cerebro que participa en la mejoría de la memoria, mostraron niveles reducidos de GR.

Las especies de Agave evaluadas en este trabajo experimental incrementaron la actividad de GR, dato que es consistente con lo reportado en la literatura para varios compuestos naturales de diferentes sistemas biológicos para GR, así como otras enzimas antioxidantes en diversos ensayos de inducción de estrés oxidante.

En este sentido, se puede mencionar la evaluación de saponinas totales de *Taraphochlamys affinis* en un modelo de estrés oxidativo inducido con CCl₄ en células hepáticas, las saponinas de esta planta tuvieron la capacidad de revertir el daño inducido por CCl₄ al aumentar significativamente la actividad enzimática de Catalasa, GP y GR en hígado, disminuir los niveles de peroxidación lipídica así como de algunos mediadores inflamatorios como iNOS, Prostaglandina E₂, COX-2 y TNF α (Huang *et al.*, 2012).

Mediante el mismo ensayo de inducción de estrés oxidativo crónico en riñón, se observó que la fracción metanólica de *Oxalis corniculata* la cual esta compuesta principalmente por flavonoides, alcaloides, terpenos, esteroides y saponinas fue capaz

de inhibir la expresión de iNOS y FN-κB así como de aumentar la actividad de enzimas antioxidantes, entre ellas GR (Khan y Zehra, 2013).

En células RAW 264.7 estimuladas con LPS con un previo tratamiento del extracto metanólico y acuoso de *Taraxcum officinale* G. H. Weber, se observó una disminución en la producción de ON al inhibirse a iNOS y FN-κB mientras que aumentó la actividad de enzimas antioxidantes como GR (Park *et al.*, 2011).

La enzima NADPH oxidasa aumenta su actividad promoviendo el estrés oxidante al participar en la producción de especies reactivas de oxígeno (Taille *et al.*, 2004; Nobuhisa *et al.*, 2006). Sin embargo, eso no fue lo que mostró nuestro estudio, ya que el grupo control negativo (considerado como grupo de daño), tuvo menor actividad de dicha enzima con respecto al grupo control basal.

Sin embargo, durante los procesos pro-inflamatorios que promueven la aparición de la EA, se activan varias cascadas de señalización en presencia de moléculas como LPS, ya que éste altera la estructura y por lo tanto, la función de determinadas moléculas. Además, también compromete la estabilidad de la BHE porque aumenta la permeabilidad de moléculas desde y hacia el cerebro lo cual puede producir efectos adversos y duales.

De acuerdo a lo anterior, la actividad de la enzima pro-oxidativa NADPH oxidasa depende del acoplamiento del complejo proteico que la constituye. NOX₂ es uno de los componentes de dicho conjunto y se expresa en células endoteliales de la microvasculatura así como en macrófagos, y una vez activa, se encarga de producir aniones superóxido, desencadenando una serie de eventos que conducen a la sobre producción de EROS. Taille *et al.*, (2004), reportaron que la sobre expresión de enzimas como la hemo oxigenasa en macrófagos activados, puede producir una disminución en la actividad de NADPH oxidasa al disminuir la expresión de NOX₂.

La activación de NOX₂, depende del acoplamiento de otros componentes del complejo ubicados en el dominio intracelular, la proteína p22^{phox} que juega un importante papel al estabilizar a NOX₂ porque facilita el acoplamiento con p47^{phox}, lo cual activa por completo la actividad oxidasa (Nobuhisa *et al.*, 2006).

Más aún, p47^{phox}, posee una región autoinhibidora (AIR) (Bao *et al.*, 2001), y algún estímulo externo (como el LPS), podría inhibir o estimular el acoplamiento y activación del complejo NADHP oxidasa.

Actualmente, se ha demostrado que se puede inhibir esta enzima al interferir la interacción molecular de NOX₂ y p47^{phox} empleando pequeños péptidos semejantes a aquellos de la región de unión entre ambas moléculas (Rey *et al.*, 2001).

En este sentido, bajo algunos estímulos como el LPS, se activa al endotelio y a los macrófagos, y algunos compuestos farmacológicos pueden actuar sobre p47^{phox} previniendo su fosforilación activadora y evitando la traslocación del complejo hacia la membrana celular y bloquear la función oxidasa (Selemidis *et al.*, 2008).

Por otro lado, los resultados observados en el grupo control positivo (Indometacina 5mg/Kg), fueron de los más altos entre los diferentes grupos. La Indometacina, como ya se mencionó, es un antiinflamatorio no esterooidal empleado ampliamente en la medicina clínica y en estudios de toxicidad, sin embargo, la administración crónica de éste, ha mostrado que causa daños en la mucosa gastrointestinal (Kaplan *et al.*, 2012) lo cual limita su empleo. Indometacina tiene la capacidad de inhibir la actividad de enzimas involucradas en los procesos inflamatorios, COX-1 y COX-2, enzimas clave para la producción de prostaglandinas (moléculas inflamatorias), además de que se sabe que afecta la fosforilación oxidativa (Jacob *et al.*, 2001).

Basivireddy *et al.*, (2002) establecieron que en enterocitos, la administración única de 40 mg/Kg de Indometacina produjo daños en el proceso de respiración celular, lo cual indica una disfunción mitocondrial. También se pudo observar peroxidación lipídica evidenciándose que la Indometacina produjo un daño oxidativo.

En la literatura, existen más estudios que relacionan el daño y por lo tanto, la disfunción de la membrana mitocondrial producido por la Indometacina (Buttke y Sandstrom, 1994) y que dicho daño se debe a la generación de EROS, las cuales conducen a la apoptosis de neuronas (Busciglio y Jankner, 1995). Por lo tanto, dicho daño puede ser consecuencia de un efecto directo de la Indometacina en el organelo, causando una sobreproducción de EROS que afecta a la actividad mitocondrial.

En nuestros resultados, los tratamientos de *A. americana* L., *A. tequilana* Weber. y *A. angustifolia* Haw, muestran una actividad enzimática de NADPH oxidasa menor a aquella observada en aquellos individuos del grupo control basal.

Estos datos indican que los extractos acetónicos de estas especies de Agave poseen compuestos que pueden inhibir en algún punto el acoplamiento de las subunidades que activan a NADPH oxidasa, o por otro lado, disminuir a nivel pre o post transcripcional la expresión de alguno de los componentes de dicho complejo. O simplemente inducir la síntesis de moléculas que promuevan la protección más que la degeneración neural.

Entre los compuestos químicos presentes en el género Agave mencionados en otros capítulos, se pueden encontrar saponinas triterpénicas y esteroidales que presentan una gran variedad de actividades, entre ellas la anti-inflamatoria y la antioxidante, por ejemplo, Jeong *et al.*, (2013) trataron células de la microglia con Lancemósido A (5, 10 y 20 μ M), saponina triterpénica aislada de *Codonopsis lanceolata*, durante una hora y posteriormente se estimularon con LPS (100 ng/ml) durante 16 hrs y encontraron que

además de inhibir moléculas que se involucran con el estrés oxidativo como algunas IL y COX-2, también produjo la inhibición de componentes de membrana y citosólicos de NADPH oxidasa, ya que inhibió la fosforilación activadora y la expresión de p47^{phox} y por otro lado la inhibición del RNAm de p67^{phox}.

Por otro lado, Akebia saponina D, aislada de *Dipsacus asper* Wall, inhibe la apoptosis neural asociada a la inflamación y estrés oxidativo, al disminuir la regulación de Bax (proteína pro-apoptótica) y sobre regular la expresión de Bcl₂, proteína anti-apoptótica (Xing, *et al.*, 2012).

Más aún, las saponinas panaxatriol (PTS), una de las fracciones biológicas más activas de *Panax notoginseng*, planta que protege contra trastornos cerebro vasculares mediante la supresión de trombosis cerebral al disminuir la viscosidad sanguínea (Liu *et al.*, 2007), además de reducir el edema cerebral en ratas (Yao y Li, 2002), es neuroprotectora, ya que induce e incrementa la expresión de Thioredoxina-1 (Trx-1), molécula citoprotectora contra el estrés oxidativo, porque es un secuestrador de radicales libres como oxígeno singlete, OH y H₂O₂; se considera un factor neurotrófico en neuronas colinérgicas centrales ya que promueve la transducción de señales del Factor de Crecimiento Neural (NGF por sus siglas en inglés), el cual se disminuye en trastornos neurodegenerativos, también inhibe enzimas quinasas reguladoras de la apoptosis como ASK-1, además de ser inhibidor del FN-κB activado por TNFα e IL-1β (Luo *et al.*, 2011).

En este sentido, la literatura reporta la actividad antioxidante significativa que posee Apocinina, compuesto aislado de las raíces de *Picrorhiza kurroa*, debido a que puede inhibir a NADPH oxidasa en neutrófilos (Van den Worm *et al.*, 2001) y disminuir la producción de superóxido. Apocinina preserva la estabilidad de la BHE (Yenari *et al.*, 2006). Se ha demostrado que también reduce la traslocación de p22^{phox} en la membrana

plasmática, por lo tanto, la unión con p47^{phox} y la subsecuente activación de NADPH oxidasa, además de prevenir la muerte neural inducida con TBI e inhibir la activación de la microglia (Choi *et al.*, 2012).

Por otro lado, la endotoxemia inducida con LPS es un modelo útil en el establecimiento de inflamación sistémica y daño en la función cerebral, asociada a un fuerte estado pro-inflamatorio.

El cerebro de ratones con daño, que recibieron sólo LPS y vehículo, presentó un aumento significativo en la concentración de las citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF γ . Estas citocinas juegan un importante papel en mediar la respuesta inflamatoria y facilitan la comunicación entre el sistema inmune, el endocrino y el nervioso (Watkins *et al.*, 1995). Estos resultados concuerdan con la literatura en la que se menciona que la administración local (vía i.c.v.) de 50 μ g de LPS induce un incremento de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β (Tyagi *et al.*, 2010).

Los resultados aquí presentados, indican que el modelo de neuroinflamación inducida por LPS corrobora lo ya establecido en la literatura. Se puede observar que la Indometacina, el fármaco usado como control positivo, provoca el efecto anti-inflamatorio ya descrito. Esta sustancia fue capaz de modular la concentración cerebral de al menos tres de las citocinas pro-inflamatorias analizadas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α), ya que se observó que los animales administrados con Indometacina redujeron la concentración de dichas moléculas.

De manera contraria a lo esperado, ninguno de los tratamientos derivados de los Agaves provoca cambios en la concentración de IL-1 β e IL-6, en comparación al grupo de daño. Es probable que los compuestos presentes en los Agaves no tengan algún efecto sobre la modulación de la IL-6, o bien éstos estén modulando a la alta la concentración de esta molécula para inhibir a otras citocinas pro-inflamatorias, por

ejemplo, se ha reportado que la IL-6 inducida con el ejercicio, es capaz de inhibir la producción y por lo tanto, disminuir la concentración de el TNF- α en el plasma de humanos que se ejercitaron durante 3h y que posteriormente se les administró i.p. LPS (0.06 ng/Kg) (Starkie *et al.*, 2003).

Más aún, se ha reportado también que la IL-6 disminuye la concentración de el INF γ y de TNF- α , mediante el modelo de inflamación inducida con LPS. Incluso hay una correlación entre la IL-6 y el TNF α , ya que en los astrocitos, la primera se sobreexpresa en presencia de la segunda (Akiyama *et al.*, 2000).

La IL-6 forma parte de un grupo de citocinas que comparten una subunidad receptora (gp130) como componente crítico de la señal de transducción. El receptor soluble de la IL-6 (sIL-6R), aumenta la acción de gp130, y durante dicho proceso, se neutralizan las señales de IL-6. Se sabe que esta citocina, posee actividades biológicas duales dependiendo del estímulo o de su activación a nivel de receptores (Marz *et al.*, 1998).

Los resultados observados para el caso de IL-1 β , mostraron una elevada concentración con respecto al control Basal, una posible explicación para estos hallazgos pudiera ser la compleja regulación de esta molécula, la cual posee dos tipos receptores membranales, como resultado de la expresión de dos genes diferentes (Kaushik *et al.*, 2013).

El receptor tipo 1 (IL-1RI) se constituye de dos subunidades: la proteína receptora y una proteína accesoria. La señal intracelular se genera después que IL-1 β se une a la subunidad receptora y ésta a su vez se une a la proteína accesoria. Mientras que el tipo II (IL-1II) se le llama “receptor señuelo”, ya que tanto IL-1 β como IL-1 α se unen a este, pero con mayor afinidad para la primera y dicho receptor es incapaz de unirse a la proteína accesoria.

Rauschmayr *et al.*, (1997) demostraron que en ratones transgénicos que expresan constitutivamente IL-1RII en keratinocitos son más resistentes a la inflamación local, suponiendo entonces que el receptor tipo II participa más en proteger a las células contra estímulos inflamatorios.

Más aún, IL-1 β es considerada la citocina principal involucrada en activar el eje HPA para producir corticosterona y disminuir la producción de ON a través de la inhibición de la actividad de las enzimas Oxido Nítrico Sintasa neural y la Oxido Nítrico Sintasa inducible, dicha actividad es mediada por otro tipo de receptor para IL-1 β , conocido como el receptor antagónico (Gadek *et al.*, 2012). El receptor antagónico de IL-1 β actúa uniéndose a los receptores tipo I y II haciendo inaccesible la unión de IL-1 α ó IL-1 β a ellos (Koj, 1996). Por lo tanto podríamos considerar que la sobreproducción de ésta citocina en nuestro modelo crónico de inflamación inducida con LPS podría ser debido a la activación de respuestas anti-inflamatorias asociadas a los receptores tipo II ó antagónico, de hecho la estimulación de monocitos con LPS incrementa la concentración de IL-1 α ó IL-1 β así como su receptor antagónico (IL-1Ra) (Rokita *et al.*, 1997).

En este sentido no hay un efecto de los Agaves sobre este sistema. Recientemente, se mostró que una tetraciclina-3 modificada llamada COL-3 es capaz de disminuir la expresión de TNF- α en un modelo de endotoxemia con LPS, sin embargo de manera sorprendente no tiene efecto sobre IL-1 β . Los autores atribuyen la selectividad del efecto de este antibiótico a su posible farmacocinética (Edan *et al.*, 2013), pero en realidad el presente trabajo, nos mostró que no hay una clara evidencia farmacológica que nos indique la razón por la cual el tratamiento con algún el extracto acetónico de los Agaves utilizados, no modifique la concentración de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 o IL-1 β pero si el de TNF- α e IFN- γ .

Cabe señalar que las citocinas son importantes en la transmisión de las señales durante la respuesta inflamatoria, en las fases iniciales las células en las que se está llevando a cabo la reacción inflamatoria, pueden liberar citocinas como la IL-6 o IL-1 β . Pero una vez que los linfocitos y las células mononucleares acuden a la región inflamada, pueden ser activados por los antígenos y liberar citocinas propias, dentro de las que destacan TNF- α e IFN- γ , de tal forma que la expresión o liberación de éstas puede ser un curso temporal asociado al efecto que el LPS ejerce sobre las células efectoras, en nuestro caso sobre la microglia.

No obstante, si bien no se observó efecto de *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. americana* sobre la concentración de IL-6 o IL-1 β , si se observó un efecto modulador de la respuesta sobre las otras dos citocinas. Dicho efecto es debido a la composición química de estas especies vegetales, y se ha postulado que los principales compuestos capaces de actuar sobre la modulación en la concentración de las citocinas son las saponinas, las cuales pueden tener una acción aislada o sinérgica.

En la actualidad, existen reportes en la literatura en los que se indica un efecto inmunomodulador de las saponinas, por ejemplo Park *et. al.*, (2009), al estimular células microgliales con LPS (100 ng/ml) y tratarlas con extracto de Ginseng Rojo Koreano ó con saponinas totales del Ginseng, encontraron que se reducen los niveles de TNF- α inducidos por LPS, y una supresión significativa en la expresión del Factor Nuclear κ B (FN κ B) y MAP Kinasa, ambas son moléculas de señalización durante los procesos de inflamación.

Asimismo, Akebia saponina D, aislada de *Dipsacus asper*, ampliamente utilizada en China para el tratamiento de artritis y fracturas, moduló a la baja notablemente el incremento de TNF α , IL-1 β y COX 2 inducido por β -amiloide, a 90 y 270 mg/Kg en el cerebro de ratas Sprague-Dawley (Xing *et al.*, 2012).

Las Saponinas esteroideas totales de *Rhizoma anemarrhenae* administradas crónicamente (200 mg/Kg por ocho semanas v.o.) disminuyen notablemente la concentración de TNF- α inducido con estreptozotocina en homogenizados de cerebro y en suero en ratas (Liu *et al.*, 2012).

El daño inducido con Escopolamina en ratones (1 mg/Kg i.p.) aumentó la concentración de el TNF- α y la IL-1 β el doble con respecto al grupo control basal, sin embargo, el tratamiento con Timosaponina AIII a 20 y 40 mg/Kg v.o. indujo una potente inhibición sobre la expresión de dichas moléculas pro-inflamatorias 5 hr antes de la administración de la Escopolamina (Lee *et al.*, 2009).

En este sentido, las saponinas Panaxtriol (PTS) que constituyen una de las fracciones biológicamente activas de *Panax notoginseng*, planta que protege contra la isquemia cerebral en ratas al aliviar el edema cerebral y promover un incremento en la expresión de Trx-1, molécula que inhibe la activación del FN κ B y actúa como un factor neurotrófico en neuronas colinérgicas; promueve la transducción de señales del factor neurotrófico NGF (Nerve Growth Factor), el cual se ve disminuido o deficiente en trastornos neurodegenerativos como la EA, además de que estas saponinas inhiben a COX-2 (Wo *et al.*, 2011).

El ginsenósido-Re aislado de *Panax ginseng* inhibió la producción de el TNF- α y la IL-1 β en macrófagos murinos Raw 264.7 estimuladas con LPS (Paul *et al.*, 2012) además, Wang *et al.*, (2012) mostraron que el ginsenósido-Rd también inhibe al TNF- α y la IL-1 β en tejidos de pata inflamadas por carragenina y que dicho efecto podría deberse a que también inhibe al FN κ B esto a dosis desde 12.5 hasta 50 mg/Kg administrado intramuscular. El pre-tratamiento de células microgliales BV-2 con el ginsenósido Rg1 atenúa la sobre-activación de éstas inducida con LPS al disminuir la expresión de COX-2, FN κ B, TNF- α e IL-1 β .

Por otro lado, la administración de colinolíticos centralmente activos produce efectos importantes en diferentes actividades conductuales. La Escopolamina es un fármaco colinolítico que induce una disminución en los procesos de aprendizaje y memoria, además de que tiene su efecto biológico en el proceso de almacenamiento de la información. El ensayo de daño cognitivo inducido con escopolamina, se tomó de aquel propuesto por (Elrod y Buccafusco, 1988).

El control positivo empleado fue Galantamina, debido a que es un agonista de AChI, fue aislado de *Galantus nivalis* y es materia prima para elaborar fármacos como Nivalin[®] ya que facilita el proceso de aprendizaje facilitando la sinapsis colinérgica; modula alostéricamente los receptores nicotínicos de AChI además de incrementar la disponibilidad de AChI al inhibir a la enzima AChE (Heinrich y Teoh, 2004).

Sin embargo, a pesar de tener un mecanismo de acción dual para mejorar la memoria, los grupos de *A. tequilana* y *A. americana* tuvieron un mejor efecto al haber mostrado mayor tiempo en Lr. Lo anterior puede ser relacionado con sus componentes químicos, ya que se sabe que poseen una gran variedad de saponinas triterpénicas y esteroidales de las cuales existen una gran variedad de estudios a cerca de su actividad nootrópica.

Lee *et al.*, (2000) empleando la evitación pasiva como paradigma, evaluaron el contenido total de saponinas del ginseng rojo en comparación con Piracetam y N-metil-D-glucamina, fármacos nootrópicos y encontraron una actividad importante en la latencia de retención durante la administración aguda a 200 mg/kg con respecto a Piracetam (500 mg/kg) y en la administración crónica (7 días) a la misma concentración en comparación con N-metil-D-glucamina a 500 mg/Kg.

Wang *et al.*, (2006) evaluaron también saponinas totales de Ginseng (GS) a través de la evitación pasiva, pero en este caso el daño cognitivo fue inducido a través

de la administración i.c.v. en ratas de βA_{25-35} (50 μg). La administración crónica v.o. de GS (80 mg/Kg) tuvo una notoria mejoría en la memoria (Lr. 600 seg) con respecto al grupo control negativo (120 seg).

Timosaponina AIII y Sarsasapogenina saponinas esteroidales aisladas de *Anemarrhena asphodeloides* fueron evaluadas (40 mg/Kg v.o.) sobre el daño cognitivo inducido con Escopolamina (1mg/Kg i.p.) empleando el mismo paradigma y mostraron tener una actividad significativa al ser mayor el tiempo de retención con respecto al grupo control negativo (Lee *et al.*, 2009).

Sin embargo existen otros ensayos como el laberinto acuático de Morris y el laberinto en forma de Y, que son empleados para evaluar el efecto sobre el daño cognitivo de diversos compuestos. En este sentido, la Akebia saponina D, saponina triterpénica aislada de *Dipsacus asper* Wall indujo una reversión sobre el daño inducido con β -amiloide (10 μg i.c.v.) en los paradigmas antes mencionados a través de una administración crónica (28 días) a 90 y 270 mg/kg v.o. (Xing *et al.*, 2012)

Los mecanismos de acción a través de los cuales las saponinas actúan para reducir los daños inducidos a través de diferentes compuestos podría deberse a que poseen actividades biológicas variadas, que en conjunto protegen a las neuronas colinérgicas al disminuir la neuroinflamación e inhibir la apoptosis ya que se sabe que disminuyen la regulación de Bax (proteína proapoptótica) y sobre regulan a la proteína antiapoptótica Bcl2 (Xing *et al.*, 2012) además, se ha demostrado que los ginsenósidos Rb1 y Rg1,(saponinas del ginseng) poseen actividad neurotófica y neuroprotectora sobre neuronas colinérgicas, razón por la cual el Ginseng es una planta ampliamente utilizada para mejorar la memoria (Rudakewich *et al.*, 2001).

Como ya se mencionó anteriormente, la endotoxemia inducida con LPS es un modelo útil en el establecimiento de inflamación sistémica y daño en la función

cerebral, asociada a un fuerte estado pro-inflamatorio, pro-oxidante y que dichos aspectos fisiopatológicos inducidos, están asociados a que el LPS altera la estabilidad de la BHE, al aumentar la permeabilidad de la misma.

Los resultados obtenidos permitieron observar por un lado, que el estímulo inducido con la administración del LPS estableció un ambiente pro-inflamatorio y pro-oxidante. Y por otro lado, que el daño inducido con escopolamina altera los procesos de memoria y aprendizaje. De acuerdo a lo reportado en la literatura, existen varios estudios que coinciden con lo que nosotros estamos reportando y posiblemente alguno o algunos de los compuestos presentes en los extractos, como las saponinas, pueden estar respondiendo a dichos ambientes inducidos en el presente trabajo de investigación. Además es la primera vez que se reporta tales actividades en estas especies de Agave.

11. CONCLUSIONES.

Los resultados del presente trabajo experimental muestran por primera vez la importancia farmacológica que tienen las especies *Agave tequilana* F. A.C. Weber, *Agave angustifolia* Haw y *Agave americana* L. Marginata Hort. ya que presentaron actividades biológicas importantes que pueden ser utilizadas para el tratamiento de los procesos fisiopatológicos que se relacionan con la enfermedad de Alzheimer.

A través del modelo de inflamación inducida con la administración i.p. TPA y de neuroinflamación inducida con LPS empleado en el presente estudio se pudo establecer:

- Que *A. angustifolia* Haw y *A. tequilana* Weber poseen efecto anti-inflamatorio *in vivo* y que si bien para *Agave americana*, ya había sido reportado, este solo se atribuía a la mezcla de saponinas como hecogenina y tigogenina.
- El efecto anti-inflamatorio se debe también a la presencia del compuesto aislado y que fue identificado como Cantalasonina-1.
- El efecto protector contra el daño inducido con LPS (*Agave tequilana* Weber y *Agave americana* L).
- *A. angustifolia* Haw inhibe a AChE, enzima involucrada en el progreso de la EA.
- *A. tequilana* Weber, *A. angustifolia* Haw y *A. americana* L promueven de promover la actividad *in vitro* de la enzima antioxidante GR y disminuir aquella que asociada con la detonación del estrés oxidativo, NADPH oxidasa en homogenizados cerebrales con daño inducido con LPS.
- Que los diferentes Agaves modulan la concentración de citocinas pro-inflamatorias *in vitro* a la alta de IL-6 e IL-1 β y a la baja de TNF- α e INF γ en homogenizado cerebral.
- Además, mejoran significativamente el deterioro cognitivo inducido con Escopolamina evaluado *in vivo* a través del paradigma de Evitación Pasiva.

12.PERSPECTIVAS.

A partir del desarrollo experimental del presente trabajo, podrían surgir varias ideas nuevas con las cuales trabajar como por ejemplo, debido a que la saponina esteroideal aislada de *A. americana* solo fue evaluada para ver su probable inhibición sobre el edema auricular inducido con TPA, se podría someter dicho compuesto a evaluación biológica sobre:

La actividad enzimática de la enzima β -secretasa, la cual es encargada de la producción de los agregados de β -amiloide.

En este mismo sentido, evaluar el efecto que puede presentar sobre los daños que induce el β -amiloide en el sistema nervioso central como por ejemplo, la actividad antioxidante y de de inhibición sobre AChE.

Asi mismo, determinar su efecto sobre la síntesis de moléculas inflamatorias como Citocinas pro-inflamatorias, Prostaglandinas y Leucotrienos.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Abbot, N., Ronnback, L. y Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain-barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:41-53.
2. Abdel, M., Miyase, T., Melek, F., el-Shabraway, O., Mahmoud, II. y Mina, S. 2002. New steroidal saponins from *Agave lophantha* Schiede and their pharmacological evaluation. *Pharmazie.* 57:562-6.
3. Aguilar, A., Camacho, J., Chino S., Jáquez, P. y López, M. 1994. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social: Información Etnobotánica.* Instituto Mexicano del Seguro Social: D.F., México.
4. Aid, S., Langenbach, R., Yomberg Bosetti, F. 2008. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2. *J. of Neuroinflamm.* 5:17
5. Akira, S., Taga, T. y Kishimoto, T. 1993. IL-6 in biology and medicine. *Advances in Immunology.* 54: 1-78.
6. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole G, Cooper M, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich B, Finch C, Frautschy S, Griffin W, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie I, McGeer P, O'Banion M, Patcher J, Passinetti G, Plata C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel F, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wiss-Coray T. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 21: 383-421.
7. Alvarez, O., Vega, I., Sierra, V., Caballero, B., Tomás, C., Camins, A., García, J., Pallás, M. y Coto, A. 2006. Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology.* 7: 43-52.

8. Alzheimer's Association. 2009. Alzheimer's disease facts and figures..
Alzheimer's and Dementia. 5:234-2
9. Annane, D. 2009. Hippocampus: A future target for sepsis treatment. *Intensive Care Med*. 35:585-586
10. Antel, J., Becher, B. y Owens, T. 1996. Immunotherapy for multiple sclerosis: from theory to practice (comment). *Natural Medicine*. 2:1074-1075.
11. Aswal, B., Bhakuni, D., Goel, A., Kar, K., Mehrotra, B. y Mukherjef, K. 1984. Screening of Indian plants for biological activity: Part X. *Indian Journal of experimental Biology*. 22:312-332.
12. Banks, W., Moinuddin, A. and Morley, J. 2001. Regional transport of TNF-alpha across the blood-brain barrier in young ICR and young and aged SAMP8 mice. *Neurobiology of Aging*. 22:671-676.
13. Bao, J., Sato, K., Li, M., Gao, Y., Abid, R., Aird, W., Simons, M. y Post, M. 2001. PR-39 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteosoma-mediated I kappa B alpha degradation. *American Journal of Physiology Heart and circulatory physiology*. 28:H2612-H2618.
14. Barger, S. y Harmon, A. 1997. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature*. 388: 878-881.
15. Basivireddy, J., Vasudevan, A., Jacob, M. y Balasubramanian, K. 2002. Indomethacin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in villus enterocytes. *Biochemical Pharmacology*. 15:339-349.
16. Batti, L. y O'Connor, J. 2010. Tumor necrosis factor- α impairs the recovery of synaptic transmission from hypoxia in rat hippocampal slices. *J. of Neuroim.* 218: 21-27.

17. Behl, C., Davis, B., Lesley, R. y Schubert, D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell*. 77: 817-827.
18. Bermejo, F., Benito, J., Vega, S., Medrano, M. y Román, G. 2008. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J. Neurol. Sci.* 264: 63–72.
19. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. D.R. 2009. Hecho en México.<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7588>
20. Black, P. 2003. The inflammatory response is an integral part of the stress response: implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain Behav. Immun.*17:350-364.
21. Blomberg L. 2000. Tequila, mezcal y pulque: lo auténtico mexicano. Ed. Diana. Primera Ed. México. 23-57.
22. Blunden, G., Carabot, C. y Cripps, A.1980. Ruizgenin, a new steroidal sapogenin diol from *Agave lechugilla*. *Steroids*. 35:503-510.
23. BOLETIN INFORMATIVO de la FEDERACIÓN MEXICANA DE ALZHEIMER, A.C. Abril - Mayo - Junio, 2009 / Año 2, No. 5
24. Braak, H. y Braak, E. 1995. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging*. 16 (3): 271-278.
25. Brown, A., Baltan, Tekkok ,S. y Ransom, B. 2004. Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochem Int.* 45: 529–36
26. Busciglio, J. y Jankner, B. 1995. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's síndrome neurons *in vitro*. *Nature*. 378: 776-779.

27. Butterfield, D., Hensley, K., Cole, P., Subramaniam, R., Aksenov, M., Aksenova, M., Brummer, P., Haley, B. y Carney, J. 1997. Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 68:2451-2457.
28. Buttke, T. y Sandstrom, P. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*. 15:7-10.
29. Calvello, R., Panaro, M., Carbone, M., Cianciulli, A., Perrone, M., Vitale, P., Malerba, P. y Scilimati, A. 2012. Novel selective COX-1 inhibitors suppress neuroinflammatory mediators in LPS-stimulated N13 microglial cells. *Pharmacological Research*. 65(1): 137-148.
30. Chan, T., Hughes, S., Baxter, L., Rosinova, E., McGregor, I., Morcos, Y., van Nieuwenhuyzen, P. y Hu, P. 2007. Inflammation and breakdown of the blood-retinal barrier during "physiological aging" in the rat retina: a model for CNS aging. *Microcirculation*. 14:63-76.
31. Chavarria, A. y Alcocer, J. 2004. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmunity Reviews* 3. 2251– 2260.
32. Chen, P., Chen, C., Kuo, C., Lee, T., Kuo, Y. y Lee, C. 2011. Cytotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. *Planta Medica*. 77: 929-933
33. Chen, Y. y Swanson, R. 2003. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 23: 137-149.
34. Choi, B., Jang, B., Kim, J., Lee, B., Sohn, M. Song, H. y Suh, S. 2012. Prevention of traumatic brain injury-induced neuronal death by inhibition of NADPH oxidase activation. *Brain Research*. 1481: 49-58.

35. Cirrito, J., Deane, R., Fagan, A., Spinner, M., Parsadanian, M., Finn, M., Jiang, H., Prior, J., Sagare, A., Bales, K., Pau, S., Zlokovic, B., Piwnicka, D., y Holtzman, D. 2005. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation*. 115: 3285-3290.
36. Clementi, M., Pezzotti, M., Orsini, F., Sampaiolese, B., Mezzogori, D., Grassi, C., Giardina, B. y Misti, F. 2006. Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42) induces cell death in human neuroblastoma via Bax/Bcl ratio increase: An intriguing role for methionine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 342:206-213.
37. Corbiere, C., Liagre, B., Bianchi, A., Bordii, K., Dauca, M., Netter, P. y Beneytout, J. 2003. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *International Journal of Oncology*. 22(4): 899-905.
38. da Silva, B. y Parente J. 2005. A new bioactive steroidal saponin from *Agave shrevei*. *Z Naturforsch [C]*. 60(1-2):57-62.
39. da Silva, B., de Sousa A., Silva, G., Mendes, T. y Parente J. 2002. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Z Naturforsch*. 57:423-428.
40. Dantzer, R. 2004. Cytokine-induced sickness behavior a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol*. 500:399-411.
41. De Keyser, J., Mostert, J. y Koch, M. 2008. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci*. 267: 3-16
42. Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., La Rue, B., Guo, H., Wu, Z., Holtzman, D. y Zlokovic, B. 2005. IgG-assisted age-dependent clearance of

- Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. *Journal of Neuroscience*. 14: 11495-11503.
43. Deane, R., Wu, Z. y Zlokovic, B. 2004. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates Alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*. 35: 2628-2631.
44. Del Campo, M. 1938. El pulque en México precortesiano. *Anales del Instituto de Biología, UNAM. México*. 9:1-14.
45. Desai, B., Monahan, A., Carvey, P. y Hendey, B. 2007. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell transplantation*. 16: 285-299.
46. Dewitt, D., Perry, G., Cohen, M., Doller, C. y Silver, J. 1998. Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. 149:329-340.
47. Ding Y, Tian RH, Yang CR, Chen YY, Nohara T. 1993. Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong No. 1. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 41(3):557-60.
48. Dubois, B., Feldman, H., Jacova, C., Cummings, J., Dekoski, S., Barberger, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N., Galasko, D., Gauthier, S., Hampel, H., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Sarazin, M., de Souza, L., Stem, Y., Visser, P. y Scheltens, P. 2010. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *The lancet Neurology*, 9 (11): 1118-1127

49. Edan, R., Luqmani, Y. y Masocha, W. 2013. COL-3, A chemically modified tetracycline, inhibits lipopolysaccharide-induced microglia activation and cytokine expression in the brain. *PLoS One*. 8: e57827. doi: 10.1371.
50. Eikelenboom, P. y van Gool, W. 2004. Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 111 : 281-294.
51. Elrod, K. y Buccafusco, J. 1988. An evaluation of the mechanism of Scopolamine-induced impairment in the two passive avoidance protocols. *Pharmacology Biochemistry & Behaviour*. 29: 15-21.
52. Fang, C., Wu, W., Liu, Q., Sun, X., Ma, Y., Zhao, Y. y Li, Y. 2010. Dual functions of β -amyloid oligomer and fibril in Cu (II)-induced H_2O_2 production. *Regulatory Peptides*. 163:1-6.
53. FAO Food and Nutrition Paper 14/7 Roma, 1986.
54. Ferri, C., Prince, M. y Brayne, C. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 366: 2112-2117.
55. Gabbita, S., Subramaniam, R., Allouch, F., Carney, J. y Butterfield, D. 1998. Effects of mitochondrial respiratory stimulation on membrane lipids and proteins: an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochimica et Biophysica*. 1372: 163-173.
56. Gadek, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., Spyрка, J. y Bugajski, J. 2012. Brain nitric oxide synthases in the interleukin-1 β -induced activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacological Reports*. 64:1455-1465.
57. García M. "Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México". 1995. En Linares, E., Dávila, F. Chiang, R. y T. Elías (Comp.). Conservación de Plantas en Peligro de Extinción: Diferentes Enfoques. UNAM, México. 51-75.

58. García, M., Quílez, A., Sáenz, M., Martínez, M. y de la Puerta, R. 2000. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 71: 395–400.
59. Gazulla, J. y Cavero, M. 2006. Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol.* 42 (7): 427-432.
60. Gentry H. 1982. Agaves of Continental North America. Ed. Universidad de Arizona. 1ª Ed. U.S.A. 1982; 1-13.
61. Girish, G., Agrawal, P., Sati, P. y Thakur, R. 1991. Agaveside C, a steroidal glycoside from *Agave cantala*. *Phytochemistry.* 30(4): 1336-1339.
62. González A y Rodríguez R. 2000. Plantas americanas para la España ilustrada. Génesis, desarrollo y ocaso del proyecto español de expediciones botánicas. Editorial complutense. Madrid, España. 25-37.
63. Grammas P, Ovase R. 2002. Cerebrovascular TGF- β contributes to inflammation in the Alzheimer's brain. *American Journal of Pathology.* 160:1583-1587.
64. Granados D. Los Agaves en México. 1999. Universidad Autónoma de Chapingo. Primera Impresión. México. 54-78.
65. Gurib, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Asp. Med.* 27:1-93
66. Hardwood, H., Chandler, C., Pellarin, L., Bangerter, F., Wilkins, R., Long, C., Cosgrove, P., Malinow, M., Marsetta, C., Pettini, J., Savoy, Y. y Maynet, J. 1993. Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin P-tigogenin in cellobioside (CP-88818; tiqueside)1. *Journal of lipid research.* 34: 377-395.
67. Heinrich, M. y Teoh, H. 2004. Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology.* 92: 147-162.

68. Hermon, M., Cairns, N., Egly, J., Fery, A., Labudova, O. y Lubec, G. 1998. Expression of DNA excision-repair-cross-complementing proteins p80 and p89 in brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 251(1): 45-48.
69. Hernández R, Lugo E, Díaz L. y Villanueva S. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave Lechugilla* Torrey. *E-Gnosis* (online) 3:11-16.
70. Huang, Q., Zhang, S., Zheng, L., He, M., Huang, R. y Lin, X. 2012. Hepatoprotective effects of total saponins from *Taraphochlamys affinis* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 50:713-718.
71. Huang, X., Atwood, C., Hartshorn, M., Multhaup, G., Goldstein, L., Scarpa, R., Cuajungco, M., Gray, D., Lim, J., Moir, R., Tanzi, R. y Bush, A. 1999. The amyloid- β -peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry*. 38: 7609-7616.
72. Indrayanto G, Studiawan H Cholies N. 1994. Isolation and quantitation of manogenin and kammogenin from callus cultures of *Agave amaniensis*. *Phytochemistry Anal*. 5:24-26.
73. INEGI. XII Censo General de Población y Vivienda, 2000.
74. Jacob, M., Bjarnason, I. y Simpson, J. 2001. Effects of indomethacin on energy metabolism in rat and human jejuna tissue *in vitro*. *Clinical Science*. 101: 493-498.
75. Jaeger, L., Dohgu, S., Sultana, R., Lynch, J., Owen, J., Erickson, M., Shah, G., Price, T., Fleegal, M., Butterfield, A. y Banks, W. 2009. Lipopolysaccharide

- alters the blood-brain barrier transport of amyloid β protein: A mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*. 23:509-517.
76. Jellinger, K. 2007. The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia. *Acta Neuropathologica*. 113: 349-388.
77. Jeong, Y., Jung, J., Le, T., Kim, D. y Kim, H. 2013. Lancemoside A inhibits microglial activation via modulation of JNK signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 431: 369-375.
78. Jin, J., Liu, K. y Yang, C. 2003. Three new hecogenin glycosides from fermented leaves of *Agave americana*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 5(2):95-103.
79. Jin, J., Liu, X. y Yang, C. 2002. Three new hecogenin glycosides from fermented leaves of *Agave americana*. *J Asian Nat Prod Res*. 5(2):95-103.
80. Jin, J., Zhang, Y. y Yang, C. 2004. Four new steroid constituents from the waste residue of fibre separation from *Agave americana* leaves. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 52(6):654-8.
81. Kaplan, k., Odabasoqlu, F., Halici, Z., Cadirci, E., Atalay, F., Aydin, O. y Cakir, A. 2012. Alpha-lipoic acid protects against indomethacin-induced gastric oxidative toxicity by modulating antioxidant system. *Journal of Food Science*. 77:224-230.
82. Kaushik, D., Thounaojam, M., Kumawat, K., Gupta, M. y Basu, A. 2013. Interleukin-1 β orchestrates underlying inflammatory responses in microglia via Kruppel-like factor 4. *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/jnc.12382. [Epub ahead of print]

83. Khan, M. y Zehra, H. 2013. Amelioration of CCl₄-induced nephrotoxicity by *Oxalis corniculata* in rat. *Experimental and toxicologic pathology*. 65:327-334.
84. Kniesel, U. y Wolburg, H. 2000. Tight junctions of the blood-brain-barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20:57-76.
85. Koj, A. 1996. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1317: 84-94.
86. Kose, N., Asashima, T., Muta, M., Lizasa, H., Sai, Y. y Terasaki, T. 2007. Altered expression of basement membrane-related molecules in rat brain pericyte, endothelial and astrocyte cell lines after transforming growth factor-beta 1 treatment. *Drug Metabolic Pharmacokinetics*. 22: 255-266.
87. La Rue, B., Hogg, E., Sagare, A., Jovanovic, S., Maness, L., Maurer, C., Deane, R. y Zlokovic, V. 2004. Method for measurement of the blood-brain barrier permeability in the mouse brain: application to amyloid-beta peptide in wild type and Alzheimer's Tg2576 mice. *Journal of Neuroscience Meth.* 138: 233-242.
88. Laduzek, K., Kowalski, J., Gabryel, B. y Herman, Z. 2005. Chlorpromazine and loxapine reduce interleukin 1 and interleukin -2 release by rat mixed glial and microglial cell cultura. *Europ. Neuropsy.* 15(1):23-30.)
89. Lee, B., Jung, K. y Kim, D. 2009. Timosaponin AIII isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, ameloriates learning and memory deficits in mice. *Pharmacology and Biochemistry Behavior*. 93: 121-127.
90. Lee, J., Lee, Y., Yuk, D., Choi, D., Ban, S., Oh, K. y Hong, J. 2008. Neuroinflammation induced by lipopolisaccharide causes cognitive impairment

- through enhancement of beta-amyloid generation. *Journal of neuroinflammation*. 5:37
91. Lee, S., Moon, Y. y You, K. 2000. Effects of red ginseng saponins and nootropic drugs of impaired acquisition of ethanol-treated rats in passive avoidance performance. *Journal of Ethnopharmacology*. 69: 1-8.
92. Li, Y., Liu, L. y Kang, J. 2000. Neuronal-glia interactions mediated by il-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *Journal of Neuroscience*. 20:149-155.
93. Licastro, F., Grimaldi, L., Bonafé, M., Martina, C., Olivieri, F., Cavallone, L., Giovanietti, S., Masliah, E. y Franceschi, C. 2003. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiology of Aging*. 24: 921-926.
94. Liu, B. y Hong, J. 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharm. Exp. Ther.* 304: 1-7.
95. Liu, C., Wang, C., Liu, P. y Feng, Q. 2007. Analyze on curative effect of PTS in treatment of 116 cases of cerebral infraction. *Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine*. 30:6-7.
96. Liu, Y., Zhu, X., Lu, Q., Wang, J., Li, W., Wei, Y. y Yin, X. 2012. Total saponins from *Rhizoma anemarrheneae* ameliorate diabetes-associated cognitive decline in rats: Involvement of amyloid-beta decrease in brain. *Journal of Ethnopharmacology*. 139:194-200.

97. López, M., Mancilla, N. y Mendoza, G. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var azul . *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51: 7835-7840.
98. Lovell, M., Ehmman, W., Buttler, S. y Markesbery, W. 1995. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in the Alzheimer's disease. *Neurology*. 45:1594-1601.
99. Lozoya, X.; Lozoya, M. 1982. *Flora Medicinal de México. Primera parte: Plantas Indígenas*; IMSS: D.F., México.
100. Lukiw, W. y Bazan, N. 2000. Neuroinflammatory signalling upregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 25: 1173-1184.
101. Luo, F., Wang, S., Qui, L., Song, N., Lv, T. y Bai, J. 2011. Protective effect of Panaxatriol saponins extracted from *Panax notoginseng* against MPTP-induced neurotoxicity in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*. 13: 448-453.
102. Luterman, J., Haroutunian, V., Yemul, S., Ho, L. y Purohit, D. 2000. Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Arch. Neurol.* 57 : 1153-1160.
103. Mancilla, N. y López M. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:7832-7839
104. Marker R, Wagner R, Ulshafer E, Wittbecker D, Goldsmith J, Ruof C. 1943. Isolation and structures of thirteen new steroidal sapogenines. New sources for known sapogenins. *J. Am. Chem. Soc.* 65: 1199-1208.
105. Marker, R. y López, J. 1947. Structure of sapogenin glycosides. *J. Am. Chem. Soc.* 69: 2375-2389.

106. Markesbery, W. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology*. 23:134-147.
107. Martin, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M. y Fruscella, P. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell. Biol.* 142:
108. Marz, P., Cheng, J. y Gadiant, R. 1998. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 3251-3256.
109. McDonald, D., Brunden, K. y Landreth, G. 1997. Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide formation in microglia. *Journal of Neuroscience*. 17: 2284-2294.
110. McLay, R., Kastin, A. y Zadina J. 2000. Passage of interleukin-1-beta across the blood-brain barrier is reduced in aged mice: a possible mechanism for diminished fever in aging. *Neuroimmunomodulation*. 8:148-153.
111. Mendoza A. 1992. Con sabor a maguey. Ed. Proyecto y Ejecución Editorial S. A. de C. V. 1ª Ed. UNAM. México. 1-39.
112. Miao, P., Madec, K., Gong, Y., Shen, H., Eisenstat, D., Melanson, M., Gu, X., Leong, C., Klowak, M. y Namaka, M. 2008. Axotomy-induced up-regulation of tumor necrosis factor-alpha in the dorsal root ganglia. *Neurology Research*. 30:623-631.
113. Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L., Muñoz, F., Ruíz, F., Leighton, F. e Inestrosa, N. 2000. The role of oxidative stress in the toxicity induced by

- amyloid- β peptide in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 62: 633-648.
114. Monroy, C. yCastillo, P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. Pp 265.
115. Nair, A., Frederick, T. y Miller, S. 2008.: Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cell Mol Life Sci*. 65:2702-2720.
116. Netland, E., Newton, J., Majocha, R. y Tate, B. 1998. Indomethacin reverses the microglial response to amyloid β -protein. *Neurobiology of Aging*. 19:201-204.
117. Nielsen, S., Nagelhus, E., Amiry, M., Bourque, C. Agre, P. y Ottersen, O. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *Journal of Neuroscience* 17: 171-180.
118. Nobuhisa, I., Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F. y Sumimoto, H. 2006. Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47 phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22 phox. *The Biochemical Journal*. 15:183-192.
119. Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R. y Miyahara, Y. 2002. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiology of Aging*. 23: 639-644.
120. Organización Mundial de la Salud (2009). Nota descriptiva N°297, Julio de 2008. Revisado el 16 de diciembre de 2009 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html> .

121. Organization Mundial de la Salud. Neurological disorders: Public health challenges. Switzerland: World Health Organization. 2006; 204-207.
122. Osbourne, A. Saponins in cereals. *Phytochemistry*. 62: 1-4
123. Park, C., Park, J., Noh, K., Shin, J. y Song, Y. 2011. Taraxcum officinale Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF-kB modulation in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 27:834-842.
124. Park, J., Park, E., Kim, D., Jung, K., Lee, E., Hyun, J., Kang, J. y Kim, H. 2009. Anti-inflammatory mechanism of ginseng saponins in activated microglia. *Journal of Neuroimmunology*. 209: 40-49.
125. Paul, S., Shin, H. y Kang, S. 2012. Inhibition of inflammations and macrophage activation by ginsenoside-Re isolated from Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Food and Chemistry Toxicology*. 50:1354-1361.
126. Peana, A., Morettin, M., Manconi, V., Desole, G. y Pippia, P. 1997. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal saponins of *Agave americana*. *Planta Med*. 63: 199-202.
127. Pérez, E.; Gallardo, C. 1997. *Diagnostico Botanico-Ecologico General del Parque Zoológico "Zoofari", en el Estado de Morelos; Morelos, Mexico.*
128. Pérez, J. 2000. La genética y la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol*. 30: 1619.
129. Perry, N., Bollen, C., Perry, E. y Ballard, C. 2003. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 75,651-659.

130. Persidsky, Y., Ramírez, S., Haorah, J. y Kanmogne, G. 2006. Blood-brain-barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of Neuroimmunology and Pharmacology*. 1:223-236.
131. Popescu, B., Toescu, E., Popescu, L., Bajenaru, O., Muresani, F., Schultzberg, M. y Bogdanovic, N. 2009. Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia. *Journal of the neurological Sciences*. 15:1-2.
132. Rabadanal, R., Bonkanka, C., Hernández, M. y Sánchez, C. 2005. Analgesic and tropical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum*. *J. Ethnopharmacol*. 96: 591–596.
133. Rauschmayr, T., Groves, R. y Kupper, T. 1997. Keratynocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unites States of America*. 94: 5814-5819.
134. Réaux-le, A., Van, J., Rosténe, W. y Mélik, S. 2013. Current status of chemokines in the adult CNS. *Progres in Neurobiology*. 104:67-92.
135. Rendón, J., Juárez, B., Pinos, J., Aguirre, J. y Delgado, R. 2012. Effects of different sources of fructans on body weight, blood metabolites and fecal bacteria in normal and obese non-diabetic and diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutrition*. 67(1):64-70.
136. Reubinoff, B., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M., Reinhartz, E., Itzik, A. y Ben-Hur, T. 2001. Neural Progenitors from human embryonic stem cells. *nat. biotech* 19:1134-1140.

137. Rey, F., Cifuentes, M., Kiarash, A., Quinn, M. y Pagano, P. 2001. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice. *Circulation Research*. 31:408-414.
138. Rodrigues, C., Pererira, B. y Paz J. 2011. A new steroidal saponin from *Allium ampeloprasum* var. *porrum* with anti-inflammatory and gastroprotective effects. *Phytochemistry*. 4:306-310.
139. Rogers, J., Strohmeyer, R., Kovelowski, C. y Li, R. 2002. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia*. 40: 260-269.
140. Rokita, H., Kosz-Vnenchak, M., Stalinska, K. y Stachura, J. 1997. Interleukin 1 receptor antagonist localization exclusively in non parenchymal cells of the mouse liver. *Cytokine*. 9:249-253.
141. Rudakewich, M., Ba, F. y Benishin, C. 2001. Neurotrophic and neuroprotective actions of ginsenoside Rb1 and Rg1. *Planta Medica*. 67, 533-537.
142. Sankara, S. y Nair, A. 1970. Chlorogenin and kaempferol glycosides from the flowers of agave americana. *Phytochemistry*. 9:2582-2590.
143. Sastre, M., Dewatcher, .I, Landreth, G., Willson, TM. Klockgether, T., van Leuven, F. y Heneka, M. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *Journal of Neuroscience*. 23:9796-9804.
144. Sati, O. y Pant, G. 1985. Cantalasonin-1, a novel spirostanol bisdesmoside from *Agave cantala*. *Journal of Natural Products*. 48(3):395-399

145. Sauder C, De la Torre J. 1999. Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *Journal of Neuroimmunology*. 96:1 29-45.
146. Selemidis, S., Sobey, C., Wingler, K., Schmidt, H. y Drummond, G. 2008. NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacology & Therapeutics*.120:254-291.
147. Selkoe, D., Wolfe, W. 2007. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell*. 13, 215-221.
148. Shao, C., Xiong, S., Li, G., Gu. L.,Mao, G., Markesbery, W. y Lovell, M. 2008. Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain. *Free Radical Biology and Medicine*. 45:813-819.
149. Simmons, J., Tinto, W., McLean, S. y Reynolds, W. 2004. Saponins from *Furcraea selloa* var. *Marginata*. *Fitoterapia*. 75: 634-638.
150. Soria, J., Arroyo, D., Gaviglio, E., Rodríguez, M., Wang, J. e Iribarren, P. 2011. Interleukine 4 induces the apoptosis of mouse microglial cells by a caspase-dependent mechanism. *Neurobiology of Disease*. 43: 616-624.
151. Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinkers, R., De Keyser, J., Haegeman, G. y Gerlo, S. 2011. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Research Reviews*. 67: 157-183.
152. Srikanth, V., Maczurek, A., Phan, T., Steele, M., Westcott, B., Juskiw, D. y Münch, G. 2011. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 32(5):763-777.

-
153. Starkie, R., Ostrowski, S., Jauffred, S., Febbraio, M. y Klarlund, B. 2003. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin induced TNF- α production in humans. *The FASEB Journal*, 17: 884-886
154. Streit W. Microglia as neuroprotective immunocompetent cells of the CNS. *Glia*. 2002; 40: 133-139.
155. Streit, W., Walter, S. y Pennell, N. 1999. Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiology*. 57:563-581.
156. Su, J., Osoewaga, M., Matsuoka, T., Minohara, M., Tanaka, M. e Ishizu, Y. 2006. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. *Journal of Neurology Science*. 243: 21-30.
157. Taille, C. El-Benna, J., Lanone, S., Dang, M., Oginer, E. y Aubier, M. 2004. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:28681-28688.
158. Taisne, C., Norel, X., Walch, L., Labat, C., Verriest, C., Mazmanian, G. y Brink, C. 1997. Cholinesterase activity in pig airways and epithelial cells. *Fundamental Clinical Pharmacology*. 11: 201-205.
159. Tamagno, E., Parola, M., Guglielmotto, M., Santoro, G., Bardini, P., Marra, L., Tabaton, M. y Danni, O. 2003. Multiple signaling events in amyloid β -induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 35(1):45-58.
160. Tanovic A, Alfaro V. Neuroprotección con Memantina (antagonista no competitivo del receptor NMDA-glutamato) frente a la excitotoxicidad asociada

- al glutamato en la enfermedad de Alzheimer y en la demencia vascular. *Revista de Neurología*. 2006; 42 (10): 607-616.
161. Terrando, N., Fidalgo, A., Vizcaychipi, M., Cibeli, M., Ma, D., Monaco, C., Feldmann, M y Maze, M. 2010. The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Critical Care*. 14:R88.
162. Thuerauf, N. y Fromm, M. 2006. The role of the transporter P-glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases. *European Arch Psychiatry Clinical Neuroscience*. 256: 281-286.
163. Tinto, W., Simmons, J., McLean, S. y Reynolds, W. 2005. Constituents of *Agave americana* and *Agave barbadensis*. *Fitoterapia*. 76: 594-597.
164. Tocharus, J., Chongthammakun, S. y Grovitrapong, P. 2008. Melatonin inhibits amphetamine-induced nitric oxide synthase mRNA overexpression in microglial cell lines. *Neuroscience Letters*. 439:134-137.
165. Toornvliet, R., vanBerckel, B., Luurtsema, G., Lubberink, M., Geldof, A., Bosch, T., Oerlemans, R., Lammertsma, A. y Franssen, E. 2006. Effect of age on functional P-glycoprotein in the blood-brain barrier measured by use of (R)-[(11)C] verapamil and positron emission tomography. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 79: 540-548.
166. Tyagi, E, Agrawal, R., Nath, C. y Shukla, R. 2007. Effect of anti-dementia drugs on LPS induced neuroinflammation in mice. *Life Science*. 8:1977-1983.

167. Tyagi, E., Agrawal, R., Nath, C. y Shukla, R. 2010. Effect of melatonin on neuroinflammation and acetylcholinesterase activity induced by LPS in rat brain. *European Journal Of Pharmacology*. 640:206-210
168. Ujiie, M., Dickstein, D., Carlom D. y Jefferies, W. 2003. Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model. *Microcirculation*. 10:463-470.
169. Vallieres, L. y Rivest, S. 1997. Regulation of the genes encoding IL-6, its receptor and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine IL-1 beta. *Journal of Neurochemistry*. 69: 1668-1683.
170. Van den Worm, E., Beukelman, C., Van den Berg, A., Kroes, B., Labadie, R. y Van Dijk, H. 2001. Effects of methoxylation of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*. 433: 225-230.
171. [van Rensburg](#), s., [Daniels](#), W., van Zyl, [J.](#) y [Taljaard](#) J. 2000. A Comparative Study of the Effects of Cholesterol, Beta-Sitosterol, Beta-Sitosterol Glucoside, Dehydro-epiandrosterone Sulphate and Melatonin on In Vitro Lipid Peroxidation. *Met.Brain Dis*. 15(4):257-265, DOI: 10.1023/A:1011167023695.
172. Von Bernhardt R, Ramírez G, Toro R, Eugén J. Pro-inflammatory conditions promote neuronal damage mediated by Amyloid Precursor Protein- and degradation by microglial cells in culture. *Neurobiol Disease*. 2007; 26: 153-164.
173. Vorbrodt, A., Dobrowska, D., Meeker, H. y Carp, R. 1999. Immunogold study of regional differences in the distribution of glucose transporter (GLUT-1)

- in mouse brain associated with physiological and accelerated aging and scrapie infection. *Journal of Neurocytology*. 28:711-719.
174. Wang, L., Wang, B., Ng, S. y Lee, T. 2006. Effects of ginseng saponins on β -amyloid-induced amnesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 103–108.
175. Wang, L., Zhang, Y., Wang, Z., Li, S., Min, G., Wang, L., Chen, J., Cheng, J. y Wu, Y. 2012. Inhibitory effect of ginsenoside-Rd on carrageenan-induced inflammation in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 90: 229-236.
176. Wang, Y., Feng, B., Huang, H., Kang, L., Cong, Y., Zhou, W., Zuo, P., Cong, Y., Song, B. y Ma, B. 2010. Glucosylation of steroidal saponins by cyclodextrin glucanotransferase. *Planta Medica*. 76: 1724-31.
177. Watkins, L., Maier, S. y Goehler, L. 1995. Cytokine-to brain communication: a review and analysis of alternative mechanisms. *Life Science*. 57: 1011-1026
178. Wilkomirski, B., Bobeyko, V. y Kintia, P. 1975. New steroidal saponins of *Agave americana*. *Phytochemistry*. 14: 2657-26-59.
179. Wo, F., Wang, S., Qui, L., Song, J. y Lv, T. 2011 Protective effect of Panaxtriol saponins extracted from *Panax notoginseng* against MPTP-induced neurotoxicity *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. 13:448-453.
180. Wyss-Coray, F., Yan, F., Lin, H., Lambris, J., Alexander, J. 2002. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 10837-10842.

181. Xing, Y., Lin-na, W., Quian-ming, D., Lin, M., Li, Ch., Ran, Y., Ling, L., Jing, L., Zhong, Y. y Hui, J. 2012. Akebia saponin D attenuates amyloid B-induced cognitive deficits and inflammatory response in rats: Involvement of Akt/NF- κ B pathway. *Behavioral Brain Research*. 235: 200-209.
182. Yang, H., Yao, Y., Uryu, K., Lee, E., Zhao, L., Funk, C., Trojanowski, J., Lee, V. y Pratico, D. 2004. Selective suppression of NF- κ B by indomethacin modulates A β levels and deposition but not metabolism in a model of Alzheimer disease. *Neurobiology of aging*. 25:S256.
183. Yenari, M., Xu, L., Tang, X., Quido, Y. y Giffard, R. 2006. Microglia potentiate damage to blood brain barrier constituents: Improvement by mynocycline in vivo and in vitro. *Stroke*. 37: 1087-1093.
184. Yesavage, J., O'Hara, R., Kraemer, H., Noda, A., Taylor, J., Ferris, S., Gély, M., Rosen, A., Friedman, L., Sheikh, J. y Derouesné, C. 2002. *Journal of Psychiatric Research*, 36 (5):281-286.
185. Yokosuka A, Mimaki Y, Kuroda M, Sashida Y. 2000. A new steroidal saponin from the leaves of *Agave americana*. *Planta Medica*. 66:393-6.
186. Yokosuka A, Mimaki Y. 2007. Steroidal glycosides from *Agave utahensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 55(1):145-9.
187. Zamilpa, A., Tortoriello, J., Navarro, V., Delgado, G. y Alvarez, L. 2002. Five new steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimycotic activity. *J. Nat. Prod.* 65: 1815–1819.
188. Zoklovic, B. 2004. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 89:807-811.

189. Zuliani, G., Ranzini, M., Guerra, G., Rossi, L. Munari, M., Zurlo, A., Volpato, S., Atti, A., Blé, A. y Fellin, R. 2007. Plasma cytokines profile in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *Journal of Psychiatric Research*. 41: 686-693.

ANEXO I. Artículo de investigación publicado

Molecules **2013**, *18*, 8136–8146; doi:10.3390/molecules18078136

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Anti-Inflammatory Activity of Different Agave Plants and the Compound *Cantelasaponin-1*

Nayeli Monterrosas-Brisson ^{1,2}, Martha L. Arenas Ocampo ², Enrique Jiménez-Ferrer ¹, Antonio R. Jiménez-Aparicio ², Alejandro Zamilpa ¹, Manases Gonzalez-Cortazar ¹, Jaime Tortoriello ¹ and Maribel Herrera-Ruiz ^{1,*}

¹ Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina No. 1, Col. Centro, Xochitepec 62790, Morelos, Mexico;

E-Mails: monterrosasnayeli@hotmail.com (M.-B.N.); enriqueferrer_mx@yahoo.com (J.-F.E.); azamilpa_2000@yahoo.com.mx (Z.A.); gmanases@hotmail.com (G.C.M.); jtortora2@yahoo.es (T.J.)

² Doctorado en Desarrollo de Productos Bióticos, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, P. O. Box 24, Yautepec 62730, Morelos, Mexico;

E-Mails: mlarenas@ipn.mx (A.O.M.L.); arjaparicio@gmail.com (J.A.R.A.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: cibis_herj@yahoo.com.mx; Tel./Fax: +52-777-361-2155.

Received: 22 April 2013; in revised form: 29 May 2013 / Accepted: 6 June 2013 /

Published: 10 July 2013

Abstract: Species of the agave genus, such as *Agave tequilana*, *Agave angustifolia* and *Agave americana* are used in Mexican traditional medicine to treat inflammation-associated conditions. These plants' leaves contain saponin compounds which show anti-inflammatory properties in different models. The goal of this investigation was to evaluate the anti-inflammatory capacity of these plants, identify which is the most active, and isolate the active compound by a bio-directed fractionation using the ear edema induced in mice with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) technique. A dose of 6 mg/ear of acetone extract from the three agave species induced anti-inflammatory effects, however, the one from *A. americana* proved to be the most active. Different fractions of this species showed biological activity. Finally the F5 fraction at 2.0 mg/ear induced an inhibition of 85.6%. We identified one compound in this fraction as (25*R*)-5*α*-spirostan-3*β*,6*α*,23*α*-triol-3,6-di-*O*-*β*-D-glucopyranoside (cantelasaponin-1) through ¹H- and ¹³C-NMR spectral analysis and two dimensional experiments like DEPT NMR, COSY, HSQC and HMBC. This steroidal glycoside showed a dose dependent effect of up to 90% of ear edema inhibition at the highest dose of 1.5 mg/ear.

Keywords: Agavaceae; *A. angustifolia* Haw; *A. tequilana* Weber; *A. americana*; cantalasaponin-1; inflammation

1. Introduction

Agaves have great economic and cultural importance for several native and cross-breed communities in Mexico, and for centuries people have used these plants as sources of food, fuel, shelter, and fiber, as fertilizer and ornamentals, but also in traditional medicine. These plant species belong to the family *Agavaceae*, of which there are some 300 species in the World, over 250 of which are found in Mexico [1].

The use of agave as food and fermented beverages source has persisted in Mexico for over 7,000 years. Tequila and mezcal, both distilled from agave, have become true Mexican symbols due to the fact that both have been certified with a “Denominación de origen” (protected designation of origin) according to the *Norma Oficial Mexicana* (NOM, Official Mexican Regulations) regulations NOM-006-SCFI-2005 (tequila) and NOM-070-SCFI-1994 (mezcal).

While these species are used as sources of fermented beverages, their use in traditional medicine has also been widely reported by Mexican herbalists [2]. *A. americana* L. is one of the 500 more widely used medicinal plants in several countries [3]. In Mexico it is used as diuretic and laxative, and also in wound, syphilis, scurvy and cancer treatments, but it's also used to treat the lack of movement in extremities and postpartum belly inflammation [4–6]. Sap from *A. angustifolia* Haw is used as a treatment for digestive troubles and as a remedy for sprains and broken bones not only in people, but also in animals [7]. The main use for *Agave tequilana* (blue agave or blue weber) is the production of tequila.

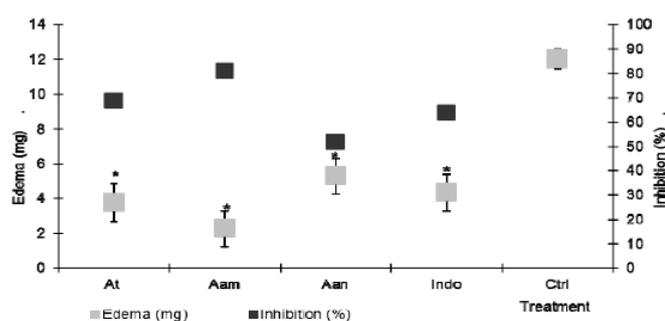
The leaves of these species represent an important source of secondary metabolites like fructans, and flavonoids, but mainly terpenoids and steroidal saponins [5,8]. There are different saponins which have been isolated and identified in several species of the agave genus, such as smilagenin (steroidal saponin which precedes another eight saponins) and gitogenin [9] isolated from *A. lechugilla*. Manogenin and kamogenin, from *A. amanuensis* callus culture [10]. Hecogenin, tigogenin, agavasaponin E and H from *Agave americana* [11–15]. Steroidal saponins from *A. attenuata* [16,17] and *A. shrevei* [18]. Data in the literature indicate that agave genus species have an anti-inflammatory effect, for example, the aqueous extract of *A. intermixta* reduces carrageenan-induced plantar edema [19]. Steroidal saponins isolated from *A. attenuata* Salm-Dyck and *A. shrevei* Gentry, exhibit anti-inflammatory activity in a membrane permeability induced by acetic acid model [16,18]. Hecogenin, and tiogenin isolated from *A. americana* L., induce greater anti-inflammatory activity than the aqueous extract they come from, and even the anti-inflammatory steroidal drug, dexamethasone, in the essay of carrageenan-induced sub-plantar edema [11]. Furthermore, Mana *et al.* found that this species' leaves have compounds with antitumor activity [20]. *A. americana* extract orally administered to sheep, with different doses of saponins (120, 240 and 360 mg/kg) has antiprotozoal activity, as well as the capacity to lower the serum concentration of cholesterol and glucose, which helps the growth of these animals' offspring [21].

The goal of this investigation was to evaluate the anti-inflammatory effect of three species of the agave genus—*A. americana*, *A. tequilana* and *A. angustifolia*—due to the fact that there aren't many pharmacological studies of these plants, which are widely used by several communities in Mexico. This was done using the auricular edema induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate ($4\beta,9\alpha,12\beta,13\alpha,20$ -pentahydroxytiglicia-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoate 13-acetate, TPA) model, in addition to a chemical analysis of the species with better biological activity, which led to the structural elucidation of an anti-inflammatory compound.

2. Results and Discussion

Topical administration of TPA caused an approximately 12 mg edema in this test (Figure 1, negative control group, Ctrl). The concentration employed in the present study was selected after performing some screening assays of TPA-induced auricular edema to analyze the anti-inflammatory activity of *A. americana* y *A. tequilana* and *A. angustifolia* acetone extracts. We decided to evaluate them at 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, y 10.0 mg/ear, and significant biological activity was seen starting from 2.0 mg/ear. There were no statistical differences between groups (data not shown), but the 6.0 mg/ear effect was higher, so we chose that concentration to perform our assays. It was observed that the groups that received *A. tequilana* (At), *A. americana* (Aam) and *A. angustifolia* (Aan) showed a significant decrease ($p < 0.05$) of edema caused by TPA, having inflammation levels of only 3.7 mg, 2.2 mg and 5.7 mg, corresponding to inhibition percentages of 68%, 81% and 51%, respectively. Mice that received indomethacin locally (indo to 1.0 mg/ear, positive control) showed an average level of 4.3 mg (67.2%) of edema inhibition, which was significantly different from control group ($p < 0.05$, Figure 1). The aqueous extract of *Agave intermixta* was previously tested using the TPA model and showed an edema inhibition percentage of 54.27 and 56.55% with doses of 3 mg/ear and 5 mg/ear, respectively [19].

Figure 1. Effect of the topical administration of the acetone extract of *A. tequilana* (AT), *A. americana* (Aam), *A. angustifolia* (Aan) at 6 mg/ear, on TPA induced ear edema. Indo = Indomethacin. ANOVA, *post-hoc* Bonferroni * $p < 0.05$ ($n = 7$, mean + SD, when it is compared with the negative control).



So far, in the literature there was only one report in 1997 of any such activity from *A. americana*. In that paper the authors showed that an extract of this species (at doses of 200 and 300 mg/kg, ip) and

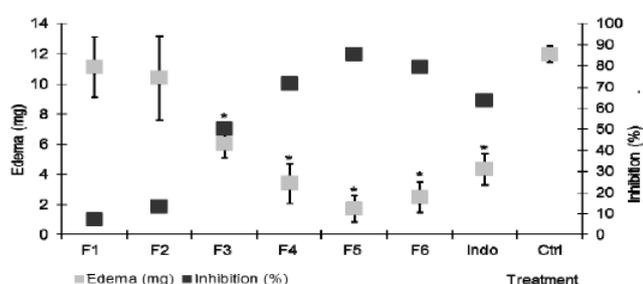
the corresponding mixture of genins (hecogenin and tiogenin) induced a decrease in carrageenan-induced plantar edema in Wistar rats [11].

There are no reports of such activity in the species *A. tequilana* and *A. angustifolia*. As seen in Figure 1, the *A. americana* acetone extract showed higher activity than the other two species at the same dose, and even higher than the reference drug indomethacin. This nonsteroidal anti-inflammatory drug is widely used to treat edema due to its ability to block the inflammatory cascade associated with arachidonic acid by inhibiting the enzymes cyclooxygenase 1 (COX1) and 2 (COX2). There are pharmacological reports which indicate the anti-inflammatory effect of different species of the agave genus, which is mainly attributed to the presence of steroidal saponins [16,18] and terpenes [22]. Thus, the anti-inflammatory activity of several species of the agave genus has already been established by several tests, including the one induced with TPA for *A. intermixta* Trel [19], and also in an induced vascular permeability test with acetic acid to *A. attenuata* Salm-Dyck [16] and *A. shevrei* Gentry [18].

Apparently, *A. americana* has the ability to decrease the inflammatory process caused by different substances, and their effect may be due to local or systemic application. Both carrageenan [23] and TPA [24], activate the cyclo-oxygenase pathway, in addition to being sensitive to drugs that act as antagonists of the prostaglandins and glucocorticoids synthesis pathways.

Due to its higher activity, a bio-guided chemical fractionation of *A. americana* was carried out. Six fractions with different chromatographic profile (F1 to F6, with ascending polarity) could be separated by open column chromatography (CC). Each one of these in turn was evaluated in the TPA-induced ear edema at a dose of 2 mg/ear. Lower polarity fractions F1 and F2 did not cause any significant changes ($p > 0.05$, Figure 2) in ear edema level (11.14 mg and 10.4 mg, respectively) compared to the inflammation control group (12 mg).

Figure 2. Effect of the topical administration (2 mg/ear) of the fractions with different polarity from acetone extract of *A. americana* on TPA induced ear edema. Indo = indomethacin (1 mg/ear). ANOVA, *post-hoc* Bonferroni * $p < 0.05$ (n = 7, mean \pm SD, when it is compared with the negative control).

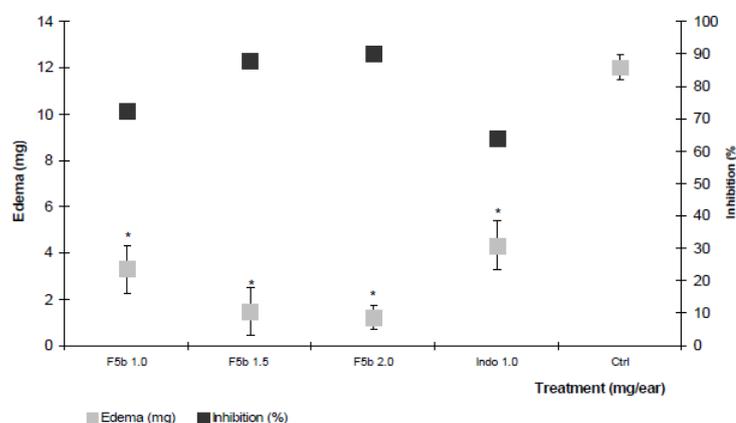


Ear edema, measured as a weight difference between the ears, was 6.02 mg in the group that received fraction F3, which represents a 49% inhibition (Figure 2), indicating the presence of some anti-inflammatory compounds. As the polarity of the extracts F4, F5 and F6 increased, the biological effect also increased, showing an edema level of 3.4, 1.7 and 2.4 mg, which represents a 71.7%, 85.6% and 79% edema inhibition, respectively, being significantly different from control group ($p < 0.05$,

Figure 2). The data thus suggests that this plant contains more than one compound with the capacity to inhibit the local effects of TPA.

Fraction F5 was separated chemically because it caused a higher edema decrease. From the fractionation of F5, a precipitate (F5b) was isolated, which showed anti-inflammatory activity in the TPA model, so it was decided to evaluate it at three doses (1.0, 1.5 and 2.0 mg/ear). The tests indicated that the three doses employed induced inflammation decreases of 3.3, 1.4 and 1.2 mg, corresponding to inhibition percentages of 72.5%, 87.6% and 90%, respectively. Although there were no statistical differences between the analyzed groups, a dose-dependent behavior was observed, and F5b had a higher anti-inflammatory effect than indomethacin at a dose of 1.0 mg/ear (Figure 3).

Figure 3. Effect of the topical administration of different doses (1.0, 1.5 and 2.0 mg/ear) of precipitate F5b isolated of *A. americana*, on TPA induced ear edema. Indo = Indomethacin (1 mg/ear). ANOVA, *post-hoc* Bonferroni, * $p < 0.05$ ($n = 7$, mean \pm SD, when it is compared with the negative control).



The precipitate F5b was exhaustively acetylated to give a white solid whose ^{13}C -NMR spectroscopic analysis showed 57 signals, 29 of which could be assigned to an acetylated spirostanol skeleton type due to the characteristic ketal carbon signal at δ 108.6 (C-22). The other 28 carbon signals corresponded to the presence of two sugar moieties. The anomeric signals were observed at δ 4.62 (d, 8 Hz)/98.1 for H-1' and C-1' and δ 4.46 (d, 8 Hz)/101.7 for H-1'' and C-1'', respectively. The interglycosidic connectivities were determined by the long-range heteronuclear coupling correlations ($^3J_{\text{CH}}$) observed in the HMBC experiment of C-1' (δ_{C} 98.1) of glucose with H-3 (δ_{H} 3.49) and C-1'' (δ_{C} 101.7) of glucose with H-6 (δ_{H} 3.26) (Table 1). Taken together this indicated to us that the parent compound corresponded to (25*R*)-5 α -spirostan-3 β ,6 α ,23 α -triol-3,6-di-*O*- β -D-glucopyranoside (Table 1). This saponin has been previously described from *A. cantala* as cantalasaponin-1 [25], later it was also identified in *A. americana* [13,26].

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C -NMR (100 MHz) data of the peracetylated derivative of cantalasaponin-1.

Position	δ_{C}	δ_{H}	Position	δ_{C}	δ_{H}
			3-O-glc		
1	39.6		1'	98.7	4.62 (d, 8)
2	27.8		2'	71.4	4.92 (dd, 8, 9.6)
3	78.6	3.499 (m)	3'	72.8	5.14 (dd, 9.2, 10)
4	28.9		4'	68.5	5.04 (dd, 9.6, 9.6)
5	49.3		5'	71.8	3.62 (dddd, 2, 4.8, 7.6, 12)
6	81.12	3.26 (m)	6'a	62.2	4.05 (dd, 2, 12)
7	37.1		b		4.22 (dd, 4.8, 12)
8	33.8		6-O-glc		
9	53.5		1''	101.7	4.46 (d, 8)
10	36.6		2''	71.6	4.92 (dd, 8, 9.6)
11	20.77		3''	73.2	5.14 (dd, 9.2, 10)
12	39.69		4''	68.6	5.04 (dd, 9.6, 9.6)
13	41.1		5''	71.8	3.62 (dddd, 2, 4.8, 7.6, 12)
14	56.0		6'' a	62.3	4.05 (dd, 2, 12)
15	31.8		b		4.22 (dd, 4.8, 12)
16	81.17	4.41 (m)			
17	61.7	0.75 (s)			
18	13.5	0.77 (s)			
19	16.2				
20	36.1				
21	14.2	0.90 (d, 6)			
22	108.6				
23	68.5	4.80 (dd, 11.6)			
24	34.1	1.46 (m)			
25	30.8				
26 a		3.37 (m)			
b	65	3.29 (m)			
27	16.5	0.78 (d, 6)			

Experiments analyzed in CDCl_3 , δ in ppm, J in Hz.

This saponin was found in some members of the Agavaceae family and could act as a marker, as reported in 2004, from its isolation in the species *Furcraea selloa* which also belongs to that family [27]. Importantly, there is some evidence that this compound has biological activity. For example, its cytotoxic effects against JTC-26 cells which induce human cervical carcinoma has been reported [25]; the same activity was analyzed against human cells inducing HL-60 promyelocytic leukemia, but it was not active in those experiments [28]. Recently, this saponin was isolated from *A. sisalana* and it was evaluated again in a cytotoxicity test but on human MCF-7 breast cancer and NCI-H460 non-small cell lung cancer lines, and it was not active either [29]. The present report is the first to demonstrate the dose-dependent anti-inflammatory activity of cantalasaponin-1.

It has been shown that secondary metabolites from *A. americana* such as the steroidal saponins and triterpenes found in different parts of the plant, but mainly in its leaves, induced several activities. Examples of these compounds are tigogenin, which has shown anticancer [30] and anti-inflammatory activity [11], besides promoting the union of nuclear factor Kappa B to DNA, which promotes the anti-proliferative effect associated to cancer [31]. Chlorogenin, another steroidal saponin, induces

toxicity against HL-60 human promyelocytic leukemia cells [32], and also has anti-inflammatory activity [33]. Considering that cantalasonin-1 is structurally linked with these active compounds (it contains one C-23 hydroxyl more than chlorogenin, and two more than tigenin) we can propose a direct relation to the biological activity observed in this study.

3. Experimental

3.1. General

12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate [4 β ,9 α ,12 β ,13 α ,20-pentahydroxytiglic-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoate 13-acetate, TPA, \geq 99% purity (by TLC)] and indomethacin [Indo, \geq 99% purity (by TLC)] were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All NMR spectra were recorded in CDCl₃ on a Varian INOVA-400 MHz instrument (operated at 400 MHz for ¹H-NMR, NOESY, ¹H-¹H COSY, HSQC, and HMBC, and at 100 MHz for ¹³C-NMR). Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS).

3.2. Plant Material

The different agave leaves used were identified in the Biology Institute of the National University of Mexico (UNAM) by Dr. Abisai Josue García Mendoza as *Agave tequilana* F. A.C. Weber, *Agave angustifolia* Haw and *Agave americana* L. Marginata Hort. *A. americana* L. Marginata Hort. material was collected in the Toluca de Lerdo Municipality in the state of Mexico (19°17'29"N, 99°39'38"W); *A. tequilana* F.A.C. Weber and *A. angustifolia* Haw. were obtained from controlled cultivations in Tlaquiltenango (18°37'48"N, 99°10'00"W) in the state of Morelos.

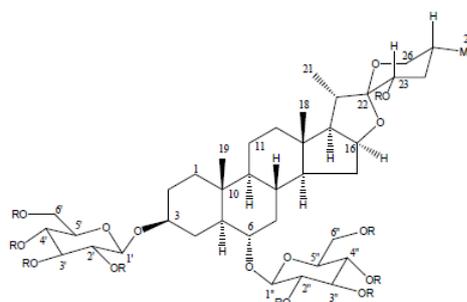
3.3. Chemical Fractionation

The leaves were cut into pieces of approximately 10 cm in size, weighed and placed in trays for lyophilization (Heto Drywinner lyophilizer, Model DW3, Heto Holten A/S, Allerød, Denmark). Once the vegetable material was dry, it was weighed and ground (Pulvex plastic mill, D.F., Mexico), and then macerated in acetone for 72 h. The product thus obtained was filtered and the extract was concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator (Heildolph Laborota Model 4000, Schwabach, Germany). Once the solvent was removed, the resulting *A. tequilana* (At), *A. americana* (Aam) and *A. angustifolia* (Aan) extracts were lyophilized and refrigerated at 4 °C until further use.

The most biologically active extract, in this case the *A. americana* one, was subjected to partition with an immiscible 1:1 mixture of water/ethyl acetate (1 L, three times). The organic fraction (F-EtOAc 10 g) was concentrated by low-pressure distillation and separated on an open chromatographic column (50 × 500 mm, silica gel 70–230, 100 g, Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase consisted of a gradient of *n*-hexane/ethyl acetate/MeOH mixtures (250 mL each sample). Concentrated fractions (characterized by eluent composition and amount isolated) were grouped according to their chemical similarities: **F1** (100:0:0, 0.32 g), **F2** (80:20:0, 0.45 g), **F3** (50:50:0, 0.6 g), **F4** (45:45:10, 2.1 g), **F5** (40:40:20, 3.8 g) and **F6** (0:0:100, 2.3 g). Fraction **F5** afforded in acetone a white precipitate (0.5 g) which was separated by Whatman paper filtration, and denominated F5b. In order to facilitate the structure elucidation, this precipitate (100 mg) was subjected to an acetylation process (1:2 pyridine-Ac₂O,

3 h), as previously described [34]. The crude product of this reaction was partitioned with an ethyl acetate/water mixture. The organic fraction was concentrated to dryness. Crystallization from *n*-hexane-ethyl acetate afforded the peracetate derivative (25 mg). ^1H - and ^{13}C -NMR analysis (Table 1) and two dimensional experiments like COSY, HSQC and HMBC allowed us to confirm the chemical structures shown in Figure 4.

Figure 4. Chemical structure of cantalasaponin-1 and its peracetylated derivative.



Cantalasaponin-1 (R = H); peracetylated derivative (R = COCH₃)

3.4. Animals

Male ICR mice (35 gr weight) were used. All animals were purchased from Harlan Mexico (D.F. Mexico), and kept in an animal house for three weeks with a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness and free access to water and food (pellets, Harlan). Three days before testing began the animals were conditioned to the laboratory environment and to the researcher. All experiments were conducted in accordance with the Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (Ministry of Agriculture, NOM-062-ZOO-1999, Mexico). The experimental protocols were approved by the Research Committee of Mexican Institute of Social Security with the recording number R-2010-1701-21. The minimum number of animals and duration of observation required to obtain consistent data were employed.

3.5. Experimental Design

Groups of seven mice were formed, each corresponding to one of the following treatments: (a) negative control (TPA 2.5 μg dissolved in 20 μL of acetone), (b) positive control (indomethacin, 1 mg/ear) and (c) the acetone extracts of leaves of *A. tequilana*, *A. americana* and *A. angustifolia* at 6.0 mg/ear dose. The ear treatment administration procedure was initiated in the surgical anesthesia stage (pentobarbital sodium 50 mg/Kg via, ip). The left ear of each mouse served as control reference for all treatments because only 10 μL of 70% ethanol were administered on both sides of the ear. For all treatments with agave species, these were administrated 10 μL on both sides of the right ear. For positive control, the same volume of a solution of indomethacin (a non-steroidal anti-inflammatory drug) was applied and for the negative control group, only ethanol to 70%. Fifteen minutes after treatment administration, 10 μL of TPA (pro-inflammatory) solution was applied on both sides of the right ear.

Thereafter, 4 h later, the animals were sacrificed by cervical dislocation, and then 6 mm sections were taken from the ears of each mouse from all groups, the sections were weighed and the weight differential was determined [35].

In the case of the extract that showed significant anti-inflammatory effect, was performed fractionation and some selected fractions were tested (2 mg/ear). Finally, we constructed a dose-response curve for the isolated compound at the doses of 1.0, 1.5 and 2.0 mg/ear. The results were used to determine the TPA induced edema inhibition percentage was obtained using expression below:

$$\text{Inhibition (\%)} = [\Delta w_{\text{control}} - \Delta w_{\text{treatment}}] \times 100$$

where $\Delta w = wt - wnt$; wt is the weight of the section of the treated ear; wnt is the weight of the section of the non-treated ear.

4. Conclusions

In this work, the anti-inflammatory activity of acetone extract of *A. angustifolia* Haw and *A. tequilana* Weber was reported for the first time. Moreover, although the anti-inflammatory effect of *A. americana* had already been described, it was previously attributed to a mixture of saponins such as hecogenin and tiogenin, while in this paper it is shown that the anti-inflammatory effects of this plant may also be due to the presence of cantalasonin 1.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Mexican Institute of Social Security (IMSS) (FIS/IMSS/PROT/G10/848). Also, by Basic Grant 209315 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico, for the PhD studies of Nayeli Monterrosas Brisson, in the Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN) and by the complementary Grant 99183988 from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS-México).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Almazara, E. De viandas y brebajes. Tequila. *Contactos* **2008**, *70*, 50–53.
2. Aguilar, A.; Camacho, J.; Chino S.; Jáquez, P.; López, M. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social: Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social: D.F., México, 1994.
3. Lozoya, X.; Lozoya, M. *Flora Medicinal de México. Primera Parte: Plantas Indígenas*; IMSS: D.F., México, 1982.
4. Ding, Y.; Tian, R.H.; Yang, C.R.; Chen, Y.Y.; Nohara, T. Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong No. 1. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 557–560.

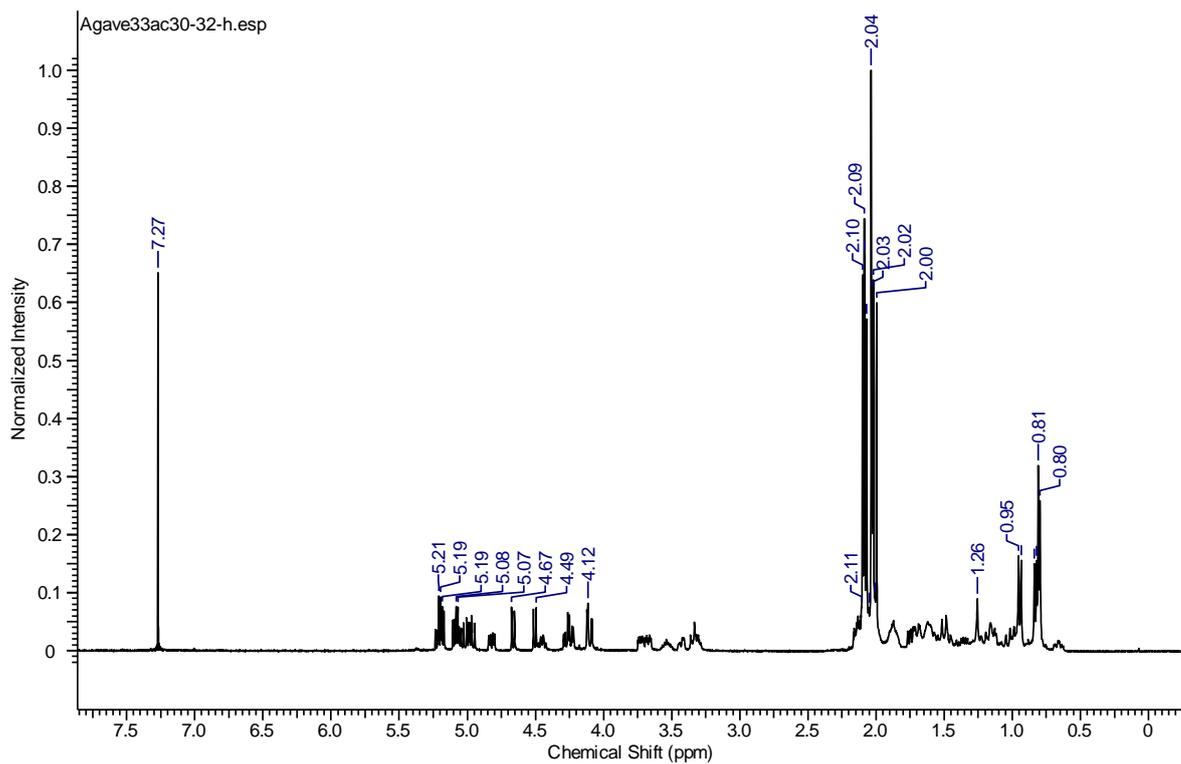
5. López, M.; Mancilla, N.; Mendoza, G. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var azul. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7835–7840.
6. Vargas, O.; Zizumbo, D.; Martínez, J.; Coello, J.; Colunga, P. Diversity and structure of landraces of Agave grown for spirits under traditional agriculture: A comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*. *Am. J. Bot.* **2009**, *96*, 448–457.
7. Pérez, E.; Gallardo, C. *Diagnostico Botanico-Ecologico General del Parque Zoológico “Zoofari”, en el Estado de Morelos*; CONABIO: Morelos, Mexico, 1997.
8. Mancilla, N.; López, M. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7832–7839.
9. Blunden, G.; Carabot, A.; Cripps, A.L.; Jewers, K. Ruizgenin, a new steroidal sapogenin diol from *Agave lechuguilla*. *Steroids* **1980**, *35*, 503–510.
10. Inhdrayanto, G.; Studiawan, H.; Cholies, N. Isolation and quantitation of manogenin and kammogenin from callus cultures of *Agave amaniensis*. *Phytochem. Anal.* **1994**, *5*, 24–26.
11. Peana, A.; Morettin, M.; Manconi, V.; Desole, G.; Pippia, P. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. *Planta Med.* **1997**, *63*, 199–202.
12. Yokosuka, A.; Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Sashida, Y. A new steroidal saponin from the leaves of *Agave americana*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 393–396.
13. Jin, J.M.; Liu, X.K.; Yang, C.R. Three new hecogenin glycosides from fermented leaves of *Agave americana*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2003**, *5*, 95–103.
14. Jin, J.M.; Zhang, Y.J.; Yang, C.R. Four new steroid constituents from the waste residue of fibre separation from *Agave americana* leaves. *Chem. Pharmacol. Bull.* **2004**, *52*, 654–658.
15. Hernández, R.; Lugo, E.; Díaz, L.; Villanueva, S. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave Lechugilla* Torrey. *E-Gnosis* **2005**, *3*, 11–16.
16. Da Silva, B.P.; de Sousa, A.C.; Silva, G.M.; Mendes, T.P.; Parente, J.P. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Z. Naturforsch. C* **2002**, *57*, 423–428.
17. Mendes, T.; de Medeiros, G.; da Silva, B.; Parente, J. A new steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Nat. Prod. Res.* **2004**, *18*, 183–188.
18. Da Silva, B.P.; Parente, J.P. A new bioactive steroidal saponin from *Agave shrevei*. *Z. Naturforsch. C* **2005**, *60*, 57–62.
19. García, M.; Quílez, A.; Sáenz, M.; Martínez, M.; de la Puerta, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71*, 395–400.
20. Mana, S.; Gaoa, W.; Zhang, Y.; Huangc, L.; Liud, C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 703–714.
21. Nasri, S.; Salem, B. Effect of oral administration of *Agave americana* or *Quillaja saponaria* extracts on digestion and growth of Barberine female lamb. *Livest. Sci.* **2012**, *147*, 59–65.
22. Augustin, J.; Kuzinaa, V.; Andersen, S.; Baka, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 435–457.
23. Gepdiremena, V.; Mshvildadzeb, H.; Su leymana, R. Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 440–444.

24. Gábor, M. *Mouse Ear Inflammation Models and Their Pharmacological Applications*; Akadémiai Kiadó: Budapest, Hungary, 2000.
25. Sati, O.; Pant, G. Cantalasonin-1, a novel spirostanol bisdesmoside from *Agave cantala*. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 395–399.
26. Tinto, W.; Simmons, J.; McLean, S.; Reynolds, W. Constituents of *Agave americana* and *Agave barbadensis*. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 594–597.
27. Simmons, J.; Tinto, W.; McLean, S.; Reynolds, W. Saponins from *Furcraea selloa* var. *Marginata*. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 634–638.
28. Wang, Y.; Feng, B.; Huang, H.; Kang, L.; Cong, Y.; Zhou, W.; Zuo, P.; Cong, Y.; Song, B.; Ma, B. Glucosylation of steroidal saponins by cyclodextrin glucanotransferase. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1724–1731.
29. Chen, P.; Chen, C.; Kuo, C.; Lee, T.; Kuo, Y.; Lee, C. Cytotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. *Planta Med.* **2011**, *77*, 929–933.
30. Aswal, B.; Bhakuni, D.; Goel, A.; Kar, K.; Mehrotra, B.; Mukherjee, K. Screening of Indian plants for biological activity: Part X. *Indian J. Exp. Biol.* **1984**, *22*, 312–332.
31. Corbiere, C.; Liagre, B.; Bianchi, A.; Bordii, K.; Dauca, M.; Netter, P.; Beneytout, J. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.* **2003**, *22*, 899–905.
32. Yokosuka, A.; Mimaki, Y. Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 807–815.
33. Rodrigues, C.; Pererira, B.; Paz, J. A new steroidal saponin from *Allium ampeloprasum* var. *porrum* with anti-inflammatory and gastroprotective effects. *Phytochemistry* **2011**, *4*, 306–310.
34. Zamilpa, A.; Tortorello, J.; Navarro, V.; Delgado, G.; Alvarez, L. Five new steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimycotic activity. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1815–1819.
35. Rabadanal, R.; Bonkanka, C.; Hernández, M.; Sánchez, C. Analgesic and tropical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum*. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 591–596.

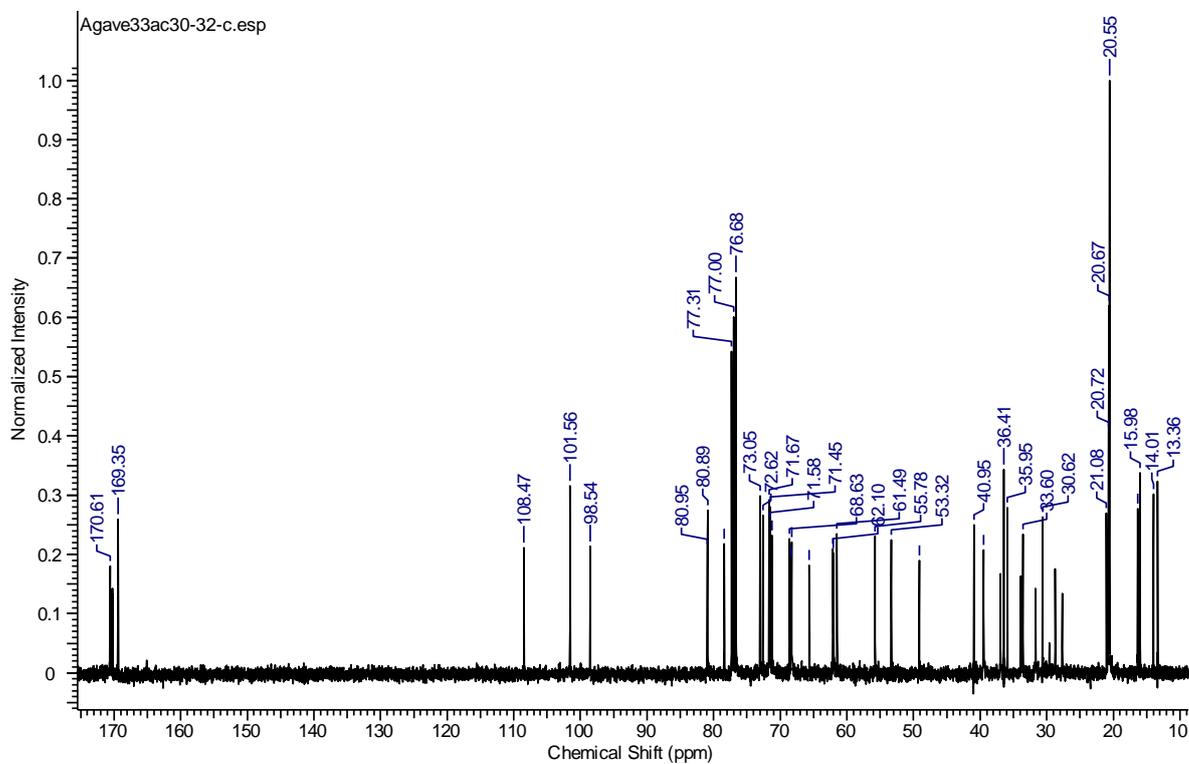
Sample Availability: Samples of the all compounds are available from the authors.

© 2013 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 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

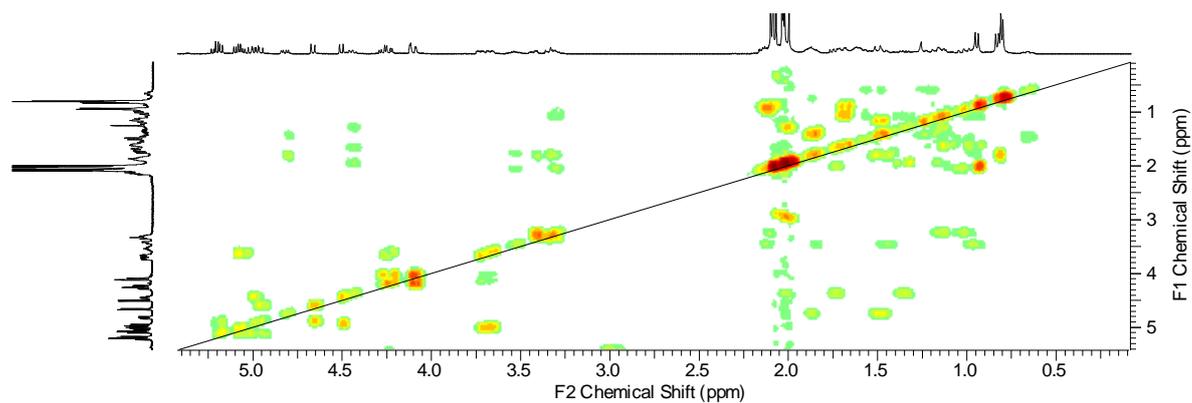
ANEXO II: Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Cantalasonina-1



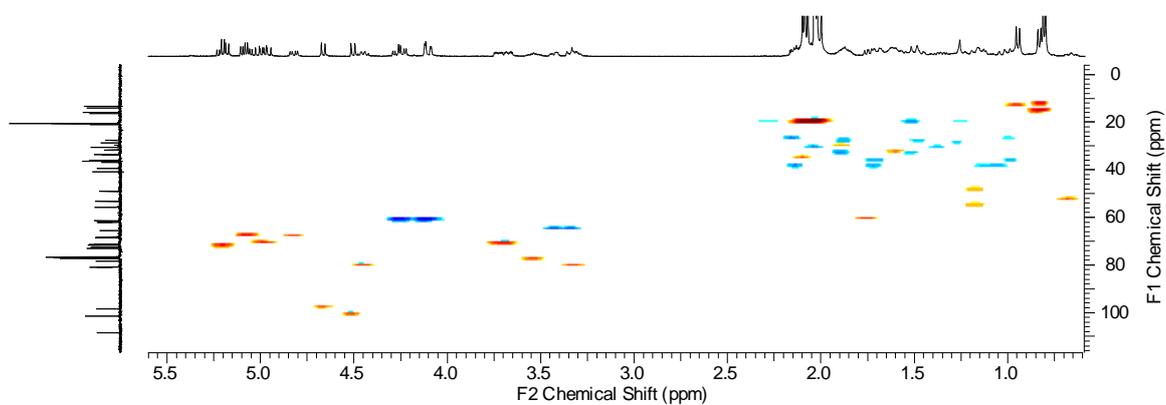
Espectro de RMN 1H de Cantalasonina-1



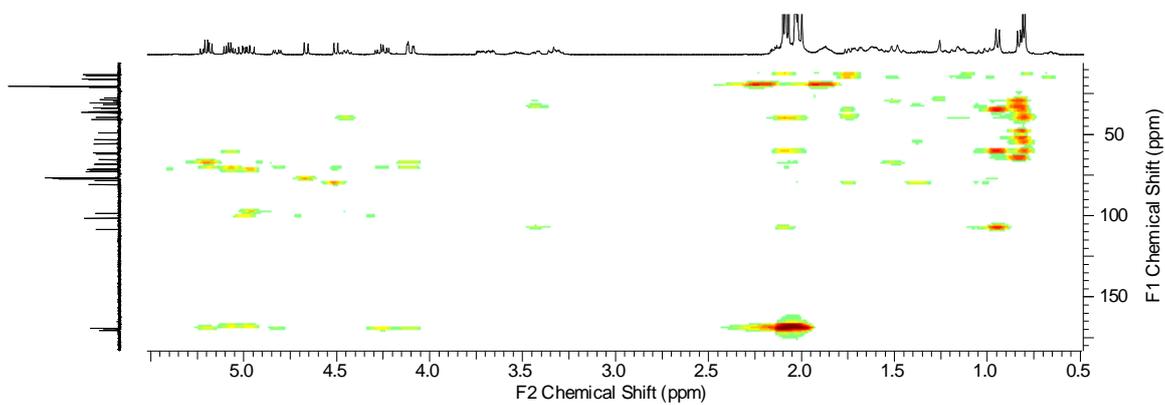
Espectro de RMN C13 de Cantalasonina-1



Espectro de RMN (COSY): correlación homonuclear 1H-1H de Cantalasaponina-1



Espectro de RMN (HSQC): correlación heteronuclear C-H a una ligadura de
Cantalasaponina-1



Espectro de RMN (HMBC): Correlación heteronuclear C-H doble ligadura de
Cantallasaponina-1