

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Evaluación de la actividad neuroprotectora de extractos de *Valeriana prionophylla* y *Passiflora ligularis* (Granadilla) en un modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad inducida en ratones CD-1

Informe de Tesis

Presentado por:

César José Rodríguez Mirón

Para optar al título de:

Químico Farmacéutico

Guatemala septiembre de 2021

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Evaluación de la actividad neuroprotectora de extractos de *Valeriana prionophylla* y *Passiflora ligularis* (Granadilla) en un modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad inducida en ratones CD-1

Informe de Tesis

Presentado por:

César José Rodríguez Mirón

Químico Farmacéutico

Guatemala, Octubre de 2021

Índice

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	4
3.1 Envejecimiento	4
3.1.1 Mecanismos de Envejecimiento.....	5
3.1.2 Envejecimiento y su relación directa con el desarrollo de enfermedades asociadas al SNC	10
3.2 Neurodegeneración:	11
3.2.1 Mecanismos de Neurodegeneración	12
3.2.2 Modelos in vivo utilizados en el estudio de envejecimiento y neurodegeneración.....	16
3.3 Medicina tradicional en Guatemala.....	18
3.3.1 Plantas nativas con actividad sobre el sistema nervioso central	19
IV. Justificación	22
V. Objetivos	24
4.1 Objetivo General.....	24
4.2 Objetivos Específicos	24
VI. Hipótesis	25
VII. Materiales y Métodos	26
7.1 Universo y Muestra.....	26
7.1.1 Universo	26
7.1.2 Muestra	26
7.2 Materiales.....	26
7.2.1 Equipo para pruebas cognitivas.....	26
7.2.2 Equipo para medición de metabolismo	26
7.2.3 Equipo para administración y manipulación de animales	26
7.2.4 Equipo para preparación de soluciones a administrar.....	27
7.2.5 Drogas y Reactivos.....	27
7.2.6 Animales.....	27
7.3 Métodos.....	28
7.3.1 Declaración de Ética.....	28
7.3.2 Animales.....	28
7.3.3 Reactivos y Extractos	28
7.3.4 Diseño Experimental.....	29

7.3.5	Ensayos de Comportamiento.....	30
7.3.6	Determinación de Parámetros metabólicos	32
7.3.7	Análisis Estadístico.....	34
VIII.	Resultados.....	35
8.1	Diferencia de peso corporal en validación del modelo	35
8.2	Laberinto en cruz elevado en validación del modelo.....	36
8.3	Campo Abierto en validación del modelo.....	38
8.4	Metabolismo en validación del modelo	39
8.5	Diferencias de peso en evaluación farmacológica	41
8.6	Nado Forzado en evaluación farmacológica	43
8.7	Laberinto acuático de Morris en evaluación farmacológica	44
8.8	Campo abierto en evaluación farmacológica	46
8.9	Laberinto en cruz elevado en evaluación farmacológica	48
8.10	Metabolismo en evaluación farmacológica	50
IX.	Discusión.....	53
X.	Conclusiones	62
XI.	Recomendaciones.....	63
XII.	Referencias.....	64
XIII.	Anexos	82

I. Resumen

El envejecimiento es un proceso multisistémico e irreversible en todos los seres vivos, que puede llevar al desarrollo de múltiples trastornos del sistema nervioso central (SNC) y de metabolismo. Esto ha abierto en los últimos años la importancia de la búsqueda de alternativas que mejoren la calidad de vida y retarden el desarrollo de problemas asociados a envejecimiento. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad protectora de *Passiflora ligularis* Juss y *Valeriana prionophylla* Standl en un modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad. Inicialmente se estableció el modelo de inducción a partir de la evaluación de tres combinaciones de D-Galactosa (D-Gal) vía subcutánea y cloruro de Aluminio (AlCl_3) vía oral (150/13, 300/26 y 450/39 mg/kg, respectivamente) durante 60 días en ratones macho CD-1 utilizando pruebas de comportamiento y parámetros bioquímicos sanguíneos por espectrofotometría. Posteriormente, se evaluó la actividad protectora de los extractos vía oral (10, 50 y 100 mg/kg) durante 60 días usando pruebas de comportamiento como el laberinto acuático de Morris, campo abierto, laberinto en cruz elevado y nado forzado, así como parámetros sanguíneos. Los datos mostraron que la combinación más alta de D-Gal/ AlCl_3 (450/39 mg/kg) fue la más efectiva para la inducción del modelo, por lo que se seleccionó para estudios posteriores. En la evaluación farmacológica se observó que el grupo administrado con *P. ligularis* a 50 mg/kg presentó tiempos significativamente mayores de nado en el cuadrante objetivo en laberinto de Morris ($P < 0.05$) y número de entradas totales en laberinto elevado en cruz ($P < 0.01$), comparados con el grupo control envejecido; mientras que a 10 mg/kg presentó menores tiempos de nado en la prueba de nado forzado ($P < 0.05$) y mayor distancia recorrida en la prueba de campo abierto ($P < 0.01$). A su vez, se observó una diferencia significativa entre los valores de colesterol total ($P < 0.001$) a todas las dosis evaluadas y de creatinina a 10-50 mg/kg de *P. ligularis*, comparadas con el grupo envejecido. Los grupos administrados con *V. prionophylla* a 10 y 100 mg/kg presentaron tiempos de nado en el cuadrante objetivo en laberinto de Morris significativamente mayores ($P < 0.05$) comparados con el grupo control envejecido; mientras que a 10 y 50 mg/kg presentaron mayores entradas totales en la prueba de laberinto elevado en cruz ($P < 0.01$). A su vez, se observó una diferencia significativa en los valores de colesterol total en sangre ($P < 0.001$) a todas las dosis evaluadas de *V. prionophylla*. Estos resultados sugieren que ambas especies pueden asociarse a protección de alteraciones del SNC y metabolismos asociados a envejecimiento.

II. Introducción

A nivel mundial la relevancia del envejecimiento en el desarrollo de enfermedades ha aumentado en los últimos años, la OMS calcula que para el año 2050 la cantidad de personas con más de 60 años aumentará de 12% a 22% (OMS, 2017). Como resultado de este aumento se puede esperar un aumento similar en el desarrollo de patologías asociadas al envejecimiento (Collins et al., 2018; Stroo et al., 2017). Entre se pueden mencionar las enfermedades neurodegenerativas entre las más prevalentes en personas mayores de 60 años (OMS, 2015). El envejecimiento se caracteriza por ser multifactorial, además es la causa de múltiples enfermedades que se desarrollan en los diferentes sistemas del cuerpo (Kim, 2003). A pesar de esto el envejecimiento no se considera como un proceso patológico (Knapowski et al., 2002). En cambio, este se considera un proceso natural que deben experimentar todos los seres vivos y es por ello que se considera inevitable (Lazarus & Harridge, 2018). A lo largo del tiempo se han realizado diferentes estudios que han permitido conocer la fisiología involucrada en este procedimiento (Goswami et al., 2019; Hahr, 2019). En base a estos se ha determinado la importancia del envejecimiento en el desarrollo de múltiples patologías (Abdelkarim et al., 2019; Glassock & Rule, 2016). El desarrollo de estas enfermedades se encuentra directamente relacionado con alteraciones a nivel celular producidas por cambios moleculares que se producen como consecuencia del paso del tiempo (Guillaumet-Adkins et al., 2017). Dichas alteraciones ocurren por medio de diferentes vías y mecanismos que derivan en la disminución de las funciones normales de los órganos y sistemas del cuerpo (Shay, 2018).

Entre las enfermedades neurodegenerativas, las más prevalentes como Alzheimer, Parkinson y demencia se encuentran asociadas al envejecimiento (Kemper, 1994; Wahl et al., 2017). Estas se caracterizan por alteraciones en las funciones fisiológicas normales del sistema nervioso central. Las alteraciones fisiológicas conducen a una serie de cambios en la conducta normal entre los que se incluyen pérdida de la memoria y dificultades motrices (Petersen et al., 1997). Como consecuencia de esto las enfermedades neurodegenerativas son una causa de mortalidad y deterioro cognitivo en adultos mayores (O'Brien et al., 2003). Además del envejecimiento existen múltiples factores de riesgo que pueden contribuir al desarrollo de estas, tal es el caso de la calidad de vida y factores genéticos (Przedborski et al., 2003). Todo el proceso fisiopatológico de neurodegeneración ha sido estudiado en múltiples ocasiones (Fone et al., 2020; Freire, 2021; Jellinger, 2010). Consecuentemente

también se han estudiado las principales patologías y el mecanismo por medio del cual se desarrollan (Jain & Goldstein, 2012; Kumar et al., 2015). La realización de estos estudios ha brindado una mejor perspectiva sobre estas enfermedades. Para estudios sobre envejecimiento, neurodegeneración y neuroprotección por lo general se seleccionan modelos in vivo debido a la complejidad del proceso (Mitchell et al., 2015). Uno de los modelos más utilizados en ratas y ratones es el de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad inducida por D-Galactosa y Cloruro de Aluminio respectivamente (Parameshwaran et al., 2010a). Por medio de este modelo se ha evaluado la capacidad neuroprotectora de productos naturales y sintéticos además de estudios de la fisiología del envejecimiento y neurodegeneración (Liao & Kennedy, 2014). En la actualidad para un país con la biodiversidad en especies vegetales como es el caso de Guatemala estas suponen una alternativa para el tratamiento o prevención de patologías (Vargas & Andrade-Cetto, 2018). En adición a esto la etnobotánica es una herramienta muy importante que brinda una guía en la selección de plantas para evaluar la acción farmacológica de estas. Esta se basa en los conocimientos milenarios sobre el uso de plantas como componentes ceremoniales y alternativas terapéuticas (Hoyler et al., 2018). Sin embargo, estas en su mayoría no poseen estudios que avalen su actividad terapéutica.

Es por ello que este estudio pretendió evaluar tanto la efectividad del modelo de envejecimiento acelerado como la actividad farmacológica de extractos de *P. ligularis* y *V. prionophylla*. Para ello se realizó la evaluación del modelo fisiopatológico, la cual consistió en administración de D-galactosa (SC) y Cloruro de Aluminio (PO) durante 60 días en dosis de 150/13, 300/26 y 450/39 mg/kg respectivamente. Posterior a los 60 días se realizaron pruebas de comportamiento, campo abierto y laberinto en cruz elevado, y metabolismo, glucosa, urea, creatinina, colesterol y triglicéridos, para evaluar la efectividad del modelo. En cuanto a la evaluación de la actividad farmacológica de los extractos de ambas plantas se realizó la inducción del modelo de la misma manera y en paralelo a esta se administró por vía oral los extractos de ambas plantas en dosis de 10, 50 y 100 mg/kg. Posterior a los 60 días se realizaron pruebas de comportamiento y metabolismo para evaluar la actividad farmacológica sobre el modelo utilizado. Los resultados revelaron posible actividad protectora sobre el sistema nervioso central en el desarrollo de estados de depresión y ansiedad, así como sobre memoria y aprendizaje, además de posible actividad protectora sobre metabolismo para ambos extractos a diferentes dosis.

III. Antecedentes

3.1 Envejecimiento

El envejecimiento se define como una disminución gradual de las funciones normales de los órganos que reduce la habilidad para mantener la homeostasis bajo situaciones específicas, como consecuencia del paso del tiempo (Knapowski et al., 2002). En general es un proceso complejo y multifactorial ya que incluye factores ambientales, genéticos y celulares. Además, es un proceso inevitable e irreversible, lo que quiere decir que todos los seres vivos deben pasar por esta disminución de las funciones fisiológicas normales. Este proceso en muchas ocasiones se considera una patología, especialmente cuando se desarrollan enfermedades asociadas al envejecimiento. Sin embargo, por la misma naturaleza del envejecimiento no existe un tratamiento para evitar envejecer. Todas las alternativas tanto farmacológicas como no farmacológicas se enfocan en mejorar la calidad de vida de las personas y en reducir el deterioro de órganos específicos para evitar el desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento. Estos tratamientos son importantes ya que como se mencionó con anterioridad existe un deterioro de las funciones fisiológicas normales. Entre las que se pueden mencionar la capacidad vital pulmonar, el flujo sanguíneo cerebral, el rango de filtración glomerular y la capacidad máxima de toma de oxígeno. Siendo el último el más afectado ya que se reduce hasta en un 80%, lo que genera daño en los órganos que necesitan del oxígeno para su funcionamiento. Es importante mencionar que muchos de los órganos afectados por el paso del tiempo inician su deterioro entre las edades de 30-40 años. Y en la mayoría de los casos presentan un deterioro de 1% por cada año a partir del inicio de la degeneración.

Esta condición se ha estudiado a lo largo de los años pudiendo determinar los mecanismos fisiopatológicos que producen el envejecimiento. Dentro de la fisiopatología del envejecimiento existen dos elementos fundamentales que aceleran la pérdida de funcionalidad de los órganos. El primero de estos es la degeneración progresiva celular, que tiene como principal causa daños a nivel molecular. Esta se puede producir en cualquier órgano o tejido y conforme avanzan los años ocurre en mayor cantidad y con mayor rapidez. El segundo es la pérdida de la capacidad de regeneración y reparación celular. Este mecanismo es sumamente importante para controlar el primer factor mencionado, y de esta manera evitar la pérdida de las funciones normales de los órganos. Al combinar ambos

factores existe una rápida degeneración de los tejidos y de órganos que a su vez generan más daño. Además de estos dos factores a nivel celular existen diferentes mecanismos moleculares que también aceleran el envejecimiento. Cabe destacar que estos mecanismos moleculares en la mayoría de ocasiones son los que inician el daño celular. Al generar este daño se pueden considerar causantes o precursores de los dos factores celulares que aceleran el envejecimiento (Kim, 2003). A continuación, se presentan los mecanismos moleculares y celulares que producen el envejecimiento.

3.1.1 Mecanismos de Envejecimiento

Según Martel et al. los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de envejecimiento se dividen en siete principales. Estos mecanismos son muy importantes para el estudio del envejecimiento y para el posible desarrollo de alternativas que mejoren la calidad de vida. Estos además de producir y acelerar el proceso de envejecimiento también se ven involucrados en el aumento de la aparición de enfermedades crónicas en diferentes sistemas del cuerpo.

3.1.1.1 Activación de vías de insulina y de factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1)

Esta es una de las vías más importantes dentro del funcionamiento del cuerpo humano. Esta es una vía energética sumamente importante. Se encarga de regular crecimiento celular, desarrollo celular, síntesis proteica y almacenamiento energético. Esta se activa cuando existe una gran cantidad de nutrientes como es el caso de glucosa y aminoácidos. Esto produce la liberación de insulina que actúa como regulador de la concentración de nutrientes. Es por ello que es de las más utilizadas dentro de las funciones normales del cuerpo humano. Sin embargo, la activación de estas vías corresponde un factor importante en cuanto al desarrollo de envejecimiento.

Existen diferentes mecanismos por medio de los cuales se puede producir y acelerar el proceso de envejecimiento por medio de estas vías. El primero y más importante indica que al activarse la señalización Insulina/IGF-1 se inhibe la síntesis de proteínas utilizadas como factores de transcripción. Específicamente las llamadas FOXO, estas inducen la expresión de un gran número de enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y chaperonas entre

otras. Estas enzimas protegen la célula y retrasan el envejecimiento de varias maneras. Estas incluyen la neutralización de especies reactivas de oxígeno, reparación de daños en ADN, mantenimiento de la estructura proteica entre otras funciones. Es por ello que al inhibir la producción de proteínas FOXO por medio de la activación de esta vía se disminuye la síntesis de enzimas protectoras y reparadoras para la célula. Lo cual desemboca en mayor daño celular y pérdida de las funciones normales que produce y acelera el proceso de envejecimiento.

Otros de los mecanismos se han observado en diferentes modelos animales. En ratones y gusanos se ha observado que un alto consumo de glucosa disminuye la esperanza de vida como consecuencia de una hiperactivación de la vía de señalización de insulina. En ratones transgénicos se ha observado que la inactivación de la vía Hormona de crecimiento/IGF-1 aumenta la longevidad en un 20%-70%. Finalmente se ha observado que una dieta alta en proteína animal, la cual induce la producción de IGF-1, está asociada con reducir la longevidad en ratones y humanos (Martel et al., 2019).

3.1.1.2 Activación de mTOR e inhibición de autofagia

mTOR es una quinasa reguladora del crecimiento celular, metabolismo y también funciona como sensor de nutrientes en la célula. mTOR es regulada por AMPK, la cual es dependiente de energía. En altas concentraciones energéticas AMPK se ve inhibida y por lo tanto mTOR también es activada. Esta quinasa se ve inhibida con bajas concentraciones de glucosa o nutrientes, y ejercicio prolongado de igual manera que la activación esta ocurre por medio de AMPK. Esta inhibición provoca una desactivación del crecimiento celular para de esa manera mantener los nutrientes necesarios para regular los niveles de energía. Cabe resaltar que la vía de señalización que involucra mTOR es la vía Insulina/IGF-1, por lo cual ambos mecanismos se encuentran interrelacionados. Además de la desactivación del crecimiento celular también se activa la autofagia al momento de inhibir mTOR. La autofagia es un proceso en el cual la célula se alimenta de sus propios orgánulos y moléculas. Esta es importante ya que permite deshacerse de los orgánulos dañados o inservibles, por lo cual optimiza la función celular y aumenta su vida útil. Esto se traduce en rejuvenecimiento celular el cual es importante para evitar procesos de envejecimiento. Estos procesos ocurren al inhibir la expresión de mTOR, sin embargo, la mayor parte del

tiempo la expresión de esta quinasa es estimulada. Esta se ve estimulada por insulina, factores de crecimiento y estrés oxidativo, lo cual permite asociarla con otras patologías relacionadas con el envejecimiento. Al mantenerse estimulada la expresión de mTOR también se evita la activación de la autofagia. Al ocurrir esto se provoca que no haya rejuvenecimiento celular y por lo tanto los orgánulos dañados se mantienen dentro de la célula causando daño celular. El daño celular finalmente desemboca en el desarrollo de envejecimiento y por lo tanto la pérdida de las funciones celulares normales. Finalmente es importante mencionar que, sumado a esto, con el paso de los años la autofagia también disminuye. Lo cual representa una pérdida de las funciones celulares aún más rápida. (Martel et al., 2019).

3.1.1.3 Alta concentración de ROS y otros radicales libres

El envejecimiento se caracteriza por una acumulación progresiva de daño celular y disminución de en los mecanismos de reparación y reemplazo. Esto provoca un malfuncionamiento y pérdida de las funciones fisiológicas normales. En la generación de daño celular tienen un papel sumamente importante y mayoritario las especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres. Las ROS se producen como un subproducto de la respiración celular que ocurre en la mitocondria y causan daño a las células de diferentes maneras. Conforme el paso del tiempo ocurre una acumulación de ROS ya que la función mitocondrial disminuye. El aumento en la cantidad de ROS afecta diferentes células en el cuerpo lo cual puede llegar a causar daño proteico, disfunción de los orgánulos y daños en el ADN. La acumulación de todos estos tipos de daño desemboca en una disfunción celular característica del envejecimiento (Ganjam et al., 2019; Martel et al., 2019; Trist et al., 2019).

3.1.1.4 Erosión telomérica e inhibición de telomerasa

Los telomeros son conocidos como la parte final del cromosoma, estos son sumamente importantes en el proceso de replicación de material genético en la célula. Su importancia radica en que estos marcan el límite de la replicación ya que poseen secuencias no codificantes recurrentes en la parte 3' final. Esto ocurre para prevenir la pérdida de secuencias codificantes durante la replicación. Es importante mencionar que con cada replicación se pierde una parte de la cadena telomérica, esta puede ser de 30 hasta 200 nucleótidos. Al existir esta pérdida los telomeros inevitablemente sufren un acortamiento, el

cual es considerado como un reloj mitótico ya que se puede determinar cuántas veces se ha replicado la célula en base a la longitud de estos. Cuando el acortamiento es crítico las células pueden llegar a un estado de senescencia que afecta las funciones celulares alterando los patrones de expresión genética de los inhibidores del ciclo celular, además disminuye el potencial proliferativo celular y se activa la apoptosis. Además del acortamiento provocado por los ciclos de replicación celular también se puede producir erosión telomérica. Esta consiste en alteración de los telómeros por factores externos como es el caso de daño oxidativo, esto produce alteraciones que posteriormente se pueden detectar como ADN dañado o roto que posteriormente será destruido. La destrucción de estas porciones cromosómicas provoca alteraciones en la expresión genética y por lo tanto altera las funciones celulares normales lo cual desemboca finalmente en la pérdida de las funciones celulares y desarrollo de envejecimiento.

Es importante mencionar que para poder evitar estos mecanismos existe una enzima que alarga y protege los telómeros. La telomerasa es el mecanismo de defensa ante estos mecanismos. Esta consta de dos componentes, un componente de ARN (TERC) y un componente catalítico (TERT). Esta actúa utilizando a TERC como modelo para que TERT pueda sintetizar nuevas porciones teloméricas y colocarlas en el final de la cadena. En general la actividad de la telomerasa es baja, por lo cual se puede considerar como inhibida constantemente. Esta inhibición permite que no exista protección ante el daño y la erosión telomérica lo cual finalmente provoca la disfunción celular y por lo tanto el envejecimiento. (Aix et al., 2018).

3.1.1.5 Aumento de células senescentes

La senescencia es un estado irreversible en el cual las células dejan de replicarse y usualmente desarrollan resistencia a la apoptosis. Una gran variedad de tipos estrés celular pueden provocar senescencia, entre estos se incluyen el daño al ADN (erosión telomérica), expresión oncogénica, nutrientes (grandes cantidades de glucosa), metabolitos, hormonas, daño molecular e inflamación. Las células senescentes usualmente atraen a las células inmunes provocando que estas generen inflamación por medio de la secreción de citocinas proinflamatorias y patrones moleculares asociados a daño, lo cual afecta la función fisiológica normal de las células. Estas células se acumulan en varios tejidos durante el

envejecimiento, lo cual contribuye a la disfunción de órganos y al desarrollo de enfermedades crónicas. (Childs et al., 2015).

3.1.1.6 Productos finales de glicación avanzada (AGEs)

La glicación se describe como una reacción no enzimática entre un azúcar reductor y otra molécula que puede incluir proteínas, nucleótidos y lípidos. Esta reacción ocurre debido a un exceso en las concentraciones de carbohidratos en la sangre y contribuye al desarrollo de patologías como diabetes y aterosclerosis; además es importante mencionar que están asociados con estrés oxidativo e inflamación que pueden llegar a provocar enfermedades neurodegenerativas. La relación entre AGEs y envejecimiento es sumamente discutida ya que se presentan diferentes dificultades entre las que se pueden mencionar la variedad de fuentes de AGEs, la aparición gradual de AGEs que hace muy complicado el proceso de detección en humanos y la falta de métodos lo suficientemente sensibles para determinación y cuantificación de AGEs. Sin embargo, se consideran un factor clave en el desarrollo del envejecimiento. En total los AGEs incluyen más de 20 productos diferentes, existen diferentes estudios en varios sistemas del cuerpo humano que relacionan los AGEs con el envejecimiento. Entre estos estudios se incluyen los realizados en la piel y su relación con el colágeno. También se puede mencionar el realizado en la salud de los huesos y finalmente estudios en tejido nervioso, obteniendo como resultado que la acumulación de AGEs en estos sistemas aceleran el proceso de envejecimiento y favorecen el desarrollo de enfermedades crónicas. Por lo cual es considerado un mecanismo sumamente importante en el desarrollo del envejecimiento (Dong et al., 2017; Wei et al., 2017).

3.1.1.7 Disfunción mitocondrial

La mitocondria tiene a su cargo muchas funciones importantes dentro de la producción de energía. Este orgánulo es el encargado de la máxima producción de ATP en la célula, además de poseer funciones de señalización celular y regulación de la muerte celular. Al pasar el tiempo la función mitocondrial se puede ver reducida, esta reducción se puede traducir en menor producción de energía, mayor producción de ROS y desregulación de diferentes procesos celulares. Todas estas alteraciones afectan las funciones celulares normales y por lo tanto existe una disminución de los procesos fisiológicos y por lo tanto acelera el proceso de envejecimiento.

Además de la disfunción mitocondrial como un problema funcional también se debe tomar en cuenta otro factor como es el caso de la comunicación entre orgánulos. Esta se produce usualmente por interacción directa entre orgánulos, a excepción de la comunicación entre mitocondria y retículo endoplasmático que no necesita interacción directa. La comunicación es fundamental para el desarrollo de funciones biológicas normales por medio de señalización de diferentes vías y regulación de otras. Al existir alteraciones en el proceso de comunicación pueden llegar a ocurrir problemas como es el caso del desarrollo de estrés mitocondrial que resulta en acumulación citoplasmática de lisosomas disfuncionales con baja capacidad hidrolítica que afecta directamente las funciones celulares normales y por lo tanto favorece el desarrollo de envejecimiento. (Fernández-Mosquera et al., 2017).

3.1.2 Envejecimiento y su relación directa con el desarrollo de enfermedades asociadas al SNC

El envejecimiento es un factor principal en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. El envejecimiento es un proceso en el cual se pierden las funciones celulares normales y se pierde la capacidad de reparación y regeneración. Este proceso ocurre en diferentes sistemas y órganos del cuerpo humano y el sistema nervioso no está exento de este proceso. Sobre el cerebro humano se puede mencionar que a pesar de que constituye menos del 2% del total del peso del cuerpo humano llega a consumir más del 20% de los nutrientes totales. Este funciona por medio de potenciales de acción y es posible la transmisión de señales por medio de sinapsis. Para la propagación de los potenciales de acción y las señales es necesario el uso de ATP como fuente energética, por ello es necesaria la gran cantidad de nutrientes. Sus células funcionales son conocidas como neuronas y funciona por medio de redes neuronales que permiten una comunicación más eficiente. El envejecimiento afecta directamente este órgano y ese es el proceso conocido como neurodegeneración. En el proceso de envejecimiento normal se deben tomar en cuenta factores genéticos y ambientales, y es diferente para cada individuo. En cuanto a los procesos que se ven afectados en el cerebro como causa del envejecimiento se encuentran la pérdida de memoria, disminución en las funciones ejecutoras, y alteraciones en el comportamiento. Estas alteraciones son producidas por algunos de los mecanismos de envejecimiento que se producen alrededor del cuerpo humano. Entre estos se pueden

mencionar la acumulación de estrés oxidativo, disminución de la función mitocondrial y reducción en la regeneración celular por mencionar algunos. Algunos de estos mecanismos de envejecimiento permiten que se produzcan moléculas y compuestos que favorecen la aparición de enfermedades específicas (J. J. Chen, 2019). Este es el caso de la inhibición de la autofagia, esta al inhibirse permite la formación de Amiloide β , que es fundamental en la fisiopatología del desarrollo de Alzheimer. Además de esto la inhibición de la autofagia también participa en el desarrollo de Parkinson y la enfermedad de Huntington.

3.2 Neurodegeneración:

El cerebro humano es un órgano sumamente complejo, este se encuentra dentro del cráneo y es el encargado de regular todas las funciones del cuerpo humano. Como se mencionó con anterioridad el consumo energético de este es sumamente elevado debido a la cantidad de señales que transmite. Las señales se transmiten a través de sus células funcionales llamadas neuronas, además de estas también posee células estructurales llamadas células gliales. Este órgano al igual que el resto de órganos del cuerpo humano también se ve afectado por los procesos fisiológicos como el envejecimiento. En este ocurre un proceso llamado neurodegeneración. El término neurodegeneración hace referencia a la disminución progresiva de las funciones fisiológicas normales del cerebro. Este como se mencionó con anterioridad tiene como principal causa el envejecimiento. Además del envejecimiento se deben tomar en cuenta otros factores como los son los factores genéticos y ambientales. Estos factores alteran las funciones cerebrales de manera que se pierden diferentes funciones fisiológicas normales. Entre estas se encuentran funciones cognitivas, motoras y funciones cerebrales mayores. En la mayoría de los casos también se presenta la aparición de patologías específicas que afectan funciones específicas. Es importante mencionar que las enfermedades neurodegenerativas no tienen cura por lo cual únicamente se pueden controlar y prevenir, pero no curar. Entre las patologías más comunes se pueden mencionar dos que son consideradas las de mayor incidencia a nivel mundial. Estas son Alzheimer y Parkinson. Cada una de estas es producida por diferentes factores, en el caso de Alzheimer por la producción de Amiloide β . El Parkinson por deficiencias en la producción de dopamina. El desarrollo de ambas patologías se encuentra directamente relacionado con envejecimiento y las vías moleculares involucradas en el desarrollo de estas patologías están relacionadas con las vías moleculares presentes en el

envejecimiento. Como es el caso de la producción de daño oxidativo por ROS, la disfunción mitocondrial, aumento de células senescentes y vías relacionadas con el metabolismo de carbohidratos como es el caso de la vía insulina/IGF-1 (Madore et al., 2020). A continuación, se presentarán de manera más detallada los mecanismos más importantes de neurodegeneración y la manera en que contribuyen al desarrollo de patologías.

3.2.1 Mecanismos de Neurodegeneración

Los mecanismos involucrados en neurodegeneración son muy parecidos a los involucrados en envejecimiento. Sin embargo, es importante delimitar cuales son específicos para neurodegeneración y comprender como actúan a nivel celular y molecular sobre el cerebro. Se debe tomar en cuenta que algunos de estos mecanismos son producto de los mecanismos involucrados en envejecimiento. En este caso se dividen en cinco principales mecanismos los cuales se presentan a continuación.

3.2.1.1 Dinámica proteica anormal

Las proteínas son macromoléculas sumamente importantes en el desarrollo de las funciones celulares normales. Estas desempeñan funciones enzimáticas, de transportadores e incluso de receptores para antígenos específicos. Es importante resaltar que uno de los mecanismos por medio del cual se pueden dañar las células gliales y neuronales es la interacción anormal entre proteína-proteína. Ese tipo de anormalidades lleva a un deterioro no solamente de una neurona sino de varias y en la mayoría de los casos incluso provoca la desintegración de redes neuronales complejas lo cual limita las funciones cerebrales normales. El mecanismo exacto por el cual ocurre esto no se conoce del todo. Sin embargo, muchas de estas interacciones anormales son aleatorias o por daño proteico. Estas interacciones alteran la conformación de las proteínas cerebrales y provocan el desempaquetamiento de manera gradual. Lo cual provoca que estas proteínas se conviertan en polímeros insolubles que adoptan formas desordenadas y no son funcionales. Los polímeros amorfos forman depósitos por medio de agregación y se convierten en estructuras fibrilares que favorecen las propiedades amiloidóticas. Como consecuencia de esto se favorece la pérdida de funciones cerebrales y el desarrollo de patologías como Alzheimer. Además de las interacciones anormales entre proteínas existen más problemas asociados a desordenes proteicos que generan daño neuronal. El doblamiento proteico es sumamente importante ya que en base a este se obtienen las

actividades específicas de la proteína. Al no doblarse correctamente o desdoblarse la proteína no podrá realizar sus funciones normales. Dentro de las causas de daño neurocelular se encuentran defectos en el doblamiento o desdoblamiento de las proteínas. Estos pueden ocurrir gracias a secuencias de aminoácidos dañadas en la proteína, sustituciones innecesarias de aminoácidos en la estructura funcional, y errores inherentes. Además, pueden producirse problemas con las chaperonas, que son las encargadas del doblamiento proteico. A pesar de existir este tipo de problemas la célula posee su propio sistema de control de calidad para proteínas. Este es proporcionado por varios orgánulos celulares como el retículo endoplasmático que se encarga del doblamiento proteico y su regulación. En el citosol ocurre la detección de proteínas desdobladas para evitar la pérdida de funciones celulares. Sin embargo, conforme avanzan los años estos mecanismos se vuelven más lentos, por lo cual existe un aumento de polímeros deformes. Lo cual afecta la función celular y favorece la neurodegeneración (Jellinger, 2010).

3.2.1.2 Muerte apoptótica

La apoptosis se puede definir como una forma de muerte celular controlada que se caracteriza por contracción celular, condensación de cromatina, fragmentación de ADN y la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados rápidamente por macrófagos. Este proceso es dependiente de energía, por ello utiliza ATP para síntesis proteica, activación de la señal, formación de apoptosoma y reacciones de fosforilación de protein-quinasa. El proceso de apoptosis es el encargado de regular las dos vías naturales de muerte neuronal. Estas son muerte temprana de precursores de proliferación y neuroblastos jóvenes postmitóticos. La segunda es la muerte tardía de neuronas postmitóticas. Este es un proceso natural y normal en la fisiología neuronal. Sin embargo, durante la cascada apoptótica se activan diferentes factores que son los que provocan el daño celular neuronal. En el caso de la enfermedad de Alzheimer se ha observado la apoptosis como efector de la desregulación de dos marcadores moleculares importantes en el desarrollo de esta los cuales son proteína BAX y Caspasa-3, además de porciones de ADN fragmentado junto a la activación de estas proteínas. La activación de estas caspasas precede la formación de enredos neurofibrilares en cerebros de pacientes con Alzheimer. Esto finalmente provoca la formación de amiloides que provocan esta patología. En el caso de la enfermedad de Parkinson se ha observado principalmente en modelos de ratones a los cuales se les ha inducido Parkinson con MPTP, el mecanismo de la inducción ocurre por efecto apoptótico

inducido. Esto se pudo determinar por la aparición de cadenas de ADN fragmentadas, características de la apoptosis, cambios morfológicos de los núcleos y finalmente por la activación de la caspasa 3, todo esto sobre neuronas dopaminérgicas. Todos estos elementos sugieren la apoptosis como factor fundamental en el desarrollo de enfermedad de Parkinson (Okouchi et al., 2007; Siracusa et al., 2020).

3.2.1.3 Disfunción mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo sumamente importante para todas las células del cuerpo humano. Este es el principal productor de energía en las células. Es por esta razón que en las células neuronales su importancia se incrementa debido a la gran cantidad de energía que necesita el cerebro para su correcto funcionamiento. Además de esta función energética también se encarga de otras funciones como la regulación metabólica, control del ciclo celular y desarrollo de la muerte celular. Es por ello que anomalías en la función mitocondrial suponen una causa de la pérdida de función celular. Estas anomalías pueden ser causadas normalmente por el envejecimiento. Al existir una función limitada o anormal de la mitocondria además de que no se producirá la cantidad de energía necesaria para el funcionamiento celular también se debe tomar en cuenta que aumentará la producción de ROS. La hiperproducción de especies reactivas provoca daño mitocondrial lo cual se traduce en alteraciones durante la fosforilación oxidativa que la dejan incompleta. Esto representa efectos catastróficos en la producción de energía por medio de la mitocondria. Esto contribuye al favorecimiento de la citotoxicidad por medio de dos vías las cuales son necrosis y apoptosis. Cabe destacar que el daño mitocondrial producido por el envejecimiento ocurre por medio de dos mecanismos diferentes. El primero de estos ocurre por medio de daños en las enzimas que participan durante la cadena respiratoria. El segundo de estos mecanismos ocurre directamente sobre el ADN mitocondrial. Es importante mencionar que este daño puede llegar a causar daño tanto en el mantenimiento neuronal como en la función axonal.

La disfunción mitocondrial posee un rol importante en el desarrollo de las dos patologías neurodegenerativas más prevalentes. En el caso de la enfermedad de Alzheimer existe una gran cantidad de evidencia que implica problemas en el metabolismo energético y daño

oxidativo como factores importantes en el desarrollo de la enfermedad. En los cerebros con Alzheimer se ha observado en promedio una reducción de 50% en el contenido de ARNmt que provocan una reducción en la fosforilación oxidativa. Todo esto desemboca finalmente en daño neuronal causado por anomalías en la función mitocondrial. Estas anomalías en la función mitocondrial se atribuyen a la presencia de Amiloide β oligomérico.

En el caso de la enfermedad de Parkinson las alteraciones mitocondriales y la producción de especies oxidantes son partes importantes del proceso patológico. Entre los daños que se han observado en la enfermedad de Parkinson se pueden mencionar en varias áreas de la mitocondria. Se pueden mencionar disfunción en la cadena de transporte de electrones, daño al ADNmt y anomalías en la morfología y dinámica mitocondrial. En general la disfunción mitocondrial favorece e incrementa la turbulencia libre. Esta desestabiliza las redes microtubulares y promueve la oligomerización de α -Sinucleína, las cuales son mutaciones que provocan la enfermedad de Parkinson (Hoffman et al., 2017; Jellinger, 2010).

3.2.1.4 Daño oxidativo, producción de ROS y radicales libres

Parte de este mecanismo se abordó en el apartado anterior. La producción de ROS y otros radicales libres causan daño celular que se traduce en pérdida de la función neuronal normal. El daño oxidativo como tal se produce por una producción mayor de especies oxidantes reactivas en comparación con los mecanismos antioxidantes. Este daño como se mencionó con anterioridad puede alterar moléculas biológicas importantes y producen una cascada de eventos. Entre estos se puede mencionar disfunción de la respiración mitocondrial, excitotoxicidad y un aumento fatal en el calcio citosólico. La acumulación de estos factores son los que conducen finalmente a la disfunción celular. Los mecanismos por medio de los cuales ocurren estos daños son varios. El primero de estos indica que la producción excesiva de óxido nítrico y ROS puede mediar el desdoblamiento proteico en ausencia de predisposición genética. El segundo de estos ocurre por acción de los radicales libres sobre las diferentes macromoléculas del cuerpo. Entre los diferentes tipos de radicales libres generados por los organismos los radicales hidroxilos y peroxinitrito son los más potentes. Estos pueden dañar células por vías no selectivas de oxidación de proteínas, lípidos, ácidos grasos y ácidos nucleicos. El tercero de estos mecanismos es sobre la regulación de autofagia. En este mecanismo el radical superóxido juega un papel

importante ya que es la especie reactiva con mayor influencia en la regulación de autofagia. La autofagia ocurre cuando la célula no logra compensar el desbalance oxidativo, lo cual genera estrés. Posterior a eso la célula entra rápidamente en apoptosis con muerte celular rápida mientras la respuesta compensatoria puede garantizar supervivencia a largo plazo (Hamza et al., 2021; Jellinger, 2010; Trombetta-Lima et al., 2020).

3.2.1.5 Inflamación

En el sistema nervioso central las reacciones de inflamación crónica son señales de activación inmune. El proceso de inflamación en el sistema nervioso central contribuye directamente con la disminución de la función neuronal. Dentro de los principales mecanismos que causan inflamación en el sistema nervioso central y dan origen a enfermedades neurodegenerativas se pueden mencionar varias. La primera de estas es el rompimiento de la barrera hematoencefálica con influencia de proteínas plasmáticas, lo cual causa daño local y se considera como el mecanismo inicial de varias enfermedades neurodegenerativas. El segundo de estos incluye la infiltración de fibrinógeno y la actividad microglial que pueden llegar a causar daño neuronal en cerebros inflamados que sufren de Alzheimer. En ocasiones el proceso inflamatorio ocurre debido a disfunción en las células inmunes. En el sistema nervioso central los dos tipos de células que se pueden observar son los astrocitos y los fagocitos mononucleares que incluyen la microglia y los macrófagos perivasculares. Con la activación de estas células se favorece la expresión de marcadores moleculares proinflamatorios. Entre estos se puede mencionar las interleucinas (IL), el factor de necrosis tumoral (TNF), y especies reactivas como óxido nítrico o diferentes ROS. Al activarse estos factores el sistema inmune produce respuestas inflamatorias. Lo cual causa daño celular y por lo tanto pérdida de las funciones neuronales normales (Beurel et al., 2013; J. Chen et al., 2013; Shamim & Laskowski, 2017).

3.2.2 Modelos *in vivo* utilizados en el estudio de envejecimiento y neurodegeneración:

Los modelos *in vivo* brindan una perspectiva importante en el estudio de factores neurodegenerativos y protectores. En el estudio de actividad biológica de extractos vegetales son sumamente importantes ya que permiten determinar la actividad biológica de un extracto en un organismo que desarrolla todas sus funciones fisiológicas normales. A

continuación, se presentan algunos de los modelos *in vivo* más utilizados en la evaluación de extractos vegetales y su actividad sobre envejecimiento y neurodegeneración.

Modelo en ratones macho Kuming con neuroenvejecimiento inducido por D-Galactosa y A β 1-42: El modelo utilizado en diferentes estudios con diferentes animales para el estudio de envejecimiento corresponde a la administración de D-galactosa. Un aumento en el consumo de carbohidratos acelera el envejecimiento debido a varios de los mecanismos explorados con anterioridad. Entre estos se puede mencionar la activación de vías como la Insulina/IGF-1, también los productos de finales de glicación avanzada aceleran este proceso. En general es un modelo sumamente confiable para el estudio de envejecimiento. Asociado a la administración de D-galactosa también se implementó el uso de Cloruro de aluminio, este como neurotóxico. Este modelo se desarrolló en ratones macho Kuming, sin embargo, puede ser aplicado a otras cepas de ratones. En el estudio que se utilizó el modelo se determinó la actividad neuroprotectora y anti-envejecimiento de un extracto vegetal. Esto indica la viabilidad de la aplicación de un modelo similar *in vivo* para determinar la actividad de extractos vegetales (Zhong et al., 2019).

Modelo en ratas macho Wistar con Alzheimer inducido por A β 1-42: En este caso el modelo utilizado fue específicamente para el estudio de una patología. Para la inducción de Alzheimer en el modelo *in vivo* se utilizó como agente inductor el cloruro de aluminio. El cloruro de aluminio genera neurotoxicidad gracias a la exposición crónica a aluminio. El aluminio es un metal tóxico que afecta tanto cerebro como hueso, bazo e hígado. El cerebro es el más afectado ya que es el órgano en donde más se acumula y finalmente causa neurotoxicidad. Este genera pérdida de funciones cognitivas, neuroinflamación y daño oxidativo. Para el estudio se utilizaron ratas macho Wistar para determinar la actividad de un extracto vegetal. Lo cual ratifica la importancia de los modelos *in vivo* en el estudio de neurotoxicidad y la actividad de extractos ante esta. Además, brinda una perspectiva de la cantidad de modelos diferentes que se pueden utilizar para evaluar este tipo de actividad (Chiroma et al., 2018).

Modelo en ratas Wistar macho con Parkinson inducido por Rotenona: Al igual que en el estudio anterior se utilizó un modelo para una patología específica la cual es Parkinson. Para la inducción de Parkinson se pueden utilizar diferentes reactivos. Sin embargo, el más

utilizado es la Rotenona, este reactivo induce Parkinson por medio de diferentes mecanismos. Entre estos se encuentra la producción de elevados niveles de estrés oxidativo. Además, eleva los niveles de citoquinas proinflamatorias lo cual conlleva a una pérdida significativa de las funciones motoras. En este caso el estudio se centró en la actividad anti-Parkinson de la espermidina. Para ello se utilizaron ratas macho Wistar a las cuales se les indujo Parkinson. La aplicación de modelos *in vivo* no es exclusiva para la evaluación de extractos vegetales. Estos pueden ser utilizados para evaluar fármacos, moléculas o metabolitos específicos como la molécula estudiada en este estudio (De Oliveria et al., 2009; Sharma et al., 2018).

3.3 Medicina tradicional en Guatemala

América Latina es una región con una gran biodiversidad tanto de fauna como de especies vegetales. La gran diversidad en cuanto a plantas que presentan la mayoría de países de la región permite una gran cantidad de posibles alternativas para el desarrollo de terapias basadas en productos naturales. En gran parte del territorio latinoamericano habitaron grandes civilizaciones como es el caso de los mayas, aztecas e incas, todas con un gran conocimiento de medicina tradicional. Guatemala es parte de una región en la que habitaron los mayas, esta civilización se caracterizó por su implementación de técnicas médicas basadas en plantas. Varios de estos conocimientos se han mantenido gracias a la transmisión entre generaciones a partir de la comunicación oral. En la actualidad en el interior del país aún se utilizan varios de estos métodos de medicina tradicional en las comunidades. El problema dentro de la aplicación de la medicina tradicional es que en muchas ocasiones esta no es del todo confiable. Esta principalmente se basa en el conocimiento empírico y no se tienen protocolos específicos para la identificación y uso correcto de las plantas. Por ejemplo, dentro de la selección de plantas existen muchas que presentan muchas características morfológicas similares y por lo tanto se dificulta su selección e identificación. Además de esto no se puede garantizar que las plantas utilizadas poseen el efecto farmacológico deseado ya que en la mayoría de los casos estas carecen de estudios que comprueben estas actividades (Cáceres & Cruz, 2019). A pesar de estos problemas la medicina tradicional supone una alternativa sumamente viable y accesible como prevención y adyuvante en el tratamiento de enfermedades crónicas. La utilización de plantas como tratamiento de varias enfermedades corresponde a una parte sumamente importante en las comunidades del interior del país. Es por ello que es necesario realizar estudios específicos de la actividad biológica de las plantas utilizadas con mayor frecuencia.

Además de la evaluación de esta actividad también es necesario buscar alternativas para integrar este tipo de medicina a la medicina moderna y de esta manera favorecer la calidad de vida de los pacientes (Hoyler et al., 2018). El uso de plantas medicinales no se limita a un solo sistema o región del cuerpo humano. Estas se pueden aplicar para tratar diferentes patologías. Muchas de las plantas que se utilizan incluso no son nativas, sin embargo, se utilizan diferentes comunidades. Algunas poseen actividad antimicótica como es el caso de *Valeriana prionophylla* y *Solanum nigrescens* las cuales fueron evaluadas en dos trabajos de tesis (Behar, 1993; García, 2013). Otras plantas con actividad antimicrobiana como es el caso de plantas de la familia anacardiaceae, del género *Smilax*, *Brosium alicastrum*, *Cassia alata*, *Quercus skinneri*, y *Tabebuia rosea*, todas igualmente evaluadas mediante trabajos de tesis (Hernandez, 1995; Pineda, 1998; Taracena, 1990). También se ha evaluado la actividad antiinflamatoria *Gnaphalium stramineum* y *Arrabidea chica* (do Amaral et al., 2012; Rastrelli et al., 1998). Además de las presentadas anteriormente se abordarán algunas plantas utilizadas en medicina tradicional con actividad sobre el sistema nervioso central.

3.3.1 Plantas nativas con actividad sobre el sistema nervioso central

3.3.1.1 Sedantes y relajantes:

Passiflora ligularis: *P. ligularis* es una planta nativa de la región lationamericana, esta se distribuye desde México hasta el sur de Perú. Se conoce comúnmente como Granadilla, es una planta trepadora de tallos cilíndricos, y glabros con hojas acorazonadas de color verde oscuro. Posee flores con brácteas ovales, foliosas y pétalos blancos rosados. Su composición química se basa principalmente en flavonoides que son los que le confieren actividad biológica. Entre los metabolitos más importantes que presenta esta planta se pueden mencionar la Apigenina, Luteolina, Quercetina, Vitexina, Isovitexina y Orientina. Su actividad farmacológica es su función como sedante, esta actúa a nivel del sistema nervioso, posee actividades relajantes y calmantes por lo cual es utilizada en crisis nerviosas y para estrés. Como resultados obtenidos del estudio se determinó que los extractos de *Passiflora ligularis* poseen mayor actividad ansiolítica comparada con extractos de *Passiflora mixta*, todo esto en ratones *Mus musculus* (Balseca Chávez, 2016). Esto comprueba la actividad sobre el sistema nervioso central de los extractos de esta planta, lo cual la convierte en una candidata para evaluar sus propiedades neuroprotectoras y anti envejecimiento.

Valeriana prionophylla: Esta planta pertenece al género Valeriana. Es originaria de Guatemala. Aún no se realizan estudios de su caracterización y composición fitoquímica. Entre la actividad biológica atribuida a esta planta se puede mencionar actividad antioxidante y vasorrelajante. Además, se ha observado actividad ansiolítica y antidepresiva. Y es de gran uso en medicina tradicional. Un estudio realizado en el año 2011 sobre los efectos antidepresivos de esta planta arrojó como resultado que posee actividad antidepresiva. El estudio fue realizado en un modelo *in vivo* en ratones hembra Swiss y comprueba la actividad sobre el sistema nervioso central. Sin embargo, no se evaluó su actividad neuroprotectora (Holzmann et al., 2011).

Ternstroemia tepezapote: Es una planta originaria del área desde México hasta Panamá, puede llegar a medir hasta 20 metros, sus hojas son elíptica a oblongo-obovada. Miden de 3.7 a 8.6 cm de largo y de 1.4 a 3.6 cm de ancho. Sus flores son blancas a rosadas, axilares con pétalos amarillos. Esta es conocida como trompillo y se determinó su actividad sedante e hipnótica en un trabajo de tesis del año 2007 en el cual se evaluó su actividad junto a la actividad de otras dos plantas no nativas por medio de un modelo *in vivo* en ratones macho albinos a los cuales se les administró por medio de infusiones acuosas distintas dosis de extractos de las tres plantas. También se evaluó la prueba de potenciación de sueño para comprobar su acción hipnótica y se concluyó que si poseía actividad sedante e hipnótica (Castillo, 2007).

3.3.1.2 Estimulantes

Theobroma cacao: Esta planta se distribuye desde el sur de México hasta parte de las amazonas. Es un árbol pequeño que puede llegar a los 20 metros, posee una copa baja, densa y extendida. Sus hojas son grandes, alternas, colgantes, elípticas u oblongas. Su corteza externa es de color castaño oscuro, agrietada, áspera y delgada. Sus flores se presentan en racimos a lo largo del tronco y las ramas, son de color rosa, púrpura y blanco de talla pequeña. Es conocida por su efecto estimulante en el sistema nervioso central el cual es posible gracias a la presencia de alcaloides. Un estudio del año 2017 determinó la actividad protectora contra el daño oxidativo por parte de esta planta. Para ello se indujo neuro y cardiotoxicidad en ratas macho Wistar con doxorubicina. El resultado obtenido indicó que el extracto de las hojas de *T. cacao* protege contra el daño oxidativo tanto en

cerebro como en el corazón. Este estudio indica las propiedades neuroprotectoras por medio del mecanismo de daño oxidativo inducido por doxorubicina. Esto convierte a esta planta nativa de la región en un candidato para su evaluación en neuroprotección y envejecimiento (Kosoko et al., 2017; Nehlig, 2013).

Tagetes lucida: Esta planta es nativa de Guatemala y de México. Es comúnmente conocida como pericón y es muy utilizada dentro la medicina tradicional. Es una planta herbácea, perenne y erecta que alcanza los 80 cm de alto. Sus hojas son simples, opuestas, indivisas, sésiles, lineares a oblongas y elípticas. Sus flores son liguladas, amarillas, con láminas flaveladas o suborbiculares. Esta planta se utiliza principalmente para tratar el malestar estomacal y se ha evaluado esta propiedad por medio de un estudio in vitro de un trabajo de tesis en el año 1989. Se evaluó extracto de éter y de benceno de esta planta para comprobar su actividad antiespasmódica (Salguero, 1989). Sin embargo, se ha evaluado su actividad como antidepresivo. Para este estudio se utilizaron ratas Wistar macho y se obtuvo como resultado que favorece la actividad antidepresiva. Además de esto se determinó que no posee efectos sobre la actividad motora y comportamiento sexual por lo cual se sugiere validar su uso en humanos (Gabriela et al., 2012; Ortiz et al., 2013).

IV. Justificación

Las enfermedades neurodegenerativas son una causa común de mortalidad y deterioro cognitivo en adultos mayores. Alzheimer, Parkinson y demencia son las más prevalentes a nivel mundial (OMS, 2015). Aproximadamente de 50 millones de personas sufren alguna de estas patologías (OMS, 2017). De estos 50 millones un 60% viven en países de ingresos bajos y medios y se calcula que entre un 5% y 8% de la población general de 60 o más años sufren demencia en algún momento. Las proyecciones a futuro son aún más complicadas, se estima que para 2030 el total de personas aumente a 82 millones y para 2050 hasta 152 millones (OMS, 2019). Este aumento representa una disminución de la calidad de vida tanto de las personas que las padecen como de su entorno (Sixsmith et al., 2008). Para los países en vías de desarrollo incluso representa una disminución de la esperanza de vida debido al elevado costo y poco acceso a tratamientos para gran parte de la población (Tschanz et al., 2004).

A pesar del elevado costo de los tratamientos farmacológicos para enfermedades neurodegenerativas estos no son suficientes para curar a los pacientes. Estos se centran en el control de los signos y síntomas, pero no representan una cura definitiva. La mejor estrategia para el control de este tipo de patologías es la prevención. Esta se logra por medio de diferentes alternativas tanto farmacológicas como no farmacológicas (Khan et al., 2006). La utilización de productos naturales ha tomado auge como una alternativa para la prevención de este y todo tipo de enfermedades en la última década. Evidencia de esto es el estudio realizado por la red europea de medicina alternativa y complementaria en el cual se presentan aspectos como la aplicación de productos herbales y homeopáticos en la medicina moderna (Cambrella, 2012). En países con una amplia biodiversidad, cultura milenaria en el uso de plantas medicinales y poco acceso a servicios de salud y medicamentos como Guatemala es imperativo el uso de esta alternativa (Stepp, 2018). Para la implementación de esta alternativa debe existir evidencia científica que avale la actividad de las especies vegetales. Entre las plantas tradicionales con actividad sobre sistema nervioso central se pueden mencionar las familias Valerianaceae y Passifloraceae. Ambas conocidas por su actividad sedante sobre el sistema nervioso central (Awad et al., 2007; Marroquín et al., 2012; Rodríguez-Cruz et al., 2020)(Awad et al., 2007; Marroquín et al., 2012; Rodríguez-Cruz et al., 2020). La familia Valerianaceae posee metabolitos como los valepotriatos y el ácido valerénico, los cuales se cree son protectoras del sistema

nervioso central y se ha evaluado su actividad en estudios de ansiedad, memoria y neuroinflamación (Müller et al., 2012; Nam et al., 2013; Rodríguez-Cruz et al., 2020; Vishwakarma et al., 2016) En cuanto a la familia Passifloraceae esta posee apigenina y quercetina, los cuales se han evaluado con resultados prometedores en estudios sobre su actividad antioxidante y protectora del sistema nervioso central y en modelos de ansiedad y depresión (M Al kuraishy, 2020; Marroquín et al., 2012; Otify et al., 2015). Es por ello que se deben estudiar con mayor profundidad las especies endémicas del país.

V. Objetivos

4.1 Objetivo General

- 4.1.1 Evaluar la acción neuroprotectora y antienvjecimiento de extractos de *Valeriana prionophylla* y *Passiflora ligularis* en un modelo in vivo en ratones CD-1 con envejecimiento y neurotoxicidad inducida por D-Galactosa y Cloruro de Aluminio.

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1 Comprobar la efectividad de un modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Galactosa/Cloruro de Aluminio en ratones macho CD-1, a dosis de 150/13, 300,26 y 450/39 mg/kg respectivamente.
- 4.2.2 Evaluar actividad neuroprotectora y antienvjecimiento de N-Acetilcisteína a concentración de 100 mg/kg en un modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad inducido por D-Galactosa y Cloruro de Aluminio.
- 4.2.3 Estimar actividad neuroprotectora y antienvjecimiento de extractos de *V. prionophylla* y *P. ligularis* a dosis de 10, 50 y 100 mg/kg en un modelo in vivo en ratones CD-1 con envejecimiento y neurotoxicidad inducida por D-Galactosa y Cloruro de Aluminio.
- 4.2.4 Determinar actividad antienvjecimiento en metabolismo de extractos de *V. prionophylla* y *P. ligularis* a dosis de 10, 50 y 100 mg/kg por medio parámetros metabólicos relacionados con envejecimiento por medio de medición de niveles séricos de glucosa, colesterol total, triglicéridos, creatinina y urea a través de evaluación espectrofotométrica.
- 4.2.5 Determinar la actividad neuroprotectora de extractos de *V. prionophylla* y *P. ligularis* a dosis de 10, 50 y 100 mg/kg por medio de ensayos de comportamiento para memoria, locomoción, ansiedad y depresión utilizando laberinto acuático de Morris, campo abierto, laberinto en cruz elevado y nado forzado respectivamente.

VI. Hipótesis

Hipótesis 1: Los extractos de *Valeriana prionophylla*, a diferentes dosis presentan actividad neuroprotectora en un modelo de envejecimiento acelerado y neurodegeneración inducida en ratones CD-1.

Hipótesis 2: Los extractos de *Passiflora ligularis*, a diferentes dosis presentan actividad neuroprotectora en un modelo de envejecimiento acelerado y neurodegeneración inducida en ratones CD-1.

VII. Materiales y Métodos

7.1 Universo y Muestra

7.1.1 Universo

Corresponde a todas las plantas nativas o naturalizadas y con uso tradicional en Guatemala con actividad sobre el sistema nervioso central.

7.1.2 Muestra

Corresponde a las plantas nativas con actividad sobre el sistema nervioso central: *Valeriana prionophylla* y *Passiflora ligularis*.

7.2 Materiales

7.2.1 Equipo para pruebas cognitivas

7.2.1.1 Laberinto de Morris

7.2.1.2 Laberinto en cruz elevado

7.2.1.3 Campo abierto

7.2.1.4 Recipiente de 4 litros transparente

7.2.1.5 Cámara digital (Sony, 30x optical zoom, 3.5-6.3/4.9-139)

7.2.1.6 Software ToxTrac (Source Forge, Slashdot media)

7.2.2 Equipo para medición de metabolismo

7.2.2.1 Microlab 300 (Vital scientific, Países Bajos)

7.2.2.2 Tubos Vacutainer rojo sin EDTA

7.2.2.3 Centrifugadora (VWR Scientific, modelo V, Estados Unidos)

7.2.3 Equipo para administración y manipulación de animales

7.2.3.1 Jeringas de 1 mL graduadas (Green Ject, Estados Unidos)

7.2.3.2 Sonda intragástrica para ratones

7.2.3.3 Agujas 27G-30G (Green Ject, Estados Unidos)

7.2.3.4 Guantes de nitrilo o látex

7.2.3.5 Rejillas de metal

7.2.3.6 Balanza semi analítica (Nordika, Estados Unidos)

7.2.4 Equipo para preparación de soluciones a administrar

7.2.4.1 Micropipeta semi automática 20 µL- 200 µL (Eppendorf, Alemania)

7.2.4.2 Micropipeta semi automática 100 µL – 1000 µL (Eppendorf, Alemania)

7.2.4.3 Tips para micropipeta semiautomática de 20 µL- 200 µL (Eppendorf, Alemania)

7.2.4.4 Tips para micropipeta semiautomática de 100 µL – 1000 µL (Eppendorf, Alemania)

7.2.4.5 Balanza analítica

7.2.4.6 Cristalería para preparación de reactivos y diluciones

7.2.5 Drogas y Reactivos

7.2.5.1 D-Galactosa (98% de pureza, Sigma-Aldrich, Alemania)

7.2.5.2 Cloruro de Aluminio (AlCl₃, Sigma-Aldrich, Alemania)

7.2.5.3 Diasys Glucosa GOD FS (Diaysis, Alemania)

7.2.5.4 Diasys Colesterol total FS (Diaysis, Alemania)

7.2.5.5 Diasys HDL- Colesterol precipitante FS (Diaysis, Alemania)

7.2.5.6 Diasys Triglicéridos FS (Diaysis, Alemania)

7.2.5.7 Diasys Creatinina FS (Diaysis, Alemania)

7.2.5.8 Diasys urea FS (Diaysis, Alemania)

7.2.6 Animales

7.2.6.1 Ratones macho CD-1 de aproximadamente 6 semanas con pesos de 33-36g.

7.3 Métodos

7.3.1 Declaración de Ética

Todos los procedimientos experimentales realizados en animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (publicación NIH, No. 80-23, revisada en 1996). Los protocolos fueron sometidos y aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC (Ref. CICAL-CCQQF-02-2021).

7.3.2 Animales

Treinta y dos ratones CD-1 machos de entre 6-8 semanas con un peso aproximado de 35 ± 3 g se utilizaron para la validación del modelo y setenta y dos ratones CD-1 machos de entre 6-8 semanas con un peso aproximado de 35 ± 3 g para la evaluación farmacológica de la actividad de los extractos vegetales. Todos fueron proporcionados por el Bioterio "Dra. Amarilis Saravia" de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Los ratones fueron albergados dentro de las instalaciones del Bioterio "Dra. Amarilis Saravia" en condiciones de acuerdo a guías internacionales de cuidado animal. Se mantuvieron en cajas a temperatura de 21°C con una humedad relativa de 60% en ciclos de 12 h luz/oscuridad automáticos, con agua y comida ad libitum durante el periodo de estudio.

7.3.3 Reactivos y Extractos

D-Galactosa (D-Gal) (pureza 98%), Cloruro de Aluminio (AlCl_3) (pureza 99%) y N-Acetilcisteína (NAC) (pureza 100%) fueron comprados de Sigma-Aldrich, Missouri, USA. Para la validación del modelo D-Gal fue disuelta en solución salina fisiológica 0.9% para inyección subcutánea en el cuello del ratón a dosis de 150, 300 y 450 mg/kg de peso, mientras AlCl_3 fue disuelto en agua filtrada para administración oral en dosis de 13, 26 y 39 mg/kg de peso. Mientras que para la evaluación farmacológica de las plantas D-Gal fue disuelta en solución salina fisiológica 0.9% para inyección subcutánea en el cuello del ratón a dosis de 450 mg/kg de peso, mientras AlCl_3 fue disuelto en agua filtrada para administración oral en dosis de 39 mg/kg de peso y NAC fue disuelta en agua filtrada para administración oral a dosis de 100 mg/kg de peso. Los extractos metanólicos de hojas de

Passiflora ligularis y etanólicos de rizoma de *Valeriana prionophylla* fueron realizados en el Laboratorio de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. La especie vegetal herborizada e identificada de *V. prionophylla*, colectada en Cajúl, Quiche (Latitud 15°28'43.1") y *P. ligularis*, colectada en San José Poaquil, Chimaltenango (Latitud 14°48'58" Longitud 90°54'45") se encuentran almacenada en el herbario BIGU de la Universidad de San Carlos de Guatemala y en el herbario del Laboratorio FARMAYA respectivamente. Los extractos secos se disolvieron en agua filtrada para administración oral a dosis variables de 10, 50 y 100 mg/kg de peso. Para el análisis bioquímico se utilizaron kits específicos para cada parámetro, todos obtenidos de Diasys®, Alemania.

7.3.4 Diseño Experimental

Para la validación del modelo después de una semana de aclimatación los ratones fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos de ocho ratones cada uno. Un grupo control y tres grupos experimentales con combinaciones de dosis variables de D-Gal y AlCl₃. La administración de D-Gal, por vía subcutánea en el cuello, y AlCl₃, por vía oral, se realizó durante 60 días consecutivos de la siguiente manera: Grupo Control (normal)- Vehículo/vehículo; Grupo 1- 150/13 mg/kg D-Gal/AlCl₃; Grupo 2- 300/26 mg/kg D-Gal/ AlCl₃; Grupo 3- 450/39 mg/kg D-Gal/ AlCl₃. Luego de 60 días se realizaron evaluaciones de comportamiento (Laberinto en cruz elevado y campo abierto) y posterior a estos se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca, bajo efectos de anestesia (ketamina 120 mg/kg y xilazina 12 mg/kg) para la evaluación de parámetros bioquímicos y se les efectuó eutanasia. Para la evaluación farmacológica de plantas, después de una semana de aclimatación los ratones fueron divididos aleatoriamente en nueve grupos de ocho ratones cada uno. Un grupo control (normal), un grupo envejecido (ENV), un grupo de N-Acetilcisteína (NAC) y tres grupos experimentales de cada planta a dosis variables de 10, 50 y 100 mg/kg de peso. La administración de extractos se realizó durante 60 días consecutivos por vía oral de la siguiente manera Grupo Control (normal) -Vehículo, ENV- Vehículo, NAC- N-Acetilcisteína 100 mg/kg, Grupo 4- *P. ligularis* 10 mg/kg, Grupo 5- *P. ligularis* 50 mg/kg, Grupo 6- *P. ligularis* 100 mg/kg, Grupo 7- *V. prionophylla* 10 mg/kg, Grupo 8- *V. prionophylla* 50 mg/kg y Grupo 9- *V. prionophylla* 100 mg/kg. Dos horas previo a la administración de los extractos durante los 60 días a todos los grupos, excepto al grupo

control (normal), se les administró D-Galactosa por vía subcutánea en el cuello en dosis de 450 mg/kg de peso y Cloruro de Aluminio por vía oral en dosis de 39 mg/kg de peso, mientras al grupo normal se le administró solución salina fisiológica 0.9% por vía subcutánea y agua por vía oral. Luego de 60 días se realizaron evaluaciones de comportamiento (Laberinto en cruz elevado, campo abierto, Laberinto acuático de Morris y Nado Forzado) y posterior a estos se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca, bajo efectos de anestesia (ketamina 120 mg/kg y xilazina 12 mg/kg) para la evaluación de parámetros bioquímicos y se les efectuó eutanasia.

7.3.5 Ensayos de Comportamiento

Para la evaluación de comportamiento se tomó en cuenta el estrés como un factor que puede afectar los resultados finales. Por ello estos se realizaron en un orden específico de tal manera que se realizó primero los de menor estrés y se continuó de manera ascendente en el orden que se presentan a continuación.

7.3.5.1 Laberinto en cruz elevado

Posterior a los 60 días de administración y para los grupos de ratones tanto de la validación del modelo, así como para la evaluación farmacológica de extractos, se realizó la prueba de laberinto en cruz elevado para la determinación de parámetros relacionados a un cuadro de ansiedad. El aparato compuesto por dos brazos abiertos y dos brazos cerrados, en forma de cruz, era en su totalidad de color negro, con dimensiones de 5 cm de ancho en cada brazo, y 35 cm de largo, además los brazos cerrados con paredes de 40 cm de altura. Para la determinación de los parámetros de ansiedad se colocó al ratón en el centro del laberinto y se dejó explorar durante 6 minutos completos mientras el recorrido se grababa. Entre cada ratón el aparato se limpió con alcohol al 70%. Previo al inicio de la prueba se aclimataron al área durante dos horas. Se evaluó los siguientes parámetros durante la prueba la cantidad de entradas en brazos abiertos y cerrados, la cantidad de entradas totales y los tiempos en cada área del laberinto y el análisis se realizó por medio de observación directa.

7.3.5.2 Campo abierto

Posterior a los 60 días de administración y para los grupos de ratones tanto de la validación del modelo, así como para la evaluación farmacológica de extractos, se realizó la prueba de campo abierto para la determinación de parámetros relacionados con locomoción y exploración. El laberinto compuesto por una estructura cuadrada de cuatro paredes totalmente de color negro, sin relieves ni texturas y de dimensiones de 40 cm x 40 cm de largo y ancho, así como paredes de 30 cm de altura. Cada ratón se colocó en el centro del laberinto y se monitoreó su comportamiento durante 6 minutos por medio de la grabación del mismo. Entre cada ratón se limpió el laberinto con alcohol 70% y previo al inicio del ensayo se aclimataron durante dos horas en el área de la prueba. El análisis de datos se realizó por medio de software de rastreo animal (ToxTrac®, La Coruña, España).

7.3.5.3 Laberinto acuático de Morris

Posterior a los 60 días de administración y los ensayos de LCE y campo abierto, para los 72 ratones se realizó la prueba de laberinto acuático de Morris (LAM) para la evaluación de aprendizaje y memoria. Esta se realizó en un recipiente circular de 100 cm de diámetro y con una altura de 50 cm, en su totalidad coloreada de negro y con una plataforma desmontable de 35 cm de altura, además de figuras geométricas de diferentes colores y formas en cada uno de los puntos cardinales. La prueba constó de siete días en total, seis días de entrenamiento y un día de evaluación. Para esta el recipiente se llenó con agua a 23°C hasta cubrir un centímetro la plataforma con agua coloreada de negro de tal manera que no se observara la plataforma. Los primeros seis días cada uno de los ratones se entrenó de manera individual durante tres veces por día, para ello se colocó la plataforma en un cuadrante específico y el ratón se colocó en diferente cuadrante para cada uno de los entrenamientos, siendo la misma rotación específica todos los días y para todos los ratones. Cada ratón se colocó durante un minuto o hasta que encontrara la plataforma, en caso de que terminara el minuto y el ratón no logró encontrar la plataforma se llevó gentilmente hasta la plataforma e independientemente si la encontró por su cuenta o fue guiado se dejó durante diez segundos en la plataforma. Entre cada entrenamiento se le dio un descanso de 30 segundos a cada ratón. Con cada ratón se cronometró el tiempo que tardó en encontrar la plataforma durante cada entrenamiento y durante todos los días. El

séptimo día se realizó la evaluación, para esta de igual manera se llenó el recipiente con la misma cantidad de agua, sin embargo, con la diferencia que no se colocó la plataforma. Todos los ratones se colocaron una única vez y de manera individual por un minuto en uno de los tres cuadrantes, el mismo para todos los ratones, y se dejó nadar por un minuto. La evaluación fue grabada para cada ratón y los resultados se obtuvieron por medio de software de rastreo animal (ToxTrac®, La Coruña, España) y el parámetro evaluado fue el tiempo que el ratón pasó en el cuadrante en el que se encontraba la plataforma.

7.3.5.4 Nado Forzado

Posterior a los 60 días de administración y los ensayos de LCE, campo abierto y LAM, para los 72 ratones se realizó la prueba de nado forzado para la evaluación del estado depresivo de los ratones. Esta se realizó en un recipiente transparente de 20 cm de diámetro y altura de 25 cm con capacidad para cuatro litros de agua. El recipiente se llenó con 3.5 litros de agua y se colocó a cada uno de los ratones de forma individual durante 6 minutos, mientras se grabó el ensayo. Se evaluó el tiempo en movimiento y tiempo inmóvil para cada uno de los ratones y se obtuvieron los datos por medio de observación y con ayuda de un cronómetro.

7.3.6 Determinación de Parámetros metabólicos

Posterior a los 60 días de administración, los ensayos de comportamiento y la eutanasia de los ratones se realizó el análisis bioquímico de parámetros metabólicos séricos, tanto para muestras de la validación como para las muestras de la evaluación farmacológica de los extractos vegetales, esto por medio de análisis espectrofotométrico en Microlab 300, Vital Scientific, Países Bajos, todos con kits específicos para el parámetro de Diasys®, Alemania.

7.3.6.1 Colecta de muestras

Las muestras se colectaron el día de la eutanasia a los ratones por medio de punción cardíaca y se centrifugaron a 5000 rpm durante diez minutos y se separó el suero sanguíneo con pipeteadores semiautomáticos de 200 microlitros.

7.3.6.2 Medición de Glucosa sérica

El análisis se realizó por medio del kit Diasys® Glucose FS GOD, Alemania, comparado con estándar y se preparó la muestra según las instrucciones del fabricante incluidas en el kit. La medición se realizó a una longitud de onda de 546 nm en contra de blanco de reactivo utilizando 1000 microlitros de reactivo con 10 microlitros de muestra previamente incubada durante 10 minutos a 37°C.

7.3.6.3 Medición de Creatinina sérica

El análisis se realizó por medio del kit Diasys® Creatinine FS, Alemania, comparado con estándar y se preparó la muestra según las instrucciones del fabricante incluidas en el kit. La medición se realizó a una longitud de onda de 492 nm en contra de blanco de reactivo utilizando 1000 microlitros de reactivo con 50 microlitros de muestra previamente incubada durante 60 segundos a 37°C.

7.3.6.4 Medición de Urea sérica

El análisis se realizó por medio del kit Diasys® Urea FS, Alemania, comparado con estándar y se preparó la muestra según las instrucciones del fabricante incluidas en el kit. La medición se realizó a una longitud de onda de 365 nm en contra de blanco de reactivo utilizando 1000 microlitros de reactivo con 10 microlitros de muestra previamente incubada durante 40 segundos a 37°C.

7.3.6.5 Medición de Colesterol sérico

El análisis se realizó por medio del kit Diasys® Cholesterol FS, Alemania comparado con estándar y se preparó la muestra según las instrucciones del fabricante incluidas en el kit. La medición se realizó a una longitud de onda de 546 nm en contra de blanco de reactivo utilizando 1000 microlitros de reactivo con 10 microlitros de muestra previamente incubada durante 10 minutos a 37°C.

7.3.6.6 Medición de Albúmina sérica

El análisis se realizó por medio del kit Diasys® Albúmina FS comparado con estándar y se preparó la muestra según las instrucciones del fabricante incluidas en el kit. La medición se realizó a una longitud de onda de 546 nm en contra de blanco de reactivo utilizando 1000 microlitros de reactivo con 10 microlitros de muestra previamente incubada durante 10 minutos a 37°C.

Únicamente para la validación se realizó la medición de Triglicéridos de la siguiente manera

7.3.6.7 Medición de Triglicéridos sérica

El análisis se realizó por medio del kit Diasys® Triglicéridos FS comparado con estándar y se preparó la muestra según las instrucciones del fabricante incluidas en el kit. La medición se realizó a una longitud de onda de 546 nm en contra de blanco de reactivo utilizando 1000 microlitros de reactivo con 10 microlitros de muestra previamente incubada durante 10 minutos a 37°C.

7.3.7 Análisis Estadístico

Los datos tanto de la validación como de la evaluación farmacológica de extractos vegetales, se analizaron utilizando el software estadístico Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (S.E.M.). Las comparaciones estadísticas se realizaron entre cambios de parámetro (medida en tiempo 0- medida en tiempos posteriores) para pesos utilizando ANOVA de dos vías entre los grupos tratados con tratamiento experimental y tratados con vehículo, seguido de la prueba posterior de comparación Bonferroni. Mientras para los parámetros de comportamiento, glucosa, colesterol total, triglicéridos, creatinina y urea solamente se obtuvieron datos finales y se analizó por medio de ANOVA de una vía entre los grupos tratados con tratamiento experimental y tratados con vehículo, seguido de la prueba posterior de comparación Bonferroni. Los valores $P < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

VIII. Resultados

8.1 Diferencia de peso corporal en validación del modelo

Para determinar las dosis que garantizan la inducción de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad se realizó inicialmente una validación con tres diferentes combinaciones de D-galactosa (D-Gal, SC)/Cloruro de Aluminio (AlCl_3 , PO) en dosis de 150/13, 300/26, 450/39 mg/kg, respectivamente, en ratones macho CD-1 de 6 semanas. El cambio en el peso corporal es un parámetro importante durante el envejecimiento por el impacto del mismo en el metabolismo y comportamiento durante 60 días. Se observó una disminución de los valores promedio de peso corporal únicamente en el grupo con D-Gal/ AlCl_3 450/39 mg/kg, con respecto al grupo Control (normal) lo cual indica la funcionalidad biológica del modelo a estas dosis (Figura 1).

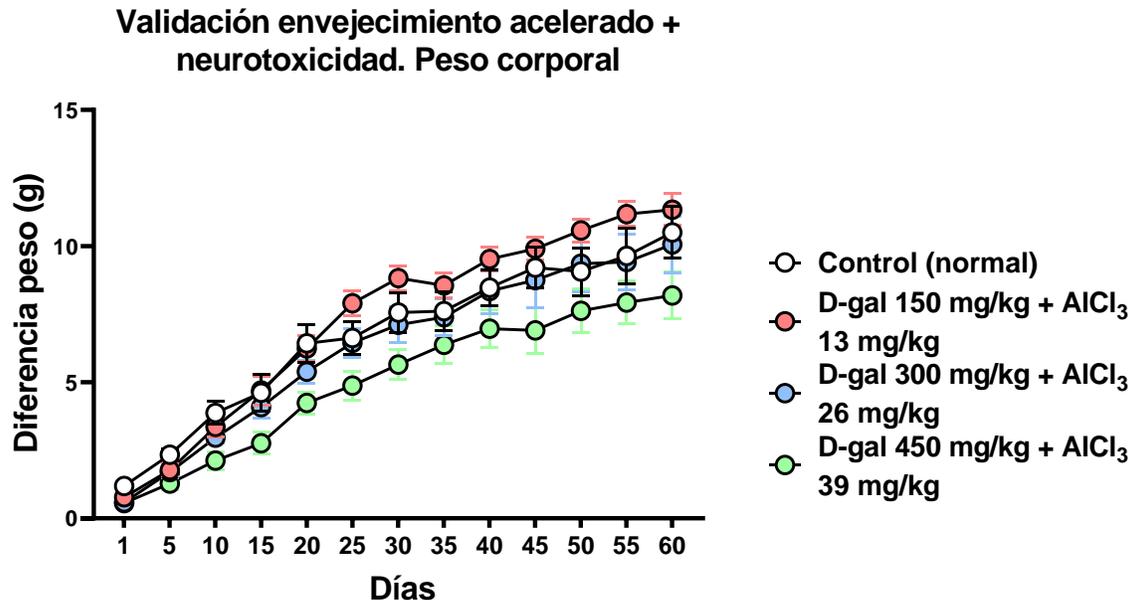


Figura 1. Cambios en el peso corporal en validación del modelo de envejecimiento acelerado por D-Galactosa (D-Gal) y neurotoxicidad por Cloruro de Aluminio (AlCl_3) en ratones macho CD-1 durante 60 días (n=8 por grupo). Diferencias de peso de tres

combinaciones de D-Gal (SC) y AlCl₃ (PO) comparadas con un grupo Control (normal). Se presentó una disminución de peso en la dosis más alta administrada. Los valores son expresados media \pm error estándar de la media (SEM).

8.2 Laberinto en cruz elevado en validación del modelo

Posterior a 60 días de tratamiento con D-Gal y AlCl₃ se procedió a evaluar parámetros de comportamiento como exploración espontánea y ansiedad a partir del laberinto en cruz elevado, los cuales se encuentran directamente relacionados con el sistema nervioso central y envejecimiento. Al evaluar la exploración en los brazos abiertos no se observó una diferencia en el número de entradas (Figura 2A). Por el contrario, el número de entradas totales en las tres combinaciones experimentales mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día 30, comparados con el grupo Control (normal). El grupo D-Gal/AlCl₃ 450/39 mg/kg mostró adicionalmente reducción significativa en el número de entradas a los 60 días, lo cual sugiere inducción de neurotoxicidad a partir de los 30 días (Figura 2B). Por otra parte, los tres grupos presentaron una reducción, la cual no fue significativa, del tiempo en los brazos abiertos tanto a los 30 como a los 60 días comparados con el grupo Control (normal) siendo el grupo D-Gal/AlCl₃ 450/39 mg/kg el que mayor disminución presentó (Figura 2C).

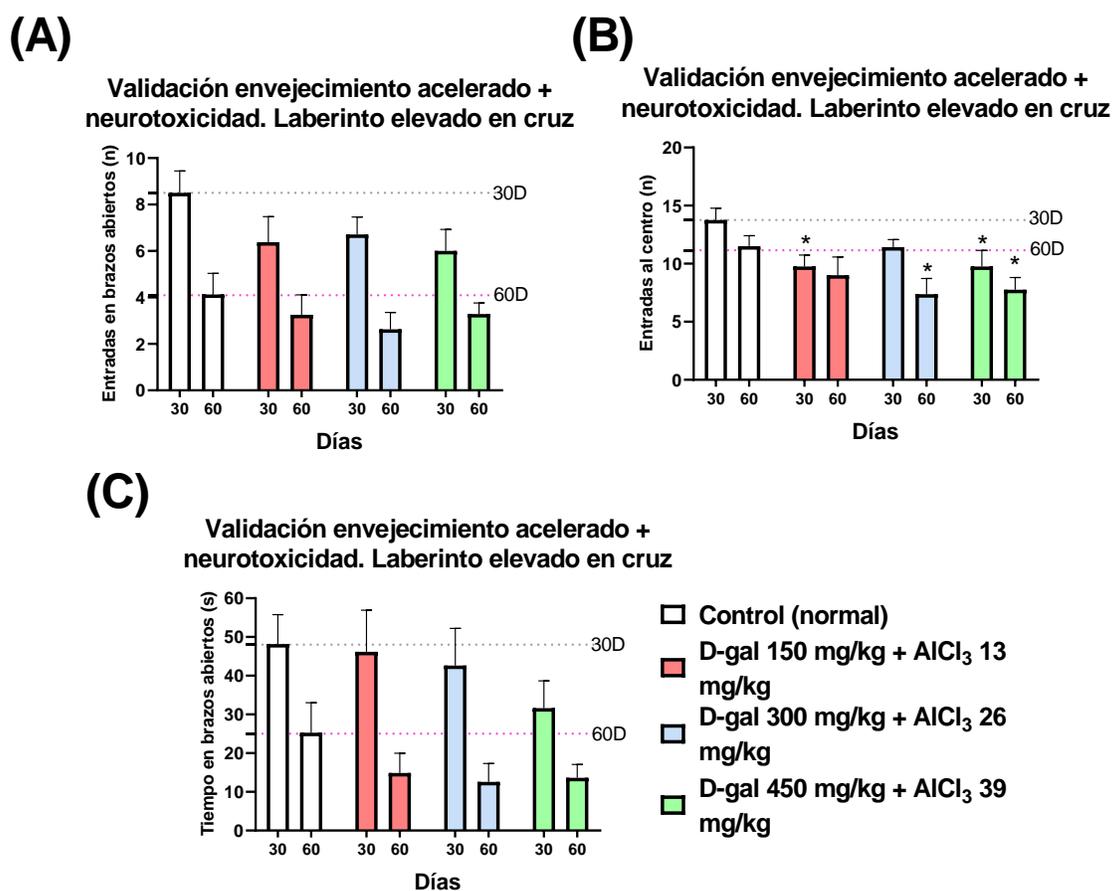


Figura 2. Laberinto en cruz elevada en validación de envejecimiento acelerado por D-Galactosa (D-Gal) y neurotoxicidad por Cloruro de Aluminio (AlCl₃) en ratones macho CD-1 (n=8 por grupo). (A) Número de entradas en brazos abiertos de tres grupos a diferentes dosis de D-Gal y AlCl₃. No se observó cambio significativo en ninguno de los tres grupos con respecto al grupo Control (normal). (B) Número de entradas totales en brazos de tres grupos a dosis diferentes de D-Gal/AlCl₃. Se observó disminución significativa al menos uno de los dos días y en la combinación con dosis más altas en ambos días. (C) Tiempo en brazos abiertos de tres grupos a dosis diferentes de D-Gal/AlCl₃. Se observó disminución en el tiempo en brazos abiertos en todos los grupos con respecto al grupo Control (normal). Los valores son expresados media ± error estándar de la media (SEM). *P < 0.05 denota diferencias significativas comparadas con el grupo control.

8.3 Campo Abierto en validación del modelo

En paralelo a la realización del laberinto en cruz elevado se evaluaron parámetros como locomoción, exploración y ansiedad por medio del campo abierto, las cuales están directamente relacionados con el sistema nervioso central y dependen del envejecimiento. **Los datos obtenidos en esta fase fueron obtenidos a partir de la medición directa del comportamiento a partir de dos observadores independientes.** Al evaluar el tiempo en el centro para los tres grupos no se observó cambio significativo en el tiempo explorado (Figura 3A). De la misma manera, no se observaron cambios significativos en el tiempo en movimiento, a pesar de que se observó una disminución conforme aumentaba la dosis (Figura 3B). De forma similar, no se observó un cambio significativo en el número de entradas al centro (Figura 3C) ni en el número de cuadros recorridos para ninguno de los grupos con respecto al grupo Control (normal) (Figura 3D). Estos datos sugieren que el envejecimiento acelerado combinado con neurotoxicidad no tiene un impacto en la exploración.

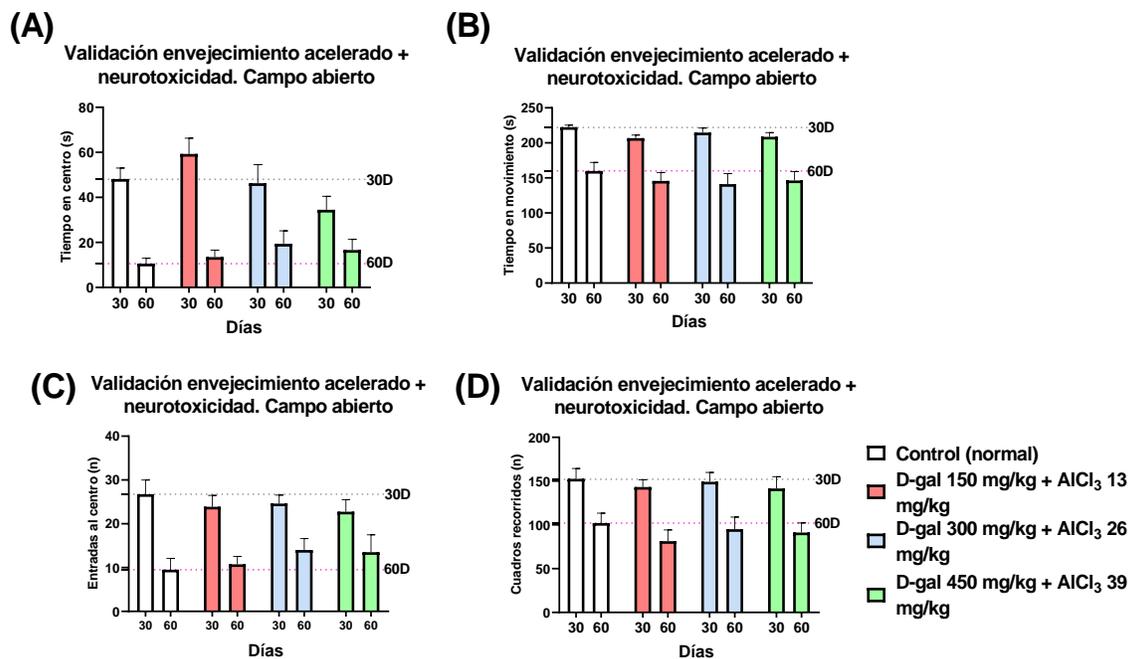


Figura 3. Campo Abierto en validación de envejecimiento acelerado por D-Galactosa (D-Gal) y neurotoxicidad por Cloruro de Aluminio (AlCl₃) en ratones macho CD-1 (n=8)

por grupo). Tiempo en el centro de tres grupos a diferentes dosis de D-Gal/ AlCl_3 . No se observó cambio significativo en el tiempo en el centro (A), en el tiempo en movimiento (B), en la cantidad de entradas en el centro (C) y en la cantidad de cuadros recorridos (D) de ninguno de los grupos con respecto al grupo Control (normal). Los valores son expresados media \pm error estándar de la media (SEM).

8.4 Metabolismo en validación del modelo

Posterior a los 60 días de inducción, se realizó análisis colorimétrico de diferentes parámetros a partir de muestras de sangre para la evaluación bioquímica de metabolismo, ya que durante el envejecimiento existe una mayor acumulación de productos de eliminación y menor cantidad de productos útiles debido a la ralentización del metabolismo. Se observó un aumento en la concentración de glucosa en sangre para los tres grupos experimentales con respecto al grupo Control (normal), sin embargo, este no fue significativo (Figura 4A). En cuanto a Nitrógeno de Urea en sangre no se observó ningún cambio significativo para los grupos experimentales con respecto al grupo Control (normal) (Figura 4B). Para la creatinina sérica se observó una disminución de los valores promedio dependiente de la dosis (figura 4C). Además, se observó un aumento en la concentración de colesterol en la dosis más alta de D-Gal y AlCl_3 , lo cual indica una ralentización en el metabolismo a mayores dosis de D-Gal/ AlCl_3 (figura 4D).

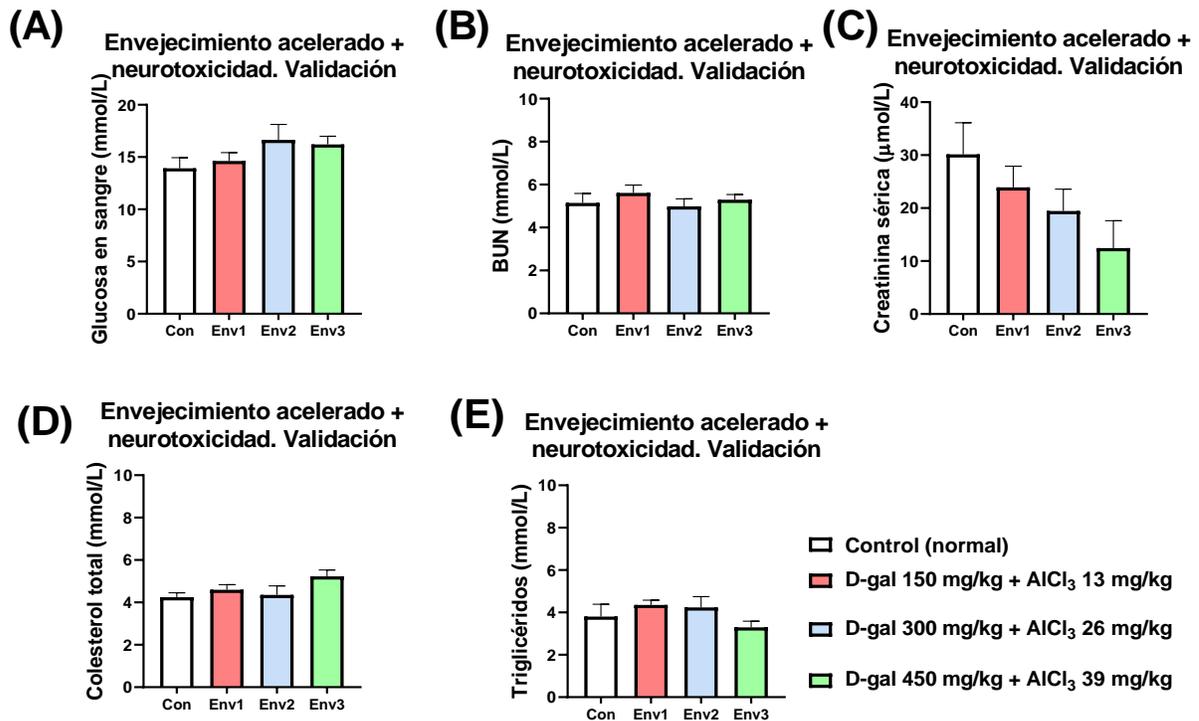


Figura 4. Análisis de sangre en validación de envejecimiento acelerado por D-Galactosa (D-Gal) y neurotoxicidad por Cloruro de Aluminio ($AlCl_3$) en ratones macho CD-1 ($n=8$ por grupo). No se observaron cambios significativos en sangre de los niveles de glucosa (A), Nitrógeno de Urea (B), y triglicéridos (E) en ninguno de los grupos con respecto al grupo Control (normal). (C) En cuanto a la creatinina sérica se observa tendencia a la disminución de la misma conforme aumenta la dosis de D-Gal/ $AlCl_3$. (D) Mientras en colesterol total se observó un aumento en los valores promedio de la concentración en sangre en la combinación más alta de D-Gal/ $AlCl_3$ con respecto al grupo normal. Los valores son expresados media \pm error estándar de la media (SEM).

8.5 Diferencias de peso en evaluación farmacológica

A partir de la selección de la combinación de D-Gal (SC) y $AlCl_3$ (PO) más óptima para generar un modelo de envejecimiento acelerado con neurotoxicidad, se seleccionó la concentración de 450/39 mg/kg, respectivamente, para futuros experimentos. Se evaluó la actividad protectora en este modelo tras la administración oral individual de extractos de *Passiflora ligularis* y *Valeriana prionophylla* a tres diferentes dosis, 10 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg, en ratones CD-1 macho de 8 semanas, durante 60 días en paralelo a la administración de D-Gal y $AlCl_3$. Dentro del modelo, la administración de *P. ligularis* 50 mg/kg suprimió la pérdida de peso comparada con el grupo envejecido, acercando a valores promedio similares con el grupo Control (Figura 5). Otras dosis del extracto de esta especie no mostraron diferenciadas comparadas con el grupo envejecido. Esto sugiere que *P. ligularis* podría tener un impacto en el metabolismo durante 60 días dependiendo de la dosis.

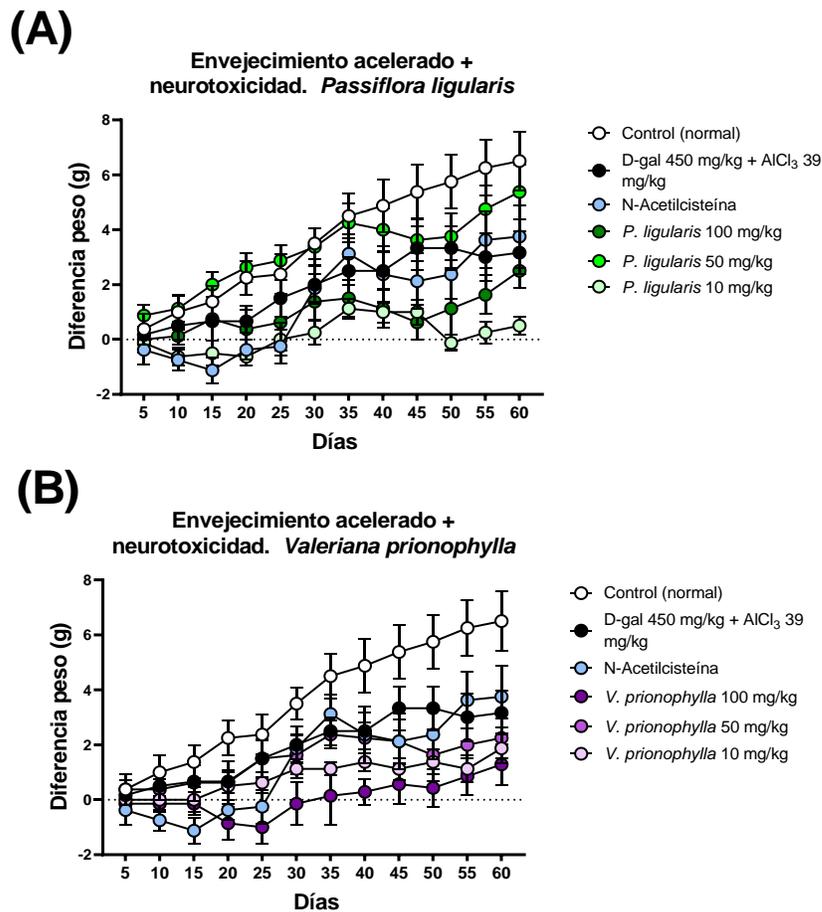


Figura 5. Cambios en pesos corporales tras la administración oral de extractos de *Passiflora ligularis* y *Valeriana prionophylla* en modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Galactosa (D-Gal) y Cloruro de Aluminio (AlCl₃) en ratones macho CD-1 (n=8 por grupo). La inducción de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad mostró una reducción de pesos comparado con el grupo control (normal). Esta reducción fue ligeramente suprimida únicamente por el grupo *P. ligularis* 50 mg/kg. Los valores son expresados media \pm error estándar de la media (SEM).

8.6 Nado Forzado en evaluación farmacológica

Luego de 60 días se evaluó el estado de depresión, el cual es un problema relacionado directamente al sistema nervioso central que en muchas ocasiones también puede ser producido por neurotoxicidad como por envejecimiento, esto a partir del tiempo inmóvil en nado forzado. Se observó disminución en los valores promedio del tiempo inmóvil tanto en los grupos NAC y *P. ligularis* 10 mg/kg, así como tendencia a la disminución del tiempo inmóvil a dosis bajas de *P. ligularis*, lo cual sugiere potencial antidepresivo por parte de este extracto a dosis bajas en el modelo utilizado.

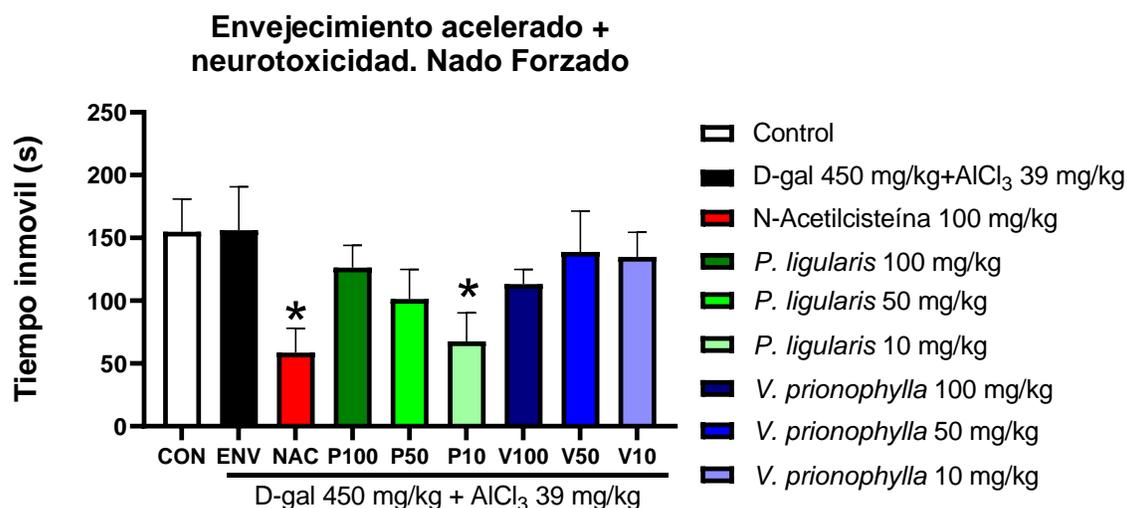


Figura 6. Nado forzado tras la administración oral extractos de *Passiflora ligularis* y *Valeriana prionophylla* en modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Galactosa (D-Gal) Cloruro de Aluminio (AlCl₃) en ratones macho CD-1 (n=8 por grupo). Se observó disminución significativa en los valores promedio de tiempo inmóvil para los grupos N-Acetilcisteína, así como para *P. ligularis* 10 mg/kg con respecto al grupo Envejecido. Los valores son expresados media ± error estándar de la media (SEM). *P< 0.05 denota diferencias significativas comparadas con el grupo ENV.

8.7 Laberinto acuático de Morris en evaluación farmacológica

Posterior a los 60 días se evaluó memoria y aprendizaje por medio del laberinto acuático de Morris, en el cual se realizan 6 días de entrenamiento con la plataforma colocada en un cuadrante y un día de ensayo final en el cual no se coloca la plataforma, a partir de este se pueden observar problemas relacionados con el aprendizaje y la memoria que se encuentran relacionados directamente con el sistema nervioso central y su degeneración producida por neurotoxicidad y envejecimiento. Todos los datos obtenidos el día final se obtuvieron mediante software de rastreo animal. No se observaron cambios significativos entre los grupos experimentales de *P. ligularis* (Figura 7A) y *V. prionophylla* (Figura 7B) comparado con el grupo Envejecido con D-Gal/ AlCl_3 . Por el contrario, se observó un aumento en los valores promedio de tiempo en el cuadrante donde se encontraba la plataforma por parte de los grupos de *P. ligularis* 50 mg/kg y *V. prionophylla* 100 mg/kg y 10 mg/kg comparados con el grupo Envejecido, lo cual sugiere actividad protectora de la memoria y estimulante del aprendizaje para estos extractos a dichas dosis en el modelo utilizado (Figura 7C).

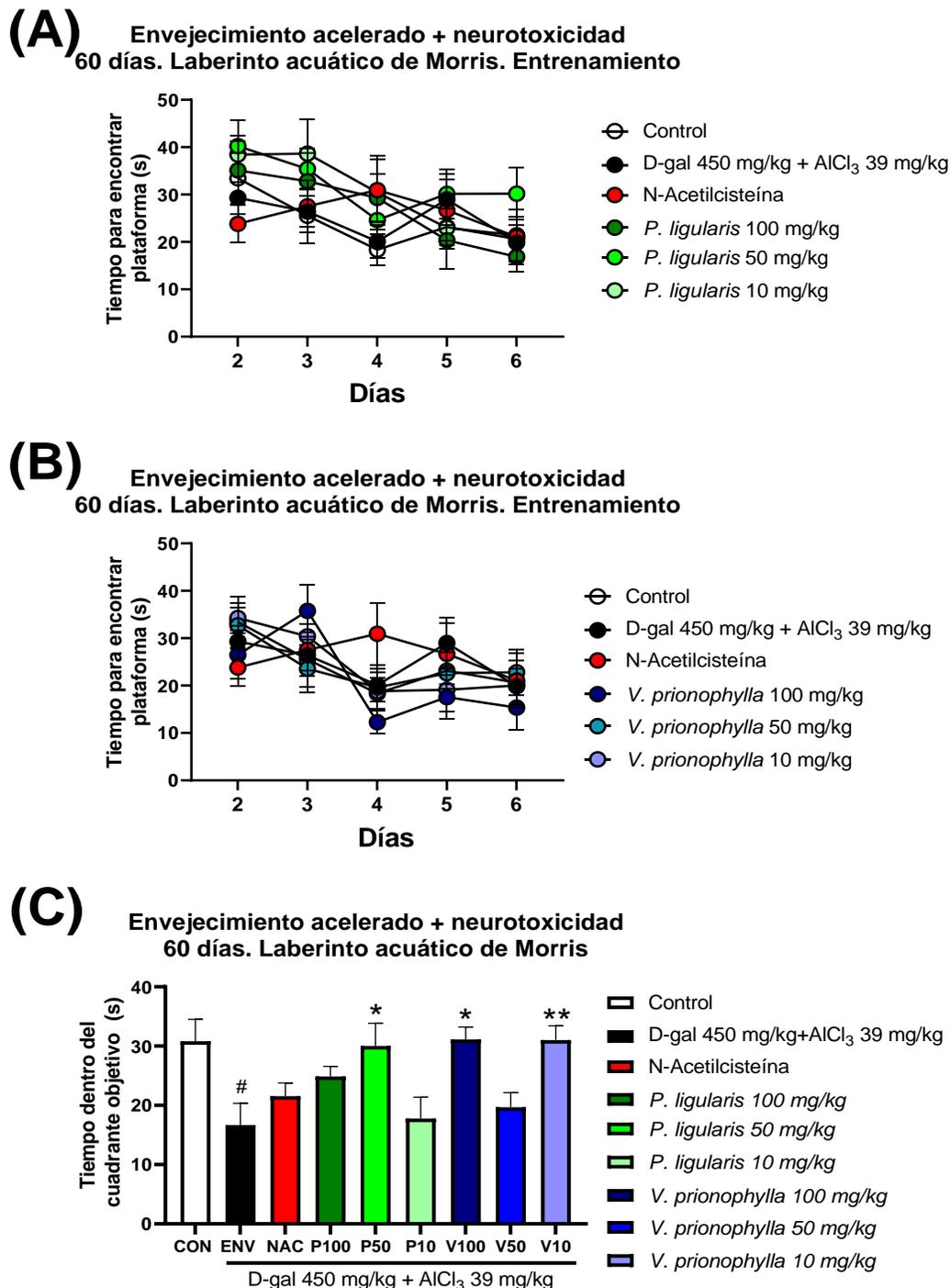


Figura 7. Laberinto acuático de Morris tras la administración oral de extractos de *Passiflora ligularis* y *Valeriana prionophylla* en modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Galactosa (D-Gal) y Cloruro de Aluminio (AlCl_3) en ratones

macho CD-1 (n=8 por grupo). Tiempo de latencia durante entrenamiento. No se observó cambio significativo entre los grupos de *P. ligularis* (A) y los de *V. prionophylla* (B) comparado con grupo Envejecido. (C) Se observó un aumento en los valores promedio del tiempo dentro del cuadrante para los grupos *P. ligularis* 50 mg/kg, así como los grupos de *V. prionophylla* de 100 y 10 mg/kg comparados con el grupo Envejecido. Los valores son expresados media \pm error estándar de la media (SEM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ denota diferencias significativas comparadas con el grupo ENV.

8.8 Campo abierto en evaluación farmacológica

Posterior a los 60 días se evaluó la actividad protectora en los parámetros de locomoción, exploración y ansiedad por medio de campo abierto, ya que estos se encuentran directamente relacionados con el envejecimiento y neurodegeneración. Los datos se obtuvieron mediante un software de rastreo animal. Se observó una disminución en los valores promedio de la distancia recorrida en los grupos Control y N-acetilcisteína (NAC) así como en el grupo experimental *P. ligularis* 10 mg/kg, además se observó tendencia a la disminución de los valores de distancia recorrida relacionada con dosis más bajas tanto de *P. ligularis* como *V. prionophylla* (Figura 8A). Además, se observó una disminución en los valores promedio de la velocidad total en los grupos Control y NAC así como tendencia a la disminución de los valores de distancia recorrida relacionada con dosis más bajas de *P. ligularis* así como dosis más altas de *V. prionophylla* (Figura 8B). De igual manera se observó un aumento en los valores promedio de porcentaje de tiempo en el centro en los grupos Control y NAC al igual que tendencia al aumento relacionado con dosis más bajas de *P. ligularis* así como dosis más altas de *V. prionophylla* (Figura 8C). También se observó una disminución de los valores promedio de aceleración total con respecto al grupo Envejecido por parte de los grupos Control y NAC, así como el grupo experimental *P. ligularis* 10 mg/kg (Figura 8D). Estos datos sugieren protección en contra de problemas neurológicos relacionados con la locomoción por parte de los extractos evaluados en el modelo utilizado.

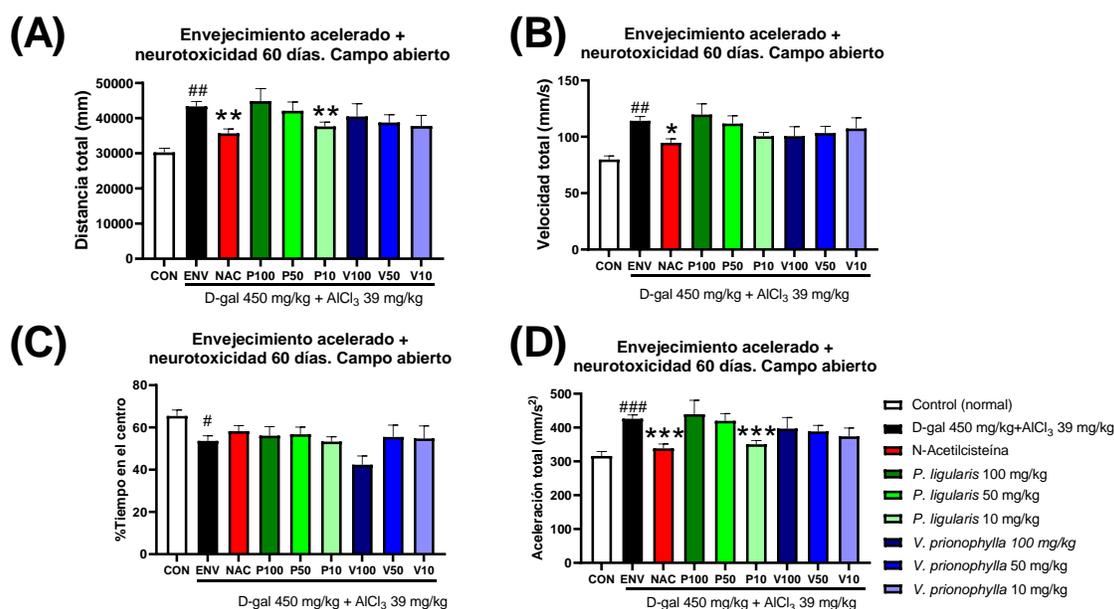


Figura 8. Campo abierto tras la administración oral de extractos de *Passiflora ligularis* y *Valeriana prionophylla* en modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Galactosa (D-Gal) y Cloruro de Aluminio (AlCl₃) en ratones macho CD-1 (n=8 por grupo). (A) Se observó disminución en la distancia total promedio recorrida para los grupos N-acetilcisteína (NAC) y *P. ligularis* 10 mg/kg con respecto al grupo Envejecido (ENV). (B) Se observó disminución en los valores promedio velocidad total para el grupo NAC y grupo Control con respecto al grupo ENV. (C) No se observó cambio significativo en el porcentaje de tiempo en el centro para los grupos experimentales con respecto al grupo ENV. (D) Se observó disminución de los valores promedio de aceleración total para los grupos NAC y *P. ligularis* 10 mg/kg con respecto al grupo ENV. Los valores son expresados media \pm error estándar de la media (SEM). *P< 0.05, **P< 0.01, *** P< 0.001 denota diferencias significativas comparadas con el grupo ENV.

8.9 Laberinto en cruz elevado en evaluación farmacológica

Posterior a los 60 días de administración se evaluó la actividad neuroprotectora en los parámetros de locomoción, exploración y ansiedad por medio de laberinto en cruz elevado, debido a que estos se encuentran directamente relacionados con envejecimiento y neurotoxicidad. Se observó una disminución en la cantidad de entradas en los brazos abiertos por parte de los grupos control, *P. ligularis* 50 mg/kg y *V. prionophylla* 50 mg/kg (Figura 9A). En cuanto al número de entradas en los brazos cerrados no se observó diferencia entre ninguno de los grupos con respecto al grupo envejecido (Figura 9B). Por otra parte, se observó una disminución en el número de entradas totales, tanto en brazos abiertos como cerrados, por parte del grupo Control, así como los grupos experimentales de *P. ligularis* 50 mg/kg y *V. prionophylla* 50 mg/kg y 10 mg/kg (Figura 9C). De la misma manera se observó un aumento en el número de estiramientos en los brazos cerrados por parte del grupo control y se observó un aumento de los mismos a menores dosis de *P. ligularis*, así como dosis altas de *V. prionophylla* lo cual sugiere que los cambios en este parámetro pueden ser dependiente de concentración (Figura 9D). Al igual que resultados anteriores se observó una disminución de la cantidad de estiramientos en brazos abiertos por parte del grupo control, así como los grupos experimentales de *P. ligularis* 50 mg/kg y *V. prionophylla* 50 mg/kg (Figura 9E). Estos resultados sugieren actividad protectora en parámetros relacionados a ansiedad y locomoción para ambos extractos a dosis específicas.

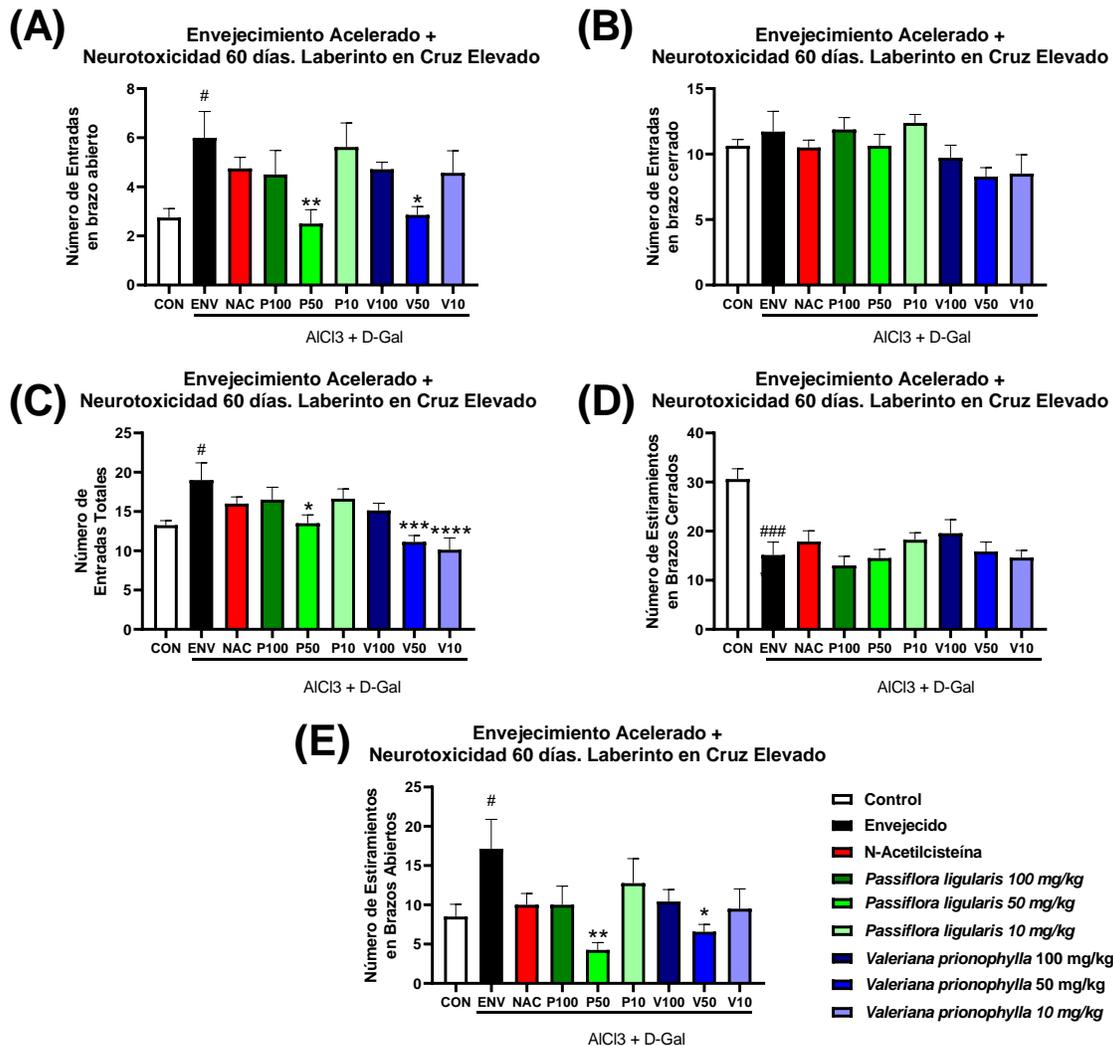


Figura 9. Laberinto en cruz elevado tras la administración oral de extractos de *Passiflora ligularis* y *Valeriana prionophylla* en modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Galactosa (D-Gal) Cloruro de Aluminio (AlCl₃) en ratones macho CD-1 (n=8 por grupo). (A) Se observó disminución en la cantidad promedio de entradas en los brazos abiertos para los grupos Control (normal), *P. ligularis* 50 mg/kg y *V. prionophylla* 50 mg/kg con respecto al grupo Envejecido (ENV). (B) No se observó diferencia en ninguno de los grupos con respecto al grupo ENV. (C) Se observó una disminución en el número de entradas totales en los grupos Control (normal), *P. ligularis* 50 mg/kg y *V. prionophylla* 50 mg/kg y 10 Mg/kg con respecto al grupo ENV. (D) Se observó un aumento en el número de estiramientos en los brazos cerrados en el grupo Control

(normal) con respecto al grupo ENV. (E) Se observó una disminución de los valores promedio en la cantidad de estiramientos en los brazos abiertos para los grupos Control (normal), *P. ligularis* 50 mg/kg y *V. prionophylla* 50 mg/kg. Los valores son expresados media \pm error estándar de la media (SEM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ denota diferencias significativas comparadas con el grupo ENV.

8.10 Metabolismo en evaluación farmacológica

Luego de los 60 días se evaluó parámetros metabólicos los cuales son de suma importancia en envejecimiento ya que durante el mismo existe una mayor acumulación de productos de eliminación y menor cantidad de productos útiles debido a la ralentización del mismo. Se observó una disminución en los valores promedio de Glucosa sérica en el grupo *P. ligularis* 50 mg/kg con respecto al grupo Envejecido (ENV) lo cual indica potencial hipoglicemiante en el modelo utilizado para el grupo experimental (Figura 10A). Además, se observó que los grupos *P. ligularis* 50 mg/kg y 10 mg/kg presentan un aumento de la creatinina sérica con respecto al grupo ENV (Figura 10B). Por el contrario, en albúmina sérica no se observó cambio significativo en ninguno de los grupos con respecto al grupo ENV (Figura 10C). Finalmente se observó que el grupo Control (normal) presenta disminución en los niveles séricos de colesterol con respecto al grupo ENV, de la misma manera todos los grupos de *P. ligularis* y *V. prionophylla* presentan disminución en los valores promedio con respecto al grupo Envejecido, lo sugiere potencial hipocolesterolémico para todos los grupos experimentales en el modelo utilizado (Figura 10D). Por otra parte, se observó disminución en los niveles de urea en sangre para los grupos *P. ligularis* 100 mg/kg y *V. prionophylla* 10 mg/kg, lo cual sugiere actividad nefroprotectora de estos extractos en el modelo utilizado (Figura 10E).

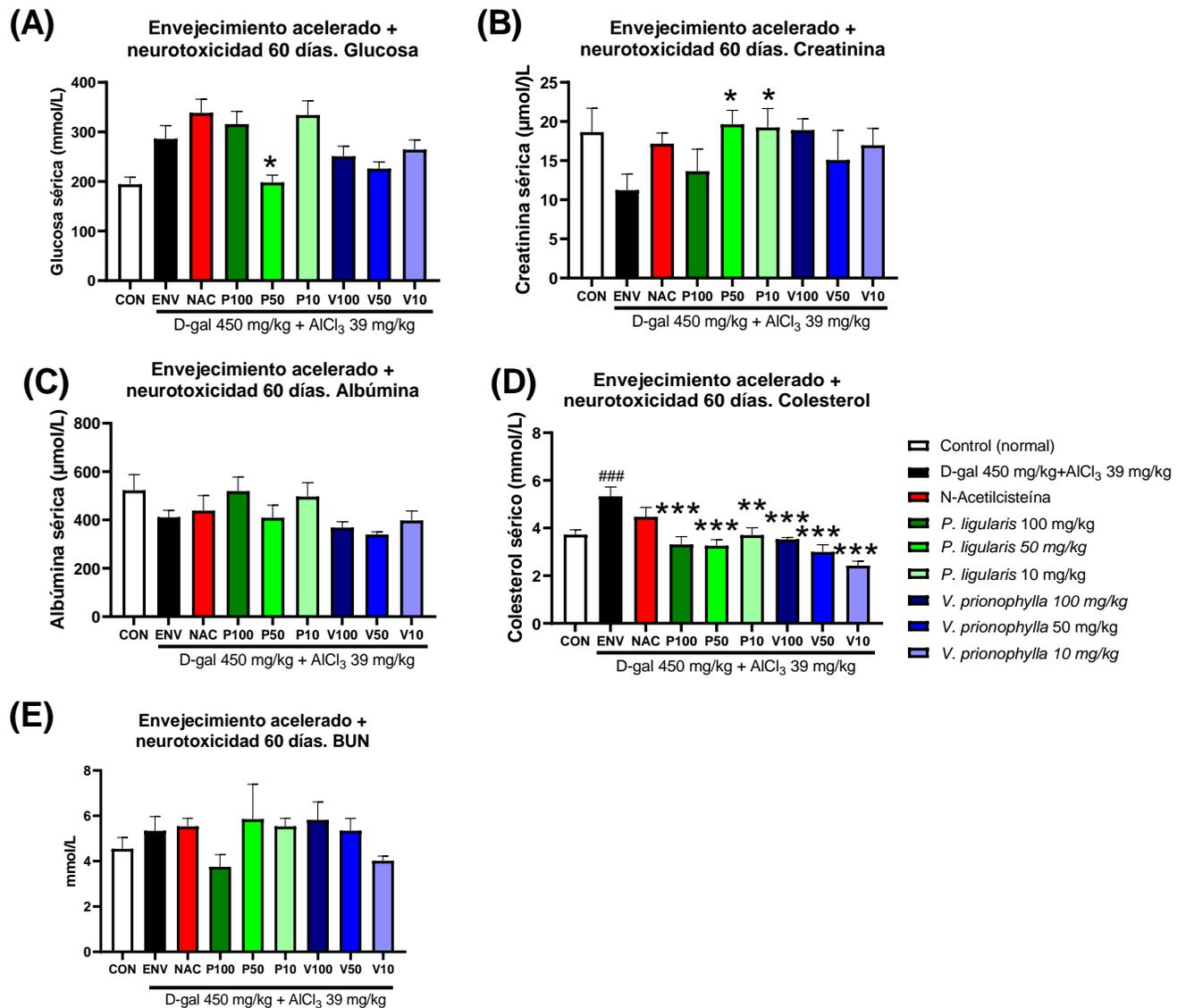


Figura 10. Metabolismo tras la administración de extractos de *Passiflora ligularis* y *Valeriana prionophylla* en modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Galactosa (D-Gal) y Cloruro de Aluminio (AlCl₃) en ratones macho CD-1 (n=8 por grupo). (A) Se observó una disminución de los niveles de glucosa en sangre en el grupo *P. ligularis* 50 mg/kg con respecto al grupo Envejecido (ENV). (B) Se observó un aumento significativo en los niveles de creatinina sérica en los grupos de *P. ligularis* 50 y 10 mg/kg con respecto al grupo ENV. (C) No se observó cambio significativo en los niveles de albúmina sérica para ningún grupo con respecto al grupo Envejecido. (D) Se observó una

disminución significativa en los niveles de colesterol en sangre para todos los grupos de *P. ligularis* y *V. prionophylla* con respecto al grupo Envejecido. (E) Se observó una disminución de los valores promedio de urea en sangre para los grupos *P. ligularis* 100 mg/kg y *V. prionophylla* 10 mg/kg. Los valores son expresados media \pm error estándar de la media (SEM). *P< 0.05, **P< 0.01, *** P< 0.001 denota diferencias significativas comparadas con el grupo control.

IX. Discusión

El envejecimiento es un proceso natural e irreversible de todos los organismos vivos, el cual provoca el deterioro de diferentes órganos y por lo tanto la pérdida de sus funciones por medio de diferentes mecanismos. El daño oxidativo es uno de los mecanismos más importantes de daño dentro del proceso de envejecimiento (Li et al., 2019). La producción de especies reactivas de oxígeno puede ocurrir de forma endógena como es el caso de las producidas en la mitocondria durante la producción de energía como radicales superóxido y radicales hidroxilo (Kregel & Zhang, 2007), además de la producción endógena también puede producirse por fuentes exógenas entre las que se encuentran consumo de aire y agua contaminados, tabaco, alcohol, drogas y radiación entre otros (Russo et al., 2012). La mayoría de sistemas del cuerpo humano se ven afectados por este tipo de daño, principalmente los que más consumo de energía requieren para su funcionamiento (Islam, 2017). Este es el caso del sistema nervioso central, principalmente el cerebro el cual es un órgano sumamente complejo y que posee el mayor consumo de energía en relación con su tamaño dentro del cuerpo lo cual incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de la mitocondria en su necesidad de producir energía (Stefanatos & Sanz, 2018). En conjunto a este proceso actúan mecanismos antioxidantes protectores en su mayoría enzimáticos como los producidos por superóxido dismutasas, peroxirredoxinas y glutatión peroxidadas (Trist et al., 2019). Durante el envejecimiento tanto la producción de radicales libres como los mecanismos antioxidantes se ven afectados. La producción de radicales libres sufre una desregulación y por lo tanto un aumento de los mismos (Qin et al., 2013), al mismo tiempo los sistemas de defensa fallan con mayor frecuencia (H. Zhao et al., 2018) incrementando la cantidad de especies reactivas de oxígeno y por lo tanto el daño. De esta manera ocurre un daño progresivo que inicia en la célula y se incrementa hasta afectar órganos y sistemas generando daños irreversibles (Guillaumet-Adkins et al., 2017; Haddadi et al., 2014). Entre estos se encuentran problemas neurodegenerativos, que incluyen pérdida de funciones cognitivas y daños en estructuras específicas del sistema nervioso central que desembocan en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, demencia, depresión y ansiedad (Patki et al., 2013; Qin et al., 2013; Yan et al., 2016; Y. Zhao & Zhao, 2013). Para el estudio tanto de problemas neurodegenerativos como de envejecimiento son muy útiles los modelos *in vivo*. Entre estos se encuentran modelos de envejecimiento acelerado inducido por D-Galactosa (D-Gal)

(Azman & Zakaria, 2019), modelos de Alzheimer inducido por Cloruro de Aluminio (AlCl_3) (Chiroma et al., 2018; Xiao et al., 2011) y modelos de Parkinson inducido por rotenona (Siracusa et al., 2020) entre otros. Estudios previos han demostrado la confiabilidad de un modelo crónico combinado de envejecimiento acelerado por D-Gal y neurotoxicidad por AlCl_3 tanto en ratas como en ratones a dosis bajas (Cui et al., 2006; Guo et al., 2020; Xiao et al., 2011; Zhen et al., 2016) y dosis altas (Badibostan et al., 2019; Haider et al., 2015; Kong et al., 2018). La D-Gal actúa debido a la formación de especies reactivas de oxígeno lo cual genera estrés oxidativo y acelera el envejecimiento (Badibostan et al., 2019; Knapowski et al., 2002; Parameshwaran et al., 2010b), así como por la activación de vías metabólicas de carbohidratos como la vía insulínica, que aceleran la producción de senescencia celular y disminuye la autofagia y rejuvenecimiento celular (Martel et al., 2019). Mientras la neurotoxicidad ocurre por el papel del aluminio como estimulante de la actividad de acetilcolinesteras y facilidad para cruzar la barrera hematoencefálica (Chiroma et al., 2018; Liaquat et al., 2019; Shati et al., 2011), cuyo daño incluso puede ser utilizado para evaluar modelos de Alzheimer (Xiao et al., 2011). En el presente estudio se evaluó la efectividad del modelo en ratones macho CD-1 en el modelo durante un periodo de 60 días. Para ello se evaluó el modelo a tres combinaciones diferentes de D-Gal y AlCl_3 .

Durante la inducción del modelo en envejecimiento y neurotoxicidad se presentó una disminución en los pesos del grupo con las dosis más altas tanto de D-Gal como AlCl_3 , incrementándose la disminución a partir del día 45. Esto se observa de la misma manera en estudios previos que han utilizado dosis similares de D-Gal y AlCl_3 tanto en combinación como D-Gal de forma individual en ratas y en ratones de diferentes cepas (Haider et al., 2015; Malekshah et al., 2005). Al mismo tiempo estos resultados difieren de otros estudios en los cuales las dosis altas no lograron la inducción del envejecimiento acelerado, esto específicamente en ratas de la cepa Wistar (Cardoso et al., 2015). Las ratas poseen aspectos fisiológicos diferentes con respecto a los ratones y estas también varían de acuerdo a las diferentes cepas específicas de cada especie (Martignoni et al., 2006). Una de las diferencias importantes entre especies y cepas dentro del metabolismo es la presencia y actividad de las familias enzimáticas de Citocromo C oxidasa y Citocromo P450 en todas sus isoformas. Estas son necesarias en el metabolismo tanto de drogas como de otros compuestos importantes como lípidos, además de desempeñar un papel importante en la formación y control de radicales libres (Cacabelos, 2020; Martignoni et al., 2006;

Orellana & Guajardo, 2004). Por ello la actividad de D-Gal se ve afectada y por lo tanto la efectividad del modelo no está garantizada en todas las cepas y especies. La disminución de pesos con respecto al grupo control es un indicativo de envejecimiento acelerado, contrario a lo que se podría esperar de un aumento de peso, esta disminución se puede atribuir a una disminución de la masa muscular y de densidad ósea (Fatemi et al., 2018; Hor et al., 2021; D. Wang et al., 2020). Los datos de metabolismo confirman la disminución de masa muscular por medio de la medición de creatinina sérica. En esta se observó una disminución de creatinina dependiente de concentración, lo cual indica una menor producción de creatinina y se puede asociar a la disminución de tejido muscular característica del envejecimiento (Odden et al., 2009; Piñol-Ripoll et al., 2009). Además, dentro del metabolismo se observó tendencia en los diferentes parámetros. En glucosa sérica se observó un aumento dependiente de concentración con respecto al grupo control, el cual es un problema común en envejecimiento que indica la ralentización del metabolismo y por lo tanto la acumulación de sustratos metabólicos. Con respecto a colesterol sérico se observó un aumento dependiente de dosis con respecto al grupo control lo cual es normal en envejecimiento e indica la ralentización del metabolismo, aumento en la síntesis de lípidos y acumulación de tejido graso (Holloszy, 2000; Houtkooper et al., 2011; Morissette et al., 2009). Además de la disminución de peso y alteraciones metabólicas se observaron cambios en el comportamiento de los ratones. En laberinto en cruz elevado se observó una disminución en los parámetros de locomoción y exploración. Específicamente en la cantidad de entradas totales a los brazos, esto se puede asociar a envejecimiento debido a la disminución de masa muscular así como problemas neurodegenerativos que disminuyen la exploración, locomoción y orientación como ocurre en casos de demencia y depresión (Goodwin, 2015; Kang et al., 2017; Kazmi et al., 2013; Xiang et al., 2019). El presente estudio provee información nueva sobre la efectividad del modelo en la cepa de ratones CD-1 a las dosis utilizadas, ya que es el primer estudio de este tipo que se realiza en esta cepa de ratones.

Posterior a la evaluación del modelo y selección de las dosis adecuadas para la inducción se evaluó la actividad de extractos de dos plantas nativas en el modelo. En base a estudios previos que muestran actividad neuroprotectora, antioxidante, ansiolítica y antidepresiva por parte de especies de la familia Passifloraceae (Awad et al., 2007; M Al kuraisyh, 2020; Marroquín et al., 2012; Otify et al., 2015), así como el uso tradicional de *Passiflora ligularis*

Juss se seleccionó esta planta. De la misma manera en base a estudios previos que muestran actividad ansiolítica, antidepresiva y citoprotectora en modelos de Parkinson por parte de *Valeriana Prionophylla Standl* (De Souza et al., 2011; Ortiz et al., 2013), otras especies de la familia Valerianaceae (Das et al., 2021; Müller et al., 2012; Rao et al., 2005), y al uso tradicional se seleccionó esta planta. Tomando en cuenta que la etnofarmacología es necesaria en países como Guatemala ya que puede funcionar de base para el estudio de plantas nativas (Castañeda et al., 2022) Los extractos de ambas plantas se probaron a tres dosis diferentes en el modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Gal y AlCl₃. Con resultados preliminares que sugieren actividad neuroprotectora y antienvjecimiento para ambas plantas en al menos una de las dosis en los diferentes parámetros evaluados. Los parámetros evaluados fueron pesos, comportamiento y metabolismo. En los pesos únicamente uno de los grupos experimentales (*P. ligularis* 50 mg/kg) logró mantener un peso similar al control. Esto se puede asociar a la actividad antioxidante, antiinflamatoria y anti senescente comprobada de los metabolitos quercetina, kampferol y apigenina que se encuentran presentes en esta *P. ligularis* (Carvajal de Pabon et al., 2014; Devia, 2018). Esto debido al mecanismo por el cual ocurre el envejecimiento acelerado; el cual como se mencionó con anterioridad se produce por la producción de daño oxidativo y activación de vías metabólicas de carbohidratos. Además, estudios previos muestran que la apigenina disminuye el daño y la atrofia muscular por medio de inhibición de vías oxidativas y aumento de mitofagia y apoptosis (Oyebode et al., 2020; Sang et al., 2017), lo cual podría jugar un papel importante dentro de la pérdida de peso que se presenta en el modelo. De la misma manera, ninguna de las dosis de *V. prionophylla* logró frenar la disminución de peso y por el contrario lo disminuyó aún más en estos grupos. Por lo cual no se puede asociar actividad protectora en cuanto a conservación de masa muscular y densidad ósea, así como potencial antioxidante por parte de *V. prionophylla*. Sin embargo, se puede observar potencial reductor de acumulación de tejido graso la cual podría ser la causa de la mayor pérdida de peso como se ha observado en otras especies de la familia Valerianaceae (Yuki et al., 2015; Zhu et al., 2016). Además de los pesos fue necesaria la evaluación de metabolismo para evaluar envejecimiento. Por ello se realizó la evaluación de parámetros bioquímicos involucrados en el metabolismo de diferentes sustratos y productos. Dentro de estos se observó como el mejor candidato antienvjecimiento y con potencial regulador de metabolismo el grupo de *P. ligularis* 50 mg/kg, debido a su actividad reguladora de glucosa, creatinina y colesterol. Estos

resultados confirman que este fue el único grupo que logró mantener el peso con respecto al grupo control. Lo cual fortalece la hipótesis de la actividad protectora contra daño oxidativo y celular que provoca el envejecimiento. En cuanto a los niveles de glucosa es importante mencionar que al mantenerlos controlados evita el envejecimiento por metabolismo de carbohidratos y daño oxidativo (Liao & Kennedy, 2014). Por otra parte, al mantener los niveles de creatinina similares al grupo control es un indicativo de la conservación de masa muscular (Odden et al., 2009), que difiere del proceso que ocurre en envejecimiento. En lo que respecta a los niveles de colesterol se debe mencionar que durante el envejecimiento aumenta la concentración de lípidos en la sangre, debido a la ralentización del metabolismo y acumulación de tejido graso como se mencionó con anterioridad, lo cual al mantener los niveles de colesterol normales es un indicativo de que no existió afección en cuanto al metabolismo y por lo tanto brinda protección al mismo en lo que respecta a envejecimiento. En cuanto a los otros dos grupos de *P. ligularis* ambos presentaron actividad en los niveles de colesterol. Sin embargo, únicamente el grupo de 10 mg/kg presentó actividad en los niveles de creatinina. Estos datos permiten confirmar la actividad dentro del metabolismo de *P. ligularis* a diferentes dosis, debido a como se mencionó con anterioridad el potencial antioxidante y citoprotector que confiere un mejor funcionamiento a los órganos involucrados. Sin embargo, el mecanismo de acción aún no se ha descrito completamente. Por otra parte, en lo que respecta a los grupos de *V. prionophylla* estos únicamente presentaron actividad en los niveles de colesterol sérico. Esto sugiere una disminución mayor en los pesos de estos individuos ya que sumado a la posible pérdida de tejido muscular y densidad ósea no se presentó acumulación de tejido graso y por lo tanto el peso fue aún menor. Esto no es del todo malo ya que una disminución de la concentración de grasa en el cuerpo permite evitar múltiples problemas durante el envejecimiento. Dicha actividad se puede atribuir a la composición de las plantas de la familia Valerianaceae, de la cual se pueden mencionar iridoides y monovalerianester ya que presentan actividad como antiacumuladores de grasa y sobre las vías de metabolismo de (Yuki et al., 2015; Zhu et al., 2016). En el resto de parámetros evaluados no se observó actividad significativa. Sin embargo, se pudo observar posible potencial nefroprotector por parte de *P. ligularis* 100 mg/kg y *V. prionophylla* 10 mg/kg, por lo que se debe explorar con mayor profundidad estas dosis en este tipo de daño.

En lo que respecta a ensayos de comportamiento se evaluó nado forzado, laberinto acuático de Morris, campo abierto y laberinto en cruz elevado. Por medio de nado forzado se evaluó la actividad protectora en el desarrollo de depresión por parte de los extractos seleccionados. La depresión puede ocurrir a partir de varios mecanismos entre los que se puede mencionar el estrés oxidativo (van Velzen et al., 2017; Yan et al., 2016), alteración en el sistema monoaminérgico (Belzung et al., 2015; Bondy, 2002), daños en tejido cerebral (Campbell & MacQueen, 2004) y alteraciones en el sistema GABAérgico (Guiard & Di Giovanni, 2015). En el presente estudio se observó actividad protectora en el desarrollo de depresión por parte del grupo N-Acetilcisteína, lo cual se ha observado en estudios anteriores debido a la naturaleza antioxidante y protectora ante estrés oxidativo por parte de este compuesto (Bavarsad Shahripour et al., 2014; Santos et al., 2017). De la misma manera se observó actividad protectora en el desarrollo de depresión por parte de *P. ligularis* 10 mg/kg. Esta actividad se puede atribuir a la presencia de quercetina, kaempferol y apigenina, que poseen actividad antioxidante protectora (Lu et al., 2006; Xie et al., 2019; Zarei et al., 2020), inhibitoria de acetilcolinesterasa (Ademosun et al., 2016), prevención de inflamación y daño al tejido (J. Wang et al., 2020), y posible actividad GABAérgica (Zarei et al., 2020) en diferentes modelos de neurotoxicidad y envejecimiento (Ademosun et al., 2016; Lu et al., 2006; D. Wang et al., 2020; D. M. Wang et al., 2014; Zarei et al., 2020). Sin embargo, en las dosis más altas no se observó actividad protectora en el desarrollo de depresión. A pesar de esto se puede observar tendencia al desarrollo de protección dependiente de la concentración ya que se observó que al aumentar la concentración de *P. ligularis* disminuía la actividad protectora con respecto a depresión. Esto se puede atribuir a que un aumento en los metabolitos inhibidores de acetilcolinesterasas produce un aumento en las concentraciones de neurotransmisores por la alta inhibición de acetilcolinesterasas, lo cual a su vez no permite una regulación adecuada de los mismos y fomenta el desarrollo de cuadros depresivos como los causados por pesticidas (Suarez-Lopez et al., 2021). En el caso de *V. prionophylla* no se observó actividad antidepresiva. Sin embargo, se observó tendencia a un aumento de la actividad dependiente de dosis, por lo cual a dosis más altas se podría observar actividad antidepresiva como la observada en estudios previos (Müller et al., 2012). Esta actividad se atribuye a la presencia de flavonoides en diferentes especies de la familia Valerianaceae debido a la actividad neuroprotectora que se ha presentado en estudios previos, gracias a la actividad ansiolítica

(Das et al., 2021) y tranquilizante (Müller et al., 2012) que posee un papel importante en el desarrollo de depresión.

Por medio del laberinto acuático de Morris se evaluó memoria espacial y aprendizaje. En el modelo utilizado el daño en la región hipocampal encargada de la memoria se puede producir por dos vías, la primera es por la actividad estimulada de acetilcolinesterasas que produce daños directos en el tejido cerebral incluyendo el hipocampo (Rebai & Djebli, 2008); la segunda es el daño oxidativo que se genera por la producción de radicales libres, y estos se producen tanto por activación de vías metabólicas específicas y la gran demanda de energía por parte del tejido cerebral como por situaciones de estrés (Rebai & Djebli, 2008; X. Wang et al., 2014), cabe destacar que el tejido hipocampal al igual que la mayoría de tejidos cerebrales son muy susceptibles a este tipo de daño. Por parte de *P. ligularis* únicamente el grupo de 50 mg/kg presentó actividad protectora de la memoria y estimulante del aprendizaje, mientras las dosis de 10 y 100 mg/kg no presentaron actividad. En este caso la vía más aceptada de protección es la disminución de la producción de daño oxidativo por la presencia de metabolitos como la apigenina (Oyebode et al., 2020; Sang et al., 2017) y su actividad antioxidante a dosis específicas. Sin embargo, este tipo de protección no es excluyente por lo cual también se puede presentar protección por medio de inhibición de acetilcolinesterasas o protección regulación de inflamación y daño celular por la presencia de quercetina y kaempferol entre otros metabolitos (Lu et al., 2006; D. M. Wang et al., 2014; J. Wang et al., 2020). Por otra parte, en los grupos de *V. prionophylla* se observó actividad protectora por parte de los grupos de 10 y 100 mg/kg. Esta actividad puede ser producida por la presencia de valepotriatos y ácido valerénico, los cuales han presentado actividad neuroprotectora (Müller et al., 2015; Nam et al., 2013) con anterioridad. Cabe resaltar que la concentración de metabolitos es un elemento importante en cuanto a la protección brindada por estos, es por ello que no en todas las dosis se puede observar actividad protectora de la memoria. Estudios relacionados han sugerido que la actividad de los valepotriatos, por medio de la protección ante la actividad acetilcolinesterasa (de Ávila et al., 2018), y ácido valerénico (Müller et al., 2015; Nam et al., 2013), por medio de la disminución de estrés y ansiedad y su posible injerencia sobre los mecanismos involucrados en el desarrollo de ansiedad (Nam et al., 2013; Rodríguez-Cruz et al., 2020; Vishwakarma et al., 2016), los cuales se presentan en el modelo. Sin embargo,

se debe profundizar aún más sobre los mecanismos de acción tanto de *P. ligularis* como de *V. prionophylla*.

Por medio de campo abierto se evaluó la locomoción, el cual es un aspecto importante dentro de envejecimiento y neurotoxicidad. Entre los resultados destaca la actividad neuroprotectora por parte del grupo de *P. ligularis* 10 mg/kg, la cual se observa tanto en los parámetros de distancia recorrida, así como aceleración total. Contrario a la disminución en la locomoción que se presenta en la mayoría de casos de envejecimiento en el modelo utilizado se observa un aumento en los desplazamiento y velocidad de movimiento. Este hecho ocurre debido a la naturaleza del modelo combinado, el cual incluye un elemento extra de neurotoxicidad. Este tipo de comportamiento se ha observado con anterioridad en modelos en los cuales se utiliza $AlCl_3$ (Al-Amin et al., 2016), lo cual se asocia a envejecimiento sino solamente que además del envejecimiento se presenta un comportamiento asociado a daños en los tejidos cerebrales y cuadro de ansiedad. Estos son provocados principalmente por el daño que genera la estimulación de acetilcolinesterasas y por el estrés oxidativo. Partiendo del tipo de daño que ocurre es importante hacer hincapié en el potencial antioxidante de *P. ligularis*, debido a la presencia de apigenina, quercetina y kaempferol los cuales confieren actividad antioxidante protectora a este extracto a diferentes dosis. A pesar de que no se observó efecto protector de la memoria en este extracto a la concentración de 10 mg/kg si se observó en cuanto a actividad antidepresiva. Por lo cual es conveniente mencionar que estimulación de la memoria y aprendizaje depende de estructuras cerebrales diferentes a las encargadas del desarrollo de cuadros de ansiedad y depresión. Además, es bien sabido que la ansiedad y depresión se encuentran relacionada. De hecho, hasta cierto punto la ansiedad es una de las causas principales del desarrollo de cuadros de depresión (Weaving et al., 2016; Żmudzka et al., 2018). En adición a esto es pertinente mencionar que ambas ocasiones también se observa protección por parte del grupo NAC por lo cual es posible que el mismo mecanismo de protección que ocurre para el desarrollo de cuadros de depresión se da en el efecto ansiolítico de este extracto y este puede ser similar al mecanismo de protección por parte de N-Acetilcisteína.

Además, se realizó laberinto en cruz elevado, por medio del cual se evaluaron parámetros relacionados a locomoción y comportamiento exploratorio para evaluar ansiedad y envejecimiento. Entre los resultados obtenidos se puede destacar la posible actividad

neuroprotectora por parte de *P. ligularis* 50 mg/kg. Lo cual se observa en diferentes parámetros relacionados a locomoción y ansiedad como la cantidad de entradas en los brazos cerrados y entradas totales, así como comportamiento exploratorio como es el número de estiramientos en los brazos cerrados. Este tipo de actividad se puede asociar a los metabolitos presentes en esta planta y que se les atribuye actividad ansiolítica y antioxidante como es el caso de kaempferol, apigenina y quercetina (Marroquín et al., 2012; Xie et al., 2019; Zarei et al., 2020). Cabe destacar que al igual que *P. ligularis* se presentó posible actividad neuroprotectora por parte de *V. prionophylla* a dosis de 50 mg/kg y 10 mg/kg. En base a los mismos parámetros evaluados. La posible actividad neuroprotectora se puede atribuir a diferentes metabolitos que se encuentran en esta planta como es el caso de sesquiterpenos, monoterpenos, valepatriatos y ácido valérico (H. W. Chen et al., 2016; Müller et al., 2012; Vishwakarma et al., 2016), los cuales actúan por medio de diferentes mecanismos como lo son antioxidantes, sistema GABAérgico y antiinflamatorio. Por lo cual es muy complicado proponer un mecanismo específico de protección tanto para *V. prionophylla* como para *P. ligularis* y es necesario la realización de más estudios para la comprobación de los mismos.

Tanto para *P. ligularis* como para *V. prionophylla* es el primer estudio que se realiza para evaluar el potencial neuroprotector y antienvjecimiento en el modelo utilizado. Los resultados obtenidos sugieren que *P. ligularis* posee un gran potencial para el mejoramiento de la calidad de vida durante el proceso de envejecimiento, así como protección tanto de la memoria y aprendizaje como potencial protector ante el desarrollo de cuadros de ansiedad y depresión dependiendo de la concentración a la que se utilice. De la misma manera *V. prionophylla* presenta potencial neuroprotector principalmente de la memoria y aprendizaje, así como posible actividad reguladora de colesterol. Ambas plantas pueden proporcionar información importante para el desarrollo de terapias complementarias relacionadas a problemas derivados del envejecimiento, principalmente relacionadas con problemas neurodegenerativos y metabólicos, lo cual no es excluyente para otros tipos de problemas. Sin embargo, futuros estudios deben realizarse para evaluar aspectos histopatológicos y moleculares que permitan conocer los mecanismos de acción exactos de cada extracto, así como la fisiopatología del modelo. De la misma manera es necesario separar y evaluar cada uno de los metabolitos que poseen las plantas para determinar específicamente la actividad de cada uno.

X. Conclusiones

- 10.1 Se demostró la efectividad del modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad por D-Galactosa/Cloruro de Aluminio 450/39 mg/kg por medio de pesos promedio y laberinto en cruz elevado a los 30 y 60 días.
- 10.2 La administración oral de N-acetilcisteína 100 mg/kg demostró actividad neuroprotectora sobre depresión y locomoción, por medio de nado forzado y campo abierto respectivamente.
- 10.3 El extracto de *P. ligularis* a 10 mg/kg demostró actividad neuroprotectora sobre depresión y locomoción, por medio de nado forzado y campo abierto respectivamente, mientras que a 50 mg/kg demostró actividad neuroprotectora sobre memoria y ansiedad, por medio de laberinto acuático de Morris y laberinto en cruz elevado respectivamente.
- 10.4 El extracto de *P. ligularis* a 50 mg/kg demostró actividad antienvjecimiento sobre metabolismo en niveles séricos de glucosa, mientras que a 10 y 50 mg/kg en niveles séricos de creatinina y a 10, 50 y 100 mg/kg en niveles séricos de colesterol.
- 10.5 Los extractos de *V. prionophylla* a 10 y 100 mg/kg demostraron actividad neuroprotectora sobre memoria por medio de laberinto acuático de Morris, mientras que a 10 y 50 mg/kg demostraron actividad neuroprotectora sobre ansiedad por medio de laberinto en cruz elevado.
- 10.6 Los extractos de *V. prionophylla* a 10, 50 y 100 mg/kg demostraron actividad antienvjecimiento sobre metabolismo en los niveles séricos de colesterol.

XI. Recomendaciones

- 11.1 Se recomienda continuar la demostración de la actividad neuroprotectora a partir de análisis histopatológico de cerebros de los animales utilizados en el estudio para evaluar el nivel de protección a nivel celular de los extractos.

- 11.2 En base a los resultados obtenidos se recomienda continuar con estudios de estas dos plantas en los apartados específicos en los cuales mostraron actividad.

- 11.3 Se recomienda realizar caracterización y fraccionamiento de metabolitos de las especies vegetales estudiadas para determinar los metabolitos específicos involucrados en la actividad.

- 11.4 Se recomienda realizar evaluaciones posteriores de los extractos estudiados y metabolitos específicos para evaluaciones de marcadores moleculares específicos en el sistema nervioso central.

XII. Referencias

- Abdelkarim, D., Zhao, Y., Turner, M. P., Sivakolundu, D. K., Lu, H., & Rypma, B. (2019). A neural-vascular complex of age-related changes in the human brain: Anatomy, physiology, and implications for neurocognitive aging. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *107*, 927–944. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.005>
- Ademosun, A. O., Oboh, G., Bello, F., & Ayeni, P. O. (2016). Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *21*(4), NP11–NP17. <https://doi.org/10.1177/2156587215610032>
- Aix, E., Gallinat, A., & Flores, I. (2018). Telomeres and telomerase in heart regeneration. *Differentiation*, *100*, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.01.003>
- Al-Amin, M. M., Reza, H. M., Saadi, H. M., Mahmud, W., Ibrahim, A. A., Alam, M. M., Kabir, N., Saifullah, A. R. M., Tropa, S. T., & Quddus, A. H. M. R. (2016). Astaxanthin ameliorates aluminum chloride-induced spatial memory impairment and neuronal oxidative stress in mice. *European Journal of Pharmacology*, *777*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.062>
- Awad, R., Levac, D., Cybulska, P., Merali, Z., Trudeau, V. L., & Arnason, J. T. (2007). Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the γ -aminobutyric acid (GABA) system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *85*(9), 933–942. <https://doi.org/10.1139/Y07-083>
- Azman, K. F., & Zakaria, R. (2019). d-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*, *20*(6), 763–782. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09837-y>
- Badibostan, H., Mehri, S., Mohammadi, E., & Hosseinzadeh, H. (2019). Protective effect of thymoquinone on D-galactose-induced aging in mice. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, *14*(1), 14–23. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.13911>
- Balseca Chávez, G. (2016). *Evaluación comparativa de la actividad ansiolítica de los*

extractos de hojas y flores de Passiflora ligularis y Passiflora mixta por administración oral en ratones Mus musculus. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M. R., & Alexandrov, A. V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: Mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and Behavior, 4*(2), 108–122. <https://doi.org/10.1002/brb3.208>
- Behar, D. (1993). *Actividad antimicótica in vitro de Solanum nigrescens contra Cryptococcus neoformans.* Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Belzung, C., Willner, P., & Philippot, P. (2015). Depression: From psychopathology to pathophysiology. *Current Opinion in Neurobiology, 30*, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.08.013>
- Beurel, E., Harrington, L. E., & Jope, R. S. (2013). Inflammatory T helper 17 cells promote depression-like behavior in mice. *Biological Psychiatry, 73*(7), 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.09.021>
- Bondy, B. (2002). Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues in Clinical Neuroscience, 4*(1), 7–20. <https://doi.org/10.31887/dcns.2002.4.1/bbondy>
- Cacabelos, R. (2020). Pharmacogenomics of cognitive dysfunction and neuropsychiatric disorders in dementia. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093059>
- Cáceres, A., & Cruz, S. (2019). Detection and Validation of Native Plants Traditionally Used as Medicine in Guatemala. *Current Traditional Medicine, 5*(1).
- Cambrella. (2012). *Herbal and Homeopathic medicinal products.* https://cam-europe.eu/wp-content/uploads/2018/09/CAMBrella-WP2-part_2final.pdf
- Campbell, S., & MacQueen, G. (2004). The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience, 29*(6), 417–426.
- Cardoso, A., Magano, S., Marrana, F., & Andrade, J. P. (2015). D-galactose high-dose administration failed to induce accelerated aging changes in neurogenesis, anxiety, and spatial memory on young male wistar rats. *Rejuvenation Research, 18*(6), 497–

507. <https://doi.org/10.1089/rej.2015.1684>

- Carvajal de Pabon, L., Turbay Ceballos, S., Marely Álvarez, L., Rodríguez, A., Álvarez, M., Bonilla, K., Restrepo Escobar, S., & Parra, M. (2014). Relación entre los usos populares de la granadilla (*passiflora ligularis juss*) y su composición fitoquímica. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 12(2), 191–202.
- Castañeda, R., Cáceres, A., Velásquez, D., Rodríguez, C., Morales, D., & Castillo, A. (2022). *Medicinal plants used in traditional Mayan medicine for the treatment of central nervous system disorders : An overview*. 283(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114746>
- Castillo, B. (2007). *Validación farmacológica de la actividad sedante e hipnótica de las infusiones acuosas de las hojas de Mentha x piperita (menta), hojas de Ternstroemia tepezapote (trompillo), y bulbo de Allium cepa (cebolla) en ratones machos albinos*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Chen, H. W., He, X. H., Yuan, R., Wei, B. J., Chen, Z., Dong, J. X., & Wang, J. (2016). Sesquiterpenes and a monoterpenoid with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity from *Valeriana officinalis* var. *latifolia* in vitro and in vivo. *Fitoterapia*, 110, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.03.011>
- Chen, J. J. (2019). Functional MRI of brain physiology in aging and neurodegenerative diseases. *NeuroImage*, 187(September 2017), 209–225. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.05.050>
- Chen, J., Song, Y., Yang, J., Zhang, Y., Zhao, P., Zhu, X. J., & Su, H. chuan. (2013). The contribution of TNF- α in the amygdala to anxiety in mice with persistent inflammatory pain. *Neuroscience Letters*, 541, 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.005>
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 21(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Chiroma, S. M., Mohd Moklas, M. A., Mat Taib, C. N., Baharuldin, M. T. H., & Amon, Z. (2018). D-galactose and aluminium chloride induced rat model with cognitive

- impairments. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103(April), 1602–1608.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.152>
- Collins, J. A., Diekman, B. O., & Loeser, R. F. (2018). Targeting aging for disease modification in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 30(1), 101–107.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000456>
- Cui, X., Zuo, P., Zhang, Q., Li, X., Hu, Y., Long, J., Packer, L., & Liu, J. (2006). Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: Protective effects of R- α -lipoic acid. *Journal of Neuroscience Research*, 84(3), 647–654. <https://doi.org/10.1002/jnr.20899>
- Das, G., Shin, H. S., Tundis, R., Gonçalves, S., Tantengco, O. A. G., Campos, M. G., Acquaviva, R., Malfa, G. A., Romano, A., Robles, J. A. H., Clores, M. Q., & Patra, J. K. (2021). Plant species of sub-family valerianaceae—a review on its effect on the central nervous system. *Plants*, 10(5), 1–29. <https://doi.org/10.3390/plants10050846>
- de Ávila, J. M., Pereira, A. O., Zachow, L. L., Gehm, A. Z., Santos, M. Z., Mostardeiro, M. A., Back, D., Morel, A. F., & Dalcol, I. I. (2018). Chemical constituents from *Valeriana polystachya* Smith and evaluation of their effects on the acetylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Fitoterapia*, 131(October), 80–85.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.10.013>
- De Oliveria, D. M., Barreto, G., De Andrade, D. V. G., Saraceno, E., Aon-Bertolino, L., Capani, F., Dos Santos El Bachá, R., & Giraldez, L. D. (2009). Cytoprotective effect of valeriana officinalis extract on an in vitro experimental model of parkinson disease. *Neurochemical Research*, 34(2), 215–220. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9749-y>
- De Souza, M. M., Holzmann, I., Cechinel Filho, V., Mora, T. C., Cáceres, A., Martínez, J. V., & Cruz, S. M. (2011). Evaluation of behavioral and pharmacological effects of hydroalcoholic extract of *Valeriana prionophylla* Standl. from Guatemala. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011(May 2014).
<https://doi.org/10.1155/2011/312320>
- Devia, L. G. (2018). *Análisis de Flavonoides en Extracto Acuoso de Hojas de* . 1–43.

- do Amaral, R. R., Santos, A. A. D., Saravia, A., Botas, G., Cruz, R. A. S., Fernandes, C. P., Rocha, L., & Boylan, F. (2012). Biological activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. leaves. *Latin American Journal of Pharmacy*, *31*(3), 451–455.
- Dong, Z., Xu, M., Huang, J., Chen, L., Xia, J., Chen, X., Jiang, R., Wang, L., & Wang, Y. (2017). The protective effect of Ginsenoside Rg1 on aging mouse pancreas damage induced by D-galactose. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *14*(1), 616–622. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4514>
- Fatemi, I., Khaluoi, A., Kaeidi, A., Shamsizadeh, A., Heydari, S., & Allahtavakoli, M. (2018). Protective effect of metformin on D-galactose-induced aging model in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *21*(1), 19–25. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2017.24331.6071>
- Fernández-Mosquera, L., Dlogo, C. V., Yambire, K. F., Santos, G. L., Luna Sánchez, M., Bénit, P., Rustin, P., Lopez, L. C., Milosevic, I., & Raimundo, N. (2017). Acute and chronic mitochondrial respiratory chain deficiency differentially regulate lysosomal biogenesis. *Scientific Reports*, *7*(April), 1–3. <https://doi.org/10.1038/srep45076>
- Fone, K. C. F., Watson, D. J. G., Billiras, R. I., Sicard, D. I., Dekeyne, A., Rivet, J. M., Gobert, A., & Millan, M. J. (2020). Comparative Pro-cognitive and Neurochemical Profiles of Glycine Modulatory Site Agonists and Glycine Reuptake Inhibitors in the Rat: Potential Relevance to Cognitive Dysfunction and Its Management. *Molecular Neurobiology*, *57*(5), 2144–2166. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01875-9>
- Freire, M. (2021). Pathophysiology of neurodegeneration following traumatic brain injury. *West Indian Medical Journal*, *61*(7).
- Gabriela, G. C., Javier, A. A. F., Elisa, V. A., Gonzalo, V. P., & Herlinda, B. J. (2012). Antidepressant-like effect of *Tagetes lucida* Cav. extract in rats: Involvement of the serotonergic system. *American Journal of Chinese Medicine*, *40*(4), 753–768. <https://doi.org/10.1142/S0192415X12500565>
- Ganjam, G. K., Bolte, K., Matschke, L. A., Neitemeier, S., Dolga, A. M., Höllerhage, M., Höglinger, G. U., Adamczyk, A., Decher, N., Oertel, W. H., & Culmsee, C. (2019). Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons. *Cell Death and Disease*, *10*(11). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2091-2>

- García, J. (2013). *Actividad antifúngica de extractos etanólicos de hoja y rizoma de Valeriana prionophylla, colectadas en dos regiones de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Glasscock, R. J., & Rule, A. D. (2016). Aging and the Kidneys: Anatomy, Physiology and Consequences for Defining Chronic Kidney Disease. *Nephron*, *134*(1), 25–29. <https://doi.org/10.1159/000445450>
- Goodwin, G. M. (2015). The overlap between anxiety, depression, and obsessive-compulsive disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *17*(3), 249–260. <https://doi.org/10.31887/dcns.2015.17.3/ggoodwin>
- Goswami, N., van Loon, J. J. W. A., Roessler, A., Blaber, A. P., & White, O. (2019). Editorial: Gravitational Physiology, Aging and Medicine. *Frontiers in Physiology*, *10*(October), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01338>
- Guiard, B. P., & Di Giovanni, G. (2015). Central serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor dysfunction in depression and epilepsy: The missing link? *Frontiers in Pharmacology*, *6*(MAR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00046>
- Guillaumet-Adkins, A., Yañez, Y., Peris-Diaz, M. D., Calabria, I., Palanca-Ballester, C., & Sandoval, J. (2017). Epigenetics and Oxidative Stress in Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/9175806>
- Guo, L., Cao, J. hui, Wei, T. ting, Li, J. han, Feng, Y. kang, Wang, L. ping, Sun, Y., & Chai, Y. rong. (2020). Gallic acid attenuates thymic involution in the D-galactose induced accelerated aging mice. *Immunobiology*, *225*(1). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.11.005>
- Haddadi, M., Jahromi, S. R., Sagar, B. K. C., Patil, R. K., Shivanandappa, T., & Ramesh, S. R. (2014). Brain aging, memory impairment and oxidative stress: A study in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural Brain Research*, *259*, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.036>
- Hahr, J. Y. (2019). Physiology of aging. *Medical Hypotheses*, *123*(October 2018), 83–85. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.12.016>
- Haider, S., Liaquat, L., Shahzad, S., Sadir, S., Madiha, S., Batool, Z., Tabassum, S.,

- Saleem, S., Naqvi, F., & Perveen, T. (2015). A high dose of short term exogenous d-galactose administration in young male rats produces symptoms simulating the natural aging process. *Life Sciences*, *124*, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.016>
- Hamza, R. Z., Al-harbi, M. S., & Al-hazaa, M. A. (2021). Neurological alterations and testicular damages in aging induced by D-galactose and neuro and testicular protective effects of combinations of chitosan nanoparticles, resveratrol and quercetin in male mice. *Coatings*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/coatings11040435>
- Hernandez, A. (1995). *Actividad antimicrobiana de cuatro arboles nativos de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Hoffman, J. D., Parikh, I., Green, S. J., Chlipala, G., Mohny, R. P., Keaton, M., Bauer, B., Hartz, A. M. S., & Lin, A. L. (2017). Age drives distortion of brain metabolic, vascular and cognitive functions, and the gut microbiome. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *9*(SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00298>
- Holloszy, J. O. (2000). The biology of aging. *Mayo Clinic Proceedings*, *75*(SUPPL.), S3–S9. [https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(19\)30634-2](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(19)30634-2)
- Holzmann, I., Cechinel Filho, V., Mora, T. C., Caceres, A., Martinez, J. V, Cruz, S. M., & Souza, M. M. de. (2011). Evaluation of behavioral and pharmacological effects of hydroalcoholic extract of *Valeriana prionophylla* Standl. from Guatemala. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Hor, Y. Y., Ooi, C. H., Lew, L. C., Jaafar, M. H., Lau, A. S. Y., Lee, B. K., Azlan, A., Choi, S. B., Azzam, G., & Liong, M. T. (2021). The molecular mechanisms of probiotic strains in improving ageing bone and muscle of d-galactose-induced ageing rats. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 130, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/jam.14776>
- Houtkooper, R. H., Argmann, C., Houten, S. M., Canfo, C., Jenning, E. H., Andreux, P., Pénelope A., Thomas, C., Doenlen, R., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2011). The metabolic footprint of aging in mice. *Scientific Reports*, *1*. <https://doi.org/10.1038/srep00134>
- Hoyler, E., Martinez, R., Mehta, K., Nisonoff, H., & Boyd, D. (2018). Beyond medical

- pluralism: characterising health-care delivery of biomedicine and traditional medicine in rural Guatemala. *Global Public Health*, 13(4), 503–517.
<https://doi.org/10.1080/17441692.2016.1207197>
- Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39(1), 73–82.
<https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
- Jain, S., & Goldstein, D. S. (2012). Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: From pathophysiology to pathogenesis. *Neurobiology of Disease*, 46(3), 572–580.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.10.025>
- Jellinger, K. A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: A critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 457–487. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01010.x>
- Kang, S., Li, J., Zuo, W., Fu, R., Gregor, D., Krnjevic, K., Bekker, A., & Ye, J. H. (2017). Ethanol withdrawal drives anxiety-related behaviors by reducing m-type potassium channel activity in the lateral habenula. *Neuropsychopharmacology*, 42(9), 1813–1824. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.68>
- Kazmi, I., Afzal, M., Ali, B., Damanhour, Z. A., Ahmaol, A., & Anwar, F. (2013). Anxiolytic potential of ursolic acid derivative-a stearyl glucoside isolated from *Lantana camara* L. (verbanaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(6), 433–437.
[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60069-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60069-3)
- Kemper, T. (1994). Neuroanatomical and neuropathological changes during aging and dementia. *Clinical Neurology of Aging*, 3–67.
- Khan, M. B., Hoda, M. N., Yousuf, S., Ishrat, T., Ahmad, M., Ahmad, A. S., Alavi, S. H., Haque, N., & Islam, F. (2006). Prevention of cognitive impairments and neurodegeneration by Khamira Abresham Hakim Arshad Wala. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.012>
- Kim, S. (2003). Molecular biology of aging. *Archives of Surgery*, 138(10), 1051–1054.
<https://doi.org/10.1001/archsurg.138.10.1051>
- Knapowski, J., Wieczorowska-Tobis, K., & Witowski, J. (2002). Pathophysiology of ageing.

Journal of Physiology and Pharmacology, 53(2), 135–146.

Kong, S. Z., Li, J. C., Li, S. D., Liao, M. N., Li, C. P., Zheng, P. J., Guo, M. H., Tan, W. X., Zheng, Z. H., & Hu, Z. (2018). Anti-aging effect of chitosan oligosaccharide on d-galactose-induced subacute aging in mice. *Marine Drugs*, 16(6).

<https://doi.org/10.3390/md16060181>

Kosoko, A. M., Olurinde, O. J., & Akinloye, O. A. (2017). Doxorubicin induced neuro- and cardiotoxicities in experimental rats: Protection against oxidative damage by Theobroma cacao Stem bark. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(November 2016), 303–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.01.012>

Kregel, K. C., & Zhang, H. J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: Basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 292(1), 18–36.

<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00327.2006>

Kumar, A., Singh, A., & Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195–203.

<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>

Lazarus, N. R., & Harridge, S. D. R. (2018). The inherent human aging process and the facilitating role of exercise. *Frontiers in Physiology*, 9(OCT), 1–8.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01135>

Li, H., Zheng, L., Chen, C., Liu, X., & Zhang, W. (2019). Brain Senescence Caused by Elevated Levels of Reactive Metabolite Methylglyoxal on D-Galactose-Induced Aging Mice. *Frontiers in Neuroscience*, 13(September), 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01004>

Liao, C. Y., & Kennedy, B. K. (2014). Mouse models and aging: Longevity and progeria. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 109). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00003-2>

Liaquat, L., Sadir, S., Batool, Z., Tabassum, S., Shahzad, S., Afzal, A., & Haider, S. (2019). Acute aluminum chloride toxicity revisited: Study on DNA damage and histopathological, biochemical and neurochemical alterations in rat brain. In *Life*

- Sciences* (Vol. 217). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.009>
- Lu, J., Zheng, Y. lin, Luo, L., Wu, D. mei, Sun, D. xu, & Feng, Y. jian. (2006). Quercetin reverses d-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behavioural Brain Research*, 171(2), 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.03.043>
- M Al kuraishy, H. (2020). Beneficial Neuro-Pharmacological Effect of Passionflower (Passiflora Incarnate L). *Online Journal of Neurology and Brain Disorders*, 3(5). <https://doi.org/10.32474/ojnbd.2020.03.000172>
- Madore, C., Yin, Z., Leibowitz, J., & Butovsky, O. (2020). Microglia, Lifestyle Stress, and Neurodegeneration. *Immunity*, 52(2), 222–240. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.003>
- Malekshah, A. K., Torabizadeh, Z., & Naghshwar, F. (2005). Developmental toxicity of aluminum from high doses of AlCl₃ in mice. *Journal of Applied Research*, 5(4), 575–579.
- Marroquín, M. N., Cruz, S. M., & Cáceres, A. (2012). Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (Passiflora edulis, P. incarnata, P. ligularis) from Guatemala. *Acta Horticulturae*, 964, 93–98. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.964.11>
- Martel, J., Ojcius, D. M., Ko, Y. F., Chang, C. J., & Young, J. D. (2019). Antiaging effects of bioactive molecules isolated from plants and fungi. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 1515–1552. <https://doi.org/10.1002/med.21559>
- Martignoni, M., Groothuis, G. M. M., & de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2(6), 875–894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>
- Mitchell, S. J., Scheibye-Knudsen, M., Longo, D. L., & de Cabo, R. (2015). Animal Models of Aging Research: Implications for Human Aging and Age-Related Diseases. *Annual Review of Animal Biosciences*, 3(1), 283–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110829>
- Morissette, M. R., Stricker, J. C., Rosenberg, M. A., Buranasombati, C., Levitan, E. B.,

- Mittleman, M. A., & Rosenzweig, A. (2009). Effects of myostatin deletion in aging mice. *Aging Cell*, *8*(5), 573–583. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00508.x>
- Müller, L. G., Borsoi, M., Stolz, E. D., Herzfeldt, V., Viana, A. F., Ravazzolo, A. P., & Rates, S. M. K. (2015). Diene Valepotriates from *Valeriana glechomifolia* Prevent Lipopolysaccharide-Induced Sickness and Depressive-Like Behavior in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/145914>
- Müller, L. G., Salles, L. A., Stein, A. C., Betti, A. H., Sakamoto, S., Cassel, E., Vargas, R. F., von Poser, G. L., & Rates, S. M. K. (2012). Antidepressant-like effect of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *36*(1), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.08.015>
- Nam, S. M., Choi, J. H., Yoo, D. Y., Kim, W., Jung, H. Y., Kim, J. W., Kang, S. Y., Park, J., Kim, D. W., Kim, W. J., Yoon, Y. S., & Hwang, I. K. (2013). *Valeriana officinalis* extract and its main component, valerenic acid, ameliorate d-galactose-induced reductions in memory, cell proliferation, and neuroblast differentiation by reducing corticosterone levels and lipid peroxidation. *Experimental Gerontology*, *48*(11), 1369–1377. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.09.002>
- Nehlig, A. (2013). The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *75*(3), 716–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04378.x>
- O'Brien, J. T., Erkinjuntti, T., Reisberg, B., Roman, G., Sawada, T., Pantoni, L., Bowler, J. V., Ballard, C., DeCarli, C., Gorelick, P. B., Rockwood, K., Burns, A., Gauthier, S., & DeKosky, S. T. (2003). Vascular cognitive impairment. *Lancet Neurology*, *2*(2), 89–98. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00305-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00305-3)
- Odden, M. C., Shlipak, M. G., & Tager, I. B. (2009). Serum creatinine and functional limitation in elderly persons. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *64*(3), 370–376. <https://doi.org/10.1093/gerona/gln037>
- Okouchi, M., Ekshyyan, O., Maracine, M., & Tak, Y. A. (2007). Neuronal apoptosis in neurodegeneration. *Antioxidants and Redox Signaling*, *9*(8), 1059–1096.

<https://doi.org/10.1089/ars.2007.1511>

OMS. (2015). *Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud*.

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186466/9789240694873_spa.pdf?sequence=1

OMS. (2017). *El número de personas que padecen demencia se triplicará en los próximos 30 años*. <https://www.who.int/es/news-room/detail/07-12-2017-dementia-number-of-people-affected-to-triple-in-next-30-years>. <https://www.who.int/es/news-room/detail/07-12-2017-dementia-number-of-people-affected-to-triple-in-next-30-years>

OMS. (2019). *Demencia*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

Orellana, M., & Guajardo, V. (2004). Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Revista Médica de Chile*, 85–94.

Ortiz, D., Valdez, A., & Cáceres, A. (2013). Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por extractos de 18 especies vegetales nativas de Guatemala usadas en el tratamiento de afecciones nerviosas. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 22(1), 17–25.

<http://www.revistasguatemala.usac.edu.gt/index.php/qyf/article/view/176>

Otify, A., George, C., Elsayed, A., & Farag, M. A. (2015). Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics. *Food and Function*, 6(12), 3807–3817. <https://doi.org/10.1039/c5fo00875a>

Oyebode, O. T., Abolaji, A. O., Oluwadare, J. O., Adedara, A. O., & Olorunsogo, O. O. (2020). Apigenin ameliorates D-galactose-induced lifespan shortening effects via antioxidative activity and inhibition of mitochondrial-dependent apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Functional Foods*, 69(November 2019), 103957. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103957>

Parameshwaran, K., Irwin, M. H., Steliou, K., & Pinkert, C. A. (2010a). D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice. *Rejuvenation Research*, 13(6), 729–735. <https://doi.org/10.1089/rej.2010.1020>

- Parameshwaran, K., Irwin, M. H., Steliou, K., & Pinkert, C. A. (2010b). D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice. *Rejuvenation Research*, *13*(6), 729–735. <https://doi.org/10.1089/rej.2010.1020>
- Patki, G., Solanki, N., Atrooz, F., Allam, F., & Salim, S. (2013). Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Research*, *1539*, 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.033>
- Petersen, R. C., Smith, G. E., Waring, S. C., Ivnik, R. J., Kokmen, E., & Tangelos, E. G. (1997). Aging, memory, and mild cognitive impairment. *International Psychogeriatrics*, *9*(SUPPL. 1), 65–69. <https://doi.org/10.1017/s1041610297004717>
- Pineda, L. (1998). *Actividad antimicrobiana de extractos de raiz, rizoma, tallo y hojas de diferentes especies del género Smilax*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Piñol-Ripoll, G., De La Puerta, I., & Purroy, F. (2009). Serum creatinine is an inadequate screening test for renal failure in ischemic stroke patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, *120*(1), 47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01120.x>
- Przedborski, S., Vila, M., & Jackson-Lewis, V. (2003). Neurodegeneration: What is it and where are we? *Journal of Clinical Investigation*, *111*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1172/JCI200317522>
- Qin, L., Liu, Y., Hong, J. S., & Crews, F. T. (2013). NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia*, *61*(6), 855–868. <https://doi.org/10.1002/glia.22479>
- Rao, V. S., Rao, A., & Karanth, K. S. (2005). Anticonvulsant and neurotoxicity profile of *Nardostachys jatamansi* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *102*(3), 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.031>
- Rastrelli, L., Saravia, A., Hernandez, M., & De Simone, F. (1998). Antiinflammatory activity-guided fractionation of *Gnaphalium stramineum*. *Pharmaceutical Biology*, *36*(5), 315–319. <https://doi.org/10.1076/phbi.36.5.315.4647>
- Rebai, O., & Djebli, N. E. (2008). Chronic Exposure to Aluminum Chloride in Mice: Exploratory Behaviors and Spatial Learning. *Advan. Biol. Res*, *2*(1–2), 26–33.

- Rodríguez-Cruz, A., Romo-Mancillas, A., Mendiola-Precoma, J., Escobar-Cabrera, J. E., García-Alcocer, G., & Berumen, L. C. (2020). "Effect of valerenic acid on neuroinflammation in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease." *IBRO Reports*, 8(December 2019), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.12.002>
- Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-morte, D., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2012). Oxidative Stress and Diseases. *Oxidative Stress and Diseases*, 757–772. <https://doi.org/10.5772/2535>
- Salguero, I. (1989). *Estudio farmacológico de Tagetes lucida (pericón)*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Sang, Y., Zhang, F., Wang, H., Yao, J., Chen, R., Zhou, Z., Yang, K., Xie, Y., Wan, T., & Ding, H. (2017). Apigenin exhibits protective effects in a mouse model of d-galactose-induced aging via activating the Nrf2 pathway. *Food and Function*, 8(6), 2331–2340. <https://doi.org/10.1039/c7fo00037e>
- Santos, P., Herrmann, A. P., Benvenuti, R., Noetzold, G., Giongo, F., Gama, C. S., Piato, A. L., & Elisabetsky, E. (2017). Anxiolytic properties of N-acetylcysteine in mice. *Behavioural Brain Research*, 317, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.010>
- Shamim, D., & Laskowski, M. (2017). Inhibition of Inflammation Mediated Through the Tumor Necrosis Factor α Biochemical Pathway Can Lead to Favorable Outcomes in Alzheimer Disease. *Journal of Central Nervous System Disease*, 9, 117957351772251. <https://doi.org/10.1177/1179573517722512>
- Sharma, S., Kumar, P., & Deshmukh, R. (2018). Neuroprotective potential of spermidine against rotenone induced Parkinson's disease in rats. *Neurochemistry International*, 116, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.010>
- Shati, A. A., Elsaid, F. G., & Hafez, E. E. (2011). Biochemical and molecular aspects of aluminium chloride-induced neurotoxicity in mice and the protective role of *Crocus sativus* L. extraction and honey syrup. *Neuroscience*, 175, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.043>
- Shay, J. W. (2018). Telomeres and aging. *Current Opinion in Cell Biology*, 52, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.12.001>

- Siracusa, R., Scuto, M., Fusco, R., Trovato, A., Ontario, M. L., Crea, R., Di Paola, R., Cuzzocrea, S., & Calabrese, V. (2020). Anti-inflammatory and anti-oxidant activity of hidrox® in rotenone-induced Parkinson's disease in mice. *Antioxidants*, *9*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox9090824>
- Sixsmith, A., Hammond, M., & Gibson, G. (2008). Quality of life and dementia. *Care-Related Quality of Life in Old Age: Concepts, Models and Empirical Findings*, *20*(1), 217–233. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72169-9_10
- Stefanatos, R., & Sanz, A. (2018). The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Letters*, *592*(5), 743–758. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12902>
- Stapp, J. R. (2018). *Ethnoecology and Medicinal Plants of the Highland Maya* (1st ed.). Springer International Publishing.
- Stroo, E., Koopman, M., Nollen, E. A. A., & Mata-Cabana, A. (2017). Cellular regulation of amyloid formation in aging and disease. *Frontiers in Neuroscience*, *11*(FEB), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00064>
- Suarez-Lopez, J. R., Nguyen, A., Klas, J., Gahagan, S., Checkoway, H., Lopez-Paredes, D., Jacobs, D. R., & Noble, M. (2021). Associations of Acetylcholinesterase Inhibition Between Pesticide Spray Seasons with Depression and Anxiety Symptoms in Adolescents, and the Role of Sex and Adrenal Hormones on Gender Moderation. *Exposure and Health*, *13*(1), 51–64. <https://doi.org/10.1007/s12403-020-00361-w>
- Taracena, A. (1990). *Acción antibacteriana de extractos vegetales de la familia anacardiaceae usados en el tratamiento popular de diarrea*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Trist, B. G., Hare, D. J., & Double, K. L. (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*, *18*(6), 1–23. <https://doi.org/10.1111/accel.13031>
- Trombetta-Lima, M., Krabbendam, I. E., & Dolga, A. M. (2020). Calcium-activated potassium channels: implications for aging and age-related neurodegeneration. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *123*(April), 105748. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105748>

- Tschanz, J. T., Corcoran, C., Skoog, I., Khachaturian, A. S., Herrick, J., Hayden, K. M., Welsh-Bohmer, K. A., Calvert, T., Norton, M. C., Zandi, P., & Breitner, J. C. S. (2004). Dementia: The leading predictor of death in a defined elderly population: The Cache County Study. *Neurology*, *62*(7), 1156–1162.
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000118210.12660.C2>
- van Velzen, L. S., Wijdeveld, M., Black, C. N., van Tol, M. J., van der Wee, N. J. A., Veltman, D. J., Penninx, B. W. J. H., & Schmaal, L. (2017). Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *76*, 140–144.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.02.017>
- Vargas, J. M., & Andrade-Cetto, A. (2018). Ethnopharmacological field study of three Q'Eqchi communities in Guatemala. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(NOV).
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01246>
- Vishwakarma, S., Goyal, R., Gupta, V., & Dhar, K. L. (2016). GABAergic effect of valeric acid from *Valeriana wallichii* in amelioration of ICV STZ induced dementia in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *26*(4), 484–489.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.02.008>
- Wahl, D., Coogan, S. C. P., Solon-Biet, S. M., De Cabo, R., Haran, J. B., Raubenheimer, D., Cogger, V. C., Mattson, M. P., Simpson, S. J., & Le Couteur, D. G. (2017). Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia. *Clinical Interventions in Aging*, *12*, 1419–1428.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S145247>
- Wang, D. M., Li, S. Q., Wu, W. L., Zhu, X. Y., Wang, Y., & Yuan, H. Y. (2014). Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, *39*(8), 1533–1543.
<https://doi.org/10.1007/s11064-014-1343-x>
- Wang, D., Yang, Y., Zou, X., Zhang, J., Zheng, Z., & Wang, Z. (2020). Antioxidant Apigenin Relieves Age-Related Muscle Atrophy by Inhibiting Oxidative Stress and Hyperactive Mitophagy and Apoptosis in Skeletal Muscle of Mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *75*(11), 2081–

2088. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa214>

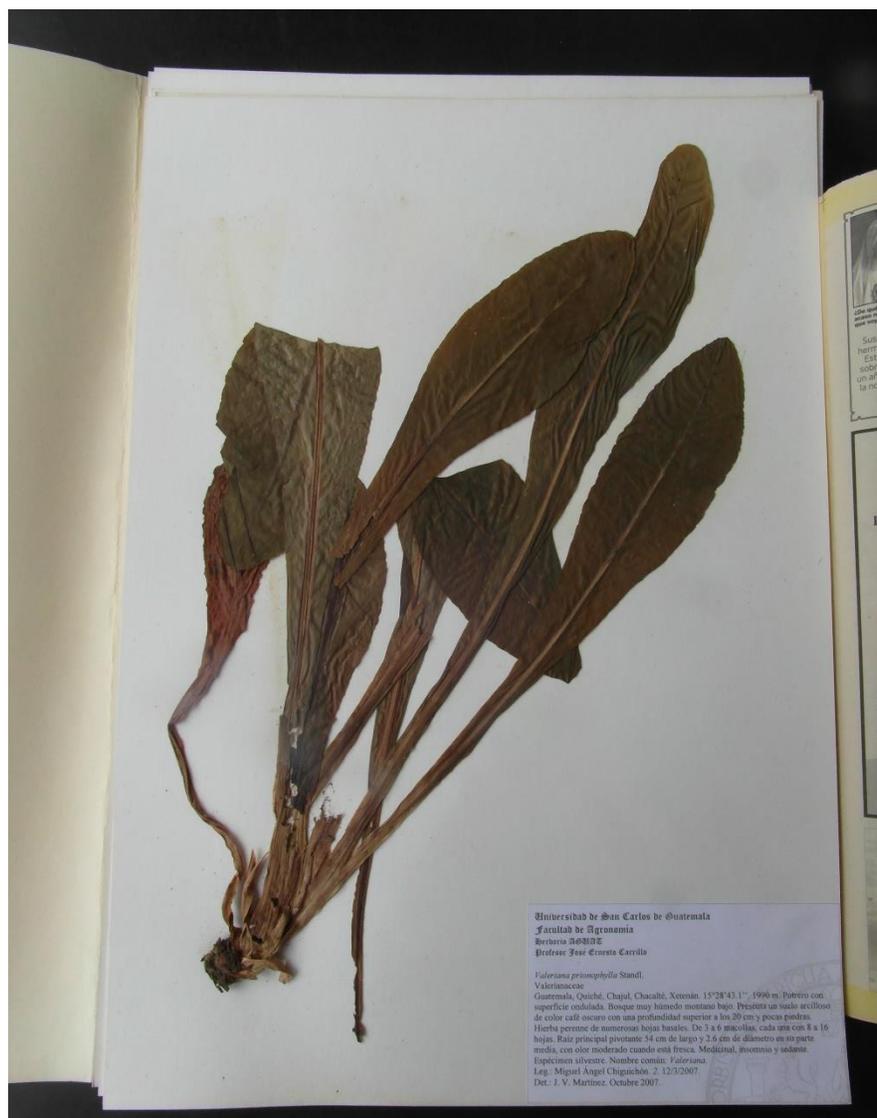
- Wang, J., Mao, J., Wang, R., Li, S., Wu, B., & Yuan, Y. (2020). Kaempferol Protects Against Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Through Intervening Oxidative and Inflammatory Stress Induced Apoptosis. *Frontiers in Pharmacology*, *11*(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00424>
- Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H. gon, & Zhu, X. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(8), 1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.015>
- Weaving, G., Batstone, G. F., & Jones, R. G. (2016). Age and sex variation in serum albumin concentration: an observational study. *Annals of Clinical Biochemistry*, *53*(1), 106–111. <https://doi.org/10.1177/0004563215593561>
- Wei, Y., Liu, D., Zheng, Y., Li, H., Hao, C., & Ouyang, W. (2017). Protective effects of kinetin against aluminum chloride and D-galactose induced cognitive impairment and oxidative damage in mouse. *Brain Research Bulletin*, *134*, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.08.014>
- Xiang, M., Jiang, Y., Hu, Z., Yang, Y., Du, X., Botchway, B. O., & Fang, M. (2019). Serotonin receptors 2A and 1A modulate anxiety-like behavior in post-traumatic stress disorder mice. *American Journal of Translational Research*, *11*(4), 2288–2303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31105836><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6511758>
- Xiao, F., Li, X. G., Zhang, X. Y., Hou, J. D., Lin, L. F., Gao, Q., & Luo, H. M. (2011). Combined administration of D-galactose and aluminium induces Alzheimerlike lesions in brain. *Neuroscience Bulletin*, *27*(3), 143–155. <https://doi.org/10.1007/s12264-011-1028-2>
- Xie, Y., Liang, D., Wu, Q., Chen, X., Buabeid, M. A., & Wang, Y. (2019). A System-Level Investigation into the Mechanisms of Apigenin Against Inflammation. *Natural Product Communications*, *14*(9). <https://doi.org/10.1177/1934578X19878600>

- Yan, B., Guo, J., Liu, X., Li, J., Yang, X., Ma, P., & Wu, Y. (2016). Oxidative stress mediates dibutyl phthalate-induced anxiety-like behavior in Kunming mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *45*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.013>
- Yuki, K., Ikeda, M., Yoshida, S., Ohno, O., Suenaga, K., Yamada, K., Uemura, D., & Miyamoto, K. (2015). Isolation of monovalerianester a, an inhibitor of fat accumulation, from valeriana fauriei. *Natural Product Communications*, *10*(8), 1333–1334. <https://doi.org/10.1177/1934578x1501000801>
- Zarei, M., Sarihi, A., Ahmadimoghaddam, D., & Soltani, E. (2020). Effects of Intracerebroventricular Micro-injection of Kaempferol on Anxiety: Possible GABAergic Mechanism Involved. *Avicenna Journal of Neuro Psycho Physiology*, *8*(2), 109–114. <https://doi.org/10.32592/ajnpp.2021.8.2.108>
- Zhao, H., Li, J., Zhao, J., Chen, Y., Ren, C., & Chen, Y. (2018). Antioxidant effects of compound walnut oil capsule in mice aging model induced by D-galactose. *Food and Nutrition Research*, *62*, 1–10. <https://doi.org/10.29219/fnr.v62.1371>
- Zhao, Y., & Zhao, B. (2013). Review Article Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*.
- Zhen, Y. Z., Lin, Y. J., Li, K. J., Zhang, G. L., Zhao, Y. F., Wang, M. M., Wei, J. B., Wei, J., & Hu, G. (2016). Effects of rhein lysinate on D-galactose-induced aging mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *11*(1), 303–308. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2858>
- Zhong, S. J., Wang, L., Wu, H. T., Lan, R., & Qin, X. Y. (2019). Coeloglossum viride var. bracteatum extract improves learning and memory of chemically-induced aging mice through upregulating neurotrophins BDNF and FGF2 and sequestering neuroinflammation. *Journal of Functional Foods*, *57*(January), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.045>
- Zhu, J., Xu, K., Zhang, X., Cao, J., Jia, Z., Yang, R., Ma, C., Chen, C., Zhang, T., & Yan, Z. (2016). Studies on the regulation of lipid metabolism and its mechanism of the iridoids rich fraction in Valeriana jatamansi Jones. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *84*, 1891–1898. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.099>

Žmudzka, E., Salaciak, K., Sapa, J., & Pytka, K. (2018). Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. *Life Sciences*, 210, 106–124.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.050>

XIII. Anexos

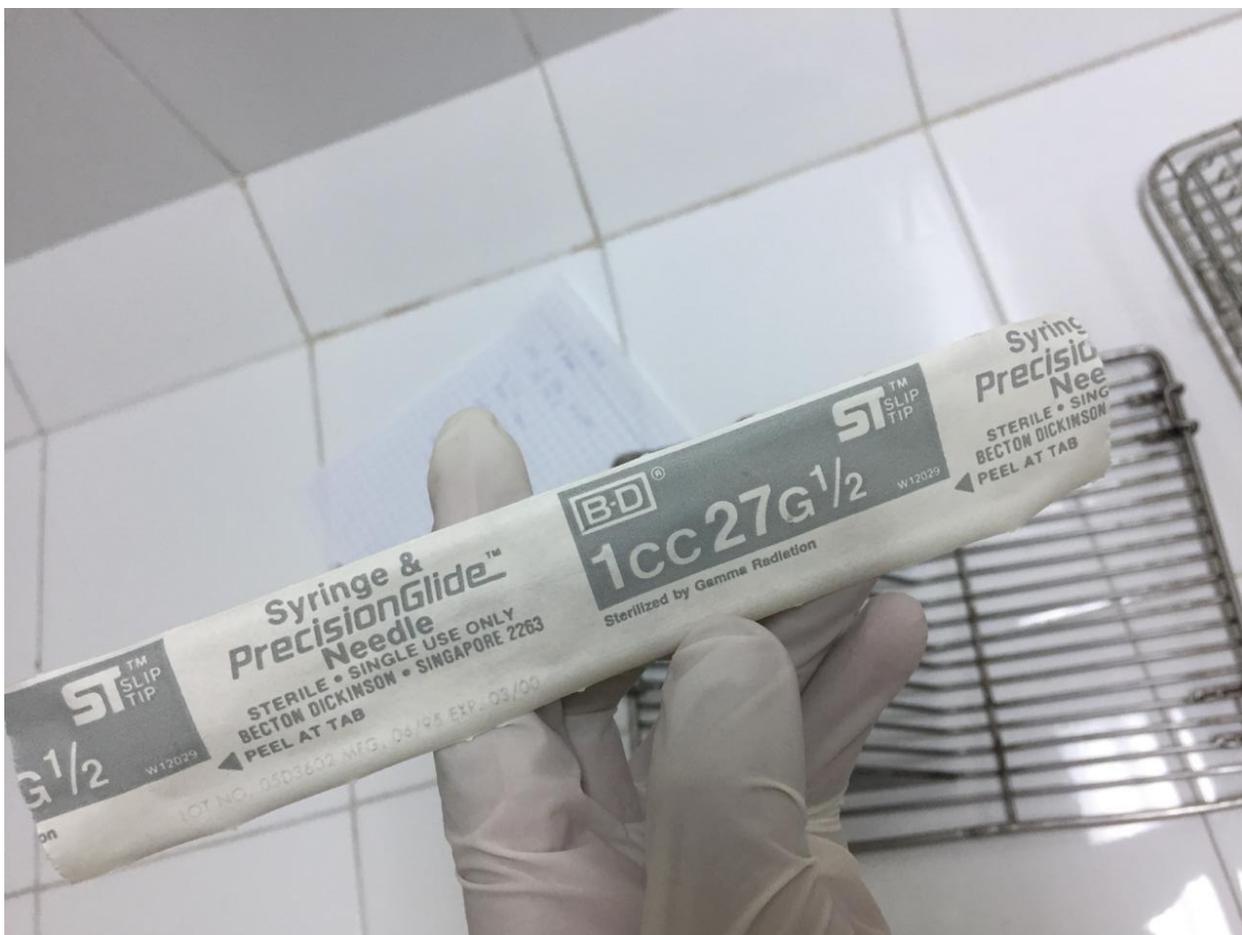
Anexo 1: Especimen de *Valeriana prionophylla* en herbario BIGU, utilizado para la obtención de extracto.



Anexo 2: Correcta técnica de sujeción y administración oral utilizada para Cloruro de Aluminio y Extractos vegetales.



Anexo 3: Jeringa de 1 mL utilizada para administración Oral y Subcutánea de reactivos y extractos



Anexo 4: Balanza digital utilizada para obtener el peso a diario de los ratones.



Anexo 5: D-Galactosa y Cloruro de Aluminio utilizados para la inducción del modelo de envejecimiento acelerado y neurotoxicidad.



Anexo 6: Preparación de extractos vegetales para administración oral.



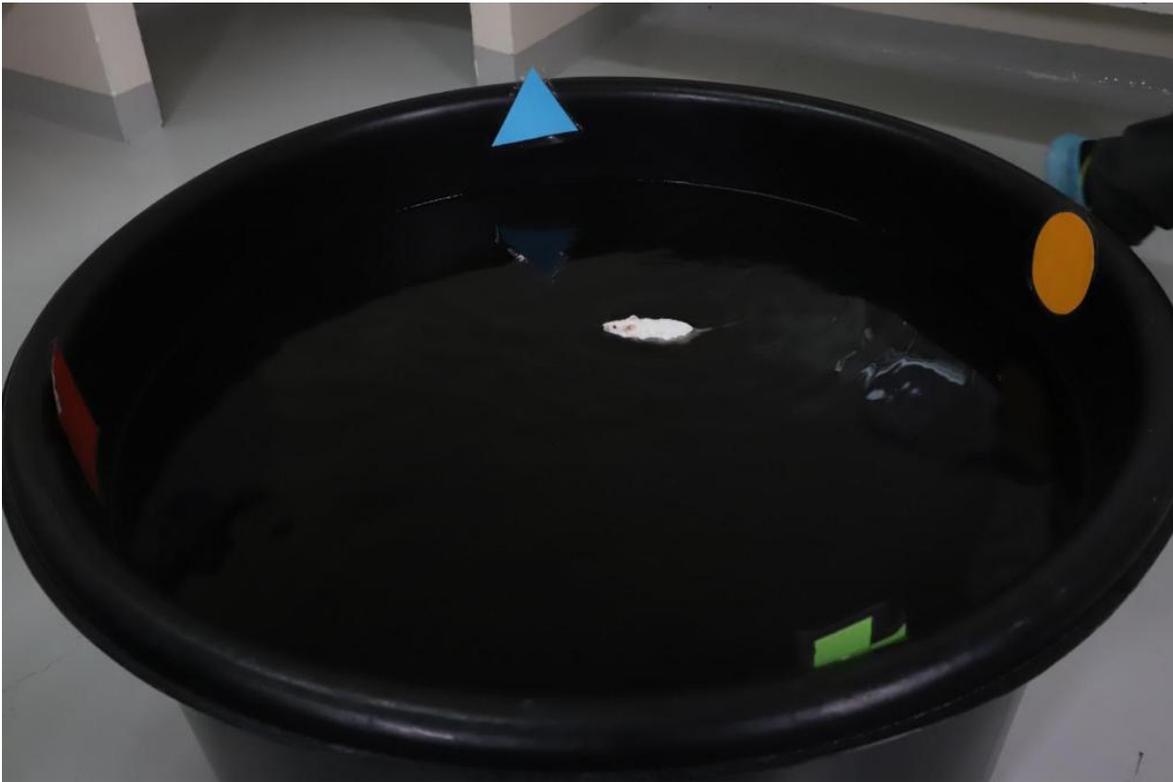
Anexo 7: Extractos preparados para administración oral



Anexo 8: Ensayo de campo abierto realizado durante la validación del modelo fisiopatológico y evaluación farmacológica de extractos.



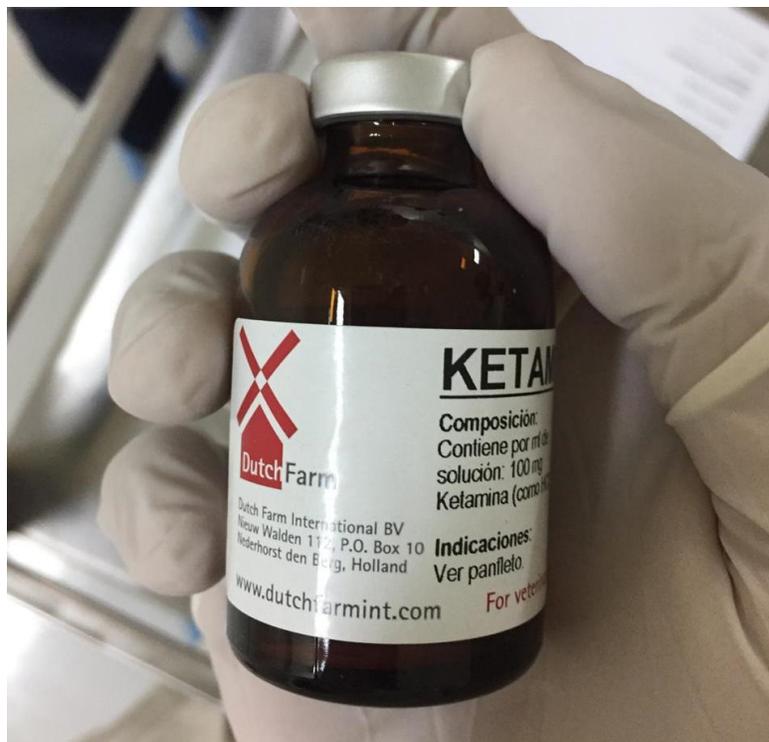
Anexo 9: Laberinto acuático de Morris para la evaluación de memoria y aprendizaje.



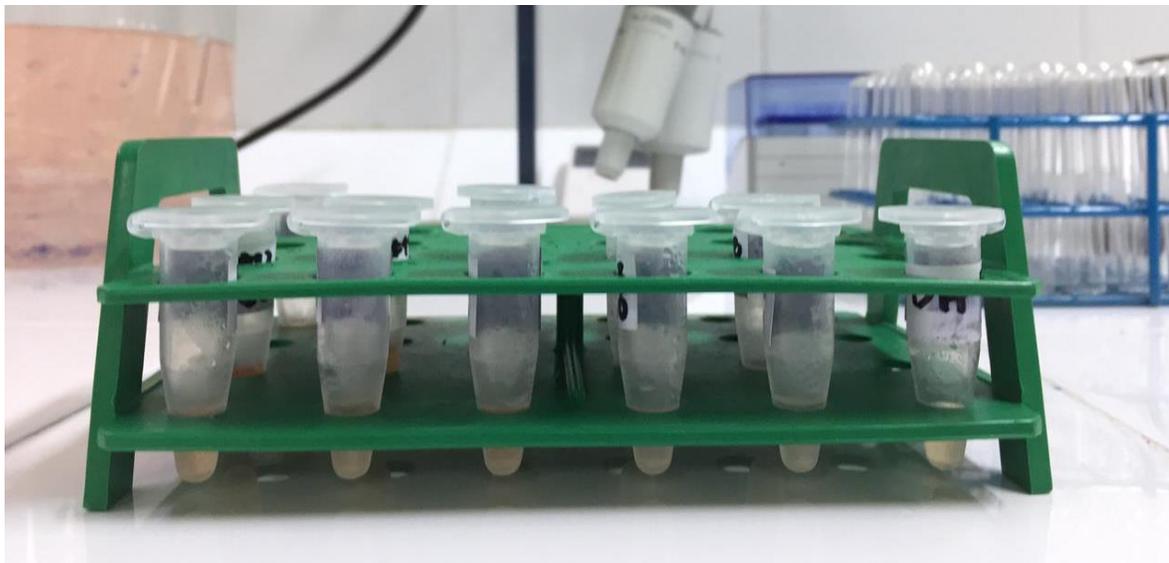
Anexo 10: Análisis de vídeos por medio de software de rastreo animal (ToxTrac®)



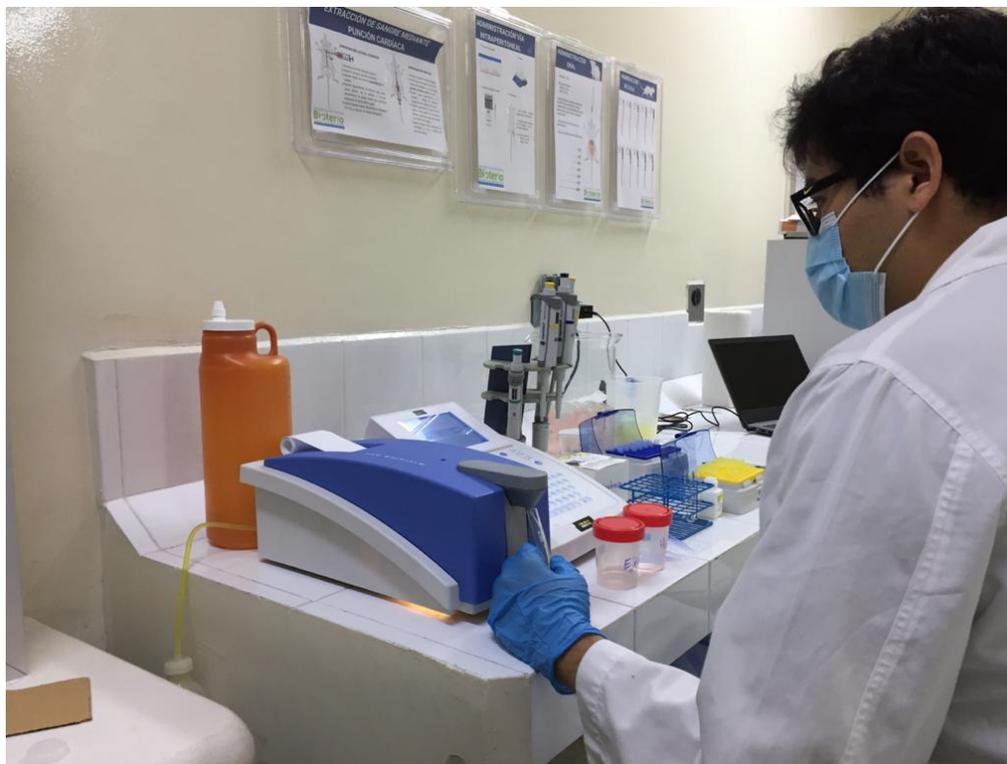
Anexo 11: Ketamina de uso veterinario utilizada para la eutanasia de los animales.



Anexo 12: Sueros sanguíneos colectados para análisis bioquímico.



Anexo 13: Análisis bioquímico realizado en Microlab 300





Br. César José Rodríguez Mirón

Autor



Rodrigo Castañeda Molina, PhD

Asesor



Licda. Lesly Yanyra Xajil Ramos

Revisora



M.A. Lucrecia Martínez de Haase,

Directora de la Escuela de Química Farmacéutica



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia