



**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

**Título del proyecto:** Potencial terapéutico de flavonoides cítricos en un modelo animal con inflamación y daño cerebral

**Alumno:** Diego Eduardo Ortega García (2182033603)

**Asesor Interno:** Dra. Beatriz Godínez Chaparro

**Asesor Externo:** M.en C. David Calderón Guzmán

## **INTRODUCCIÓN**

La colitis ulcerosa provocada por *Salmonella typhimurium* contribuye al desarrollo de síndrome del intestino irritable y enfermedad intestinal inflamatorio. Dentro de los mecanismos de daño provocados por *S. typhimurim* se destacan la inflamación sistémica, la disbiosis, que actualmente es relacionada con alteraciones a nivel de Sistema Nervioso Central y el estrés oxidante, se ha reportado que las endotoxinas de esta bacteria propician la generación de especies reactivas de oxígeno. El poder antiinflamatorio, antioxidante y neuroprotector de los flavonoides ha sido ampliamente estudiado con resultados favorables, por lo cual estudiamos si la combinación de 3 flavonoides cítricos: Diosmina, Hesperidina y Rutina podía potenciar este efecto terapéutico en un modelo animal de inflamación y daño neurológico inducido por el ácido 3-nitropropiónico (3-NPA). Se utilizaron ratas Wistar macho a las que se les administraron los flavonoides, un inóculo de *S. typhimurium*, 3-NPA o combinaciones de estos, se realizaron mediciones de marcadores de inflamación, de estrés oxidante, se buscaron alteraciones a nivel de neurotransmisores y se realizó un análisis histomorfológico del cerebro, estómago e intestino. Se concluye que la combinación de estos 3 flavonoides presentó efectos antiinflamatorios y antioxidantes moderados, sin embargo, no tuvieron efecto neuroprotector contra el ácido 3-nitropropiónico.

## **MARCO TEÓRICO**

### ***Colitis Infecciosa***

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad caracterizada por la inflamación del intestino grueso (colon) y la aparición de llagas, esta enfermedad es una de las posibles manifestaciones de la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) junto con la enfermedad de Crohn y la colitis indeterminada. Existen muchos factores que pueden causar CU como pueden ser enfermedades crónicas, trastornos en la dieta, reacciones alérgicas e infecciones bacterianas, víricas o parasitarias, dando lugar a lo que se denomina colitis infecciosa.

Existen una gran variedad de agentes causales de la colitis infecciosa, pero principalmente se destacan la *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium difficile*; y *Salmonella*; parásitos como la *Entamoeba histolytica* y el *Balantidium coli*; virus como el citomegalovirus (CMV), el virus de la infección por VIH/SIDA tipo 1 y 2; y últimamente se evidencian casos causados por hongos (Podolsky, 1991). De acuerdo con Navaneethan (2011) se ha observado que las infecciones por *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Entamoeba histolytica*, contribuyen al desarrollo del síndrome del intestino irritable postinfeccioso y EII.

### ***Salmonella typhimurium***

La *Salmonella typhimurium* es una bacteria entérica facultativa, gramnegativa e intracelular que infecta a varios huéspedes y puede causar una inflamación severa del epitelio de la mucosa intestinal, gastroenteritis y enfermedad sistémica. Entre los mecanismos de daño por infección bacteriana se ha destacado el papel del estrés oxidante, y que un efecto potencialmente importante de las endotoxinas, es el aumento de la producción de intermedios reactivos de oxígeno y óxido nítrico. Hung y Wang (2004), así como Hung (2005) reportan que la infección con *Salmonella typhimurium*, produce estrés oxidante en el sistema gástrico con disrupción de la mucosa gástrica, cuyos efectos pudieron ser mitigados mediante la administración de antioxidantes. Aun cuando el tratamiento de elección para las infecciones de origen bacteriano son los antibióticos, los extractos de plantas han sido utilizados para el tratamiento de la infección por *Salmonella*; por ejemplo, Fabri y cols. (2021) reportan que la inhibición de mediadores inflamatorios y de estrés oxidante (malondialdehído, catalasa y metaloproteínasa) están involucrados en los efectos positivos de la administración de extracto metanólico de *Mitracarpus frigidus* sobre la infección por *Salmonella*. También Calderón y cols. (2017) han demostrado que la administración de extracto de árnica y romero, tiene efecto sobre los indicadores de estrés oxidante en animales infectados con *Salmonella*. Lo anterior da soporte a la hipótesis de que el manejo de los mediadores inflamatorios y de

estrés oxidante mediante derivados de plantas, puede ser una estrategia para el tratamiento de este tipo de padecimientos.

### **Flavonoides**

Flavonoide es el término genérico con el que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas y frutas. La estructura básica de la que derivan los flavonoides es la 2-fenilcromona (fig.1), también conocida como flavona. Todos los flavonoides están hidroxilados por lo cual se designan como polifenoles (López, 2002).

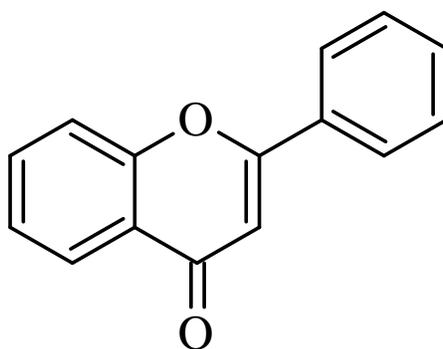


Figura 1. Estructura básica de la 2-fenilcromona de la cual derivan los flavonoides.

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes presentes en la dieta humana y se ha reportado que poseen actividad antioxidante y captadora de radicales libres. De acuerdo con Burda (2001) aquellos que tienen un grupo hidroxilo libre en la posición C-3 son los que más capacidad antioxidante exhiben y los que tienen el grupo hidroxilo libre en la posición C-4' tienen mayor actividad anti-radicales libres. Su consumo se ha asociado con riesgo reducido de padecer ciertas enfermedades crónicas tales como la aterosclerosis, cuyo efecto es atribuido a sus características antioxidantes y antiinflamatorias (Kris-Etherton, 2004). Los flavonoides también exhiben actividades antimicrobianas (Cushnie, 2005). Dastidar y colaboradores (2004) informaron que la administración intraperitoneal de sophoraisoflavona A 1,58 mg/kg o de 3,16 mg/kg de 6,8-diprenilgenisteína, proporcionó protección significativa a los ratones expuestos a  $9.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) de *Salmonella typhimurium*.

Respecto de su actividad antiinflamatoria, la evidencia sugiere que los patrones dietéticos ricos en flavonoides de origen vegetal como frutas y verduras, juegan un papel clave en la prevención de enfermedades a través de una acción multifactorial, que implica una modulación del sistema inmune y la respuesta inflamatoria (Serafini, 2010). Se ha sugerido que los mecanismos moleculares involucrados en las actividades antiinflamatorias de los flavonoides incluyen: inhibición de enzimas proinflamatorias, inhibición del factor nuclear kB (NF-kB), activación de la proteína activadora-1 (AP-1) y activación de enzimas desintoxicantes antioxidantes de fase II. (Santangelo, 2007; Yoon, 2005; Kim, 2004). Se ha descrito también que los flavonoides poseen actividad anti ulcerosa; de acuerdo con Farzaei y cols. (2015) sus efectos están mediados por la mejora de la citoprotección, reepitelización, neovascularización y angiogénesis, regulación al alza de factores de crecimiento y prostaglandinas, regulación a la baja de factores anti-angiogénicos, potenciación del óxido nítrico endotelial derivado de óxido nítrico sintetasa, supresión del daño oxidante de la mucosa, amplificación del rendimiento de la actividad antioxidante, antiácido y anti-secretora, aumento de los agentes defensivos endógenos de la mucosa, y el bloqueo de los cambios morfológicos gástricos, inflamación y ulceración gastroduodenal.

### ***Diosmina, Hesperidina y Rutina***

La diosmina (fig. 2), hesperidina (fig. 3) y rutina (fig. 4) son 3 flavonoides con estructura muy similar, los 3 son considerados glucósidos de la flavona. De forma natural se encuentran principalmente en los cítricos.

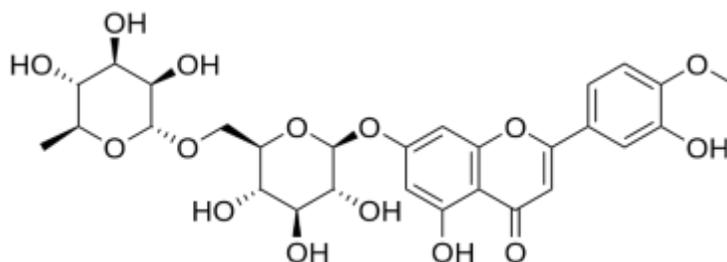


Figura 2. Estructura química de la diosmina.

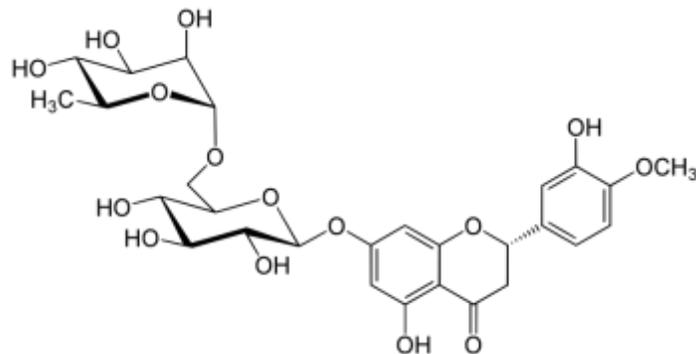


Figura 3. Estructura química de la hesperidina.

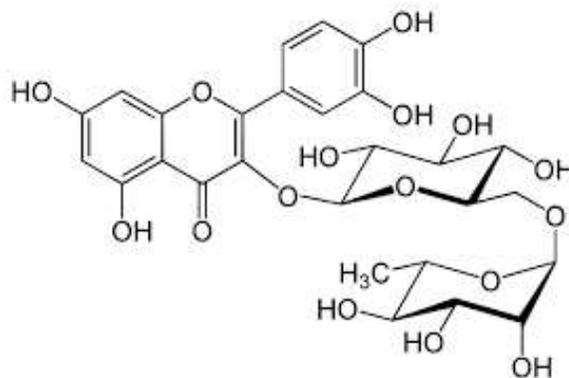


Figura 4. Estructura química de la rutina.

La diosmina (DIO) junto con la hesperidina (HSP) se utilizan para tratar la insuficiencia venosa leve, aliviar el dolor, pesadez, hormigueo y picor en los pacientes que sufren de varices, también se receta para el alivio de las hemorroides (Kakkos, 2018). La combinación de estos dos flavonoides se vende bajo el nombre Daflón® que contiene 450 mg de DIO y 50 mg de HSP.

Existen estudios que han evaluado la utilidad de DIO y HSP para el tratamiento de padecimientos relacionados con la actividad proinflamatoria. Berkov (2019) utilizando macrófagos como células blanco, mostró que concentraciones especialmente altas de DIO disminuyeron la producción de mediadores proinflamatorios: óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), interleucinas 6 y 12, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) así como los niveles de ácido ribonucleico mensajero. Yeh y cols. (2007) reportaron que el tratamiento con HSP suprimió la expresión de TNF- $\alpha$ , interleucinas 1 y 6, macrófagos tipo 2 (MIP-2) la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1,) e interleucina 12 y mejoró la producción de

interleucina 4 e interleucina 10 en lavado de pulmón de ratones retados con lipopolisacáridos. Crespo y cols. (1999) al evaluar la actividad antiinflamatoria intestinal de HSP y DIO, en la etapa aguda del modelo de colitis de rata con ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS), informaron que el pretratamiento con DIO (10 mg / kg) o HSP (10 y 25 mg/kg) redujo el daño del colon, lo cual fue confirmado bioquímicamente por una reducción en la actividad mieloperoxidasa (MPO) en comparación con los animales no tratados.

Shalkami y cols. (2018) utilizando un modelo animal murino de colitis ulcerativa mediante la administración de ácido acético, reportaron que los marcadores de inflamación (TNF-  $\alpha$ , ciclo-oxigenasa 2 y MPO) y el estrés oxidante (MDA y GSH reducido) se elevaron significativamente en asociación con aumentos en la expresión de caspasa-3 de colon, y que el tratamiento con dos dosis de DIO produjo una disminución dependiente de la dosis en las puntuaciones del índice DAI (disease activity index) y del daño al colón. La administración de DIO resultó en una reducción significativa de los marcadores de estrés inflamatorio y oxidante, así como también redujo la expresión de caspasa-3. Los autores concluyen que la terapia DIO disminuyó el desarrollo de CU dependiendo de su capacidad para disminuir la inflamación, el estrés oxidante y la apoptosis en el colon de la rata.

En cuanto a la rutina (RUT) se ha reportado que es un flavonoide con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anti ulcerante. Gautam y cols. (2016) utilizando un modelo animal de toxicidad intestinal inducido por metrotexato (MTX) demostraron que RUT tiene efectos antiinflamatorios y antioxidantes. La administración de MTX aumentó los niveles basales de MDA, aumentó la oxidación proteica y disminuyó los niveles de superóxido dismutasa (SOD). Adicionalmente, los niveles de interleucinas proinflamatorias (IL-2) se vio aumentada en el grupo intoxicado con MTX, se reporta que en los grupos administrados con RUT estos niveles fueron restaurados.

También, Kwon y cols. (2005) estudiaron el efecto antiinflamatorio de RUT en un modelo animal de CU inducido por dextrano sulfato de sodio (DSS), se reporta que la producción de la interleucina proinflamatoria IL-1 $\beta$  se ve aumentada en el colon

de los grupos intoxicados con DSS, niveles que se ven significativamente disminuidos con una dieta de 0.1% de RUT, de igual manera esta dieta disminuyó el número de úlceras provocadas por la administración de DSS. Ellos concluyen que el efecto antiinflamatorio de RUT se debe a su poder para regular la producción de genes proinflamatorios (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *GM-CSF* y *iNOS*).

### ***Relación entre la inflamación intestinal y alteraciones en Sistema Nervioso Central***

En la actualidad existen numerosas investigaciones que destacan la relación entre el proceso inflamatorio en el sistema gastrointestinal y trastornos del Sistema Nervioso Central (SNC). Se ha descrito que en la situación de *disbiosis* (alteración de la composición de la microbiota intestinal) se produce el desarrollo de inflamaciones crónicas en el intestino, lo que conduce a una situación de intestino permeable e inflamación crónica sistemática en el huésped. Serra y cols. (2019) resaltan el papel de la *disbiosis* sobre el proceso inflamatorio intestinal crónico, y la relación entre este proceso y padecimientos del SNC, haciendo énfasis en que la comunicación entre el intestino y el cerebro vía el SNC y Sistema Nervioso Entérico, tienen un papel de suma importancia. De acuerdo con Fung (2020) alteraciones del SNC están acompañadas de complicaciones intestinales y los microorganismos que colonizan el tracto intestinal, juegan un papel relevante en la regulación del SNC y la conducta del hospedero, a través de su efecto sobre el sistema inmunológico. En este sentido, Dopkins (2018) propone que el mecanismo a través del cual la *disbiosis* contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas autoinmunes, puede estar en razón de que algunos metabolitos de los microbios, tienen la capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica y ejercer su efecto mediante la regulación del sistema inmune y la modulación de la respuesta proinflamatoria.

### ***Daño neurológico inducido por el ácido 3-nitropropionico***

El ácido 3-nitropropiónico (3-NPA; fig. 5) se trata de una neurotoxina que inhibe a la succinato deshidrogenasa, enzima esencial para la respiración mitocondrial. En ratas, el 3-NPA genera daño severo en el cerebro principalmente en el cuerpo

estriado del cerebelo y en la corteza cerebral, generando síntomas similares a los de la enfermedad de Huntington, por lo cual se ha utilizado para general modelos de esta enfermedad (Nony, 1999).

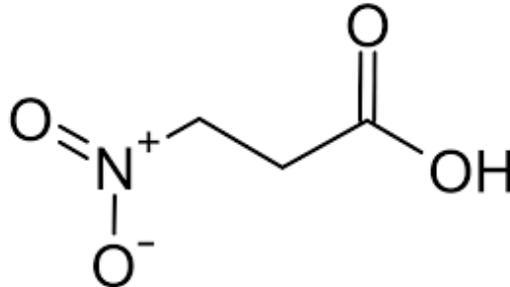


Figura 5. Estructura química del ácido 3-nitropropiónico

La enfermedad de Huntington es un padecimiento de tipo hereditario, es muy poco frecuente sin embargo es bastante agresivo, caracterizándose por el desgaste progresivo de las células nerviosas del cerebro lo que provoca déficit cognitivo y motriz (Cepeda, 2018). Resulta interesante utilizar este modelo de daño neurológico para investigar el efecto neuroprotector de los flavonoides.

#### ***Uso de flavonoides cítricos contra estrés oxidante e inflamación en cerebro***

De acuerdo con Elhelaly (2019), la administración de HSP y DIO indujo una disminución de la actividad de glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa en hígado, riñón y cerebro de animales tratados con Acrilamida, también previno la lipoperoxidación y favoreció la concentración y actividad de marcadores antioxidantes. Los autores concluyen que HSP y DIO tienen potentes efectos protectores contra el estrés oxidante, la peroxidación de lípidos y el daño del ADN inducido por la toxicidad de Acrilamida en ratas. Abdel-Shalam y cols. (2012) observaron que el tratamiento con Daflón® evitó el aumento del estrés oxidante y la inflamación en el cerebro y el hígado de rata, así como la disfunción hepática causada por la endotoxemia inducida por Acrilamida probablemente mediada por reducción de la expresión de la forma inducible de óxido nítrico sintetasa y la enzima caspasa-3 en el hígado. En tanto que en el estudio realizado por Muhammad y cols.

(2019), el tratamiento con LPS elevó la expresión de mediadores inflamatorios como el factor nuclear fosforilado- $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-1 $\beta$  y que el tratamiento con HSP redujo notablemente la expresión de citocinas inflamatorias y atenuó la generación inducida por LPS de especies reactivas de oxígeno / peroxidación de lípidos (ROS / LPO). Además, la HSP mejoró la integridad sináptica, la cognición y los procesos de memoria al mejorar la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc fosforilado (p-CREB), la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) y la syntaxina. En general, su estudio sugiere que la HSP confiere neuroprotección al regular la vía de señalización del receptor tipo Toll 4 (TLR4) / NF- $\kappa$ B contra los efectos perjudiciales del LPS. Por otra parte Welbat y cols. (2020) demostraron que el tratamiento con Metotrexato produce incremento de lipoperoxidación, disminución de los niveles de factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) y del factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2 (Nrf2), así como disminución de los niveles de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa en el grupo tratado con Metotrexato, y que el tratamiento con HSP mejoró los efectos negativos del MTX sobre el estrés oxidante y las enzimas antioxidantes, lo que sugiere que el HSP puede prevenir los efectos neurotóxicos al reducir el estrés oxidante.

También se ha estudiado el efecto neuroprotector de RUT. Arowoogun y cols. (2020) estudiaron el efecto de RUT en un modelo animal de daño cerebral inducido por sulfato de cobre (SC), se reporta que en el grupo tratado únicamente con SC los niveles de malonaldehído, óxido nítrico y mieloperoxidasa aumentaron, mientras que los niveles de SOD y la actividad de la catalasa se vio disminuida en el cerebro de las ratas, el grupo coadministrado con SC y RUT presentó una mejoría en todos los marcadores antes mencionados gracias a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Por otro lado, el grupo de investigación de Saafan (2023) demostraron que la D-galactosa induce daño oxidante en el cerebro de ratas y RUT presentó efectos antioxidantes ya que mejoró los niveles de marcadores antioxidantes como SOD-1, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa- $\alpha$ , también RUT disminuyó significativamente la acumulación de  $\beta$ -galactosidasa.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El uso terapéutico de los flavonoides a nivel mundial ha sido objeto de numerosos estudios que han encontrado resultados favorables, particularmente en algunas patologías en donde los procesos de inflamación y daño oxidante están involucrados. Entre estas enfermedades se encuentra la EII, una de las patologías con mayor incidencia en México y en el mundo; Yamamoto-Furusho y cols. (2009) analizaron la epidemiología de la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI) en México de 1987 a 2006, y reportaron que la media de casos nuevos se incrementó de 28.8 en el periodo de 1987 a 1996, a 76.1 en el segundo periodo de 1997 a 2006. En 2011 un total de 95,548 y un estimado de 1,2 millones de casos fueron notificados, en Europa y Estados Unidos respectivamente y de acuerdo con Silva (2014) la tasa de incidencia de CU puede variar de 0,5 a 31,5 por 100000 personas cada año, dependiendo de la población estudiada. La búsqueda de nuevas opciones nos ha llevado a considerar a la diosmina, hesperidina y rutina como candidatos terapéuticos para esta enfermedad. Adicionalmente, se ha visto que la CU infecciosa a través de la disbiosis puede provocar alteraciones del Sistema Nervioso Central (Dopkins, 2018) y se ha reportado que los flavonoides hesperidina, diosmina y rutina cuentan con propiedades neuroprotectoras cuando se administran por separado, se propone investigar su potencial terapéutico cuando se administran en conjunto.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antiinflamatorio, antioxidante y neuroprotector de los flavonoides cítricos Diosmina, Hesperidina y Rutina en colon, estómago y cerebro de ratas con Colitis Infecciosa inducida por *Salmonella typhimurium* ATCC14028 y daño neurológico inducido por el ácido 3-nitropropiónico.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Comprobar que la cepa de *Salmonella typhimurium* ATCC14028 que se utilizará para inducir la colitis infecciosa en los animales de experimentación, provoca inflamación en el tejido del colon y las repercusiones al SNC.

2. Medir el efecto antiinflamatorio de DIO, HSP y RUT por medio de la cuantificación de los niveles de interleucina IL-6 en sangre de ratas jóvenes con colitis infecciosa inducida con *Salmonella typhimurium* ATCC14028.
3. Medir el efecto antioxidante de DIO, HSP y RUT por medio de la cuantificación de los niveles de catalasa, GSH y lipoperoxidación de lípidos en cerebro, estómago y colón de ratas jóvenes con colitis infecciosa inducida con *Salmonella typhimurium* ATCC14028.
4. Medir las posibles alteraciones en los niveles de aminos biogénicas por efecto del daño cerebral.
5. Determinar los cambios histomorfológicos en cerebro, estómago y colón en ratas jóvenes con colitis infecciosa inducida con *Salmonella typhimurium* ATCC14028 y ácido 3-nitropropiónico.

## **Metodología**

### ***Lugar de trabajo***

Este trabajo se realizó en la torre de investigación del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

### ***Animales de Experimentación***

Este protocolo animal fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del INP con el número de registro 026/2022. Las ratas de experimentación se obtuvieron del bioterio certificado del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

Se utilizaron 30 ratas Wistar macho de 60 g de peso promedio, que se dividieron en 4 grupos con tratamientos diferentes:

- Grupo 1.- Control (NaCl 0.9%) +*Salmonella* (n=7)
- Grupo 2.- Flavonoides +*Salmonella* (n=7)
- Grupo 3.- *Salmonella*+3-NPA (n=8)
- Grupo 4.- Flavonoides+*Salmonella*+3-NPA (n=8)

Las ratas se mantuvieron en el bioterio de la torre de investigación del INP con agua y alimento *ad libitum* y ciclos de luz-oscuridad de 12 h todo el tiempo de experimentación. El manejo de los animales fue realizado con base la norma oficial mexicana de la secretaría de agricultura (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) publicada en 2001 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Antes de empezar con los tratamientos se les dio a las ratas un tiempo de estabilización de 2 semanas en las que tuvieron acceso a agua y alimento. Los tratamientos se realizaron de la siguiente forma: pasado el tiempo de estabilización a todas las ratas se les administró con una sonda gástrica 1 mL de inóculo de *S. typhimurium* que equivalía a  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC), esta misma concentración se volvió a administrar 7 días después a todos los grupos. Tanto al grupo 2 como al 4 se les administró cada 48 horas, por 15 días, 300 mg/kg de DIO, 33.3 mg/kg de HSP y 150 mg/kg de RUT. Al final de los 15 días del tratamiento con flavonoides a los grupos 3 y 4 se les administró ácido 3-nitropropionico (3-NPA) en una dosis de 24 mg/kg.

### ***Sembrado, aislamiento e identificación de S. typhimurium***

Se seleccionó una cepa de *S. typhimurium* no patógena para el ser humano del cepario del INP, la cepa seleccionada fue *Salmonella typhimurium* ATCC14028. Para el reacondicionamiento de la cepa se realizó un sembrado en medio líquido BHI (infusión cerebro corazón) y se incubó por 24 horas a 37 °C. Posteriormente para el aislamiento, una alícuota del medio líquido se resembró en medio sólido selectivo para *Salmonella* y *Shigella* y se incubó por 24 horas a 37 °C. Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación fueron Kligler, SIM y urea. Por último, se sembró en forma masiva una colonia aislada y correctamente identificada.

### ***Preparación del inóculo de S. typhimurium***

Se tomó con un hisopo la totalidad de las células del sembrado masivo y se diluyeron en una cantidad adecuada de agua destilada, una alícuota de esta dilución se leyó en espectrofotómetro a 450 nm, se diluyó la muestra hasta que la densidad

óptica fue igual a 0.175 lo que equivale a  $1 \times 10^8$  UFC/mL y se hizo una última dilución para obtener un inóculo con concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

### ***Obtención de muestras***

Una vez terminado el tiempo de tratamiento se realizó eutanasia a los 30 animales de experimentación por decapitación, previamente anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg). Se seleccionó al azar un animal de cada grupo para realizar perfusión y posterior análisis histológico.

Al momento de la eutanasia se obtuvo de 3 a 5 mL de la sangre de los animales por el método de cardiopunción. Dos gotas de la sangre fresca se utilizaron para medir triglicéridos y glucosa, utilizando tiras reactivas, y una muestra de la misma sangre se utilizó para medir hemoglobina. El resto de la sangre se depositó en tubos con EDTA y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C para obtener el plasma. El plasma se separó y se guardó en tubos Eppendorf y se congeló a -20 °C hasta que se utilizó para cuantificar interleucina-6 (IL-6).

También se extrajo el cerebro, estómago e intestino de los animales, se pesaron y en el caso del cerebro se dividió en 3 partes: corteza, cuerpo estriado y cerebelo. Todos los tejidos se dejaron sumergidos en solución salina isotónica para su conservación a -20°C. Para la medición del estrés oxidante se prepararon homogenados de los tejidos, por separado, en 3 mL de Tris-HCl 0.05 M pH 7.4.

En el caso de los animales seleccionados para ser perfundidos se les hizo pasar por vía intracardiaca solución salina isotónica y posteriormente paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Una vez terminada la perfusión se les extrajo el cerebro, estómago e intestino, los tejidos se dejaron sumergidos en paraformaldehído hasta su procesamiento.

### ***Cuantificación de hemoglobina***

Se prepararon 200 mL de una solución que contenía 10 mg de cianuro de potasio (KCN), 40 mg de ferricianuro de potasio ( $K_3Fe(CN)_6$ ) y 200 mg de bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ). De esta solución se tomaron 2.5 mL y se mezclaron con 20  $\mu$ L de sangre fresca, se dejaron reposar por 20 min y se leyeron en un espectrofotómetro

a 540 nm, los valores de densidad óptica obtenidos se multiplicaron por el factor de conversión (37.4) y se obtuvieron valores en g/dL.

### ***Medición de marcadores antiinflamatorios (IL-6)***

Se empleó un kit comercial de tipo ELISA de la marca OriGene. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para obtener las mediciones se leyó la placa en un lector de placas a 450 nm y se infirieron los valores en una curva estándar previamente estandarizada con valores de pg/mL.

### ***Determinación del estrés oxidante***

#### ***❖ Catalasa***

Se empleó un kit comercial de tipo ELISA de la marca Cayman Chemical. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para obtener las mediciones se leyó la placa en un lector de placas a 540 nm y se infirieron los valores en una curva estándar previamente estandarizada con valores de  $\mu\text{M/g}$  tejido.

#### ***❖ Lipoperoxidación (TBARS)***

Se utilizó el homogenado con los tejidos en solución buffer de Tris-HCl 0.05 M. Se prepararon 250 mL de una solución que contenía 1.25 g de ácido tiobarbitúrico (TBA), 40 g de ácido tricloroacético (TCA) y 6.25 mL de ácido clorhídrico concentrado, de esta solución se tomaron 1.5 mL y se colocaron en tubos de ensayo, posteriormente se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de los homogenados a temperatura ambiente a los tubos y se incubaron por 30 min en ebullición. Una vez transcurrido el tiempo se dejaron enfriar los tubos a 4°C por una noche para que todas las proteínas precipitaran. Para obtener los valores se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro a 532 nm y se infirieron los valores en una curva estándar previamente estandarizada con valores de  $\mu\text{M}$  Malondialdehído/g tejido.

#### ***❖ Glutación***

Para esta medición y todas las siguientes de este apartado se utilizaron homogenados libre de proteína, por lo cual se les agrego a los homogenados ácido

perclórico 0.1 M, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min y únicamente se trabajó con el sobrenadante

Se preparó el reactivo OPT que contiene 100 mg de orto-ftaldialdehido (OPT) disueltos en 10 ml de metanol. Se prepararon 100 mL de buffer de fosfatos pH 8.0 y se mezclaron con 100 mL de EDTA disódico, se tomó de esta preparación 1.88 mL y se mezclaron con 20  $\mu$ L de los homogenados de cerebro e intestino. Después se agregaron 100  $\mu$ L de reactivo OPT y se incubó por 15 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se leyó en espectrofluorómetro a longitud de excitación 350 nm y de emisión 420 nm. Los valores se infirieron en una curva estándar previamente estandarizada con valores de nM/g tejido

### ***Determinación de niveles de GABA***

Se utilizaron 200  $\mu$ L de mercaptoetanol y 400 mL de buffer de ácido bórico 0.02 M pH 9.5 y se mezclaron con 10  $\mu$ L de los homogenados de cerebro libres de proteína. Posteriormente se leyeron las muestras en un espectrofluorómetro a 340 nm excitación y 440 nm emisión. Los valores se infirieron en una curva estándar previamente estandarizada con valores de nM/g tejido.

### ***Medición de ATPasa total***

Se preparó un medio de incubación con los siguientes reactivos: 100  $\mu$ L de buffer Tris-HCl 0.25 M pH 7.4, 50  $\mu$ L de cloruro de magnesio 30 mM, 100  $\mu$ L de cloruro de potasio 35 mM, 100  $\mu$ L de cloruro de sodio 500 mM y 100  $\mu$ L de ATP 24 mM. Para cada reacción se utilizaron 500  $\mu$ L del medio de incubación y 1 mg de tejido, los cuales se depositaron en tubos de ensayo y se dejaron incubar por 30 min a 37°C, una vez terminado el tiempo se detuvo la reacción con TCA al 10%, se dejó sedimentar la proteína y se separó el sobrenadante.

Para medir la concentración de fósforo inorgánico generado se preparó una solución 0.25 M de ácido sulfúrico 98%, una solución de molibdato de amonio al 5% y una solución reductora que contiene 0.5 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, 195 mL de bisulfito de sodio anhidro al 15% y 5 mL de sulfito de sodio anhidro al 20%. Para cada tubo se utilizaron 4.1 mL de la solución de ácido sulfúrico, 0.2 mL de la solución

de molibdato de amonio, 0.2 mL de la solución reductora y 0.5 mL del medio de incubación libre de proteínas, esta mezcla se dejó incubar a 37°C por 30 min. La reacción generó un color azul que se leyó en un espectrofotómetro a 660 nm. Los valores se infirieron en una curva estándar previamente estandarizada con valores de mg de fosforo. La actividad de la enzima se reportó en valores de nM Pi/g tejido/min.

### ***Medición de Dopamina***

Se prepararon 250 ml de un buffer con las siguientes concentraciones finales: ácido cítrico 0.03 M, ácido ascórbico 0.001 M, ácido octanosulfónico 0.003 M y fosfato diácido de potasio 0.035 M. De este buffer se tomaron 1.4 mL, por muestra, y se mezclaron con 200 µL del homogenado libre de proteína. Las lecturas se realizaron en espectrofluorómetro con longitud de excitación de 282 nm y longitud de emisión de 315 nm. Los valores se infirieron en una curva estándar previamente estandarizada con valores de nM/g tejido.

### ***Medición de Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)***

Se prepararon 200 mL de buffer de acetato de sodio 10 mM con pH 5.5. Por muestra se utilizaron 1.4 mL del buffer de acetatos y 200 µL de homogenado libre de proteínas. Las lecturas se realizaron en espectrofluorómetro con longitud de excitación de 296 nm y longitud de emisión de 333 nm. Los valores se infirieron en una curva estándar previamente estandarizada con valores de mM/g tejido.

Todas las mediciones previamente descritas fueron realizadas por triplicado.

### ***Análisis estadístico***

Para la estadística de inferencia se realizó una comparación de grupos por medio de una ANOVA de una vía, se comprobó la homogeneidad de varianzas y como prueba pos-hoc se utilizó Tuckey cuando existía una distribución normal y cuando no se cumplió se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $p < 0.05$ .

### ***Evaluación histomorfológica***

Los tejidos preservados en paraformaldehído se descongelaron, lavaron con agua corriente para eliminar el paraformaldehído, se deshidrataron con soluciones de alcohol a distintos porcentajes de concentración y se aclararon con xileno con la finalidad de embeberlos en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5  $\mu$ m de grosor en microtomo, dichos cortes se montaron en cubreobjetos usando baño de gelatina y por último se les realizó una tinción con Hematoxilina-Eosina.

### ❖ **Tinción con Hematoxilina-Eosina**

#### ***Preparación de hematoxilina***

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 730 mL de agua destilada y se mantuvieron en agitación, posteriormente se agregaron 250 mL de etilenglicol y se solubilizaron por 5 min, después se añadieron 2 g de hematoxilina anhidra y se disolvió por 5 min, al término de este paso se agregaron 0.2 g de yodato de sodio y se agitó por 5 min, se agregaron 17.6 g de sulfato de aluminio y se dejó agitando por 40 min, por último se agregaron 2 mL de ácido acético glacial y se dejó agitando la solución por 10 min más. La solución resultante se filtró y se almacenó en un frasco ámbar.

#### ***Preparación de Eosina***

Se preparó una solución al 1% de floxina y otra al 1% de eosina, de la primera se tomaron 5 mL y de la segunda 50 mL y se mezclaron, después se agregaron 2 mL de ácido acético glacial y por último se le agregaron a la solución 390 mL de etanol al 96%.

#### ***Proceso de tinción***

Los cortes colocados en portaobjetos se sumergieron en distintas soluciones. En primer lugar se sumergieron en xileno por 2 horas para desparafinar los cortes, después se hidrataron los tejidos con una serie de soluciones de alcohol a distintos porcentajes de concentración (alcohol-xilol por 15 min, alcohol absoluto por 30 min y alcohol al 96% por 30 min), enseguida se sumergieron en Hematoxilina por 10 min y se enjuagaron con agua corriente para quitar el exceso del colorante, posteriormente se realizaron 20 inmersiones en un recipiente con Eosina y se deshidrataron los tejidos con las misma serie de alcoholes pero en sentido opuesto

(5 inmersiones por cada concentración de alcohol), por último se aclaró con xileno, en esta solución se mantuvieron los cortes por mínimo 10 minutos y hasta que se les colocó el cubreobjetos. Una vez colocado el cubreobjetos se dejan secar las laminillas por un día.

❖ ***Análisis histológico***

Las laminillas se observaron con ayuda de un microscopio de estereología y se tomaron fotos a 10, 20 y 40x. Se evaluaron parámetros como tamaño celular, coloración, integridad de las células y daño estructural. Con el programa PowerPoint 2016 se colocaron flechas indicando los daños.

## RESULTADOS

### ***Determinación de IL-6, triglicéridos, glucosa y hemoglobina***

En la tabla 1 se muestran los niveles en sangre de Interleucina-6 (IL-6), triglicéridos, glucosa y hemoglobina de las ratas tratadas con Flavonoides+*Salmonella*+3-NPA, se observa que el tratamiento generó un descenso en los niveles de IL-6 en comparación con el grupo control ( $p=0.009$ ).

Tabla 1. Cuantificación de interleucina 6, triglicéridos, glucosa y hemoglobina en sangre de rata

Tratamiento	Interleucina-6 (pg/mL)	Triglicéridos (g/dL)	Glucosa (g/dL)	Hemoglobina (g/dL)
<b>Ctrl+<i>Salmonella</i></b>	563.139±50.717	108.167±9.663	171.667±6.947	25.304±1.703
<b>Flavonoides+<i>Salmonella</i></b>	525.778±59.428	101.667±8.140	193.667±42.302	24.298±3.611
<b><i>Salmonella</i>+3-NPA</b>	515.560±72.795	102.143±10.699	173.143±35.536	21.127±5.050
<b>Flavonoides+<i>Salmonella</i>+3-NPA</b>	439.131±78.893**	112.857±17.677	156.286±16.810	25.265±3.566

\*\*Interleucina-6: Flavonoides+*Salmonella*+3-NPA vs Ctrl+*Salmonella*  $p=0.009$ .

Triglicéridos, Glucosa y Hemoglobina  $p=$  no significativo (N.S.)

### ***Determinación del estrés oxidante***

#### **❖ Catalasa**

Los niveles de catalasa en cerebro, estómago e intestino de rata se muestran en la tabla 2. Los resultados muestran que los niveles de actividad de la catalasa disminuyen significativamente en la corteza de las ratas tratadas tanto con Flavonoides+*Salmonella* como en las tratadas con Flavonoides+*Salmonella*+3-NPA ( $p=0.009$ ). En el caso del cerebelo también hay menor actividad en las ratas Ctrl+*Salmonella* y en las tratadas con Flavonoides+*Salmonella* ( $p=0.002$ ).

Tabla 2. Determinación de actividad de la enzima catalasa en cerebro, intestino y estómago de rata

Tratamiento	Catalasa ( $\mu\text{M/g}$ tejido)				
	Corteza	Cuerpo Estriado	Cerebelo	Intestino	Estómago
<b>Ctrl+Salmonella</b>	0.071 $\pm$ 0.008	0.052 $\pm$ 0.005	0.063 $\pm$ 0.015**	133.771 $\pm$ 61.516	15.398 $\pm$ 5.487
<b>Flavonoides+Salmonella</b>	0.042 $\pm$ 0.011**	0.050 $\pm$ 0.003	0.067 $\pm$ 0.010**	125.192 $\pm$ 42.251	14.011 $\pm$ 7.894
<b>Salmonella+3-NPA</b>	0.050 $\pm$ 0.029	0.056 $\pm$ 0.007	0.074 $\pm$ 0.013	146.152 $\pm$ 45.656	10.890 $\pm$ 5.979
<b>Flavonoides+Salmonella+3-NPA</b>	0.038 $\pm$ 0.004**	0.049 $\pm$ 0.008	0.090 $\pm$ 0.007	197.394 $\pm$ 86.154	16.853 $\pm$ 7.219

\*\*Corteza: Flavonoides+Salmonella y Flavonoides+Salmonella+3-NPA vs Ctrl+Salmonella p=0.009.

\*\*Cerebelo: Ctrl+Salmonella y Flavonoides+Salmonella vs Flavonoides+Salmonella+3-NPA p=0.002.  
Cuerpo Estriado, Intestino y Estómago p=N.S.

### ❖ Lipoperoxidación

Los niveles de peroxidación de lípidos se muestran en la tabla 3, donde se observa que el tratamiento con Flavonoides+Salmonella+3-NPA disminuyó la lipoperoxidación en cerebelo en comparación con el grupo control (p=0.043).

Tabla 3. Determinación de lipoperoxidación en cerebro, intestino y estómago de rata

Tratamiento	TBARS ( $\mu\text{M}$ Malondialdehido/g tejido)				
	Corteza	Cuerpo Estriado	Cerebelo	Intestino	Estómago
<b>Ctrl+Salmonella</b>	0.313 $\pm$ 0.032	0.504 $\pm$ 0.078	0.426 $\pm$ 0.046	0.259 $\pm$ 0.127	0.296 $\pm$ 0.087
<b>Flavonoides+Salmonella</b>	0.326 $\pm$ 0.024	0.469 $\pm$ 0.089	0.388 $\pm$ 0.101	0.279 $\pm$ 0.079	0.253 $\pm$ 0.159
<b>Salmonella+3-NPA</b>	0.348 $\pm$ 0.047	0.466 $\pm$ 0.057	0.402 $\pm$ 0.082	0.207 $\pm$ 0.052	0.177 $\pm$ 0.053
<b>Flavonoides+Salmonella+3-NPA</b>	0.311 $\pm$ 0.036	0.452 $\pm$ 0.143	0.327 $\pm$ 0.044*	0.299 $\pm$ 0.056	0.218 $\pm$ 0.068

\*Cerebelo: Flavonoides+Salmonella+3-NPA vs Ctrl+Salmonella p=0.043.

Corteza, Cuerpo Estriado, Intestino y Estómago p=N.S.

## ❖ **Glutación**

Los resultados de la tabla 4 muestran que los distintos tratamientos no modificaron los niveles de glutación de cerebro ni de intestino.

Tabla 4. Cuantificación de glutación en cerebro e intestino de rata

Tratamiento	GSH (nM/g tejido)			
	Corteza	Cuerpo Estriado	Cerebelo	Intestino
<b>Ctrl+Salmonella</b>	3.257±0.508	4.518±0.564	3.327±0.307	6.140±3.230
<b>Flavonoides+Salmonella</b>	2.732±0.500	4.285±0.588	2.999±0.332	5.171±1.108
<b>Salmonella+3-NPA</b>	2.825±0.257	4.158±0.412	3.054±0.433	4.931±1.064
<b>Flavonoides+Salmonella+3-NPA</b>	2.953±0.435	3.984±0.438	3.068±0.490	4.787±0.939

Corteza, Cuerpo Estriado, Cerebelo e Intestino p=N.S

## **Cuantificación de GABA**

Los niveles de GABA (tabla 5) disminuyeron significativamente en el cerebelo de ratas tratadas con Flavonoides+Salmonella+3-NPA en comparación con los demás grupos (p<0.001).

Tabla 5. Cuantificación de GABA en cerebro de rata

Tratamiento	GABA (nM/g tejido)		
	Corteza	Cuerpo Estriado	Cerebelo
<b>Ctrl+Salmonella</b>	1.549±0.420	3.394±0.716	5.173±0.595**
<b>Flavonoides+Salmonella</b>	1.921±0.340	1.901±0.912	5.039±0.838**
<b>Salmonella+3-NPA</b>	2.103±0.879	2.777±1.034	5.095±0.533**
<b>Flavonoides+Salmonella+3-NPA</b>	1.718±0.396	3.665±1.662	2.778±1.240

\*\*Cerebelo: Ctrl+Salmonella, Flavonoides+Salmonella y Salmonella+3-NPA vs Flavonoides+Salmonella+3-NPA p<0.001.

Corteza y Cuerpo Estriado p=N.S.

### **Determinación de la actividad de ATPasa total**

La tabla 6 nos muestra la actividad de la enzima ATPasa. Los datos muestran un aumento en la actividad de ATPasa en cerebelo de ratas tratadas con *Salmonella*+3-NPA y con Flavonoides+*Salmonella*+3-NPA comparado contra el grupo control (p=0.013).

Tabla 6. Determinación de la actividad de la enzima ATPasa en cerebro, intestino y estómago de rata

Tratamiento	ATPasa (nM Pi/g tejido/min)				
	Corteza	Cuerpo Estriado	Cerebelo	Intestino	Estómago
<b>Ctrl+<i>Salmonella</i></b>	63.309±26.921	131.887±20.278	66.688±12.325	271.035±66.254	35.989±14.916
<b>Flavonoides+<i>Salmonella</i></b>	63.144±14.735	134.159±19.906	86.771±49.468	276.400±98.270	34.663±11.063
<b><i>Salmonella</i>+3-NPA</b>	63.039±14.984	114.748±39.755	130.026±52.348*	289.010±65.284	32.681±12.034
<b>Flavonoides+<i>Salmonella</i>+3-NPA</b>	74.706±8.851	133.004±38.464	124.032±50.559*	291.938±104.292	43.046±16.662

\*Cerebelo: *Salmonella*+3-NPA and Flavonoides+*Salmonella*+3-NPA vs Ctrl+*Salmonella* p=0.013.

Corteza, Cuerpo Estriado, Intestino y Estómago p=N.S.

### **Determinación de niveles de dopamina**

Los resultados de tabla 7 muestran los niveles de dopamina en cerebro. Los datos sugieren que en las ratas tratadas con *Salmonella*+3-NPA los niveles de dopamina disminuyeron en comparación con los niveles del grupo control (p=0.012).

Tabla 7. Cuantificación de dopamina en cerebro de rata

Tratamiento	Dopamina (nM/g tejido)		
	Corteza	Cuerpo Estriado	Cerebelo
<b>Ctrl+<i>Salmonella</i></b>	28.929±4.077	38.606±4.501	48.793±4.571
<b>Flavonoides+<i>Salmonella</i></b>	25.606±6.871	38.201±6.012	46.281±4.655
<b><i>Salmonella</i>+3-NPA</b>	21.742±3.210*	36.296±4.053	44.951±5.069
<b>Flavonoides+<i>Salmonella</i>+3-NPA</b>	26.742±3.292	39.042±11.633	44.376±4.979

Corteza: *Salmonella*+3-NPA vs Ctrl+*Salmonella* \*p = 0.012.

Cuerpo Estriado y Cerebelo p=N.S.

### ***Determinación de niveles de ácido hidroxindolacético***

Los niveles de 5-HIAA en cerebro de rata mostrados en la tabla 8 no se vieron modificados por ninguno de los tratamientos en ninguna de las regiones estudiadas.

Tabla 8. Cuantificación de ácido hidroxindolacético en cerebro de rata

<b>Tratamiento</b>	<b>5-HIAA (mM/g tejido)</b>		
	<b>Corteza</b>	<b>Cuerpo Estriado</b>	<b>Cerebelo</b>
<b>Ctrl+<i>Salmonella</i></b>	1.356±0.299	1.816±0.380	1.759±0.223
<b>Flavonoides+<i>Salmonella</i></b>	1.299±0.099	1.738±0.232	1.875±0.134
<b><i>Salmonella</i>+3-NPA</b>	1.099±0.142	1.819±0.312	1.854±0.228
<b>Flavonoides+<i>Salmonella</i>+3-NPA</b>	1.264±0.200	1.909±0.144	1.869±0.199

Corteza, Cuerpo Estriado y Cerebelo p=N.S.

### ***Análisis histomorfológico***

En esta sección se muestran las microfotografías obtenidas (fig. 6-10), separadas por región. Para comparar más fácilmente se colocaron en cada figura 4 imágenes, cada una correspondiendo a un grupo de experimentación, diferenciadas por un número romano. Las imágenes con el número **I** corresponden al grupo *Ctrl+Salmonella*; las que tienen el número **II** corresponden al grupo *Flavonoides+Salmonella*; las que tienen el número **III** corresponden al grupo *Salmonella+3-NPA* y finalmente las que tienen el número **IV** corresponden al grupo *Flavonoides+Salmonella+3-NPA*. Se utilizó una escala cualitativa de 3 niveles (ligero, moderado y severo) para definir el nivel de daño.

## Corteza

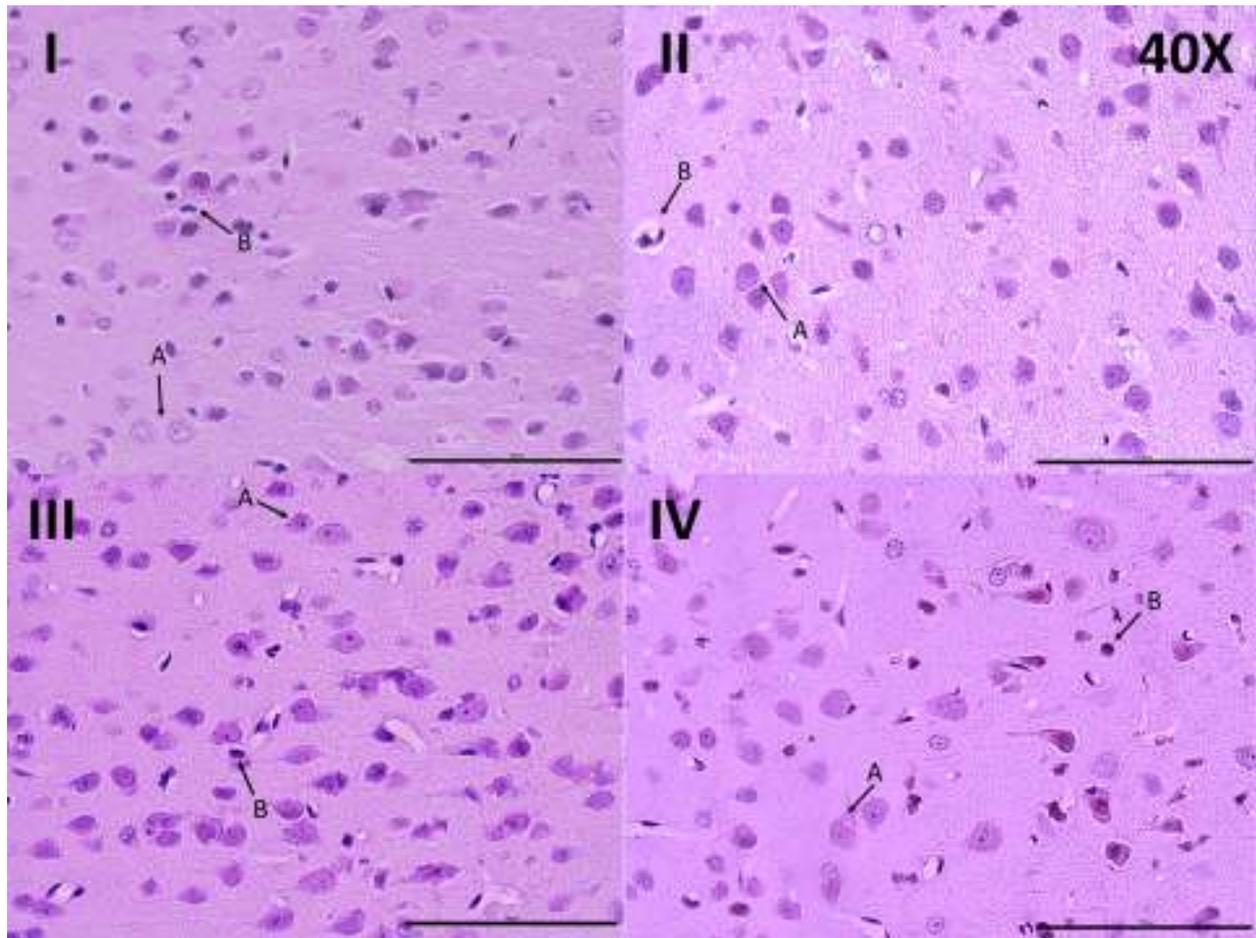


Figura 6. En las microfotografías (aumento 40X) se presentan las imágenes de la corteza cerebral de ratas expuestas a *Salmonella typhimurium* o *Salmonella typhimurium*+3-NPA y tratadas con flavonoides (únicamente grupos II y IV). En las flechas **A**, se muestran células con una citoarquitectura normal, donde se aprecia perfectamente el núcleo, el nucléolo y cromatina fina. Mientras que en las flechas **B** se muestran células anormales, picnóticas, reducidas en tamaño, acidófilas y fusiformes y otras en proceso de degeneración que presentan cromatina condensada, alternada con células normales conservadas. El daño observado en cada micrografía es: **I** daño severo; **II** daño ligero; **III** daño moderado y **IV** daño moderado.

## Cuerpo Estriado

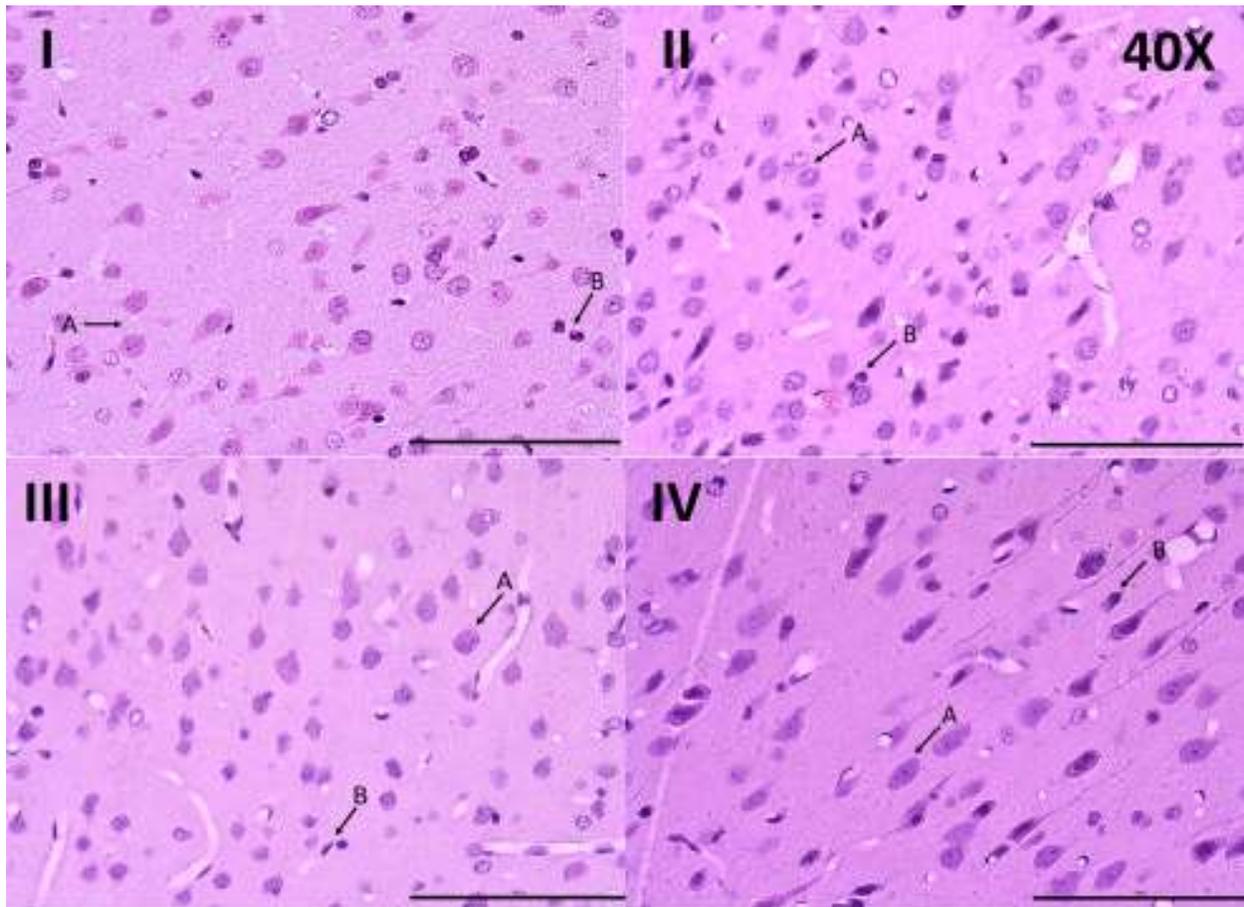


Figura 7. En las microfotografías (aumento 40X) de cuerpo estriado expuestas a *Salmonella typhimurium* o *Salmonella typhimurium*+3-NPA y tratadas con flavonoides (únicamente grupos II y IV) se encontraron alteraciones muy similares a las de la corteza. En las flechas **A**, se muestran células con una citoarquitectura normal, donde se aprecia perfectamente el núcleo, el nucléolo y cromatina fina. Mientras que en las flechas **B** se muestran células anormales, picnóticas, reducidas en tamaño, acidófilas y fusiformes y otras en proceso de degeneración que presentan cromatina condensada, alternada con células normales conservadas. El daño observado en cada micrografía es: **I** daño severo; **II** daño moderado; **III** daño ligero y **IV** daño severo.

## Cerebelo

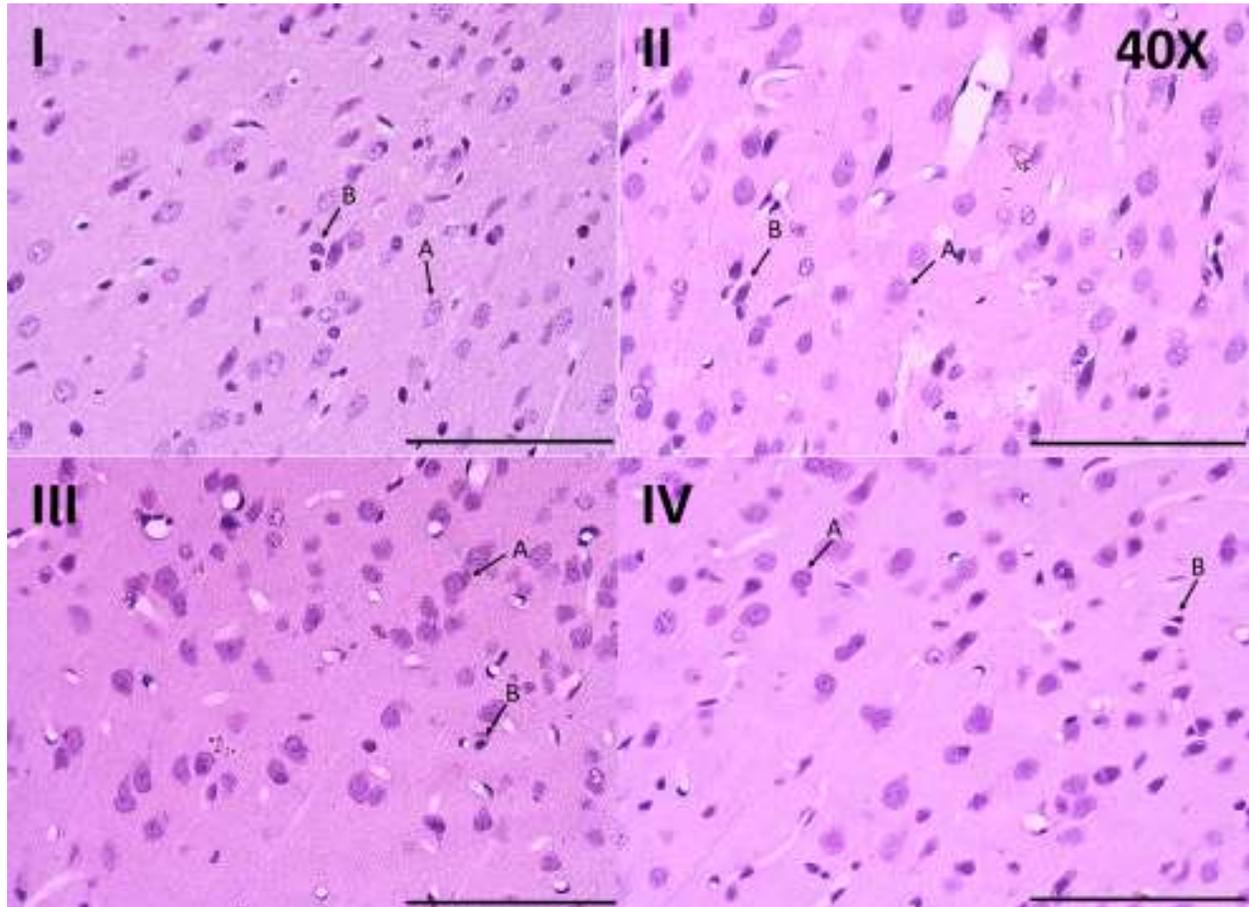


Figura 8. En las microfotografías (aumento 40X) de cerebelo de ratas expuestas a *Salmonella typhimurium* o *Salmonella typhimurium*+3-NPA y tratadas con flavonoides (únicamente grupos II y IV) se encontraron las mismas alteraciones que en corteza y hemisferios; en las flechas **A**, se muestran células con una citoarquitectura normal, donde se aprecia perfectamente el núcleo, el nucléolo y cromatina fina. Mientras que en las flechas **B** se muestran células anormales, picnóticas, reducidas en tamaño, acidófilas y fusiformes y otras en proceso de degeneración que presentan cromatina condensada, alternada con células normales conservadas. El daño observado en cada micrografía es: **I** daño severo; **II** daño moderado; **III** daño ligero y **IV** daño moderado.

## Intestino

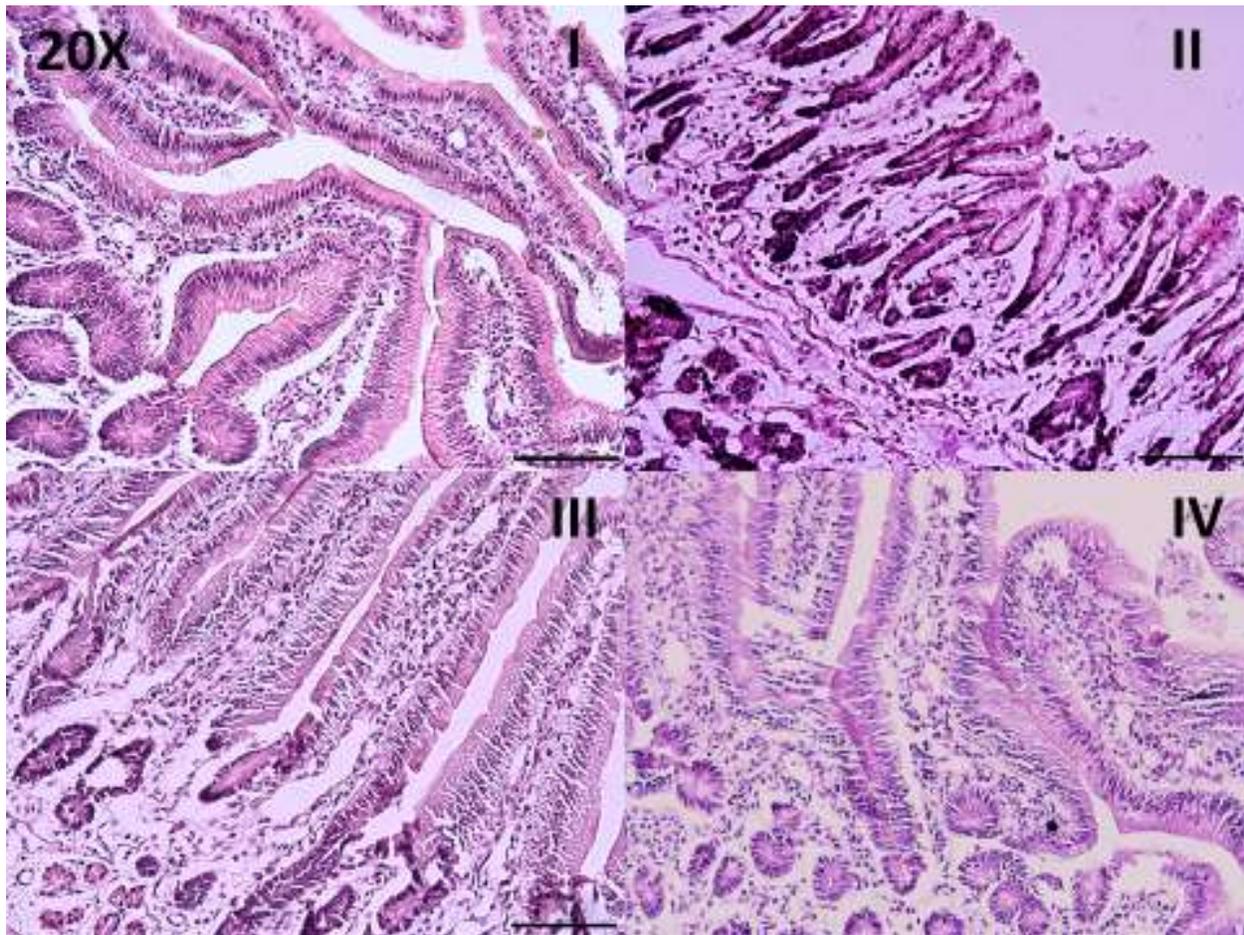


Figura 9. En ninguna de las microfotografías (aumento 20X) de intestino de ratas expuestas a *Salmonella typhimurium* o *Salmonella typhimurium*+3-NPA y tratadas con flavonoides (únicamente grupos II y IV) se encontraron alteraciones estructurales. Las tres capas: muscular, mucosa y submucosa conservan una citoarquitectura normal y sana.

## Estómago

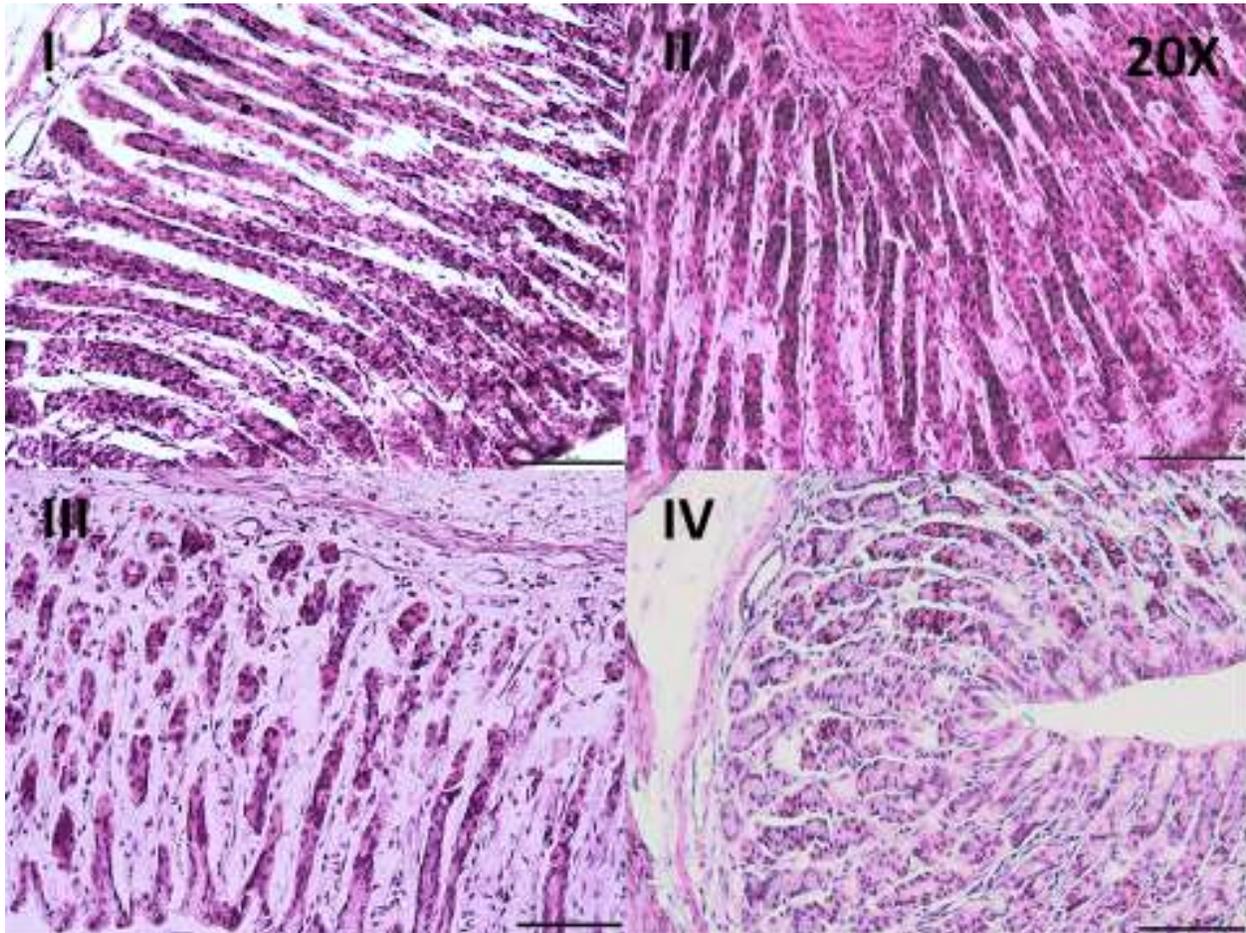


Figura 10. En las microfotografías (aumento 20X) de estómago de ratas expuestas a *Salmonella typhimurium* o *Salmonella typhimurium*+3-NPA y tratadas con flavonoides (únicamente grupos II y IV) no se encontraron alteraciones estructurales en ninguna de sus capas. Las capas muscular, mucosa y submucosa conservan una citoarquitectura normal y sana.

## Discusión

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad idiopática que provoca inflamación crónica de la mucosa del colon, esta enfermedad suele empezar en el recto y se extiende por todo el colon, provocando a nivel histológico deformación de la citoarquitectura de las criptas del colon, además de presentarse abscesos y úlceras (Ordás, 2012). En la figura 9 se puede observar que no hubo alteración en la arquitectura de las criptas, las vellosidades se observan sanas, sin deformaciones ni daños, esto puede ser un indicio de que la administración de  $1 \times 10^6$  UFC de *S. typhimurium* ATCC14028 no provocó CU en las ratas. Silva-Oliveira y col. (2021) indujeron exitosamente CU a ratas Wistar administrando un inóculo de  $1 \times 10^8$  UFC de *S. typhimurium* ATCC14028, en el análisis histomorfológico encontraron inflamación y daño moderado. El fracaso en provocar CU podría explicar porque el grupo Ctrl+*Salmonella* y el grupo Flavonoides+*Salmonella* no presentaron diferencias significativas en ninguno de los marcadores evaluados en este estudio.

Por otro lado, en los grupos tratados con 3-NPA se observó estrés oxidante y daño cerebral mayor al de los grupos solo tratados con *Salmonella*. En este caso la combinación de flavonoides que estudiamos si presentó moderado efecto antiinflamatorio y antioxidante, aunque no neuroprotector.

El proceso de inflamación es mediado por la activación de interleucinas proinflamatorias como la IL-6, se observó que el grupo tratado con flavonoides+*Salmonella*+3-NPA presentó niveles más bajos de esta interleucina en comparación con el grupo tratado con *Salmonella* y 3-NPA, lo que indica un efecto antiinflamatorio por parte de los flavonoides, estos resultados coinciden con los encontrados por Berkos (2019) quien reporta que DIO tiene efectos antiinflamatorios ya que logró suprimir diversos mediadores proinflamatorios entre ellos la interleucina 6 y 12.

El estrés oxidante se refiere a un estado donde en el cuerpo humano hay una cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que la defensa antioxidante del sistema no puede controlar, desencadenando daño celular y de tejidos. En la

investigación presente se encontró que la administración de flavonoides cítricos ayudó a mitigar el daño oxidante provocado por la infección de *Salmonella typhimurium*. La actividad de la enzima catalasa disminuyó en la corteza cerebral de las ratas tratadas con flavonoides, también la actividad de catalasa fue menor en el cerebelo de las ratas que no fueron administradas con 3-NPA, esto concuerda con lo reportado por Mascaraque (2014) quien reporta que RUT tuvo un efecto protector contra ROS. Por otro lado, la lipoperoxidación en cerebelo del grupo Flavonoides+*Salmonella*+3-NPA fue significativamente menor que el del grupo control como consecuencia de que las especies reactivas de oxígeno son el evento principal en la toxicidad con 3-NPA (Mandavilli, 2005).

El aumento en la actividad de ATPasa en cerebelo en los grupos administrados con 3-NPA se puede deber a un cambio en la afinidad de la enzima (Hoskins,1985) o puede tener relación con lo que reportan Naziroğlu y col. (2008) que sugieren que la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa aumenta en modelos de toxicidad cerebral.

En la región de la corteza se observaron niveles más bajos de dopamina en las ratas tratadas con *Salmonella*+3-NPA contra el grupo control y que estos niveles se recuperan en el grupo tratado con flavonoides. Existe evidencia de que el metabolismo de la dopamina por la enzima monoamina oxidasa puede contribuir a daño en la región del cuerpo estriado en modelos animales de Huntington (Smith, 2005).

En el análisis histomorfológico se encontró que los grupos tratados con flavonoides+*Salmonella* tuvieron un daño menor a los tratados únicamente con *Salmonella* en corteza, cuerpo estriado y cerebelo. Por otra parte, en los grupos tratados con flavonoides+*Salmonella*+3-NPA no se observó mejoría en ninguna región cerebral.

Se recomienda seguir explorando el poder antioxidante y antiinflamatorio de los flavonoides cítricos, en especial RUT sobre distintos modelos de infección bacteria, inflamación sistémica y neurotoxicidad.

## **Conclusiones**

La combinación de los flavonoides cítricos diosmina, hesperidina y rutina tuvo un moderado poder antioxidante y antiinflamatorio ante el estrés oxidante e inflamación sistémica provocada por la infección de *S. typhimurium*, sin embargo, no se observó efecto neuroprotector ante la administración de 3-NPA.

## **Bibliografía**

Abdel-Salam, O. M., Youness, E. R., Mohammed, N. A., Abd-Elmoniem, M., Omara, E., Sleem, A. A. (2012). Neuroprotective and hepatoprotective effects of micronized purified flavonoid fraction (Daflon®) in lipopolysaccharide-treated rats. *Drug Discov Ther.* 6(6):306-14.

Apolônio, A. C. & Alves, M. S. (2021). *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) inhibits inflammatory and oxidative stress mediators in *Salmonella* sp. mouse infection. *J Pharm Pharmacol.* 73(1):82-92.

Arowoogun, J., Akanni, O. O., Adefisan, A. O., Owumi, S. E., Tijani, A. S., Adaramoye, O. A. (2020). Rutin ameliorates copper sulfate induced brain damage via antioxidative and antiinflammatory activities in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.*

Berkoz, M. (2019). Diosmin suppresses the proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages via NF- $\kappa$ B and MAPKs signal pathways. *Gen Physiol Biophys.* 38(4), 315-324.

Burda, S. & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774–2779.

Calderón-Guzmán, D., Ortiz-Herrera, M., Osnaya-Brizuela, N., Barragán-Mejía, G., Hernández-García, E., Juárez-Olguín, H., Valenzuela-Peraza, P., Labra-Ruíz, N., Santamaría Del Angel, D. (2017). Assessment of Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Extracts on Dopamine and Selected Biomarkers of Oxidative Stress in Stomach and Brain of *Salmonella typhimurium* Infected rats. *Pharmacogn Mag.* 13(50):203-2.

- Cepeda, C. & Tong, X. P. (2018). Huntington's disease: From basic science to therapeutics. *CNS neuroscience & therapeutics*, 24(4), 247–249.
- Crespo, M. E., Gálvez, J., Cruz, T., Ocete, M. A., Zarzuelo, A. (1999). Anti-Inflammatory Activity of Diosmin and Hesperidin in Rat Colitis Induced by TNBS. *Planta Med.* 65(7), 651-653.
- Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agent.* 26, 343–356.
- Dastidar, S. G., Manna, A., Kumar, K. A. (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *Int J Antimicrob Agents.* 23, 99–102.
- Dopkins, N., Nagarkatti, P. S., Nagarkatti, M. (2018). The role of gut microbiome and associated metabolome in the regulation of neuroinflammation in multiple sclerosis and its implications in attenuating chronic inflammation in other inflammatory and autoimmune disorders. *Immunology.* 154(2):178-185.
- Elhelaly, A. E., Al-Basher, G., Alfarraj, S., Almeer, R., Bahbah, E. I., Fouda, M. M. A., Bungău, S. G., Aleya, L., Abdel-Daim, M. M. (2019). Protective effects of hesperidin and diosmin against acrylamide-induced liver, kidney, and brain oxidative damage in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 26(34):35151-35162.
- Farzaei, M. H., Abdollahi, M., Rahimi, R. (2015). Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. *World J Gastroenterol.* 21(21), 6499-6517.
- Fung, T. C. (2020). The microbiota-immune axis as a central mediator of gut-brain communication. *Neurobiol Dis.* 136:104714
- Gautam, R., Singh, M., Gautam, S., Rawat, J. K., Saraf, S. A., Kaithwas, G. (2016). Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1).
- Hoskins, B., Ho, I. K., Meydrech, E. F. (1985). Effects of aging and morphine administration on calmodulin and calmodulin-regulated enzymes in striata of mice. *Journal of neurochemistry*, 44(4), 1069–1073.

Hung C. & Wang P. S. (2004). Gastric oxidative stress and hemorrhagic ulcer in *Salmonella typhimurium*-infected rats *Eur J Pharmacol.* 491(1):61-8.

Hung, C. R. (2005). Modulation of gastric hemorrhage and ulceration by oxidative stress and histamine release in *Salmonella typhimurium*-infected rats. *Inflammopharmacology.* 13(1-3):235-48.

Kakkos, S. K. & Nicolaidis, A. N. (2018). Efficacy of micronized purified flavonoid fraction (Daflon®) on improving individual symptoms, signs and quality of life in patients with chronic venous disease: a systematic review and meta-analysis of randomized double-blind placebo-controlled trials. *Int Angiol.* 37(2):143-154.

Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 229–245.

Kris-Etherton, P. M., Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L., Etherton, T. D. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Ann. Rev.Nutr.* 24, 511-538.

Kwon, K. H., Murakami, A., Tanaka, T., Ohigashi, H. (2005). Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology,* 69(3), 395–406.

Lopez-Luengo, M. T. (2002). Flavonoides. *OFFARM.* 21(4), 108-113.

Mandavilli, B. S., Boldogh, I., Van Houten, B. (2005). 3-nitropropionic acid-induced hydrogen peroxide, mitochondrial DNA damage, and cell death are attenuated by Bcl-2 overexpression in PC12 cells. *Brain Res Mol.* 2005;133(2):215-23.

Muhammad, T., Ikram, M., Ullah, R., Rehman, S. U., Kim, M. O. (2019). Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF-κB Signaling. *Nutrients.* 11(3):648.

Navaneethan, U. & Giannella, R. A. (2011). Infectious colitis *Curr Opin Gastroenterol.* 27(1), 66-71.

Naziroğlu, M., Kutluhan, S., Yilmaz, M. (2008). Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, and EEG records in pentylentetrazol-induced seizures in rats. *The Journal of membrane biology*, 225(1-3), 39–49.

Nony, P. A., Scallet, A. C., Rountree, R. L., Ye, X., Binienda, Z. (1999). 3-Nitropropionic acid (3-NPA) produces hypothermia and inhibits histochemical labeling of succinate dehydrogenase (SDH) in rat brain. *Metab Brain Dis.* 14(2):83-94.

Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., Sandborn, W. J. (2012). Ulcerative colitis. *Lancet (London, England)*, 380(9853), 1606–1619.

Podolsky, D. K. (1991). Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med.* 325, 928-37.

Saafan, S. M., Mohamed, S. A., Noreldin, A. E., El Tedawy, F. A., Elewa, Y. H. A., Fadly, R. S., Al Jaouni, S. K., El-Far, A. H., Alsenosy, A. A. (2023). Rutin attenuates D-galactose-induced oxidative stress in rats' brain and liver: molecular docking and experimental approaches. *Food & function*, 14(12), 5728–5751.

Santangelo, C., Varí, R., Scazzocchio, B., DiBenedetto, Masella R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* 43(4), 394-405.

Serafini M., Peluso I., Raguzzini A. (2010). Antioxidants and the immune system: Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society.* 69, 273–278.

Serra, D., Almeida, L. M., Dinis, T. C. P. (2019). The Impact of Chronic Intestinal Inflammation on Brain Disorders: the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Mol Neurobiol.* 56(10):6941-695108).

Silva, B. C., Lyra, A. C., Rocha, R., Santana, G. O. (2014). Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 28;20(28):9458-67.

Silva-Oliveira, F. M., Cláudia de Carvalho-Fernandes, A., Henrique de Cicco-Sandes, S., Prata, L. O., Junior, M. A., Vilela da Silva, C. A., Campolina-Silva, G. H., Lorenzo de Jesus-Oliveira, M., Oliveira, C. A., Neumann, E., Nunes, Á. C., Gomes, M. A., Caliari, M. V. (2021). Co-infection by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar typhimurium and *Entamoeba dispar* pathogenic strains enhances colitis and the expression of amoebic virulence factors. *Microbial pathogenesis*, 158, 105010. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105010>

Smith, R. R., Dimayuga, E. R., Keller, J. N., Maragos, W. F. (2005). Enhanced toxicity to the catecholamine tyramine in polyglutamine transfected SH-SY5Y cells. *Neurochemical research*, 30(4), 527–531.

Welbat, J. U., Naewla, S., Pannangrong, W., Sirichoat, A., Aranarochana, A., Wigmore, P. (2020). Neuroprotective effects of hesperidin against methotrexate-induced changes in neurogenesis and oxidative stress in the adult rat. *Biochem Pharmacol.* 178:114083.

Yamamoto-Furusho, J. K., Gutiérrez-Grobe, Y., López-Gómez, J. G., Bosques-Padilla, F., Rocha-Ramírez, J. L. (2018). Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Rev Gastroenterol Mex.* 83:144-67.

Yeh, C. C., Kao, S. J., Lin, C. C., Wang, S. D., Liu, C. J., Kao, S. T. (2007). The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sci.* 80, 1821–1831.

Yoon J. H. & Baek S. J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med J.* 46, 585–596.