



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Entidad Académica

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

El árnica (*Heterotheca inuloides*) protector contra
el daño provocado por los radicales libres

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M en C. ELVIA COBALLASE URRUTIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

COMITÉ TUTOR: Dr. JOSE PEDRAZA CHAVERRI
Dra. Ma. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.




Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **COBALLASE URRUTIA ELVIA** con número de cuenta **79224963** con la tesis titulada **“EL ARNICA (HETEROTHECA INULOIDES) PROTECTOR CONTRA EL DAÑO PROVOCADO POR LOS RADICALES LIBRES”**, realizada bajo la dirección del **DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE:**

Presidente: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal: DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI
Secretario: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
Suplente: DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DRA. ROSARIO RODRIGUEZ ARNAIZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de Agosto de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
POR LA OPORTUNIDAD RECIBIDA PARA MI FORMACION
ACADEMICA Y PROFESIONAL

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR
DGAPA (UNAM) IN214908, IN201910
CONACYT 129838

TUTOR PRINCIPAL

Dr. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

Gracias por “adoptarme”, por su confianza, consejos, apoyo científico, por su constante entrega de tiempo y su gran apoyo incondicional en todo momento.

COMITÉ TUTOR:

Dr. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

Por la atención, asesoría, por la oportunidad de aprender y por abrirme las puertas de su laboratorio para llevar a cabo la parte experimental del mismo.

Dra. Ma. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Por su valiosa ayuda y por compartir su conocimiento para la culminación del presente trabajo.

Ustedes son y serán guía y ejemplo para mi vida profesional.

Infinitas gracias

Al Jurado

Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Dr. José Pedraza Chaverri
Dra. Regina Dorinda Montero Montoya
Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz
Dr. Mario Altamirano Lozano

Por su valiosa colaboración y sus atinados comentarios para mejorar este trabajo.

A la memoria del Dr. Fikrat Abdullaev Jafarova.

**Dr. Donde sea que se encuentre, siempre estará orgulloso de mi
Gracias por todo**

**A la memoria de mis padres
Profesora Celia Urrutia García
Ing. Cándido Coballase Morales**

Por su ejemplo, infinito cariño, amor, comprensión y por haberme enseñado a servir a los demás.

Gracia he llegado a realizar la más grande de mis metas.

**A mis hermanas
Ma. Del Rocío y Celia Ena
Por su buen humor y optimismo en todos los momentos más arduos.**

Gracias a ustedes tengo la herencia más valiosa que pudiera recibir.

Ber, por todo tu cariño, apoyo, paciencia, sacrificios, todos esos buenos momentos compartidos, las miles de palabras de aliento que me has dado, estoy realizando un sueño más, gracias.

Al Dr Rafael Coria Jiménez, por el apoyo y la confianza para seguir con este proyecto, por recordarme mi “ gen japonés”, a pesar de todos los contratiempos logré realizar este proyecto, gracias de todo corazón.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza por el apoyo en la revisión del los artículos y las pláticas amenas sobre ciencia.

A mis amigos, por su compañía, enseñanzas y todos esos buenos ratos compartidos en nuestra segunda casa (el laboratorio y el trabajo).

Omar Medina y Sandra Hernández por su ayuda y apoyo en todo momento de duda y problema en el transcurso de todos los experimentos.

Noemi Cárdenas, Edna García, Teresita Aceves, Beto Rojas, Angeles Alpizar, Silvia Guzmán, Octavio Gonzáles, Eva Nolasco, Sonia Mares, Neus Serrano, Dolores Ronquillo, Mariana Flores, Sitali Olguín.

Gracias por sus “porras “ y amistad.

A mi amigo de toda la vida Manuel Rodríguez Sotelo, siempre en las buenas y en las malas, por su apoyo para las determinaciones de los marcadores enzimáticos de daño hepático.

INDICE

1.	Introducción	14
2.	Antecedentes	16
2.1	Especies reactivas de oxígeno (ROS)	16
2.1.1	Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$)	17
2.1.2	Anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	18
2.1.3	Radical Hidroxilo (OH^\bullet)	19
2.1.4	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	20
2.1.5	Anión peroxinitrito (ONOO^-)	20
2.1.6	Ácido hipocloroso (HOCl)	22
2.2	Estrés oxidante	22
2.2.1	Agentes oxidantes de alto peso molecular	23
2.2.2	Superóxido dismutasa (SOD), Cu-Zn SOD y Mn-SOD	23
2.2.3	Catalasa (CAT)	24
2.2.4	Glutación peroxidasa (GPx)	24
2.2.5	Glutación reductasa (GR)	25
2.2.6	Glutathion S-Transferasa (GST)	26
2.3	Agentes oxidantes de bajo peso molecular	26
2.3.1	Glutación (GSH)	27
2.3.2	Vitamina C (ácido L-ascórbico)	27
2.3.3	Vitamina E (α -tocoferol)	28
2.3.4	Selenio (Se)	29
2.4	Polifenoles	30
2.5	<i>Heterotheca inuloides</i>	31
2.5.1	Propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, analagésicas y antioxidantes	33
2.5.2	Estrés oxidante y hepatotoxicidad como modelo de estudio	35
3.	Justificación	38
4.	Objetivo General	39
4.1	Objetivos particulares	39
5.	Materiales	40
5.1	Reactivos	40
6.	Desarrollo experimental	41
6.1	Obtención e identificación de <i>Heterotheca inuloides</i>	41
6.2	Preparación de los extractos	41
6.3	Metodologías <i>in vitro</i>	42
6.3.1	Determinación de la actividad atrapadora de ABTS	42
6.3.2	Determinación de la actividad atrapadora de DPPH	42
6.3.3	Determinación de la actividad atrapadora de ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	43
6.3.4	Determinación de la actividad atrapadora de (H_2O_2)	44
6.3.5	Determinación de la actividad atrapadora de (OH^\bullet)	45
6.3.6	Determinación de la actividad atrapadora de (HOCl)	47
6.3.7	Determinación de la actividad atrapadora de ($^1\text{O}_2$)	48
6.3.8	Determinación de la actividad atrapadora de (ONOO^-)	49
6.3.9	Definición de IC_{50}	50
6.3.10	Determinación de polifenoles	50
6.3.11	Determinación de flavonoides	51

6.4	Determinación de la actividad atrapadora del anión superóxido (O ₂ ^{•-}), por espectrometría de resonancia paramagnética electrónica (EPR)	51
6.5	Metodologías para experimentos <i>in vivo</i>	52
6.5.1	Modelo de hepatotoxicidad en ratas inducidas con tetracloruro de carbono (CCl ₄)	52
6.5.2	Preparación de los homogenados	53
6.5.3	Determinación de las actividades asparatato aminotransferasa (AST) y alaninaminotransferasa (ALT), como marcadores de daño hepático	54
6.5.4	Histopatología	54
6.5.5	Inmunohistoquímica con 4-hidroxinonenal (4-HNE) y 3- nitrotirosina (3-NT)	54
6.6	Actividad enzimática de las enzimas antioxidantes	56
6.6.1	Ensayo de la actividad de catalasa (CAT)	56
6.6.2	Ensayo de la actividad de glutation reductasa (GR)	57
6.6.3	Ensayo de la actividad de superóxido dismutasa (SOD)	57
6.6.4	Ensayo de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx)	58
6.6.5	Ensayo de la actividad de glutation S-transferasa (GST)	59
6.7	Peroxidación lipídica	60
6.8	Determinación de proteínas	61
6.9	Estadística	61
7.	Resultados	62
7.1	Determinación de polifenoles	62
7.2	Actividad de atrapamiento de los extractos de <i>Heterotheca inuloides</i>	62
7.3	Determinación de la actividad atrapadora de superóxido, por los extractos de <i>H. inuloides</i> por EPR	66
7.4	Actividad antioxidante de los compuestos bioactivos de <i>H inuloides</i>	67
7.5	Resultados <i>in vivo</i>	71
7.5.1	Determinación de la actividad de aspartato aminotransferasa (AST) y alanin aminotransferasa (ALT) como marcadores de daño hepático	71
7.5.2	Peroxidación lipídica	72
7.5.3	Análisis Histopatológico	73
7.5.4	Análisis Inmunohistoquímico	77
7.5.5	Análisis de las enzimas antioxidantes en el modelo hepático en las ratas expuestas a CCl ₄	80
8.	Discusión	82
9.	Referencias	95
10.	Artículos publicados	114

RESUMEN

El arnica (*Heterotheca inuloides*) es una planta medicinal ampliamente utilizada en México, algunos de sus principales componentes con propiedades farmacológicas han sido caracterizados, e incluyen sesquiterpenoides y flavonoides moléculas con efectos antiinflamatorios y antioxidantes. En este trabajo exploramos la capacidad para atrapar diferentes radicales libres de los extractos acetónico y metanólico obtenidos de *Heterotheca inuloides* y la comparamos con diferentes compuestos de referencia ya conocidos: el ácido ascórbico, el piruvato, la penicilamina, el glutatión, la dimetiltiourea, y el ácido nordihidroguaiarético. Ambos extractos presentaron de 2 a 12 veces mayor capacidad [IC₅₀ (mg / ml)] para atrapar a las especies de oxígeno reactivo: ABTS, DPPH, O₂^{•-}, HOCl, H₂O₂, OH[•], ¹O₂, ONOO⁻, que los compuestos de referencia. Adicionalmente, los metabolitos del extracto metanólico presentan un potente efecto antioxidante contra la mayoría de especies reactivas del oxígeno producidas (con valores de IC₅₀ de alrededor de 0,018 a 4.31 mg/ml); aunque son menos potentes que el extracto metanólico. Todos ellos tienen una respuesta dependiente de la concentración. Estos extractos contienen múltiples ingredientes activos que pueden actuar solos o de forma sinérgica respecto a sus efectos atrapadores de las diferentes especies de oxígeno. Por otra parte, la eficacia antioxidante *in vivo* de los flavonoides está poco documentada, posiblemente debido al conocimiento limitado que se tiene sobre su absorción en los seres humanos. Se utilizó un modelo de hepatotoxicidad con el tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas para evaluar el potencial de protección de los extractos acetónico y metanólico de *Heterotheca inuloides*. El pretratamiento con los dos extractos de *H. inuloides* atenuó el aumento en la actividad de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) séricas observada en la lesión hepática inducida por CCl₄. El efecto protector fue confirmado por el análisis de muestras de tejido teñidas con hematoxilina-eosina y ácido peryódico de

Schiff. Además, los dos extractos resultaron ser atrapadores del radical superóxido, lo cual fue observado por resonancia paramagnética electrónica. Por otra parte, debido al hecho de que en los experimentos anteriores el extracto metanólico presentó un mejor efecto de protección, éste se utilizó para investigar con más detalle el mecanismo de hepatoprotección. La quercetina, que es uno de los principales componentes del extracto y es conocida por su actividad antioxidante fue utilizada como control positivo. El pretratamiento de animales con el extracto metanólico o la quercetina, previno el aumento de 4-hidroxinonenal y 3-nitrotirosina en el hígado, dos marcadores de estrés oxidante. Por otra parte el tratamiento previo con el extracto metanólico o quercetina de *H. inuloides* previene la disminución en la actividad de varias enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glutatión transferasa) que acompaña a la lesión hepática inducida por CCl₄. Estos resultados sugieren que la capacidad hepatoprotectora del extracto metanólico de *H. inuloides* se puede asociar a sus propiedades antioxidantes, que también explican las propiedades biomédicas atribuidas a esta planta. Estas observaciones justifican, la investigación en animales y estudios en seres humanos de los posibles efectos benéficos de *H. inuloides*, además de que los extractos o sus componentes son buenos candidatos para ser utilizados en las industrias farmacéuticas y de alimentos como fuente accesible de antioxidantes naturales.

ABSTRACT

Arnica (Heterotheca inuloides) is a widely used medicinal plant in Mexico. Some of its main components have been characterized with pharmacological properties, among them sesquiterpenoids and flavonoids, which are anti-inflammatory molecules and antioxidants. In this investigation, we explored the ability to trap various free radicals of acetic and methanolic extracts obtained from *Heterotheca inuloides*, and compared with different reference compounds already known: ascorbic acid, pyruvate, penicillamine, glutathione, dimethylthiourea, and nordihydroguaiaretic acid. Both extracts showed 2 to 12 times greater capacity (IC_{50} (mg / ml)) to trap oxygen species reagent ABTS, DPPH, $O_2^{\bullet-}$, HOCl, H_2O_2 , OH^{\bullet} , 1O_2 , $ONOO^-$, than reference compounds. Additionally, the metabolites of the methanolic extract showed an antioxidant effect against most reactive oxygen species produced (with IC_{50} values of about 0.018 to 4.31 mg / ml), although less potent than the methanol extract, they all have concentration-dependent response. These extracts contain multiple active ingredients that could act synergistically about trapping of the different species of oxygen. On the other hand, the antioxidant efficacy of flavonoids *in vivo* is poorly documented possibly because of the limited knowledge about their absorption in humans. We use a model of hepatotoxicity with carbon tetrachloride (CCl_4) in rats to evaluate the protective power of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides*. Pretreatment with the two extracts of *H. inuloides* attenuated the increased activity of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels observed in the CCl_4 induced liver injury. The protective effect was confirmed by analysis of tissue samples stained with hematoxylin-eosin and Schiff periodic acid. In addition, both extracts were found to be trap superoxide radical, which was observed by electron paramagnetic resonance. Moreover, due to the fact that the methanolic extract in the

previous experiments showed a better effect of protection, we used it to investigate in more detail the mechanism of hepatoprotection. Quercetin, one of the main components of the extract and known for its antioxidant activity, was used as a positive control. Pretreatment of animals with the methanolic extract or quercetin, prevented to increase 4-hydroxynonenal and 3-nitrotyrosine in the liver, two markers of oxidative stress. Quercetin prevents the decrease in activity of several antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione transferase accompanying the CCl₄ induced liver injury. These results suggest that the hepatoprotective capacity of the methanol extract of *H. inuloides* may be associated with its antioxidant properties, which also explains the biomedical properties attributed to this plant. On the other hand, extracts or components are good candidates to be used in pharmaceutical and food industries as an accessible source of natural antioxidants. These observations justify research on animals and human studies about the beneficial effects of *Heterotheca inuloides*

1.INTRODUCCION

En los anales de la historia de la medicina, pocos eventos han tenido el impacto tan profundo como el ocurrido a consecuencia del conocimiento de los radicales libres (RL), las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de su influencia en los seres vivos. La producción de los ROS es un proceso natural, inevitable y constante; un continuo proceso biológico, que es consecuencia de la vida en un ambiente aeróbico. Todas las células, independientemente de su tipo, producen ROS continuamente. La producción de ROS y el estrés oxidante se asocian con la lesión tisular y muchos procesos patológicos, incluyendo arterioesclerosis, diabetes, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del hígado y el proceso normal de envejecimiento (Halliwell y Gutteridge. 2001; Valko y cols., 2007; Seifried y cols., 2007). Lo anterior ha provocado varias investigaciones encaminadas a conocer y regular la producción de radicales libres y el estrés oxidante (Bayraktar y cols., 2010; Golbidi y Laher 2010; Moreira y cols., 2010). Las especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN. No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones, las defensas antioxidantes pueden verse superadas por la excesiva generación de ROS. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidante, el cual está asociado a numerosas enfermedades como se mencionó anteriormente. Los sistemas antioxidantes endógenos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y antioxidantes con grupo tiol, son las primeras defensas contra los radicales libres, y los no enzimáticos como glutatión (GSH), vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), bilirrubinas y ácido úrico (Halliwell B y Gutteridge JM 2001 ; Valko y cols 2007; Matés y Sánchez-Jiménez 1999), pueden ser reforzados mediante la incorporación en la dieta de compuestos antioxidantes que actúan como coadyuvantes

frente al efecto deletéreo de la exposición a ROS. Existen abundantes estudios científicos que demuestran que compuestos polifenólicos como los flavonoides, carotenoides, moléculas como vitamina C y E, pueden actuar capturando ROS (Valko y cols 2007; Albano E 2006; Fang y cols 2002; Cotelle 2001). Si bien la mayoría de los reportes se basan en la determinación de su capacidad antioxidante en ensayos *in vitro* y de carácter físico-químico, se ha extrapolado su potencial beneficio en la protección *in vivo*. No obstante, no hay suficiente evidencia experimental que aporte antecedentes respecto de la capacidad de protección de estos compuestos ante el estrés oxidante en modelos fisiológicos o funcionales.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este estudio es determinar el efecto antioxidante y protector de *Heteroteca inuloides* (árnica) tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. Antecedentes

2.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

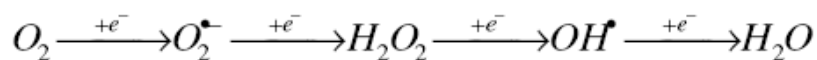
Se consideran radicales libres (RL) a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o bien un número impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad (Halliwell y Gutteridge 2001). Los ROS tienen vida media corta debido a su gran reactividad por sus electrones desapareados, los cuales interactúan con moléculas o elementos que generalmente poseen electrones apareados, produciéndose una oxidación de las moléculas estructurales de las células causando daño irreversible (Pietta, 2000). Algunos ejemplos de radicales son: Superóxido ($O_2^{\cdot-}$), Hidroxilo, (OH^{\cdot}), Peroxilo ($RO_2^{\cdot-}$), Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}), Oxígeno singulete (1O_2) y no radicales como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$), ozono (O_3). Además de los radicales de oxígeno, también hay especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y dióxido de nitrógeno (NO_2), así como moléculas con carbono como triclorometil (CCl_3^{\cdot}), que es un producto del metabolismo del tetracloruro de carbono (CCl_4) (Valko y cols 2007; Recknagel y cols 1989). (Tabla1).

Tabla 1 Especies reactivas de oxígeno

Radicales	No-Radicales
Superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	Oxígeno singulete Forma $^1\Delta$ (1O_2)
Hidroxilo (OH^{\bullet})	Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)
Peroxilo (RO_2^{\bullet})	Ozono (O_3)
Alcolxilo (RO^{\bullet})	Anion Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Hidroperoxilo (HO_2^{\bullet})	Acido Hipocloroso ($HOCl$)
Oxígeno singulete Forma $^1\Sigma$ (1O_2)	Acido Bromoso ($HOBr$)

Las reacciones univalentes (reacción 1) que llevan a la formación de las ROS se deben a la reducción sucesiva del oxígeno a anión superóxido al incorporar un electrón, a peróxido de hidrógeno al aceptar 2 electrones y a radical hidroxilo al aceptar 3 electrones (Hansberg 2002). (Reacción 1)

Reacción 1

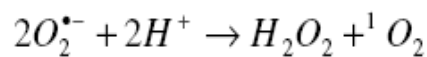


2.1.1 OXÍGENO SINGULETE (1O_2).

Cuando uno de los electrones desapareados del oxígeno absorbe energía e invierte su rotación (giro), se forma el 1O_2 . Existen dos formas del oxígeno singulete: La sigma ($^1\Sigma$) que es un radical libre, debido a que conserva los dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos $2\pi^*$ (cada electrón en un orbital), es muy reactivo y tiene una energía de excitación de 157 kJ por encima del oxígeno, y el estado delta ($^1\Delta$) el cual posee dos electrones en un solo orbital $2\pi^*$ por lo que no es un radical libre ya que no

posee ningún electrón desapareado, y posee una energía de 93.6 kJ por encima del oxígeno (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri 2006). De la misma forma, la formación de 1O_2 es llevada a cabo por fagocitos activados (reacción 2), los cuales son células que forma parte del sistema inmunológico de los seres vivos (por ejemplo los monocitos y macrófagos) y que son estimuladas cuando ya existe o hay posibilidad de daño a las células (Redmond y Gamlin 1999).

Reacción 2

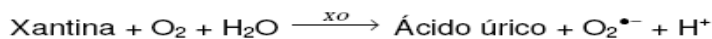


Dentro de sus blancos biológicos se encuentran: ADN, ARN, proteínas, lípidos y esteroides, sin embargo, debido a la abundancia de proteínas dentro de los sistemas biológicos y a la velocidad de reacción con el oxígeno singulete, éstas son probablemente su mayor objetivo intracelular. Se cree que los daños causados a las proteínas tiene un papel clave en el desarrollo de cataratas y algunos tipos de cáncer de piel (Davies y Truscott 2001; Trautinger 2001)

2.1.2 ANIÓN SUPERÓXIDO ($O_2^{\bullet -}$).

La producción del superóxido se lleva a cabo dentro de la mitocondria de la célula mediante la reducción del oxígeno en la cadena respiratoria, mediada por (NADPH) oxidasa y xantina oxidasa (reacción 3). Es considerado como una fuente primaria de ROS y puede interactuar con otras moléculas para generar ROS secundarios a través de procesos catalizados por enzimas o metales (Aruoma 1994; Valko y cols 2007). El $O_2^{\bullet -}$ también se produce en células que forman parte del sistema inmune como los monocitos o macrófagos, cuando estas células se activan, el complejo enzimático de la NADPH oxidasa localizado en la membrana citoplasmática, reduce parcialmente al O_2 generando $O_2^{\bullet -}$ en grandes cantidades (reacción 4) (Diplock 1994).

Reacción 3



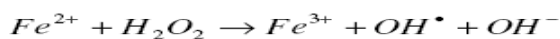
Reacción 4



2.1.3 RADICAL HIDROXILO (OH[•]).

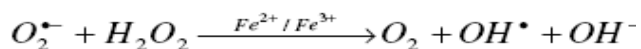
El radical hidroxilo OH[•] es altamente reactivo, con una vida media de 10⁻⁹ s (Valko y cols., 2007). Esta especie se puede formar por la radiación de alta energía como los rayos X, por división homolítica de la molécula de agua o cuando el H₂O₂ acepta un electrón desapareado por ejemplo, de un metal de transición como el Fe²⁺ o el Cu⁺, se forma el OH[•] y el ión hidroxilo (OH⁻) (reacción de Fenton, reacción 5) (Diplock y cols., 1998).

Reacción 5



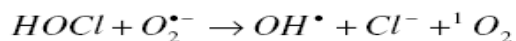
La participación del O₂^{•-} y de H₂O₂ en la reacción Haber-Weiss, catalizada por un metal de transición, también es una fuente de producción de OH[•] (reacción 6) (Cheng y cols., 2002).

Reacción 6



El OH[•] también se puede generar por medio de la reacción HOCl y O₂^{•-} (reacción 7) (Halliwell y Gutteridge 2001).

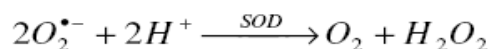
Reacción 7



2.1.4 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂).

La mayor parte de esta especie proviene de la reducción del O₂^{•-} catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD), (reacción 8)

Reacción 8.



Aunque el H₂O₂ no es un radical libre y es poco reactivo, puede difundirse a través de los compartimientos celulares y reaccionar con el O₂^{•-} en presencia de metales de transición, para generar OH[•]. Por esta razón se le considera un oxidante importante en las células de los organismos aerobios. Un grupo de flavoenzimas localizadas en el retículo endoplasmático del hígado y el riñón son importantes en el metabolismo de los aminoácidos y producen H₂O₂. (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza Chaverri 2006).

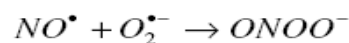
El H₂O₂ forma aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas.

Diversas enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o la fructosa-1,6-difosfato fosfatasa del cloroplasto se inactivan con el H₂O₂. A bajas concentraciones el H₂O₂ es poco reactivo, sin embargo, a concentraciones elevadas es capaz de oxidar los grupos -SH de las proteínas y causar ruptura de las hebras del ADN (Hansberg, 2002).

2.1.5 ANIÓN PEROXINITRITO (ONOO⁻).

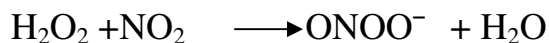
El peroxinitrito es un anión de fórmula ONOO⁻. Es una especie reactiva de nitrógeno que se forma a partir del radical NO[•] cuando se produce simultáneamente el O₂^{•-} (reacción 9).

Reacción 9



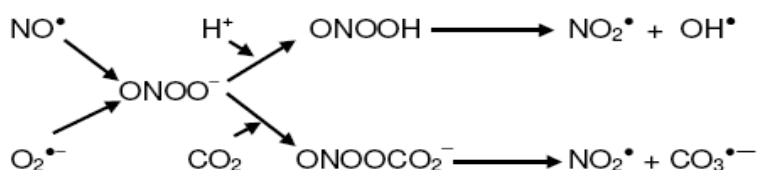
También se forma por la reacción del peróxido con nitrito (reacción 10)

Reacción 10



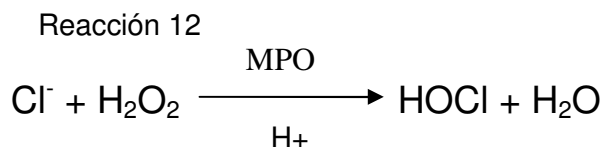
El ONOO^- es capaz de modificar un gran número de moléculas como ADN, proteínas, aminoácidos y enzimas. El aminoácido tirosina es particularmente propenso al ataque del ONOO^- , el producto de esta reacción es la formación de 3-nitrotirosina (3-NT) (Pacher y cols., 2007; Liaudet 2009; Rubbo y cols., 2009) la cual es utilizada como un marcador de la oxidación de proteínas (Halliwell 1997; Bartsaghi y cols., 2010). Se sabe que el ONOO^- está involucrado en varios estados patológicos (Rubbo y cols., 2009; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza Chavarri 2006). Durante su descomposición a pH fisiológico, el ONOO^- puede producir algunos radicales libres que son oxidantes fuertes (reacción 11). Estos productos de descomposición se forman por dos mecanismos: el primero implica la protonación del ONOO^- para formar el ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual experimenta una descomposición homolítica y genera dos radicales, OH^\bullet y dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), que son altamente reactivos. El segundo mecanismo es la reacción entre el ONOO^- y el dióxido de carbono (CO_2) para formar nitrosoperoxocarbonato (ONOOCO_2^\bullet), el cual se descompone para dar NO_2^\bullet y radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$). (reacción 11), (Xiong y cols., 2007).

Reacción 11. Formación de ONOO^- y sus productos de descomposición



2.1.6 ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl).

El ácido hipocloroso (HOCl) es un ROS con un fuerte poder oxidante, producido en neutrófilos y monocitos vía reacción de H_2O_2 con iones cloro Cl^- y catalizados por la enzima mieloperoxidasa (MPO) (reacción 12).



La producción del hipoclorito es parte de los mecanismos de defensa contra los microorganismos. También se ha demostrado que el HOCl puede tener como blanco a proteínas y lipoproteínas. La oxidación de las proteínas por el ácido hipocloroso ha sido implicado en diferentes enfermedades, incluyendo arterioesclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide y varios cánceres (Van der Veen y cols., 2009; Firuzi y cols., 2004).

2.2 ESTRÉS OXIDANTE.

Se ha estimado que alrededor de 10, 000 a 20, 000 radicales libres y otras especies tienen contacto o se producen en el organismo humano cada día (Valko y cols., 2004; Dreher y Junod 1996). Diferentes factores pueden conducir al estrés oxidante por ejemplo: exposición a contaminantes ambientales, radiaciones ionizantes, metales, pesticidas, ciertos fármacos, diabetes, arteriosclerosis, cáncer, desórdenes neurodegenerativos, procesos de envejecimiento, etc. (Pacher y cols., 2007; Albano 2006; Valko y cols., 2004; Halliwell and Gutteridge 2001). Un incremento en la producción de ROS o una baja en las concentraciones de las defensas antioxidantes puede provocar, como se mencionó anteriormente, estrés oxidante, cuyo desbalance, bajo condiciones fisiológicas normales, las células son capaces de equilibrar. Este proceso se puede llevar a cabo gracias al sistema enzimático antioxidante (Matés 2000; Halliwell y

Gutteridge 2001). Las defensas antioxidantes son muy importantes ya que remueven los RL, promoviendo una protección a los sistemas biológicos. Los antioxidantes son sustancias que se encuentran en pequeñas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, previenen o retardan la oxidación de dicho sustrato y protegen a los sistemas biológicos (Halliwell y Gutteridge 2001).

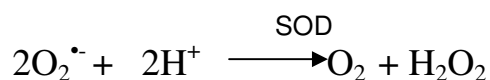
El sistema antioxidante puede ser clasificado en dos partes: agentes antioxidantes de alto peso molecular y agentes antioxidantes de bajo peso molecular.

2.2.1 Agentes antioxidantes de alto peso molecular

2.2.2 Superóxido dismutasa (SOD): Cu-Zn SOD y Mn SOD.

Son proteínas que contienen metales, y se encuentran presentes en todas las células eucariotas. La isoforma Cu -Zn SOD es una enzima que se encuentra en el citoplasma, núcleo y plasma, es un homodímero de 32.5 KDa, contiene Cu (II) y Zn (II) en el sitio activo formando un puente con el imidazol o histidina. La otra isoforma, se encuentra en la matriz mitocondrial (Mn-SOD), y es un homotetrámero de 95 KDa que contiene Mn(II) en su sitio activo, las concentraciones intracelulares de SOD se encuentran en un intervalo de 10^6 y 10^5 mM (Marklund y cols., 1982; Matsuda y cols., 1990; Elshafey y cols., 1994; Valko y cols., 2007). La SOD cataliza la conversión del superóxido a peróxido (reacción 13) tiene una alta actividad en hígado, riñón y músculo y presenta baja actividad en el cerebro al ser comparada con el hígado (Leeuwenburgh y Ji 1995).

Reacción 13



2.2.3 Catalasa (CAT).

La CAT es una enzima que contiene grupo hemo (Chaudiere y Ferrari-Iliou 1999). Esta enzima es un tetrámero de aproximadamente 240 KDa (Cheng y cols., 1981). Es una de las enzimas más eficientes y se conoce que no puede ser saturada por el peróxido a concentraciones elevadas (Lledías y cols., 1998), protegiendo a las células del daño oxidante; se encuentra principalmente en las mitocondrias y los peroxisomas y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua (reacción 14)

Reacción 14



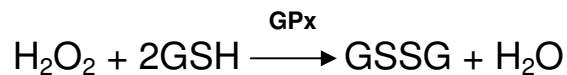
2.2.4 Glutación peroxidasa (GPx).

Es un tetrámero de aproximadamente 80 KDa, cataliza la reducción de una variedad de peróxidos e hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) utilizando glutación (GSH), se encuentra presente como varias isoformas. La GPx citosólica y mitocondrial (cGPx, GPx-1) están presente en el citosol y mitocondrias de casi todos los tejidos con diferente distribución; cataliza la reducción de peróxidos, hidroperóxidos fosfolipídicos, la GPx1 se localiza en los eritrocitos, hígado y riñón. La GPx plasmática (pGPx, GPx-3) está presente en los fluidos extracelulares de varios tejidos, aunque es en riñón donde existe en una alta concentración. La GPx de fosfolípidos (PHGPx, GPx-4) está en la membrana y citosol de varios tejidos, funciona como antioxidante en membrana celular y es abundante en testículos y en células epiteliales renales (Imai y Nakagawa 2003) La GPx gastrointestinal (GI-GPx, GPx-2) está presente en el citosol de células de riñón y tracto intestinal en humanos, funciona como antioxidante en tracto gastrointestinal (Brigelius-Flohe 1999; Matés 2000; Chu y cols., 2004; Hirota y Yasuhito 2003; Comhair y Erzurum 2005). Es

la mayor fuente de protección contra el estrés en concentraciones bajas, aunque quizá la CAT tenga una protección más significativa en un estrés oxidante severo (Yan y Harding 1997).

Esta enzima cataliza la reducción de peróxidos empleando dos moléculas de glutatión reducido (GSH). Los productos de la reacción son el glutatión oxidado (GSSG) y el agua (reacción 15).

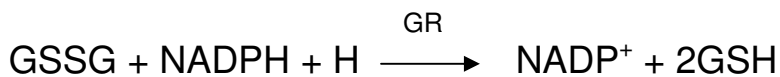
Reacción 15



2.2.5 Glutatión reductasa (GR).

La glutatión reductasa es una flavoenzima dependiente del nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de lipoperóxidos (L-OOH), que son elementos tóxicos. La GR es una enzima homodimérica compuesta por 2 subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro, con un peso molecular de 51 569 Daltons. Es una enzima que se encuentra en citoplasma y tiene a la coenzima FAD^+ en su sitio activo. Esta enzima cataliza la reducción de GSSG empleando la coenzima NADPH (reacción 16):

Reacción 16



Las evidencias indican que el NADPH reduce a FAD, el cual transfiere dos electrones a la unión disulfuro (-S-S-) entre dos residuos de cisteína del sitio activo. Dando origen a dos

moléculas de GSH. La GR mantiene los niveles adecuados de GSH en la célula (Harris 1992) para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H₂O₂. Por lo tanto, la alteración de la actividad de la GR provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de ROS.

2.2.6 Glutación S-transferasa (GST).

Hasta el momento se han identificado dos isoformas, la GST citosólica y la GST microsomal. Las GST citosólicas están divididas en cuatro familias principales: α , μ , π y θ , y en cuatro familias minoritarias: ζ , σ , κ y ω . Las GST citosólicas están constituidas por dos subunidades proteínicas idénticas, mientras que las GST microsomales son trímeros (Sharma y cols., 2004). Su función primaria es catalizar la conjugación de GSH con una gran cantidad de compuestos orgánicos (RX). La reacción general de esta enzima es:

Reacción 17



Se ha demostrado que las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutatión peroxidasa independiente de selenio y estas enzimas también pueden desintoxicar al 4-hidroxinonenal, un producto de la peroxidación de lípidos.

2.3 Agentes antioxidantes de bajo peso molecular.

Los agentes antioxidantes de bajo peso molecular generalmente se clasifican como hidrosolubles (principalmente vitamina C, GSH y ácido úrico) y como liposolubles (principalmente vitaminas E y A y bilirrubina). Es importante señalar que tanto la vitamina C como la vitamina E se obtienen de la dieta. De la misma manera, se conocen otros antioxidantes que son obtenidos también de algunos alimentos, principalmente frutas y

verduras y que contribuyen a prevenir el estrés oxidante, por ejemplo, compuestos carotenoides como el licopeno, la luteína y el beta-caroteno, y compuestos fenólicos como los flavonoles, flavonas, flavononas, antocianidinas y fenilpropanoides (Mustacich y cols., 2007; Valko y cols., 2007; Duarte y Lunec 2005; Padayatty y cols., 2003).

2.3.1 Glutación (GSH).

Es un tripéptido formado por el glutamato, cisteína y glicina, es el mayor tiol antioxidante intracelular y se encuentra en concentraciones de 1-11 mM en el citosol, 3-5 mM en el núcleo, y 5-11 mM en la mitocondria; es soluble en esos compartimentos. En los hepatocitos se encuentra en concentraciones de de 7 a 10 mM (Hammond y cols., 2007) y en el núcleo mantiene el estado redox importante para la expresión y reparación del ADN.

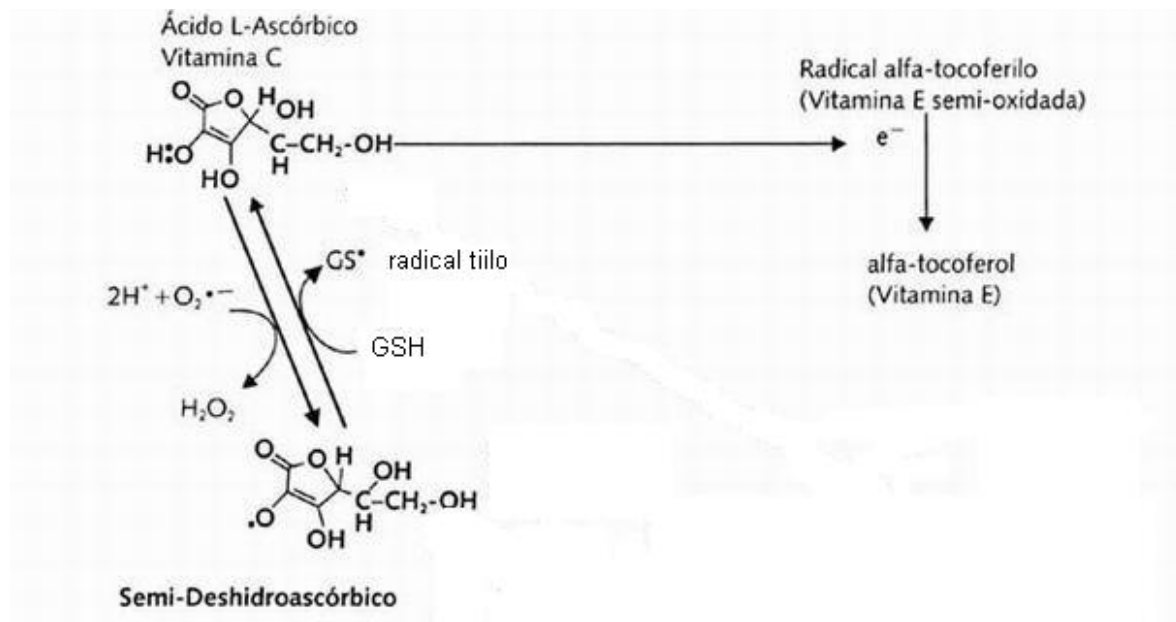
Los papeles protectores del glutación son: (1) es cofactor de varias enzimas desintoxicantes p.e: GPx, GST, entre otras; (2). participa transportando aminoácidos a través de la membrana plasmática; (3). es atrapador del HO[•] y del ¹O₂, desintoxicante de H₂O₂ y peróxidos lipídicos y (4) ayuda a regenerar antioxidantes como las vitamina C y E (Pastore y cols., 2003).

2.3.2 Vitamina C (ácido L-ascórbico).

La vitamina C es un antioxidante soluble en agua importante, se encuentra en grandes concentraciones en el plasma (60–100 mM), es atrapador de radicales libres como el O₂^{•-} y HO[•], previniendo el daño oxidante en las células (Duarte y Lunec 2005). La vitamina C actúa como donador de electrones y por lo tanto es un agente reductor. En la figura 1 se ejemplifica su mecanismo de acción: el oxhidrilo del ácido L-ascórbico reduce al radical anión superóxido al cederle un electrón, formando peróxido, al mismo tiempo que participa en la reducción del α-tocoferilo a vitamina E (Padayatty y cols., 2003). Sin

embargo, a concentraciones altas (0.3–20 mM) la vitamina C tiene una actividad prooxidante, que depende de metales de transición como Cu^{2+} o Fe^{2+} a través de los cuales se forma el HO^\bullet (Duarte y Lunec 2005).

Figura 1. Reacción del ácido L-ascórbico con el radical anión superóxido



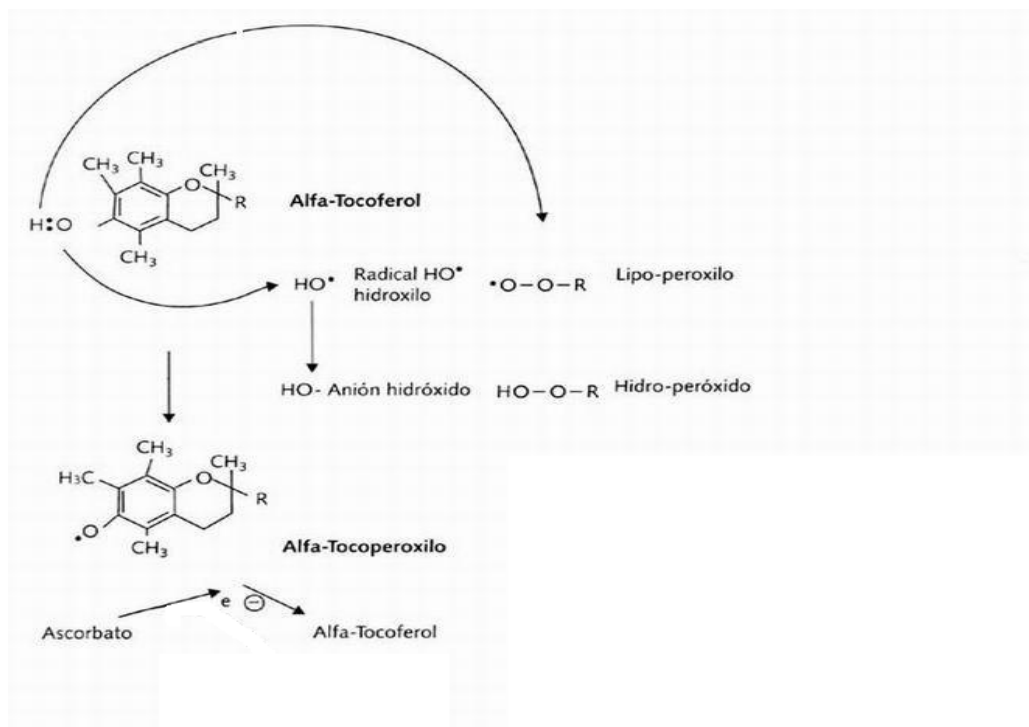
2.3.3 Vitamina E (α -Tocoferol).

La vitamina E es el término de un grupo de α -tocoferoles con una alta actividad biológica. Esta se puede incorporar como constituyente y estabilizador de la estructura de la membrana celular. La vitamina E es efectiva como agente antioxidante convirtiendo $\text{O}_2^{\bullet-}$ HO^\bullet y los radicales lipo-peroxilo en moléculas menos reactivas de acuerdo con la reacción que se presenta en la Figura 2 (Mustacich y cols., 2007).

El oxidrilo del α -tocoferol dona un electrón al radical HO^\bullet , estabilizando el radical al formar el anión hidroxilo. La molécula de α -tocoferol al ceder un electrón se constituye en un

radical α -tocoferoxilo, el cual es estabilizado al aceptar un electrón proveniente del ascorbato, restituyendo la estructura de α -tocoferol.

Figura 2. Reacción de α -tocoferol con el radical HO^\bullet



2.3.4 Selenio (Se).

El Selenio es considerado un elemento traza constituyente de las proteínas, en especial de las llamadas selenoproteínas de las cuales forma parte: la glutatión peroxidasa, la tioredoxina reductasa, la yodotironina deosinasa, la metionina sulfóxido reductasa B, la selenoproteína P y W, las cuales son consideradas como antioxidantes de peróxidos, en especial, de los que actúan sobre los lípidos, atrapando a diferentes ROS en especial al $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Burk y cols., 2003; [Lu](#) y [Holmgren 2009](#)).

Además de los antioxidantes no enzimáticos que protegen al organismo del daño causado por los radicales libres encontrados en el plasma, se encuentra la albúmina. Esta proteína es el mayor antioxidante en circulación, ya que puede inhibir las oxidaciones lipídicas y la acción de diferentes radicales por su acción de atrapadora (Medina-Navarro y cols.,

2010). El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas y también es un buen atrapador de radicales libres que reacciona con el OH^\bullet y el HOCl , principalmente, el $^1\text{O}_2$ y radical peroxilo, pero no del NO^\bullet (Glantzounis y cols., 2005; Halliwell 1996).

La bilirrubina es el producto final de la degradación del grupo hemo, siendo sus precursores la hemoxigenasa y la biliverdina. (Tomaro y Battle 2002). Por otro lado, la bilirrubina es un antioxidante más eficiente que la albúmina por su alta actividad reductora, la bilirrubina unida a la albúmina protege a esta última contra el daño por radicales libres. Reacciona como atrapador de radicales peroxilo y de $^1\text{O}_2$ (Stocker y cols., 1987), así como de las especies libres de nitrógeno (Barone y cols., 2009.)

2.4 POLIFENOLES.

Los polifenoles son [fitoquímicos](#) de bajo peso molecular, esenciales para el ser humano. Estos constituyen uno de los [metabolitos](#) secundarios de las plantas más numerosos y distribuidos por todo el organismo, con más de 800 estructuras diferentes conocidas en la actualidad. Estas moléculas representan a una gran variedad de compuestos divididos en varias clases (ácidos hidroxibenzoicos, antocianinas, flavonoides, flavonas, isoflavonas, ligninas etc), y se pueden encontrar en frutas, vegetales, vino, té, chocolates y otros productos de cocoa, por lo que son parte integral de la dieta de los seres humanos, su concentración en plasma o tejidos es más baja que la del ácido ascórbico o del tocoferol.

Los polifenoles poseen una estructura química ideal para donar electrones o hidrógenos, por lo que son buenos reductores. Los flavonoides en especial tienen una poderosa acción antioxidante *in vitro*, siendo capaces de atrapar una amplia variedad de especies reactivas actuando como agentes reductores. Además pueden quelar iones de metales de transición (Pietta 2000; Cotelle 2001; Rice-Evans 2001; Wang y Ho 2009).

2.5 HETEROTHECA INULOIDES.

Las plantas son una fuente rica en fitoquímicos bioactivos, se sabe que aproximadamente 5000 fitoquímicos han sido caracterizados en frutas, vegetales y granos, pero hay otro gran número que no ha sido identificado y que es necesario conocer por sus posibles aplicaciones en beneficio de la salud. Los fitoquímicos se han clasificado en carotenoides, fenoles, alcaloides, compuestos que contienen nitrógeno y grupos tiol (-SH); hay evidencias que sugieren que éstos están involucrados o son una fuente importante en la prevención de enfermedades crónicas (Liu 2003; 2004).

Las funciones que se le atribuyen a los fitoquímicos naturales son: agentes antioxidantes, potenciadores del sistema inmune, antiinflamatorios, antimutágenos, anticancerígenos y antibacterianos. Existen evidencias que sugieren que pueden ser de gran ayuda en enfermedades inducidas por el estrés oxidante ocasionado por los RL (Liu R 2003; 2004; Matkowski y Piotrowska 2006).

Por otro lado, es muy importante que los usuarios que consumen o utilizan las plantas en la terapia de diferentes padecimientos, tengan conocimiento de su potencial así como sus posibles efectos adversos.

En México se sabe que existen cerca de 30,000 especies de plantas de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos en la medicina tradicional por personas que habitan en comunidades rurales y urbanas, lo cual es considerado como evidencia de su eficacia (Almaguer 2001; Martínez 1989).

Una planta muy utilizada en nuestro país es la *Heterotheca inuloides* conocida como: arnica, acahua, acahualli, arnica de campo, arnica de monte, arnica del país, arnika (purépecha), cuateteco, falsa árnica y tlályetl (nahuatl) (Martínez 1984). Fig 3



Figura 3. Heterotheca inuloides

Heterotheca inuloides pertenece a la familia de las compuestas, tiene hojas alargadas y anchas, sus flores están agrupadas y colocadas en forma circular. Se encuentra generalmente en climas cálido, semicálido, semiseco y templado de hábito perenne o anual. Llega a medir hasta 1 m de alto, y se encuentra en bosques de pino y encino. Por su amplio uso medicinal, frecuentemente es cultivada en los huertos familiares y su cosecha se realiza en la época de floración.

Se encuentra distribuida en Chihuahua, Durango, Guerrero (Coyuca de Catalán), Jalisco: Guadalajara; Michoacán (Zitácuaro, Tacuaro, Coalcoman de Vázquez); Hidalgo (Gangueo); Morelia (Ocampo); Oaxaca, Puebla y Estado de México.

En la medicina tradicional *Heterotheca inuloides* adquirió gran popularidad porque en ella se encontraron propiedades medicinales muy útiles, además de que es de fácil adquisición y bajo costo. Se utiliza la planta completa y se consume como agua de tiempo para aliviar los dolores de pulmón, de corazón, muscular, reumático, estomacal, renal y úlceras; también se utiliza en forma de compresas, macerado o en forma de pomada mezclada con manteca o cataplasmas, para curar llagas, moretones, granos, rozadura, desinflamar golpes, heridas o para el dolor de muelas.

La parte aérea (flores, pétalos, estambres) en cocimiento se usa para lavar heridas, se aplica en contusiones y ronchas. Para la inflamación de matriz y ovarios se aplican compresas. El follaje es utilizado como analgésico para dolores de pecho, ardores de estómago, gastritis, así como golpes internos y externos. Las hojas en cocimiento desinfectan y desinflan heridas y como agua de uso para inducir el apetito. Asimismo, se encuentra reportado que se usa para: irritación de la vejiga, riñón, cáncer, nervios y lavar ojos, pero no se tiene definida la parte de la planta que se usa. En veterinaria se usa para remediar problemas del sistema circulatorio, digestivo, inflamaciones, heridas y problemas cutáneos de los animales. En el mercado se encuentran en diferentes presentaciones por ejemplo: en forma de tabletas, en presentación homeopática, tinturas, té, pomadas, las cuales son utilizadas para infecciones de la piel, fiebres, golpes y llagas (Rzedowski, de J. Rzedowski y cols., 2001; Villaseñor Ríos y Espinosa García 1998).

En los últimos años se han reportado en diferentes trabajos los resultados de las investigaciones sobre la caracterización de varios componentes de la flor y sus efectos biológicos.

2.5.1 Propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, analgésicas y antioxidantes.

A partir de la planta se han podido caracterizar compuestos puros como: Luteolina, Kaemferol, Kaemferol- 3,7-dimetileter, Kaemferol-3,7,4'-trimetileter, 6-metoxikaemferol-3,7-dimetileter, quercetina, quercetina-3,3'-dimetileter, quercetina-3,4'-dimetileter, quercetina-3,7-dimetileter, 3',4'-tetrametileter, quercetina-3,7,3'-trimetileter, quercetina-3,7,4'-trimetileter, quercetina-3-7. Las estructuras de estos compuestos fueron establecidas con metodologías de UV, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectro de masas (Jerga y cols., 1990). Recientemente se reportaron varios constituyentes como poliacetilenos, cadinanos, triterpenos, esteroides, sesquiterpenos y flavonoides con diferentes propiedades biológicas (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades farmacológicas de los diferentes metabolitos obtenidos de los extractos acetónico y metanólico de *Heterotheca inuloides*.

Nombre del Extracto	Composición química (% en el extracto)	Propiedades farmacológicas	Referencias
<i>Heterotheca inuloides</i> Extracto Acetónico	Cadalen-15- ácido oico, 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadaleno-4-uno-dicadaleno, 7-hidroxicadaleno , 7-hidroxi-4 α H-3,4-dihidro-cadaleno, 1α, hidroxil-1(4H)-isocadaleno-4-uno, 1α-hidroxi-4αh-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15 ácido oico, 7-(3,3-dimethylaliloxi)coumarina, Cariolan-1,9β-diol, Quercetina, Stigmasterol. β-sitosterol.	Antiinflamatorio Efecto inhibitorio de COX-1 y COX-2 Antioxidante Inhibición de la peroxidación lipíca	Haraguchi H y cols., 1997. Segura L y cols., 2000. Delgado G y cols., 2001.
<i>Heterotheca inuloides</i> Extracto Metanólico	Quercetina (0.19), Quercetina 3-O-glucosido, kaempferol, kaempferol-3-O-glucosido, D-chiro-inositol, Epinasterol, Spinasteril-3-O-β-D-glucopiranosido 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno (0.004), 7-hidroxicadaleno (0.002).	Inhibición de la actividad de Tirosinasa Antioxidante Inhibición de la peroxidación lipídica Antiinflamatorio	Haraguchi H y cols., 1997. Kubo I y cols., 1994. Delgado y cols., 2009 (comunicación personal)

En 1994 se aislaron cuatro sesquiterpenoides que presentaban actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas y dos de estos sesquiterpenoides también mostraron actividad fúngica. Estos resultados apoyan el uso de esta planta en infecciones de la piel, así como las investigaciones de su probable uso para infecciones intrahospitalarias, pues el uso de antibióticos para combatirlas puede inducir resistencia a largo plazo (Kubo y cols., 1994).

El sesquiterpenoide 7-hidroxi-3-4-dihidrocadaleno, aislado de *H. inuloides*, fue utilizado contra la peroxidación lipídica en un modelo *in vitro* utilizando microsomas de hígado de

rata y eritrocitos humanos en condiciones de estrés oxidante (Haraguchi y cols., 1996). Los sesquiterpenoides β -cariofileno, β -cariofileno 4, 5α -óxido,7-hidroxi-3-4-dihidrocadaleno y 7-hidroxi-hidrocadaleno también mostraron actividad citotóxica contra varias líneas de tumores sólidos (Kubo y cols.,1996). Asimismo el 7-hidroxi-3-4-dihidrocadaleno y 7-hidroxi-hidrocadaleno, además de los flavonoides quercetina y kaemferol, fueron evaluados como antioxidantes. Estos compuestos presentan una potente actividad atrapadora contra el radical difenil-p-picrilhidrazil (DPPH) y el anión superóxido en un modelo *in vitro* utilizando microsomas de hígado de rata, siendo mejores atrapadores los flavonoides (Haraguchi y cols., 1997). El efecto analgésico y antiinflamatorio en modelos *in vitro* e *in vivo* también ha sido evaluado con diferentes compuestos bioactivos del árnica. El 7-hidroxi-3-4-dihidrocadaleno inhibió la expresión *in vitro* de COX1 y COX2 catalizada por la biosíntesis de prostanglandinas, así como el edema inducido con aceite de croton en un modelo animal (Gené y cols., 1998; Segura y cols., 2000); otro reporte señala que el cariolan-1-9 β -diol, dicadenol y la quercetina también poseen efecto antiinflamatorio (Delgado y cols., 2001). con efectos secundarios mínimos.

2.5.2 Estrés oxidante y hepatotoxicidad como modelo de estudio.

El cuerpo humano identifica a casi todas los [xenobióticos](#) y los sujeta a un número diverso de procesos [químicos](#) y metabólicos para hacerlos de fácil eliminación. Ello implica transformaciones químicas para reducir su liposolubilidad y cambiar su actividad biológica. A pesar de que casi todos los [tejidos](#) del organismo tienen cierta capacidad de metabolizar estos productos químicos, el [retículo endoplásmico](#) del hígado es, por excelencia, el principal lugar de depuración de sustancias químicas endógenas (como el [colesterol](#), [esteroides](#), [ácidos grasos](#) y [proteínas](#)) así como exógenas incluyendo los [fármacos](#). El papel central del hígado en la depuración y transformación de sustancias

químicas hace que sea un [órgano](#) muy susceptible a intoxicaciones. La hepatotoxicidad, es una enfermedad inducida por múltiples factores como: factores ambientales consumo de agentes químicos sintéticos (medicamentos), drogas, remedios herbolarios, solventes industriales etc. (Kaplowitz 2005). En México existen alrededor de 100,000 a 200,000 pacientes cirróticos, los factores de riesgo que más se reportan son: consumo excesivo de alcohol, enfermedad hepática grasa no alcohólica, infección crónica por hepatitis B, consumo de medicamentos, lo cual afecta en gran medida a la población en edad productiva por lo que es considerado un problema de salud pública (IMSS 2009).

Los marcadores bioquímicos como son los niveles de alanin amino transferasa, aspartato amino transferasa, bilirrubinas y fosfatasa alcalina se usan con frecuencia para detectar el daño hepático (Ozer y cols., 2008).

Un modelo bien conocido de hepatotoxicidad es el inducido por el tetracloruro de carbono (CCl_4), el cual ha sido aceptado ampliamente para inducir daño hepático en modelos animales y elucidar los posibles mecanismos de daño producidos por la formación de radicales libres (Tamayo 1983, Muriel y Mourelle 1990).

El CCl_4 es un hepatotóxico liposoluble, el daño hepático causado puede producir desde una esteatosis hasta una necrosis. Induce la formación de ROS, disminuye la actividad del GSH y de las enzimas antioxidantes induciendo estrés oxidante y la lipoperoxidación lipídica. El CCl_4 requiere ser bioactivado por el sistema enzimático de Fase I P450 en el hígado, el cual forma el radical triclorometil ($\text{CCl}_3\bullet$) y al triclorometil peróxido ($\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$), estos radicales libres se pueden unir a los ácidos grasos poliinsaturados para producir peróxidos lipídicos que causan daño en la membrana celular, cambios en las enzimas hepáticas y finalmente necrosis. (Shimizu y cols., 2001; Weber y col., 2003).

Una estrategia general propuesta para la prevención y el tratamiento de la hepatotoxicidad, incluye la reducción de los ROS por el uso de antioxidantes naturales ya que éstos pueden incrementar los niveles de las defensas endógenas, así como de las

enzimas antioxidantes SOD, CAT y GST (Wu y cols., 1999; Sheweita y cols., 2001; Wang y cols., 2007; Preethi y Kuttan 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

Los RL ocasionan un desbalance entre los niveles de antioxidantes y los niveles de prooxidantes en los sistemas biológicos, dando como resultado estrés oxidante. Dicho estrés participa en la generación de diferentes enfermedades como arterioesclerosis, diabetes, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del hígado y al proceso normal de envejecimiento (Pacher y cols., 2007; Albano 2006; Valko y cols., 2004; Halliwell y Gutteridge 2001). Lo anterior ha dado lugar al estudio de antioxidantes especialmente de origen natural, para proteger del daño causado por los RL, lo que ha sido motivo de diversas estrategias de prevención de varias enfermedades (Valko y cols., 2007; Fang y cols., 2002). Por lo que, en ausencia de fármacos hepatoprotectores en la medicina moderna, un gran número de fitoquímicos y extractos de plantas utilizadas en la medicina tradicional, o que son parte de la dieta humana, con propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras, pueden ser una alternativa en el tratamiento de las mismas (Novo y Parola 2008; Gurtsevitch 2008; Conde de la Rosa y cols., 2008; Farrell y Larter 2006; Albano 2006; Otani y cols., 2005). En México la planta conocida como Arnica (*Heterotheca inuloides*), tiene bajo costo y accesibilidad en el mercado además de que ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional, es útil por sus propiedades analgésica, antihistamínica, antibacteriana, cicatrizante, antirreumática y antiinflamatoria (Jerga y cols., 1990; Kubo y cols., 1994; 1996, Haraguchi y cols., 1996, 1997; Gené y cols., 1998; Segura y cols., 2000; Delgado y cols., 2001). Sin embargo, no se conoce lo suficiente respecto a su mecanismo de protección por lo que sería útil conocer y caracterizar su capacidad antioxidante específica sobre las especies de oxígeno reactivo *in vivo* e *in vitro*. De igual manera, el estudio de sus propiedades hepatoprotectoras en un modelo *in vivo*.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las propiedades antioxidantes específicas del árnica (*Heterotheca inuloide*), sobre las especies de oxígeno reactivo y el efecto hepatoprotector de los extractos acetónico, metanólico y algunos metabolitos aislados de esta planta

4.1 Objetivos particulares

- 1.- Obtener los extractos acetónico y metanólico de *Heterotheca inuloides*.
- 2.- Mediante técnicas espectrofotométricas determinar y comparar el valor de IC₅₀ de los extractos acetónico y metanólico estudiando las siguientes especies reactivas: radical ABTS⁺•, radical DPPH•, radical H₂O₂, OH•, ¹O₂, HOCl, ONOO⁻ y de algunos metabolitos con los IC₅₀ de antioxidantes de referencia.
- 3.- Conocer si el extracto de árnica (acetónico o metanólico y algunos metabolitos), protegen del daño inducido por las especies reactivas de oxígeno en un modelo animal inducido con CCl₄ mediante:
 - 3.1 La actividad antioxidante del árnica midiendo la lipoperoxidación, en el modelo animal inducido con CCl₄.
 - 3.2 Cuantificando las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GSSG, GSH, GPx.
 - 3.3 Cuantificando el daño mediante técnicas histológicas con Hematoxilina & Eosina, tinción de Acido peryódico de Schiff (PAS), y marcadores de estrés oxidante como 4 -hidroxinonenal y 3-nitrotirosina.

5. MATERIALES

5.1 Reactivos

El piruvato de sodio, el dimetil tiourea (DMTU), el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), el L-Ácido ascórbico, la L-histidina, la sal sódica de naranja de xilenol, el N, N-Dimetil-4-nitrosoanilina (DMNA), el sulfato amoniacal de hierro (II) hexahidratado, el hidroxitolueno butilado (BHT), el 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el suero de albúmina bovina (BSA), la catalasa de hígado de bovino, el dióxido de manganeso (MnO_2), el glutatión forma reducida (GSH), el glutatión oxidado (GSSG), la DL-Penicilamina, el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), la DL-penicilamina, el dimetil sulfóxido (DMSO), el nitrito de potasio (KNO_2), el azul de nitrotetrazolio (NBT) y la xantina oxidasa, la hipoxantina, el 3,3-diaminobenzidina, la nicotina adenin dinucleótido fosfato (NADPH), el trimetoxipropano, el N-oxido-5,5-dimetil-1-pirrolin (DMPO), el 2,4-dinitrofenilhidrazina, el 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). El Hidróxido de sodio (NaOH), el fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4), el fosfato de sodio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), el hipoclorito de sodio (NaOCl), la solución al 5% de cloro disponible y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en solución al 30%, el etanol absoluto, el ácido sulfúrico (H_2SO_4), el metanol, el ácido etilendiamina tetracético disodio (EDTA), el sulfato de amonio y cloruro de cobre de J. T Baker (México, D.F.) El Persulfato de potasio, el carbonato de sodio (Na_2CO_3) y el formaldehído de Mallinckrodt (París, KY, USA). Dihidrorrodamina (DHR) 123 de Cayman Chemical (Ann Arbor, Mi, USA). La Azida de sodio de Merck (México, D.F.). El Anticuerpo policlonal anti-3NT de conejo, (Lake Placid, NY, USA). El Anticuerpo monoclonal anti-4HNE de ratón de Oxis International Inc. (Portland, OR, USA). El Anticuerpo anti IgG-conejo con peroxidasa, el anticuerpo anti IgG de rata con peroxidasa Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, England). El

Anticuerpo anti-cabra con peroxidasa Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Todos los reactivos fueron grado analítico.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Obtención e identificación de *Heterotheca inuloides*.

La *Heterotheca inuloides* fue colectada en Zacapoaxtla, Puebla, México, el material fue clasificado por la Biol. Myrna Mendoza Cruz del Departamento de Plantas Medicinales del Jardín Botánico (Instituto de Biología, UNAM), un ejemplar de la misma fue depositado en la colección del Herbario Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social de la Ciudad de México clasificado como: (Myrna Mendoza C 15, 375) .

6.2 Preparación de los extractos.

La parte aérea de la planta (inflorescencia) (2kg) se cortó y seco en la cámara de secado a 37°C, se depositó en recipientes de vidrio con capacidad de 2L y se le agregó 1.5L de acetona, después de 24 hrs, se coló y se colectó el sobrenadante obtenido, agregándole nuevamente acetona al triturado, este procedimiento se repitió 3 veces. Este mismo triturado se utilizó para el extracto con metanol, llevándose a cabo la misma metodología. Ambos sobrenadantes obtenidos se colocaron en rotovapores para evaporar los solventes y obtener los extractos puros, 12 y 15 g de los extractos fueron obtenidos respectivamente (Delgado y cols., 2001).

Los metabolitos aislados y caracterizados fueron donados por el Dr. Guillermo Delgado Lamas del Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

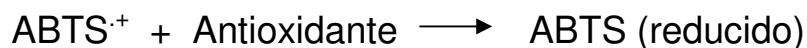
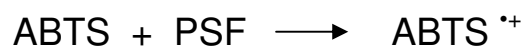
Para los experimentos *in vitro* el extracto acetónico se disolvió en metanol absoluto, el extracto metanólico y los metabolitos en amortiguador de fosfatos pH 7.2.

6.3 Metodologías *in vitro*

6.3.1 Determinación de la actividad atrapadora de ABTS.

Se utilizó la metodología desarrollada por Re y cols (1999), el radical $ABTS^{\bullet+}$ se obtuvo después de la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (PSF) (2.45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}C$), y en la oscuridad durante 16 h. El prerradical fue generado por la oxidación de ABTS con el PSF dando lugar a la formación de un cromóforo (verdeazul), que al ser puesto en contacto con el antioxidante, éste le cederá un hidrógeno para ser reducido. Una vez formado el radical $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 ($\pm 0,1$) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Se añadió 20 μL de las muestras de los diferentes extractos, a 980 μL de dilución del radical $ABTS^{\bullet+}$, se determinó la absorbancia a 754 nm. El antioxidante sintético de referencia, fue el ácido ascórbico (500 mM)

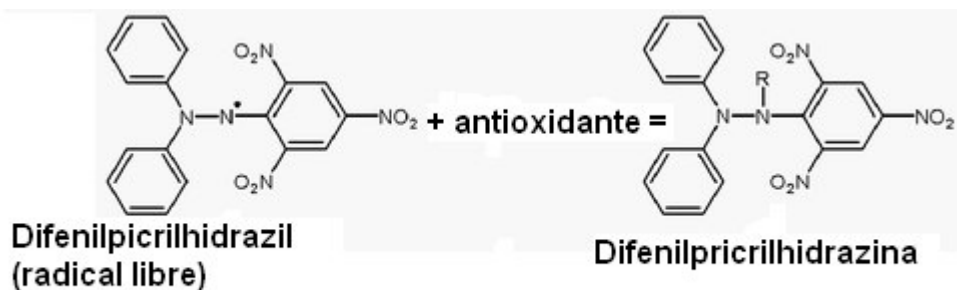
Reacción 18.



6.3.2 Determinación de la actividad atrapadora de DPPH.

Este método, desarrollado por Brand-Williams cols (1995) y modificado por Kim y cols (2002), se basa en la reducción del DPPH radical libre, que por su electrón desapareado muestra una absorción máxima a 517 nm. En presencia de un antioxidante la absorción disminuye (reacción 19). El antioxidante de referencia fue el ácido ascórbico (500 mM)

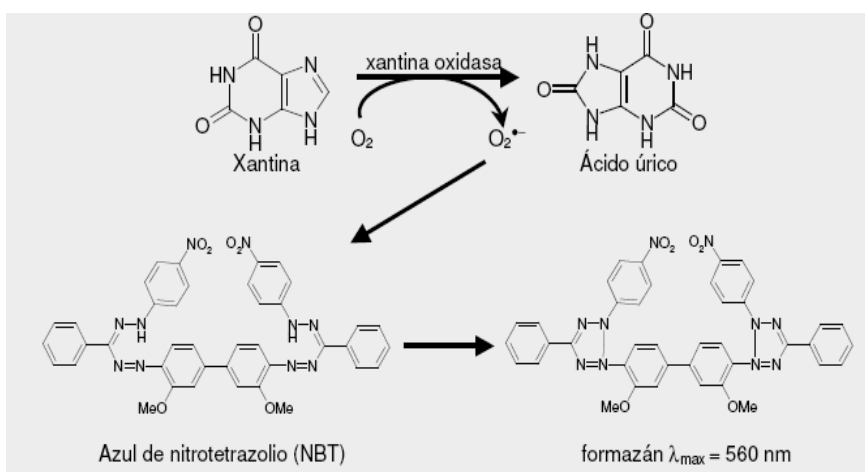
Reacción 19



6.3.3 Determinación de la actividad atrapadora de $O_2^{\cdot-}$.

FUNDAMENTO: La xantina oxidasa cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico, generándose además $O_2^{\cdot-}$ el cual reduce al NBT formándose un producto insoluble colorido (formazán) que absorbe a una longitud de onda de 560 nm

Reacción 20



Es importante que el compuesto a analizar no afecte la actividad de la xantina oxidasa, lo que evitaría la generación del $O_2^{\cdot-}$ y la reducción del NBT. Por lo que se mide la

generación de ácido úrico a una longitud de onda de 295 nm (Floriano-Sánchez y cols., 2006).

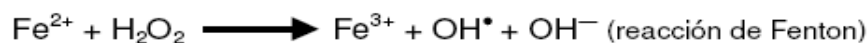
Metodología

El sustrato (800 µL) de la reacción fue preparado con xantina 90 µM, carbonato de sodio 16 µM, NBT 22.8 µM, amortiguador de fosfatos 18 mM pH 7.0 y se mezcló con 100 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 (tubo control: 0% atrapamiento) o con 100 µL de diferentes concentraciones de los extractos o los metabolitos. La reacción se inició con la adición de 100 µL de una solución (168 U/L) de xantina oxidasa. Se leyó la absorbancia a 295 nm (para la formación de ácido úrico) y a 560 nm (para la formación de formazán) cada minuto durante 3 min. Se utilizó el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) como atrapador de $O_2^{\bullet -}$.

6.3.4 Determinación de la capacidad atrapadora de H_2O_2 .

FUNDAMENTO: El H_2O_2 presente en el medio de reacción oxida al ión ferroso (Fe^{2+}) a su forma férrica (Fe^{3+}) el cual se une a la sal sódica de naranja de xilenol y forma un complejo colorido que absorbe a una longitud de onda de 560 nm. Si la muestra presenta un efecto atrapador ante el H_2O_2 entonces el Fe^{2+} no se oxidará y por lo tanto no habrá Fe^{3+} que reaccione con la sal sódica de naranja de xilenol y la formación del complejo colorido disminuirá respecto al control (Floriano-Sánchez y cols., 2006) (reacción 21).

Reacción 21



Metodología

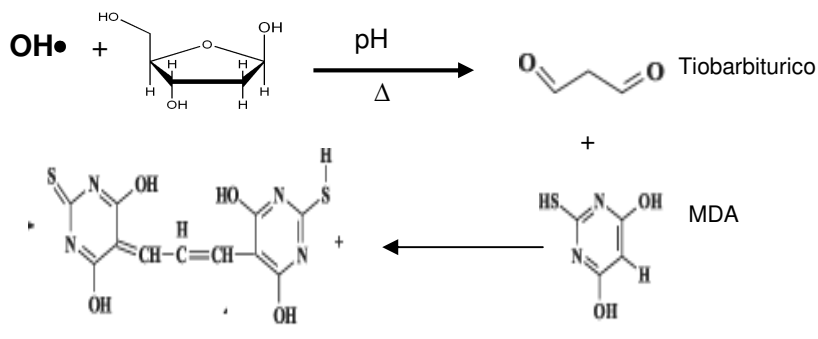
Una solución de 75 μM de H_2O_2 se mezcló (1:1 v/v) con agua destilada (control: 0% atrapamiento) o con diferentes concentraciones de los dos extractos y de los metabolitos a probar, el volumen final de la mezcla fue 100 μl y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron 0.9 ml del reactivo de FOX. Para preparar el reactivo de FOX se mezclan 9 volúmenes de hidroxitolueno butilado 4.4 mM en metanol grado HPLC con 1 volumen de una solución de naranja de xilenol 2.56 mM y sulfato ferroso amoniacal en H_2SO_4 0.25 M. Se agitó el contenido y se incubó por 10 min, después se centrifugó a 15000 x g por 10 min y la absorbancia se comparó contra el blanco que contenía metanol. Se utilizó piruvato de sodio, como compuesto de referencia.

6.3.5 Determinación de la capacidad atrapadora de OH^\bullet .

FUNDAMENTO: Los OH^\bullet generados por la reacción del complejo hierro/EDTA con H_2O_2 en presencia de ácido ascórbico, descomponen a la desoxirribosa formando una mezcla compleja de productos que con calentamiento a pH ácido, forman el malondialdehído y es detectado por su capacidad de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA); formando así un cromógeno que absorbe a una longitud de onda de 532 nm (reacción 22). Al adicionar atrapadores de OH^\bullet compiten con la desoxirribosa por los radicales producidos y por lo tanto la formación del cromógeno disminuye (Halliwell y cols., 1987; Aruoma y cols., 1989).

Reacción 22.

- 1.-Generación de OH^\bullet : $\text{Fe}^{2+} - \text{EDTA} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} - \text{EDTA} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$
- 2.- Degradación de 2-desoxirribosa por OH^\bullet



Metodología

La mezcla de reacción contenía ácido ascórbico 0.2 mM, desoxirribosa 0.56 mM, H_2O_2 1 mM, amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4, EDTA 0.208 mM/ FeCl_3 0.2 mM, se incubó a 37°C por 1 h. Después se añadió 1 mL de la solución TBA (26 mM)/HCl (2.08%)/ácido tricloroacético (15%)/Deferoxamina mesilato (0.33 mM) mas las diferentes concentraciones de los extractos o metabolitos a probar y esta mezcla se calentó a 100°C durante 10 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 532 nm. Se utilizó dimetiltiurea como compuesto de referencia (Floriano-Sánchez y cols., 2006).

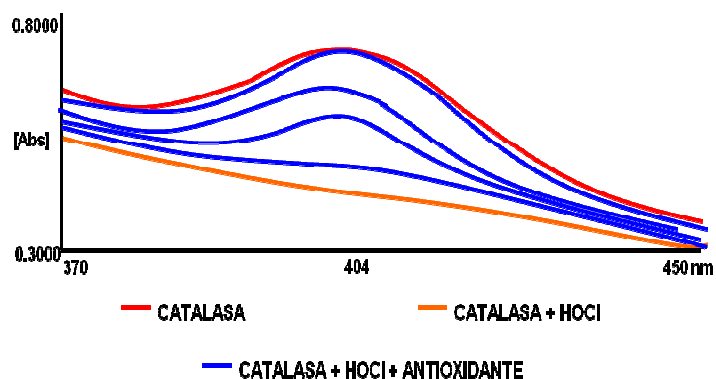
6.3.6 Determinación de la capacidad atrapadora de HOCl.

FUNDAMENTO: Este ensayo involucra un análisis espectral de la enzima catalasa en presencia de HOCl el cual inactiva a la enzima antioxidante y cambia su espectro por la destrucción del grupo hemo y la disminución del pico de catalasa a 404 nm.

Metodología

Una solución de 49.8 μM de catalasa bovina a una concentración final de (16.6 μM) se mezcló con 18 mM HOCl (6 mM) y con las diferentes concentraciones de las muestras a estudiar o con el compuesto de referencia. El espectro de la catalasa sola, catalasa+HOCl o catalasa +HOCl + extractos o metabolitos o el compuesto de referencia se registraron obteniéndose las densidades ópticas (DO) a 404 nm. La DO de la catalasa sola menos la DO de catalasa+ HOCL se consideró como el 100% de degradación de la catalasa (0% de actividad reductora) y las diferencias de la catalasa sola menos la DO de la catalasa +HOCl en presencia de extractos o metabolitos o el compuesto de referencia se compararon contra este valor (Fig 4). El compuesto de referencia utilizado fue el ácido ascórbico (Pedraza-Chaverri J y cols., 2007).

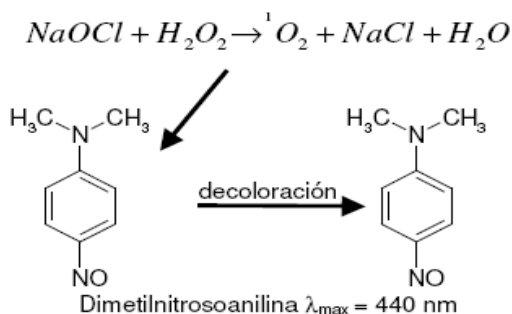
Figura. 4 Espectro de la reacción de catalasa en presencia de HOCl, HOCl+CAT, y CAT sola



6.3.7 Determinación de la capacidad atrapadora de 1O_2 .

FUNDAMENTO: El 1O_2 generado a partir de NaOCl y H_2O_2 , produce la disminución de absorbancia (decoloración) del compuesto N,N-dimetil-p-nitrosoanilina (DMNA) utilizado como atrapador selectivo de 1O_2 (reacción 23). Si el compuesto a analizar tiene una capacidad atrapadora ante 1O_2 la DMNA no se decolorará.

Reacción 23



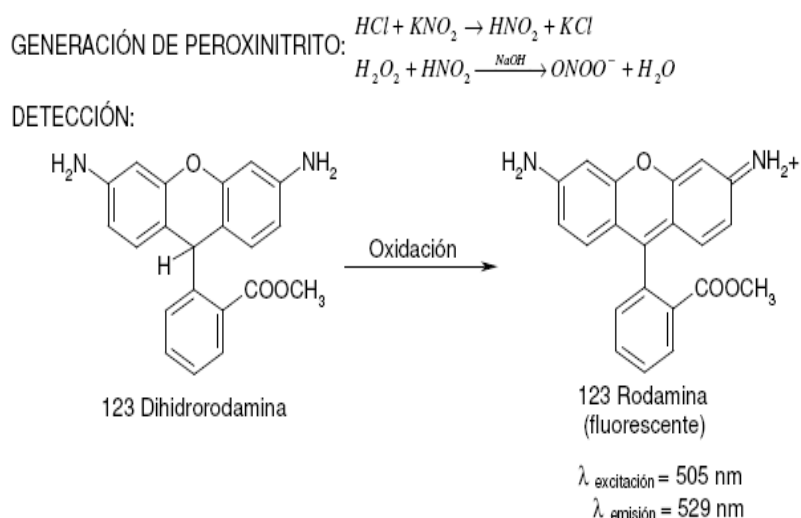
Metodología

La producción de 1O_2 por NaOCl y H_2O_2 fue determinada como se describe Medina-Campos y cols (2007), en donde el DMNA fue utilizado como aceptor de 1O_2 . La decoloración en la reacción fue monitoreada espectrofotométricamente a 440 nm. La mezcla de reacción contenía amortiguador de fosfatos 45 mM (pH 7.1), 10 mM histidina, 10 mM NaOCl, 10 mM H_2O_2 , 50 μM DMNA, y 0.1 mL de extractos o metabolitos de *H. inuloides* o el compuesto de referencia. El volumen de reacción fue de 2.0 mL y se incubó a 30°C for 40 min. La extinción de 1O_2 se determina midiendo el decremento en la absorbancia de DMNA a 440 nm (t_0). La eficiencia relativa de capacidad reductora (% inhibición de la producción de 1O_2) de extractos o metabolitos o el compuesto de referencia se estimó por las diferencias en la absorbancia del DMNA con y sin la adición de las muestras a probar o el compuesto de referencia. El GSH fue el compuesto de referencia utilizado (Floriano-Sánchez y cols., 2006; Medina-Campos y cols., 2007).

6.3.8 Determinación de la capacidad atrapadora de ONOO^- .

FUNDAMENTO: El ONOO^- provoca la oxidación de la DHR 123 produciendo la rodamina 123 que es un compuesto fluorescente y tiene una λ excitación= 505 nm y λ emisión= 529 nm (reacción 24). Si la muestra presenta propiedades antioxidantes, se disminuirá o anulará la formación de la rodamina 123.

Reacción 24



Metodología

La síntesis del peroxinitrito fue previamente descrita (Floriano-Sánchez y cols., 2006). En un baño de hielo se realizó la reacción entre 5 mL de una solución ácida de H_2O_2 0.7 M (en HCl 0.6 M) mezclada con 5 mL de KNO_2 0.6 M. La reacción se detiene añadiendo 5 mL de NaOH 1.2 M frío. El H_2O_2 residual de la mezcla se removió pasando la solución a través de una columna de MnO_2 previamente lavada con NaOH 1.2 M. La solución de ONOO^- se guarda protegida de la luz a -80°C hasta su uso; 50 μM de la solución de DHR 123 fue preparada en una solución stock 28 mM en DMSO. La solución fue protegida de la luz a 4°C durante el ensayo. La mezcla de reacción contenía 5 μM DHR-

123, 0.1 mM DTPA, las diferentes concentraciones de extractos o metabolitos o el compuesto de referencia y 25 μM ONOO^- . La densidad óptica fue registrada a 500 nm. La habilidad de las muestras para atrapar al ONOO^- fue comparada con penicilamina. Para realizar las mediciones espectrofotométricas se usó un espectrofotómetro Beckman Coulter, modelo DU-640.

6.3.9 Definición del valor de IC_{50} .

La capacidad antioxidante se expresó como IC_{50} que es el valor de la concentración de los extractos, compuestos bioactivos o del compuesto de referencia (mg) que es capaz de atrapar o inhibir el 50% de las ROS presentes o generadas en cada ensayo. Mientras más pequeño sea el valor de IC_{50} más eficaz será la capacidad de antioxidante del compuesto (Floriano-Sánchez y cols., 2006; Medina-Campos y cols., 2007).

6.3.10 Determinación de polifenoles.

La cantidad total de polifenoles en ambos extractos fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu (Ainsworth y Gillespie 2007). Un volumen de 0.1 mL que contenía 100 mg del extracto de la planta se mezcló con 100 μL del reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla fue incubada por 1 min a temperatura ambiente y se le agregó 300 μL de carbonato de sodio (200 g/L). La mezcla se incubó por 15 min. a 50°C y fue enfriada en agua. La absorbancia fue registrada a 765 nm en un espectrofotómetro (Modelo 2000 Compliant, Helios α , Cambridge, UK). El total de polifenoles fue expresado como mg de equivalentes de catequina/g de extracto después de la extrapolación en una curva estándar obtenida utilizando $\alpha(+)$ catequina.

6.3.11 Determinación de flavonoides.

El contenido total de quercetina de los extractos acetónico y metanólico se determinó utilizando cloruro de aluminio (AlCl_3) (Zhishe y cols., 1999). El extracto de la planta (0.1 mL) se adicionó a 0.3 ml agua destilada seguida por nitrito de sodio NaNO_2 (0.03 mL, 5%). Después de 5 min a 25 °C se le adicionó AlCl_3 (0.03 mL, 10%). Se incubó la mezcla 5 min a temperatura ambiente, y se le adicionaron 0.2 mL 2mM NaOH. La absorbancia fue registrada a 510 nm en un espectrofotómetro (Modelo 2000 compliant. Helios α , Cambridge, UK9). El total de quercetina fue expresado como mg de equivalentes de quercetina /g de extracto después de la extrapolación en una curva estándar obtenida utilizando quercetina como estándar.

6.4 Determinación de la actividad atrapadora del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) por espectrometría de resonancia paramagnética electrónica (EPR).

La técnica se basa en las propiedades magnéticas de los electrones desapareados en su ambiente molecular. El atrapamiento del espín es un método en el cual los radicales se pueden unir a través de los dobles enlaces de los agentes químicos de captura (DMPO, POBM) para formar un radical secundario más estable llamado aducto espín. Este aducto espín puede someterse a la resonancia paramagnética electrónica (EPR). Por lo tanto, su captura ofrece la oportunidad no sólo para detectar los radicales, sino también para caracterizar parcialmente los tipos de radicales formados (Nakano y cols., 2000).

El $\text{O}_2^{\cdot -}$ fue generado por la reacción de la xantina oxidasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico (Floriano-Sánchez y cols., 2006). El sustrato (800 μL) de la reacción fue preparado con xantina 90 μM , carbonato de sodio 16 μM , NBT 22.8 μM , amortiguador de fosfatos 18 mM pH 7.0 y se mezcló con 100 μL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 (tubo control: 0% atrapamiento) o con 100 μL con una concentración de (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los extractos y 80 μL de 5,5-dimetilpirrolin-N-óxido

(DMPO). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 25 unidades de la xantina oxidasa. Después de 2 minutos de incubación, se midió el aducto formado DMPO-OOH, con un espectrómetro de EPR (Bruker Eleksys E500, Alemania). Los espectros de EPR se registraron a 21 °C con el campo fijo en $3,470 \pm 50$ Gauss, frecuencia de modulación de 100,000 Gauss, amplitud de modulación 0.0005 Gauss, tiempo de respuesta 0.0025 s, tiempo de barrido 0.0102 s, potencia de microondas de 10 mW. Los espectros de las muestras se toman respecto a una señal espectral de referencia. La señal de referencia utilizada corresponde al aducto formado por el DMPO-OOH y el $O_2^{\cdot\cdot}$ (Sanders y cols., 1994).

6.5 Metodologías para experimentos *in vivo*

6.5.1 Modelo de hepatotoxicidad en ratas expuestas a tetracloruro de carbono (CCl_4).

Los protocolos experimentales para el manejo y uso de animales de laboratorio y eliminación de residuos biológicos fueron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y (NOM-087-ECOL-1995) respectivamente. Se utilizaron ratas Wistar macho de 180-220 g los animales fueron divididos en 7 grupos con 3 ratas cada uno, se mantuvieron en cajas de acrílico en condiciones constantes de temperatura ($21^{\circ}\pm 1$ C), humedad relativa (50- 60%) e iluminación (12 h luz/oscuridad). Aire filtrado (5 mm de partículas) con intercambio de 18 veces/h. Los animales se les proporcionó una dieta comercial estándar (Harlan 2018S Teklad dieta global esterilizado, Harland Teklad, Madison, WI, EE.UU.) y agua filtrada. El tratamiento duró 6 días, el daño hepático se indujo con CCl_4 disuelto con aceite de oliva 1:1 (v / v). El Grupo 1 recibió el aceite de oliva (0,1 ml / kg) vía oral (vo) durante seis días (grupo A.O). Grupo 2 recibió amortiguador de fosfato pH 7,4 (0,1 ml / kg) (vo) durante seis días (grupo A.F). Grupo 3 recibió 100 mg / kg de extracto acetónico (vo), durante seis días (grupo E. Ac). Grupo 4 recibió 100 mg / kg

de extracto metanólico (vo) durante seis días (grupo E. Me.). Grupos de 1 a 4 fueron considerados como grupos de control negativo. Grupo 5 fue inyectado con CCl₄/ aceite de oliva (1.5 ml / kg) vía intraperitoneal (ip) los últimos tres días del experimento. Grupo 6 recibió extracto acetónico 100 mg / kg por (vo) durante 6 días en combinación con CCl₄/ aceite de oliva (1.5 ml / kg ip) durante los últimos tres días de tratamiento. Grupo 7 recibieron extracto metanolico 100 mg / kg vía oral durante 6 días en combinación con CCl₄/ aceite de oliva (1.5 ml / kg ip) durante los últimos tres días de tratamiento. En un segundo experimento, se repitieron los grupos 2, 4 y 7 junto con los siguientes dos grupos: un grupo de animales recibieron quercetina (100 mg / kg) (vo) y otro grupo de ratas expuestas a la combinación de quercetina 100 mg / kg (vo) y 1.5 mL CCl₄ / kg (ip). Después de 48 hrs, y concluidos los tratamientos, los animales fueron anestesiados con fentobarbital (0.6 µL/kg) y se obtuvo la sangre por punción cardíaca. El hígado se extirpó de inmediato y una porción se fijó por inmersión en una solución de formalina y el resto se almacenó a -70 ° C para el análisis de las enzimas antioxidantes.

6.5.2 Preparación de los homogenados.

El tejido hepático se homogeneizó en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.0, con Tritón X-100 al 0.1%, con un politrón (Brinkmann Polytron PT 2000 (Westbury, NY, EE.UU.) y se centrifugó a 19,000 x g durante 10 min. El sobrenadante se utilizó para la determinación de proteína total (Lowry y cols 1951) y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, y glutatión transferasa (GST) (Pedraza Chaverri y cols., 2005)

6.5.3 Determinación de las actividades aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), como marcadores de daño hepático.

Las muestras de sangre de cada animal se mantuvieron durante 45 min a temperatura ambiente. El suero se separó por centrifugación a 600 x g durante 15 min y las muestras fueron almacenadas a -20°C. Las actividades de AST y ALT se midieron por la adaptación de la metodología recomendada por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) (Bergmeyer y cols., 1978), con un autoanalizador (Dimensión AR, Dade Behring Inc., Newark, DE, USA).

6.5.4 Histopatología.

El tejido hepático se fijó por inmersión en una solución de formalina al 5% (pH 7.4) y se incluyeron en parafina. Para el análisis histológico, las secciones (3 micras) se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) o con ácido peryódico de Schiff (PAS) para demostrar polisacáridos, mucopolisacáridos neutros y glicoproteínas de las membranas del hepatocito. El perfil histológico de los lóbulos del hígado se seleccionaron al azar (100 campos) de 3 ratas por grupo experimental, utilizando el software KS-300 (Carl Zeiss, Jena, Alemania), se obtuvo el porcentaje de las áreas dañadas con alteraciones histopatológicas observadas con un objetivo 100X.

6.5.5 Inmunohistoquímica con 4-hidroxinonenal (4-HNE) y 3-nitrotirosina (3-NT).

El 4-HNE es el marcador de la peroxidación lipídica más utilizado y reconocido, se cree que es responsable en gran medida de los efectos producidos por el estrés oxidante. El 4-HNE reacciona con los productos tóxicos de la lipoperoxidación o con los grupos

sulfhidrido de las proteínas (Zarkovi N 2003; Uchida K y cols., 1993). Las proteínas son polímeros de aminoácidos que ejecutan la mayor parte de las funciones vitales de las células, por otra parte los residuos de aminoácidos más susceptibles de sufrir oxidación, nitración o cloración son cisteína, tirosina, metionina y triptófano. De todos estos, el que sufre con más frecuencia los efectos del peroxinitrito y ácido hipocloroso es la tirosina, dando lugar en la mayoría de los casos a tirosinas nitradas o cloradas, relacionadas con procesos inflamatorios. La formación de 3-nitrotirosina se usa como biomarcador de la producción de peroxinitrito por ser un producto estable en situaciones de estrés oxidante (Kondo S y cols., 2002; Sanz-Camenol P y cols., 2002).

Para el análisis inmunohistoquímico se obtuvieron secciones de hígado (3 mm), se desparafinaron y se calentaron en solución de Declere (Cell Marque, Hot Springs, Arkansas, EE.UU.) para desenmascarar sitios antigénicos; la actividad endógena de la peroxidasa se disminuyó con 0.03% H₂O₂ en metanol absoluto. Los cortes de hígado se incubaron por 12 h a 4°C con una dilución de anticuerpo primarios 1:200 anti 4-HNE o anti 3-NT dilución 1:70 en amortiguador de fosfatos (pH 7.4) (PBS). Se lavaron con PBS para eliminar los anticuerpos primarios, los cortes se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado de cabra (1:500). Los anticuerpos unidos se detectaron con avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain complejo ABC-kit) y el sustrato diaminobencidina. Después se lavó con PBS, los cortes se contrastaron con hematoxilina. Todas las secciones se incubaron en las mismas condiciones con la misma concentración de anticuerpos, por lo que la inmunolocalización fue comparable entre los diferentes grupos experimentales. Para el control negativo, se utilizó suero de cabra preinmune en lugar de los anticuerpos primarios. Todas las muestras fueron examinadas por microscopía de luz Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Para el análisis morfométrico automatizado, el porcentaje de células positivas (tinción marrón) se

determinó con un analizador de imágenes computarizado KS-300 3.0 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Este equipo detecta automáticamente las células positivas para determinar su porcentaje por campo, 100 campos al azar se estudiaron con un aumento de 400x.

Los resultados se expresaron como porcentaje.

6.6 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

6.6.1 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA (CAT).

La catalasa (CAT) es una de las enzimas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por el H₂O₂ a ninguna concentración, catalizando su conversión en H₂O y O₂, para proteger a las células del H₂O₂ generado (reacción 25)

Reacción 25



Tiene un papel importante en la adquisición de tolerancia al estrés oxidante en la respuesta adaptativa de las células. La catalasa captura el H₂O₂ antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular.

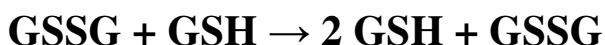
La determinación de la actividad de CAT se llevó a cabo según (Aebi 1984; Pedraza-Chaverri y cols., 2005). Se tomó 5 µl del homogenado de hígado (1:40) y se le adicionó 720 µl de peróxido de hidrógeno (30 mM) en PBS (10 mM, pH 7.0). El tubo blanco contenía 2.9 ml de PBS y 1 ml de peróxido de hidrógeno. Los tubos se leyeron a 250 nm, las unidades de catalasa se expresaron como el aumento de la descomposición de la enzima a 1 µM de peróxido de hidrógeno a 25°C. La actividad se expresó en unidades por miligramo de proteína.

El fundamento se basa en la disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno, debido a su degradación por la catalasa presente en la muestra.

6.6.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE GLUTATION REDUCTASA (GR).

Es una enzima que requiere NADPH y cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) de acuerdo con las siguientes reacciones 26 y 27:

Reacción 26



Reacción 27

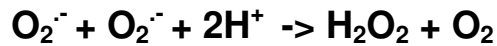


Su fundamento se basa midiendo la desaparición de NADPH a 340 nm de una mezcla de reacción que contiene GSSG, EDTA, NADPH y la fuente de la enzima (glutatión reductasa) que se encuentra en el homogenado (Carlberg I y Mannervik 1975). Se tomó 475 µl de mezcla de reacción que contenía: 0.1 M PBS pH7.6, 0.5 mM EDTA, 1.25 mM NADPH, y 0.5 mM GSSG a 25°C y se le agregaron 25 µl homogenado (1:5). Se midió durante 3 min cada minuto. La actividad se expresó en unidades por miligramo de proteína (Pedraza-Chaverri y cols., 2005).

6.6.3 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD).

La SOD constituye la primera fase de defensa antioxidante, cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, como se ilustra en la reacción 28:

Reacción 28



El peróxido de hidrógeno puede ser destruido a su vez por las actividades catalasa o glutatión peroxidasa.

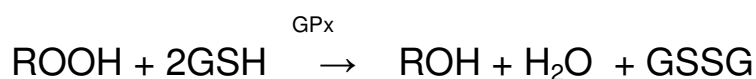
Fundamento: La actividad de SOD se mide por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) por los aniones superóxidos generados por el sistema de xantina-xantina oxidasa.

El procedimiento fue de acuerdo a Beuchamp y Fedovich (1976). Se preparó el reactivo para el ensayo de SOD el cual contenía: solución de xantina 0.122 mM, solución de EDTA 0.122 mM, solución de NBT 30.6 μM , solución Na_2CO_3 400 mM y solución de Albúmina 0.006 %, se tomaron 490 ml de reactivo de ensayo de SOD, 33 μl (1:50) del homogenado y 30 μl de xantina oxidasa, se incubó a temperatura ambiente 15 min, y se leyeron las muestras en el espectrofotómetro a 560 nm. La actividad se expresó en unidades por miligramo de proteína (Pedraza-Chaverri y cols., 2005).

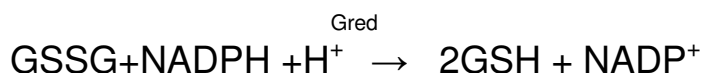
6.6.4 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA (GPx).

Fundamento: La actividad de GPx se mide de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutatión reductasa y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm por la desaparición de NADPH, la GPx al reducir los hidroperóxidos consume el glutatión reducido, que se regenera por la glutatión reductasa a partir del glutatión oxidado, en donde se consume NADPH (reacciones 29 y 30).

Reacción 29



Reacción 30



Se preparó una mezcla de reacción con PBS 50mM (pH 7.0), solución de EDTA 0.1mM, solución de azida de sodio 1 mM, glutatión reductasa (2.5 U/ml), glutatión oxidado 0.1 mM, NADPH 0.2 mM y GSH 1mM; se tomaron 800 µl de reactivo de ensayo de GPx y 270 µl PBS (tubo inespecífico) para el tubo de reacción se tomaron 30 µl homogenado (1:10), 800 µl de reactivo de ensayo de GPx, 32 µl de H₂O₂ al 30% 2.5 mM. Se agitó en un mezclador vórtex e inmediatamente se leyó a 340 nm cada minuto durante 3 min en un programa de cinética en un espectrofotómetro Beckman Coulter, modelo DU-640. La actividad se expresó en unidades por miligramo de proteína (Lawrence y Burk 1976; Pedraza-Chaverri y cols., 2005).

6.6.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE GLUTATION –S-TRANSFERASA (GST).

La glutatión S-transferasa (GST) es una familia de enzimas que catalizan la conjugación del glutatión endógeno a una variedad de compuestos electrofílicos, para hacerlos más solubles y de fácil excreción, protegiendo las macromoléculas biológicas de las consecuencias tóxicas de una reacción covalente con el xenobiótico. Estas enzimas han sido implicadas en la desintoxicación y biotransformación de muchos xenobióticos.

Fundamento: La actividad de GST, se mide por el incremento en la absorbancia del conjugado formado al reaccionar el GSH con el 1 cloro, 2, 4 dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm.

Se prepararon las siguientes soluciones: PBS 0.05mM, CDNB 0.02M y GSH 0.05 M. A un tubo de ensaye se le agregó 910 µl de PBS, GSH 20 µl, CDNB, 50 µl, 20 µl de homogenado (1:10), se agitó y se leyó en espectrofotómetro a 340nm cada min/3 min. La actividad se

expresó en unidades por miligramo de proteína (Khan N y Sultana S. 2005; Pedraza-Chaverri y cols., 2005).

6.7 Peroxidación lipídica.

El método fue por medio de la determinación colorimétrica de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica permite la detección de un cromógeno formado por el ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA), que es un producto final de la peroxidación lipídica. Se siguió la técnica reportada por Janero (1998), se homogenizó 1 gr del tejido en 50 µl de hidroxitolueno butilado 0.1 M disuelto en 1 ml de metanol absoluto y 0.95 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Se centrifugó a 3,000 x g por 10 min, se retiró la fase superior y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Se preparó el reactivo de TBA: 0.026 M de TBA, 0.211M HCl, TCA 6.66% y deferoxamina mesilada 1mM, disuelta en 42 ml de agua deionizada. La solución de TBA, se calienta a temperatura de ebullición por 30min en un baño de aceite (Thermomix 1420). Posteriormente se colocó las muestras en baño de hielo durante 5 min y se les agregó 1 ml de mezcla de butanol/piridina (15:1), se centrifugó a 3,000 g durante 15 min (Sorvall RC-5B Dupont). La fase superior se retiró y las absorbancias se leyeron a 532 nm en espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en nmol/ml MDA/mg/proteína.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.8 DETERMINACION DE PROTEINAS.

Se determinaron por el método de Lowry O y cols., 1951.

6.9 ESTADISTICA.

Todos los datos se expresan como media \pm desviación estándar y se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguido de un prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (GraphPad Prism 4.0 Software, San Diego, CA, USA.). Una pcon valor <0.05 fue considerada estadísticamente significativa.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de polifenoles.

El contenido total de polifenoles en los extractos de acetona y metanol fue de 19.35 y 50.03 mg/mL equivalentes de catequina, respectivamente. El contenido de flavonoides totales fue de 0.030 y 0.070 mg/mL de equivalentes de quercetina en los extractos acetónico y metanólico, respectivamente. Estos estudios aportan una herramienta de diagnóstico general de la capacidad antioxidante de los extractos.

7.2 Actividad de atrapamiento de los extractos de *Heterotheca inuloides*.

En el presente estudio, se investigó la habilidad reductora del extracto acetónico y metanólico para diferentes radicales libres: (radical ABTS⁺•, radical DPPH•, radical O₂⁻•, radical, H₂O₂, radical OH•, radical ¹O₂, radical HOCl y radical ONOO⁻), el análisis de los valores de IC₅₀ obtenidos mostraron que el extracto metanólico tiene una actividad reductora muy eficiente *in vitro*, excepto con DPPH• y OH•. Asimismo se observó que los extractos de *H. inuloides*, así como los compuestos de referencia utilizados atrapan en una forma dependiente de la concentración a DPPH•, ABTS⁺•, O₂⁻•, HOCl, H₂O₂, OH, ¹O₂, y ONOO⁻ (Figura 5). Los valores de IC₅₀ fueron calculados a partir de la parte lineal de la curva dosis-respuesta y se puede observar en la Tabla 2. Para ABTS⁺•, la capacidad de atrapamiento del extracto metanólico y acetónico fue 12.3 y 6.3 veces mayor que la del ácido ascórbico (Tabla 3, Figura 5A). Por otra parte, los extractos de metanol y acetona también presentaron capacidad atrapadora del DPPH• aunque fueron menos eficientes (0.60 y 0.72 veces respectivamente) que el ácido ascórbico (Tabla 3, Figura 5B). El radical O₂⁻• fue atrapado por los extractos metanólico y acetónico 2.6 y 3 veces más eficiente que el NDGA (Tabla 3, Figura 5C). La capacidad atrapadora de HOCl por los extractos metanólico y acetónico de *H. inuloides* fue significativamente mayor que la del

ácido ascórbico (2,7 y 2,5 veces respectivamente) (Tabla 3, Fig. 5D). La capacidad de atrapar de los extractos metanólico y acetónico para H_2O_2 fue de 1.8 y 1.3 veces mayor que el piruvato de sodio (Tabla 3, Figura 5E). La capacidad reductora para el OH^\bullet del extracto metanólico fue muy similar a la exhibida por DMTU, por otra parte, el extracto acetónico fue mucho menos activa que DMTU (Tabla 3, Fig. 5F). La capacidad de atrapamiento de los extractos metanólico y acetónico de *H. inuloides* para el $ONOO^-$ fue 10 veces superior a la exhibida por penicilamina (Tabla 3, Figura 5G). Los extractos de metanol y acetona fueron mayores atrapadores del oxígeno singulete (4 y 2 veces) respectivamente que el GSH (Tabla 3, Figura 5H).

Tabla 3. Capacidad atrapadora de los extractos acetónico y metanólico de *Heterotheca inuloides* y sus compuestos de referencia.

Especie	Extracto acetónico	Extracto metanólico	Compuesto de referencia	IC ₅₀ (mg/mL)
	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)
ABTS [•]	1.02±0.16* (6)	0.52±0.70* (6)	Acido Ascórbico	6.38±0.56 (6)
DPPH [•]	1.38±0.24 (6)	1.14±0.16 (6)	Acido Ascórbico	0.83±0.09 (6)
O ₂ ^{•-}	1.16±0.040* (6)	0.98±0.30* (6)	NDGA	3.02±0.45 (6)
HOCl	0.95±0.12* (6)	0.88±0.20* (6)	Acido Ascórbico	2.34±0.23 (6)
H ₂ O ₂	1.01±0.15** (6)	0.73±0.20*,& (6)	Piruvato	1.35±0.02 (6)
OH [•]	3.72±0.20* (6)	2.13±0.10**,& ^Δ (6)	DMTU	2.53±0.13 (6)
ONOO ⁻	0.26±0.30* (6)	0.24±0.10* (6)	Penicilamina	2.46±0.08 (6)
¹ O ₂	0.33±0.010* (6)	0.20±0.14* (6)	GSH	0.74±0.10 (6)

Los datos representan la media±S.D. El número de datos se encuentran entre paréntesis.
 *p<0.001, **p<0.01 vs compuesto de referencia, ^Δp<0.001 vs extracto acetónico, &p<0.05 vs extracto acetónico.

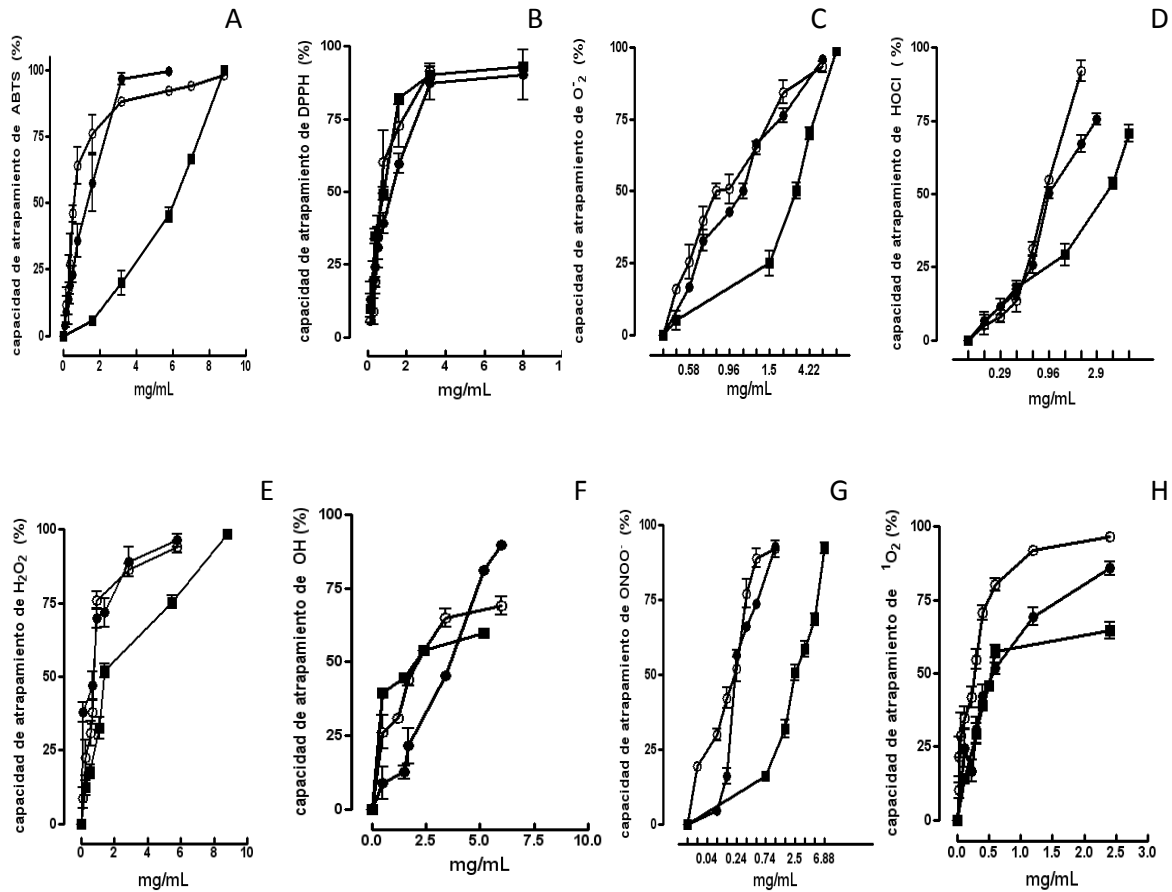


Fig. 5. ABTS^{•+} (panel A), DPPH[•] (panel B), O₂^{•-} (panel C), HOCl (panel D), H₂O₂ (panel E), OH[•] (panel F) ONOO⁻ (panel G), ¹O₂⁻ (panel H), capacidad atrapadora del extracto acetónico (●), extracto metanólico (○) y compuesto de referencia (■): ácido ascórbico para ABTS^{•+}, DPPH[•] y HOCl, NDGA para O₂^{•-}, Piruvato para H₂O₂, DMTU para HO[•], Penicilamina para ONOO⁻ y GSH para ¹O₂⁻. Cada figura es el resultado de 6 ensayos con desviación estandar.

7.3 Determinación de la actividad atrapadora del superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por los extractos de *Heterotheca inuloides* por EPR.

La formación del aducto entre el radical superóxido y el DMPO se observa como una señal muy intensa, (Fig 6, Panel 1), este mismo patrón ya ha sido reportado anteriormente (Jia Z y cols., 2008). Cuando se incubó la mezcla de reacción con el extracto metanólico y el DMPO, se observó una señal abatida del espectro de EPR (casi plana) Fig 6, Panel 2; la adición del extracto acetónico mostró una señal de EPR, de intensidad intermedia entre el control y el extracto metanólico Fig 6, panel 3. Estos datos nos indican que ambos extractos, en especial el metanólico, poseen la capacidad de inhibir la generación del $O_2^{\bullet-}$.

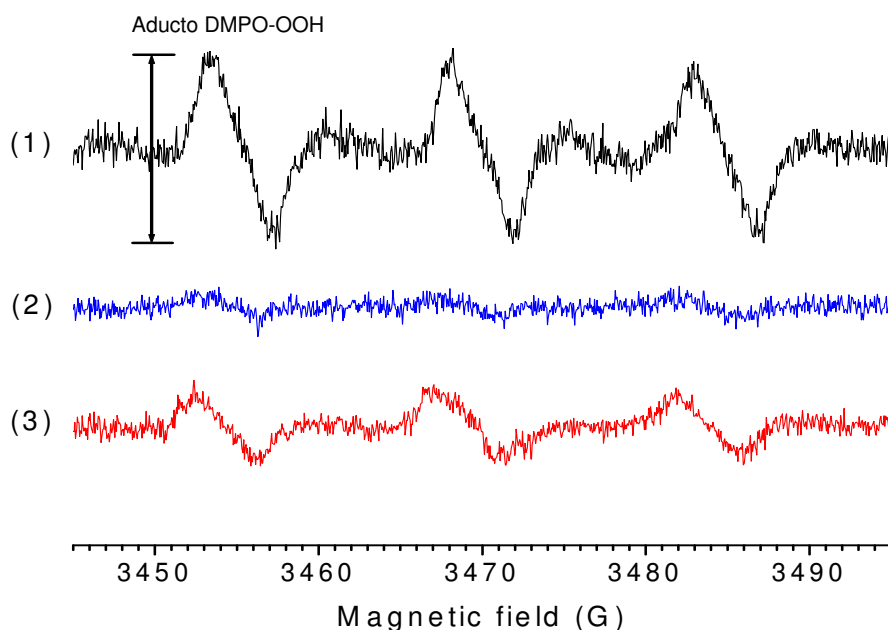


Fig. 6. Disminución de las señales del aducto $O_2^{\bullet-}$, generadas por el sistema xantina/xantina oxidasa. El aducto DMPO-OOH fue medido por espectrometría de EPR. Señal del $O_2^{\bullet-}$ generada por el sistema xantina/xantina oxidasa (panel 1). Extracto metanólico + $O_2^{\bullet-}$ (panel 2), extracto acetónico + $O_2^{\bullet-}$, (panel 3) de *H. inuloides* [0.5 $\mu\text{g/mL}$].

7.4 Actividad antioxidante de los compuestos bioactivos de *Heterotheca inuloides*.

En un intento por obtener más información sobre la naturaleza de las moléculas bioactivas relacionadas con la actividad de atrapamiento, incluimos en el análisis algunos de los metabolitos de *H. inuloides* obtenidos del extracto metanólico: (7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno, espinasteril-3-O- β -D-glucopiranosido, quercetina, D-chiro-inositol y espinasterol, previamente identificados en el extracto metanólico (Tabla 1). Nuestros resultados mostraron que estos compuestos presentan una mayor actividad de atrapamiento que los compuestos de referencia (tabla 4).

El $O_2^{\bullet -}$ es una especie de oxígeno reactivo que puede causar daño a células y al DNA. (1,2). En cuanto a la capacidad para atrapar al radical $O_2^{\bullet -}$, esta aumentó en el siguiente orden: 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno < espinasterol-3-O- β -D-glucopiranosido < quercetina < D-chiro-inositol < espinasterol; todos ellos fueron mejores antioxidantes que NDGA (Tabla 4, Figura 7A).

El HOCl es un oxidante poderoso el cual reacciona con diversas moléculas de importancia biológica. Es producido en el organismo por oxidación de los iones de Cl⁻ en el sitio de inflamación por la enzima mieloperoxidasa presente en los neutrófilos (Firuzi O y cols., 2004). En cuanto a la capacidad de atrapamiento HOCl, ésta aumentó en el siguiente orden: espinasterol-3-O- β -D-glucopiranosido < quercetina < espinasterol, todos ellos fueron mejores antioxidantes que ácido ascórbico (Tabla 4, Fig 7B). Sin embargo, la IC₅₀ de los metabolitos D-chiro-inositol y 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno excedieron los valores de las concentraciones usadas.

El H₂O₂ es un agente oxidante que inactiva a las enzimas indirectamente, generalmente por oxidación de grupos tioles esenciales (SH-), pero tiene muchos efectos tóxicos (Widmer CC y cols., 2010). La habilidad de los metabolitos para atrapar el H₂O₂ aumenta en el siguiente orden: 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno < quercetina < espinasterol-3-O-

β -D-glucopiranosido < espinasterol < D-chiro-inositol, respectivamente. En las condiciones del ensayo el piruvato se utilizó como compuesto de referencia, pero no fue eficiente su atrapamiento (Tabla 4, Fig 7C).

El OH^\bullet es un radical libre extremadamente reactivo formado en el sistema biológico y ha sido implicado en diferentes patologías (Valentão y cols., 2002). Nuestros resultados muestran que la capacidad para inhibir al radical OH^\bullet fue en el siguiente orden: D-chiro-inositol > quercetina > 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno. No obstante los valores de IC_{50} para el espinasterol y el espinasterol-3-O- β -D-glucopiranosido no se pudieron determinar (Tabla 4, Fig 7D).

El peroxinitrito (ONOO^-) se forma por la reacción entre el óxido nítrico (NO^\bullet) y el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y aunque es un fuerte oxidante, su capacidad de reacción con las biomoléculas es relativamente bajo. Se puede difundir fácilmente a través de las membrana celular (Ferrer-Sueta y Radi. 2009; Goldstein y Merényi. 2008). Los metabolitos quercetina y espinasteril-3-O- β -D-glucopiranosido fueron 11 y 12 veces más eficientes respectivamente para atrapar al ONOO^- . El 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno (1.199), el espinasterol (0.833) y el D-chiro-inositol (0.666) requirieron de concentraciones más altas (alrededor de 1mg/mL) para permitir el cálculo de los valores de IC_{50} v (Tabla 4, Figura 7E).

El radical $^1\text{O}_2$ mostró una capacidad antioxidante que disminuyó en el siguiente orden: espinasterol < 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno < espinasterol-3-O- β -D-glucopiranosido < quercetina < D-chiro-inositol (Tabla 4, Figura 7F).

Tabla 4. Capacidad atrapadora de los diferentes metabolitos obtenidos del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* y sus compuestos de referencia.

Especie	Quercetina	7-Hidroxi-4bH-3,4-dihidrocadaleno	Espinasterol	Espinasterol-3-O-β-D-glucopiranosido	D-chiro-Inositol	Compuesto de referencia	IC50 (mg/mL)
O ₂ ^{•-}	0.052±0.024 [*]	0.26±0.053 ^{*,°}	0.029±0.003 ^{*,&}	0.183±0.026 ^{*,°}	0.030±0.004 ^{*,&}	NDGA	3.023±0.3
HOCl	0.070±0.020 [*]	>1.9	0.032±0.003 [*]	4.31±0.052 ^{*,° b}	>0.666	Acido ascorbico	1.655±0.014
H ₂ O ₂	0.167±0.058 [*]	0.947±0.039 ^{*,° b}	0.057±0.005 ^{*,°+}	0.070±0.0028 ^{*,°+}	0.018±0.002 ^{*,°+, b, #}	Piruvato	1.870±0.15
OH [*]	0.258±0.015 [*]	0.689±0.015 ^{*,°}	>0.833	>4.9	0.156±0.014 ^{*,°+}	DMTU	2.396±0.120
ONOO ⁻	0.191±0.013 [*]	>1.199	>0.833	0.977±0.001 ^{*,°}	>0.666	Penicilamina	2.059±0.340
¹ O ₂	0.325±0.038 [*]	0.047±0.005 ^{*,°}	0.002±0.0003 ^{*,°+}	0.113±0.0022 ^{*,°+, b}	0.338±0.024 ^{*,+, b, #}	GSH	0.74±0.066

Los datos representan la media ± S.D. ^{*}p < 0.001 vs compuesto de referencia, ^bp < 0.001 vs espinasterol, [°]p < 0.001 vs. quercetina, [&]p < 0.05 vs quercetina ⁺p < 0.001 vs 7-Hidroxi-4bH-3,4-dihidrocadaleno, [#]p < 0.001 vs Spinasteril-3-O-β-D-glucopiranosido

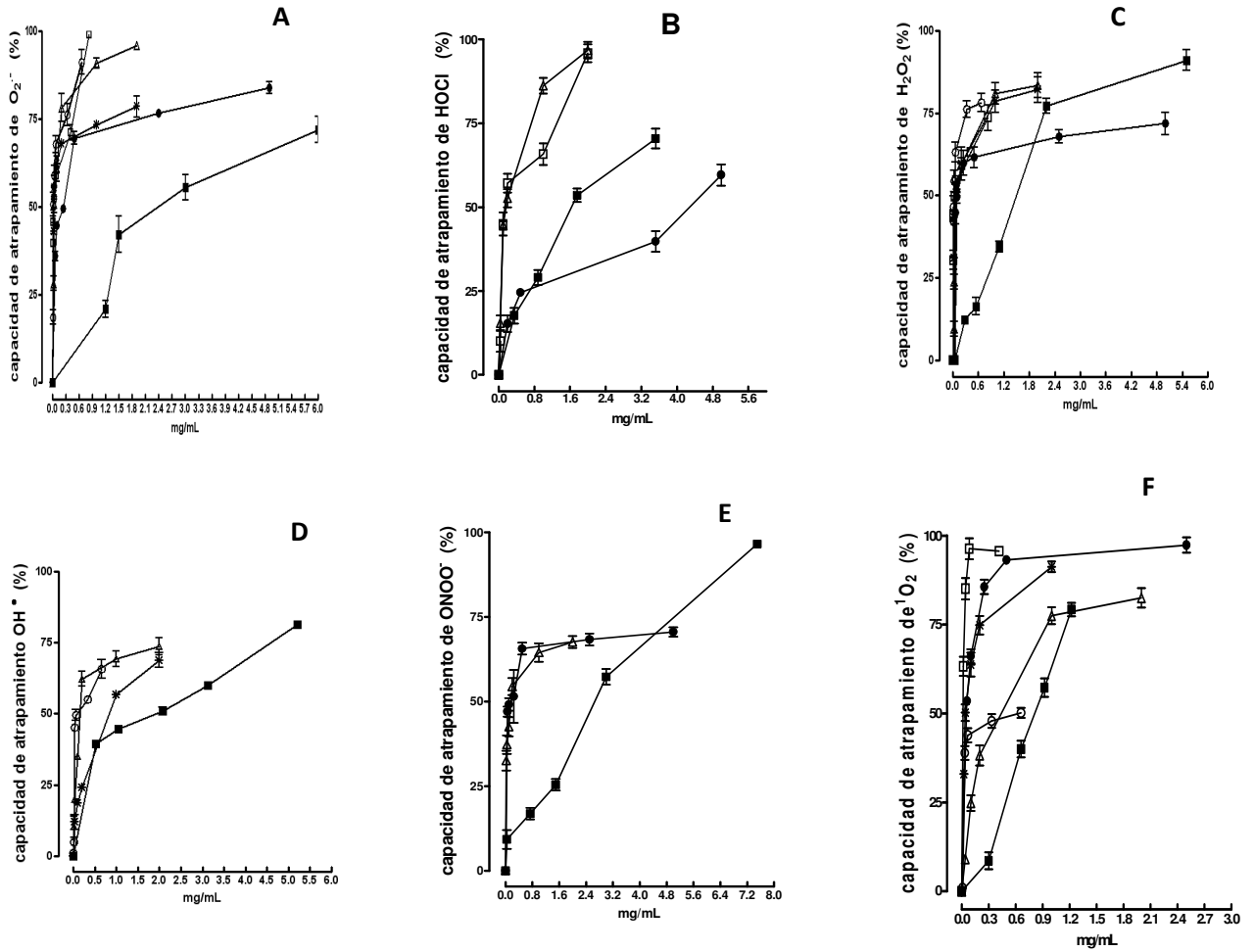


Fig. 7. Capacidad reductora de los diferentes metabolitos del extracto metanólico de *H. inuloides*. O_2^- (panel A). HOCl (panel B), H_2O_2 (panel C), OH^\bullet (panel D), $ONOO^-$ (panel E), 1O_2 (panel F). Metabolitos: quercetina (Δ), 7-hidrox-4bH-3,4-dihidro-cadaleno (*), espinasterol (\square), espinasteril-3-O- β -D-glucopiranosido (\bullet), D-chiro-inositol (\square) y compuesto de referencia (\blacksquare): NDGA para O_2^- , Piruvato para H_2O_2 , DMTU para HO^\bullet , Penicilamina para $ONOO^-$ y GSH para 1O_2 . Cada figura es el promedio de 6 ensayos y su desviación estándar.

7.5 RESULTADOS IN VIVO

7.5.1 Determinación de la actividad de aspartato aminotransferasa (AST) y alanin aminotransferasa (ALT) como marcadores de daño hepático.

La figura 8 muestra las actividades de ALT y AST en suero de los grupos de tratamiento y control en el primer experimento. Después del tratamiento CCl_4 , las actividades de ALT y AST aumentaron cinco y seis veces, respectivamente, en comparación con los grupos que recibieron aceite de oliva y solución amortiguadora de fosfato. El extracto de acetona produjo un aumento del doble de AST respecto al grupo de aceite de oliva, lo que fue un resultado inesperado que requiere de mayor investigación. La administración de cualquiera de los extractos previene el aumento de actividad de ALT y AST provocado por el CCl_4 . El extracto metanólico mostró el mayor nivel de protección reduciendo en un 70% y 75% los niveles de AST y ALT, respectivamente, a diferencia del grupo de CCl_4 , el grupo tratado con amortiguador de fosfatos mantuvo los niveles basales de AST y ALT. Estos resultados indican que ambos extractos protegen significativamente del incremento en las actividades de AST y ALT inducidas por CCl_4 .

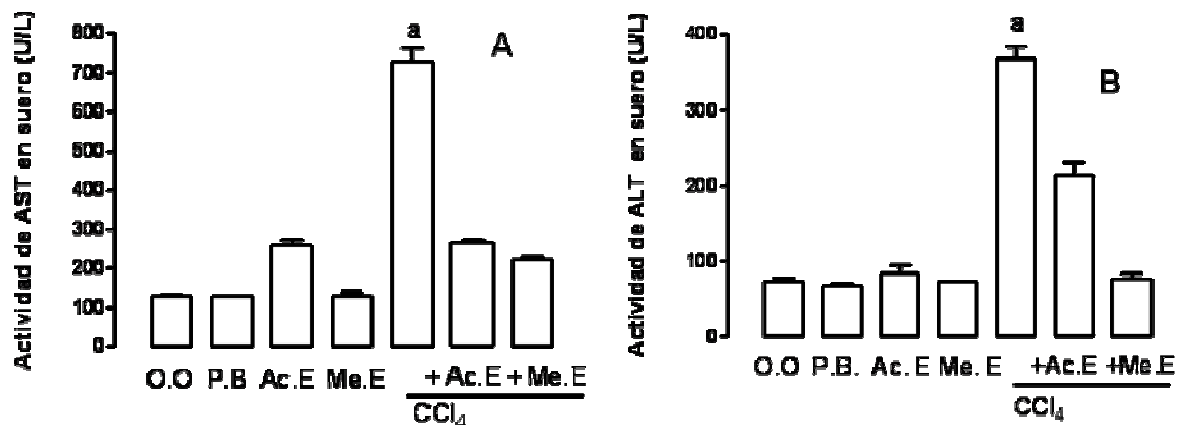


Fig. 8. Efecto de los extractos acetónico y metanólico de *H inuloides* sobre las actividades de (A) AST y (B) ALT en todos los grupos de estudio : O.O, grupo Aceite de oliva; P.B, grupo de amortiguador de fosfatos ; Ac.E, grupo de extracto acetónico; Me.E, grupo de extracto metanólico; CCl₄, grupo tratado con CCl₄; CCl₄+Ac.E, grupo tratado con CCl₄ + extracto acetónico; CCl₄+Me.E, grupo tratado con CCl₄ + extracto metanólico. Las ratas fueron sacrificadas 2 días después de la inyección con CCl₄ (1.5 mg/kg). La actividad de cada enzima fué realizada 6 veces por triplicado. Los valores representan la media±D.E de 18 determinaciones. ^ap<0.001 vs. todos los grupos.

7.5.2 Peroxidación lipídica.

Los niveles de MDA son utilizados como un marcador de daño por los radicales libres que reaccionan con los lípidos de las membranas celulares. Las mediciones de los niveles de MDA en los homogenados de hígado en el primer experimento se muestran en la Fig 9. Los niveles de MDA en el grupo de ratas tratadas con CCl₄ fueron significativamente más altos que los grupos control (A O y A F). Los grupos tratados con los extractos acetónico y metanólico tuvieron una respuesta similar al grupo tratado con A. F. Los grupos tratados con CCl₄ más extracto acetónico o metanólico inhibieron la elevación de los niveles de MDA al compararse con el grupo tratado con CCl₄.

Estos hechos muestran que cuando los radicales libres presentes exceden la habilidad de la célula para removerlos estos pueden causar la peroxidación lipídica como se observó en el grupo tratado con CCl₄, así mismo, ambos extractos son buenos atrapadores de los ROS, siendo mejor el extracto metanólico.

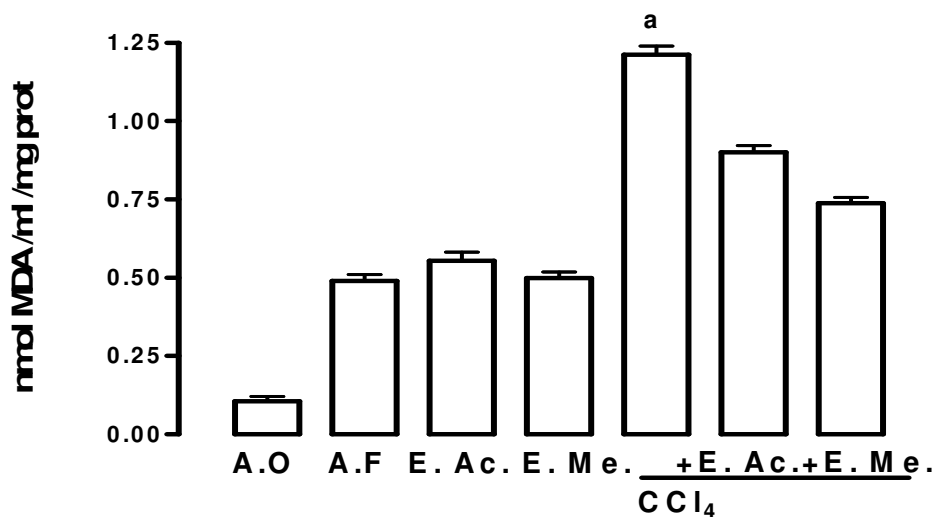


Fig. 9. Contenido de MDA en el hígado en todos los grupos de estudio: A.O, grupo Aceite de oliva; A.F, grupo de amortiguador de fosfatos ; E. Ac., grupo de extracto acetónico; E. Me., grupo de Extracto metanólico; CCl₄, grupo tratado con CCl₄; CCl₄+Ac.E, grupo tratado con CCl₄ + extracto acetónico; CCl₄+Me.E, grupo tratado con CCl₄ + extracto metanólico. Las ratas fueron sacrificadas 2 días después de la inyección con CCl₄ (1.5 mg/kg). La determinación de MDA fue realizada 6 veces por triplicado. Los valores representan la media±D.E de 18 determinaciones. ^ap<0.001 vs. todos los grupos.

7.5.3 Análisis Histopatológico.

Con el fin de investigar si la alteración de las transaminasas hepáticas obtenidas en el experimento mencionado anteriormente se reflejaban en una alteración de la integridad del tejido, se realizó un análisis histológico clásico, en rebanadas de hígado teñidos con H & E y PAS (Figura 10). Los cortes de hígado de las ratas tratadas con aceite de oliva y amortiguador de fosfato mostró la típica arquitectura lobular con microscopía de luz

(H & E y PAS, 100x), se observan las trabéculas hepáticas o cordones de hepatocitos dispuestos en hileras irregulares que se ramifican desde la periferia del lobulillo entre estas hileras irregulares de hepatocitos se observan espacios claros a manera de hendiduras que son los sinusoides hepáticos hasta la vénula central, éstos cordones se observan en forma continua. Se evidencia una gran cantidad de polisacáridos (como resultado de la tinción para PAS), que corresponde al glucógeno que se encuentra dentro de las células de los hepatocitos, se observa que la morfología es muy regular lo que nos indica un buen funcionamiento del hígado.

Los extractos acetónico y metanólico no alteraron la arquitectura normal, aunque si se observan unas pocas áreas de cordones de hepatocitos alteradas. Los hígados tratados con CCl₄ mostraron extensas zonas con necrosis centrilobular, esteatosis microvesicular y macrovesicular perivenular con fibrosis severa y necrosis. Los tratamientos con 100 mg / kg de los extractos acetónico y metanólico de *H. inuloides* durante 6 días, en el que los últimos tres días se combinaron con CCl₄, atenuaron significativamente estos cambios patológicos. En la tabla 2 se presentan los datos cuantitativos del análisis histológico en todos los grupos estudiados que confirman que los extractos acetónico y metanólico de *H. inuloides* impidieron el daño hepático inducido por CCl₄.

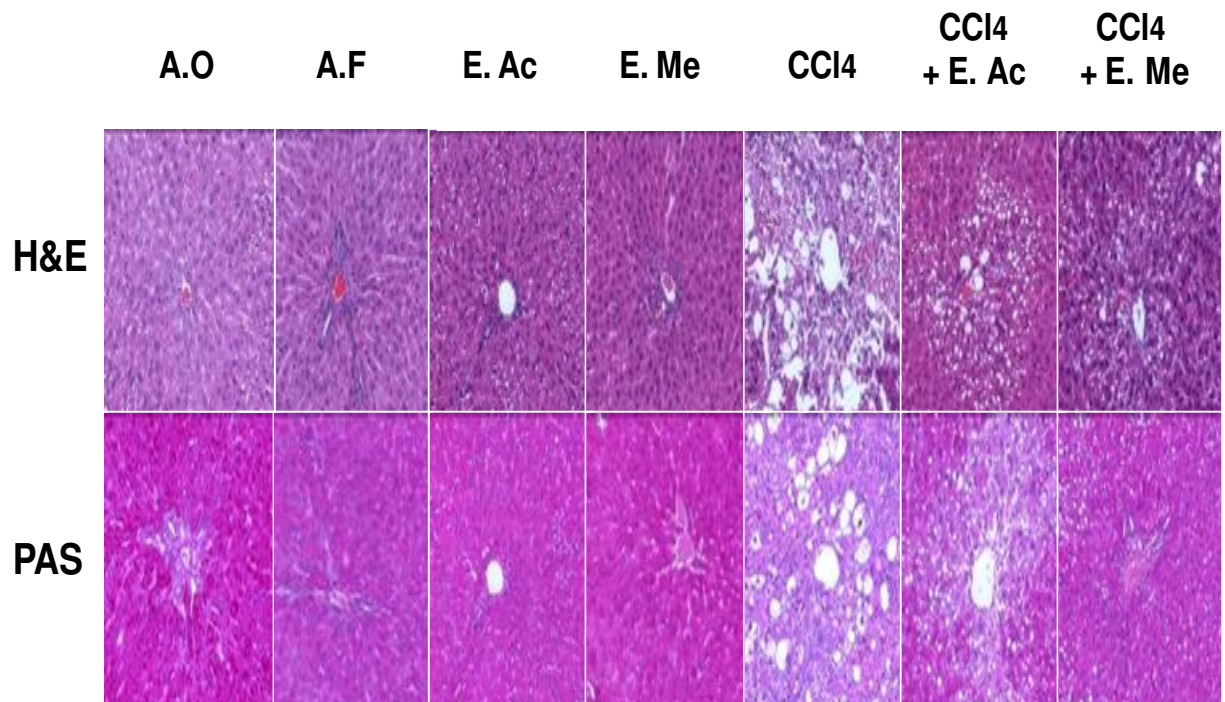


Fig. 10. Análisis histológico (H&E y PAS) de las secciones de hígado (3 μ m) de todos los grupos de estudio: A.O, grupo Aceite de oliva; A.F, grupo de amortiguador de fosfatos E. Ac, grupo de extracto acetónico; E. Me grupo de extracto metanólico; CCl₄, grupo tratado con CCl₄; CCl₄+ E Ac., grupo tratado con CCl₄ + extracto acetónico; CCl₄+ E Me., grupo tratado con CCl₄ + extracto metanólico. Las ratas fueron sacrificadas 2 días después de la inyección con CCl₄ (1.5 mg/kg). Aumento 100x.

Tabla 5. Área de daño en el hígado (%) calculada del estudio histológico con las tinciones de E&H y PAS

Grupo	E&H (%)	PAS (%)
A. O	0.0±0.0	0.0±0.0
A. F	1.0±0.0	1.0±1.0
Ext. Act	1.1±0.0	1.3±0.0
Ext. Met	1.0±0.0	1.0±0.0
CCl ₄	99.3±4.1 ^a	99.2±3.9 ^a
Ext. Act+CCl ₄	52.0±5.2	50±4.3
Ext. Met+CCl ₄	21.85±6.6	22.04±5.9

Aceite de oliva (A.O), 0.1 mL/kg; amortiguador de fosfatos (A.F), 0.1 mL/kg; extracto acetónico (Ext. Act) 100 mg/kg v.o ; extracto Metanólico (Ext. Met) 100 mg/kg p.o. Los 4 grupos fueron considerados grupo control negativo. CCl₄/aceite de oliva (1.5 mL/kg i.p.) grupo control positivo , Ext. Act +CCl₄, corresponden al extracto acetónico en combinación con CCl₄ (100 mg/kg v.o, 1.5 mL/kg i.p), Ext. Met+CCl₄, corresponden al extracto metanolico en combinación con CCl₄ (100 mg/kg v.o, 1.5 mL/kg i.p). Los valores representan la media ± D. E del porcentaje encontrado en 5 campos de estudio escogidos al azar. ^ap<0.0001 vs. contra todos los grupos.

7.5.4 Análisis Inmunohistoquímico.

A fin de explorar si el efecto de captura de radicales libres detectado en un sistema *in vitro* podría tener lugar en un sistema *in vivo*, se estimó la producción de los aductos 3-NT y 4-HNE en el hígado de las ratas expuestas a amortiguadora de fosfato, extracto metanólico y quercetina y CCl₄, CCl₄+ Ext metanólico, y CCl₄ + quercetina (Figura 11). La Inmunohistoquímica para el extracto metanólico y quercetina no mostró ningún cambio visible en el nivel de ambos marcadores celulares en comparación con sus respectivos controles. Por otra parte, la densidad de tinción positiva para 4-HNE y 3-NT fue de 99 y 24 mayor en los animales expuestos a CCl₄. La intensidad de la inmunotinción para ambos marcadores disminuyó aproximadamente un 80-90% cuando el extracto metanólico o la quercetina fueron administrados a lo largo del experimento junto con el agente tóxico (Tabla 6).

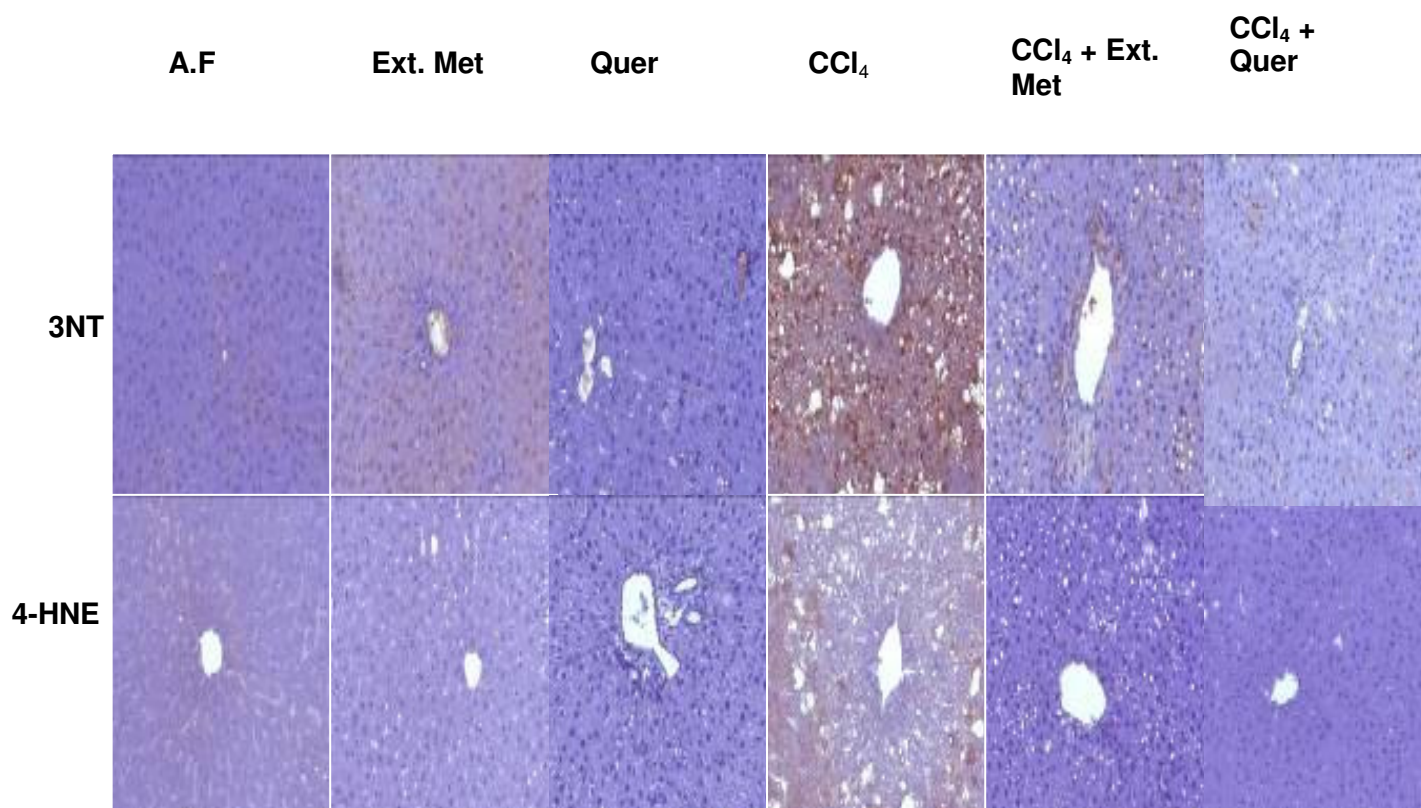


Fig. 11. Detección Inmunohistoquímica de 4-HNE y 3-NT, de las secciones de hígado (3 μ m) de todos los grupos de estudio: A.F, grupo de amortiguador de fosfatos; Ext. Met, grupo de extracto metanólico; CCl₄, grupo tratado con CCl₄; CCl₄+ Ext Met, grupo tratado con CCl₄ + extracto metabólico; CCl₄+ Quer, grupo tratado con CCl₄ + quercetina. Las ratas fueron sacrificadas 2 días después de la inyección con CCl₄ (1.5 mg/kg). Aumento 400x.

Tabla 6. Área de daño en el hígado (%) calculada del estudio inmunohistoquímico

Grupo	3NT %	4-HNE %
A.F	3.5±1.2	1.0±1.0
Ext. Met	4.3±0.7	1.0±0.0
Quercetina	2.7± 1.1	2.1±0.5
CCl ₄	85.3± 4.8 ^a	99.2±3.9 ^a
Ext. Met + CCl ₄	15.55±3.5	22.04±5.9
Quercetina + CCl ₄	7.93±2.7	12.01±1.8

Amortiguador de fosfatos (A.F), 0.1 mL/kg; 100 mg/kg p.o; extracto Metanólico (Ext. MeT) 100 mg/kg v.o. Quercetina 100 mg/kg v.o. Los 3 grupos fueron considerados grupo control negativo. CCl₄/aceite de oliva (1.5 mL/kg i.p.) grupo control positivo , Ext. Met+CCl₄, corresponde al extracto metanólico en combinación con CCl₄ (100 mg/kg v.o, 1.5 mL/kg i.p), Quer+CCl₄, corresponde a quercetina en combinación con CCl₄ (100 mg/kg v.o, 1.5 mL/kg i.p). . 3-NT: 3- Nitrotirosina; 4-HNE: 4-hidroxinonenal. Los valores representan la media ± D.E del porcentaje encontrado en 5 campos de estudio escogidos al azar de cortes de 3 animales que recibieron el tratamiento. ^ap<0.0001 vs. contra todos los grupos.

7.5.5 Análisis de las enzimas antioxidantes en el modelo hepático en las ratas expuestas a CCl₄ .

En un intento por obtener más información sobre el mecanismo de protección del extracto metanólico contra la hepatotoxicidad producida por el CCl₄, estudiamos la respuesta de naturales antioxidantes celulares, incluyendo las enzimas CAT, SOD, GPx, GR y GST en los hígados de los animales del segundo experimento (Tabla 7). Los resultados de la determinación de actividades enzimáticas en primer lugar, demostró que la administración de CCl₄ produjo un marcado descenso en los niveles de todas las enzimas antioxidantes en comparación con el grupo control que recibió amortiguador de fosfatos. CAT fue la enzima más afectada a diferencia de las demás, con una reducción del 74%, seguido por GST con una reducción del 62%, SOD y GPx mostraron una reducción del 50% y GR se vio menos afectada con una reducción del 31%. El extracto metanólico disminuyó la toxicidad del CCl₄ mostrando un incremento en la actividad de las diferentes enzimas observadas, de 8-50%. La determinación de las actividades enzimáticas en la segunda parte del experimento se llevó a cabo para evaluar los efectos de la quercetina. Los estudios realizados demostraron que la quercetina mantiene los niveles de actividad enzimática hepática, incluso en la presencia de CCl₄. La quercetina disminuyó la toxicidad de CCl₄ mostrando una mejoría del 30-100% en la actividad enzimática.

Tabla 7 Efecto del extracto metanólico y quercetina de *H inuloides*, en las actividades de las enzimas antioxidantes en el hígado de las ratas tratadas con CCl₄

Grupo	CAT	SOD	GPx	GR	GST
	k/mg	U/mg	U/mg	U/mg	µM/min/mg
	proteína	proteína	proteína	proteína	proteína
A.F	0.6±0.8	107.7±8.9	0.11±0.016	0.048±0.004	0.20±0.03
E.Me.	0.56±0.10	87.3±9.10	0.11±0.01	0.054±0.002	0.17±0.025
CCl ₄	0.16±0.29 ^a	55.1±5.19 ^a	0.052±0.019 ^a	0.033±0.003 ^a	0.075±0.030 ^a
E. Me. + CCl ₄	0.42±0.95	81.64±1.91	0.052±0.003	0.052±0.003	0.14±0.015
Segundo grupo de Determinaciones					
A.F.	0.25±0.016	82.27±0.046	0.14±0.07	0.025±0.003	0.27±0.07
Quercetina	0.38±0.012	69.13±0.013	0.13±0.018	0.018±0.008	0.23±0.19
CCl ₄	0.054±0.050 ^a	46.33±0.042 ^a	0.088±0.045 ^a	0.010±0.001 ^a	0.093±0.12 ^a
Quer +CCl ₄	0.38±0.043	65.10±0.06	0.17±0.055	0.017±0.001	0.22±0.015

Primer grupo de determinaciones: Cada determinación fué hecha dos veces por triplicado y los valores representan la media ± S.D (n=3). Amortiguador de fosfatos (P.B) 0.1 mL/kg; extracto metanólico (Me.E) 100 mg/kg v.o.; CCl₄/aceite de oliva (1.5 mL/kg i.p.);

Me.E+CCl₄ (100mg/kg/ 200 uL v.o, 1.5 mL/kg i.p), corresponde al extracto metanólico en combinación con CCl₄ (primer experimento).

Segundo grupo de determinaciones: Quer/ P.B (100mg/kg/ 200 uL v.o); corresponde a la quercetina /amortiguador de fosfatos; Quer+CCl₄ (100mg/kg/ 200 uL v.o, 1.5 mL/kg i.p) corresponde a la quercetina en combinación con CCl₄ (segundo experimento). ^ap<0.0001 vs. todos los grupos

8. DISCUSION.

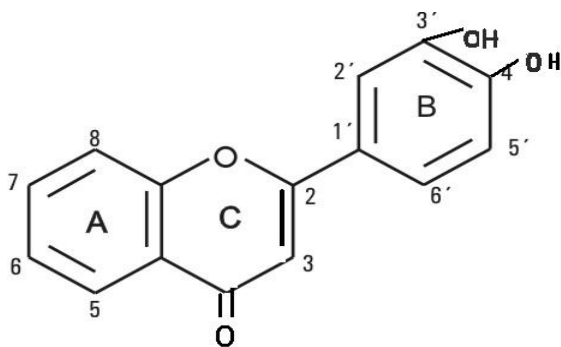
Los ROS contribuyen al desarrollo de diversas condiciones patológicas como la arteriosclerosis, diabetes, procesos de envejecimiento y respuestas inflamatorias (Halliwell y Gutteridge 2001; Valko y cols., 2007; Seifried y cols., 2007). Numerosos estudios han mostrado que estos ROS pueden estar involucrados en otras enfermedades como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, cirrosis hepática, entre otras. (Valko y cols., 2007; Seifried y cols., 2007). Un gran número de reportes han propuesto que el uso de compuestos antioxidantes, ya sean naturales o sintéticos, podría ayudar a prevenir esas condiciones y mantener la salud humana. Sin embargo, como los antioxidantes sintéticos no son los preferidos para el uso farmacológico debido a las repercusiones toxicológicas, el interés se ha centrado en la identificación de extractos y metabolitos naturales como suplementos con propiedades antioxidantes. La mayoría de estos antioxidantes naturales provienen de frutas, verduras, especias, granos y hierbas como el ginseng, la cúrcuma, el ginkgo, el romero, el té verde, la uva, el jengibre y el ajo. Estos compuestos naturales contienen una gran variedad de antioxidantes, tales como: compuestos fenólicos, polifenoles, flavonoides, carotenoides, entre otras (Rababah y cols., 2004). Hoy en día las industrias farmacéuticas o cosméticas utilizan antioxidantes como la vitamina C, el ascorbato de sodio (Elmore 2005), el timol (Andersen 2006), extractos acuosos utilizados como nutrimentos nutricionales como el Vimang y el Mangostán (Rodeiro y cols., 2008; Pedraza-Chaverri y cols., 2008).

H. inuloides es una planta con varios efectos medicinales muy utilizada en México, como medicina tradicional para el tratamiento de tromboflebitis, acné, contusiones y dolores musculares y como antiinflamatorio. Los extractos metanólico y acetónico se componen principalmente de flavonoides y terpenos los cuales se encuentran en diferentes concentraciones. Dado que los polifenoles son conocidos como responsables de tener actividad antioxidante, en este estudio se encontró que la concentración de polifenoles

totales y flavonoides era mayor en el extracto metanólico, lo cual nos sugiere que dicho extracto es el que posee un mayor potencial antioxidante. Algunos de estos terpenoides y flavonoides individualmente se reportaron como antiinflamatorios, lo cual fue confirmado con un extracto acetónico, que inhibió el edema inducido por TPA en la oreja del ratón (Delgado y cols., 2001). Una caracterización sistemática de sus propiedades atrapadoras así como de sus componentes no había sido descrita. por lo que esta caracterización es parte de la bio-evaluación de su efectividad como medicina tradicional e identificación de moléculas con potencial farmacológico.

Los polifenoles son componentes muy importantes de la planta que tienen capacidad atrapadora asociada a la presencia de los grupos hidroxilo de su estructura química, que además le confieren la capacidad de quelar iones de metales de transición (Rice-Evans y cols., 1997). Por otra parte, los datos de la literatura proponen que las características estructurales de los flavonoides para ser antioxidantes incluyen: i) un grupo catecol en el anillo B (sustituyentes hidróxilo en las posiciones 3' y 4'), ii) un enlace doble en la posición 2 y 3 conjugado con la función 4-oxo, en el anillo C y iii) la presencia de sustituyentes hidróxilo en las posiciones 3 del anillo C y 5 del anillo A. (Figura 12) Estas características son importantes para sus actividades de atrapadores de radicales libres (Choi y cols., 2007; Furuno y cols., 2002; Wang y cols., 2006).

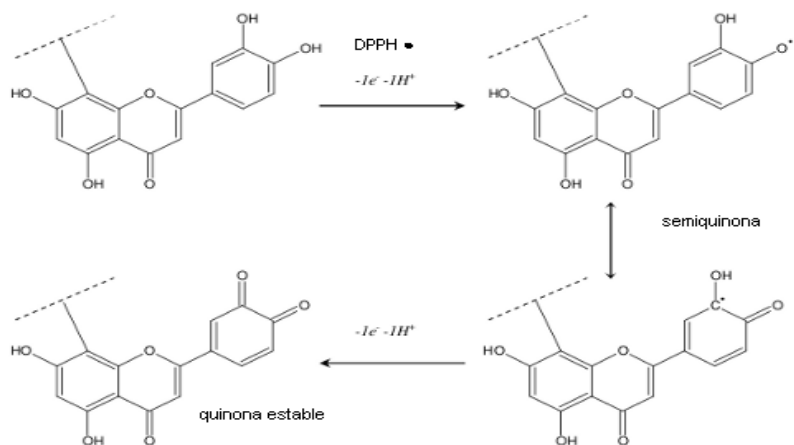
Figura 12. Características estructurales importantes de los flavonoides



Haraguchi y cols (1997) demostraron que el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol, el 7-hidroxycadalenol, los flavonoides, la quercetina y el kaempferol, obtenidos de *H. inuloides*, poseen actividad atrapadora para el radical DPPH[•], contribuyendo a esta actividad la presencia de los sustituyentes hidroxilo (OH) presentes en estos compuestos. El ácido ascórbico es un compuesto esencial en los tejidos vegetales, se ha informado que actúa como un eficaz atrapador del radical DPPH[•] (Soares y cols., 2003), por lo que fue utilizado como compuesto de referencia en este estudio. Se ha planteado que dentro de la estructura de diversos flavonoides el número de grupos hidroxilo tienen importancia para mejorar su función de atrapamiento, por ejemplo: la miricetina contiene 6 sustituyentes OH, quercetina, rutina y catequina tienen 5 sustituyentes OH, kaempferol, luteolina tienen 4 sustituyentes OH, resaltando que la presencia del grupo catecol en el anillo B parece ser esencial para mejorar su actividad antioxidante (Silva y cols., 2002).

El ensayo de ABTS es un modelo de atrapamiento rápido y eficiente del radical catión ABTS^{•+}, y se ha utilizado para el análisis de la actividad antioxidante de diversos flavonoides. El mecanismo de acción que se ha sugerido ha sido por la evaluación de la reactividad de los hidroxilos sustituyentes (OH), en el anillo B de los polifenoles, siendo más reactivo el OH en posición 3', que el de otra posición. Cuando el polifenol tiene más de dos sustituyentes OH en el anillo B (grupo catecol), se convierte en un mejor atrapador del ABTS^{•+}, el mecanismo que se sugiere es probablemente la donación de un electrón, que forma una semiquinona que al donar otro electrón forma una quinona estable (Figura 13). (Pannala y cols., 2001).

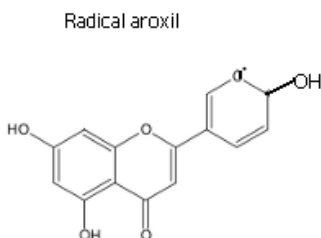
Figura 13. Formación de la estructura quinona estable



El anión superóxido es una especie de oxígeno reactivo, que puede causar daños a la célula y a ADN, lo que conduce a diversas enfermedades (Halliwell y Gutteridge 2001, Basaga H.S 1990).

Los flavonoides pueden reaccionar al transferir electrones por los sustituyentes OH del anillo B, con los radicales $O_2^{\bullet-}$, el OH^{\bullet} , el H_2O_2 y el $ONOO^-$, formando un radical aroxil estable, que a su vez puede reaccionar con un segundo radical y formar una estructura de quinona estable (Figura. 13, 14). (Rice-Evans y cols., 1996; Cao y Sofic 1997; Robak y Gryglewski 1988; Furuno y cols., 2002; Cos y cols., 1998; Nijveldt y cols., 2001; Pannala y cols., 2001; Roginsky 2003).

Figura 14. Radical aroxil



Diversos estudios confirman que la presencia de un grupo catecol es un requerimiento mínimo para poder atrapar el $O_2^{\bullet-}$ y el 1O_2 . (Robak y Gryglewski 1988; Tournaire y cols., 1993; Furuno y cols., 2002; Nagai y cols., 2005), Sin embargo, Furuno y cols., (2002), han propuesto que el grupo pirogalol (anillo B con sustituciones OH en posiciones 3', 4' y 5'), puede ser de 5 a 9 veces más efectivo que un grupo catecol solo para el radical anión $O_2^{\bullet-}$.

Una enzima importante que se incrementa durante el estrés oxidante es la xantina oxidasa, la cual está involucrada en diversas enfermedades mediadas principalmente por el $O_2^{\bullet-}$. Con el fin de conocer la capacidad inhibidora de diferentes flavonoides y relacionarlos con la estructura funcional contra la enzima xantina oxidasa, se han estudiado estos compuestos con diferente número de sustituyentes OH en el anillo A, debido a la semejanza con la xantina oxidasa. Cos y cols (1988) demostraron que los sustituyentes OH 5 y 7 del anillo A y la doble ligadura en el carbon 2 y 3 del anillo C, son esenciales para tener una mayor capacidad inhibitoria de la xantina oxidasa. Van Hoorn y cols (2002) implican al grupo catecol como un importante grupo que contribuye a la inhibición de la xantina/xantina oxidasa.

Otro mecanismo que se ha propuesto es el demostrado por Pauff y Hille (2009), los cuales relacionan a la quercetina, la silvina y la luteolina como inhibidores de la enzima xantina oxidasa, al competir e interactuar directamente con el sitio activo que contiene al molibdeno (molécula que se encuentra asociada a la xantina oxidasa), de esta forma se inhabilita la producción del radical anión $O_2^{\bullet-}$. Haraguchi y cols (1997), demostraron que los flavonoides de *H.inuloides* atrapan $O_2^{\bullet-}$ generados enzimáticamente o no enzimáticamente en microsomas hepáticos. Nuestros resultados coinciden con los reportados en otros estudios, en los que demuestran que la quercetina y kaempferol inhiben la producción de $O_2^{\bullet-}$ generados por el sistema de la xantina / xantina-oxidasa (Pannala y cols., 2001; Cos y cols., 1998; Selloum y cols., 2001). Estos hechos sugieren

que la disminución en la concentración de $O_2^{\bullet -}$ se asocian a la presencia de diferentes metabolitos de *H. inuloides*.

De todas las especies reducidas del oxígeno, la más dañina es el radical hidroxilo. Su alta toxicidad se debe a que posee una vida muy corta (10^{-9} segundos) y una alta reactividad, que le permite interactuar con todo tipo de sustratos (Valentão y cols., 2002). Se ha propuesto que las estructuras químicas de varios flavonoides las hacen eficientes quelantes de metales como Fe^{2+} o el Cu^+ , los cuales catalizan la formación del radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton (Melidou y cols., 2005; Perron y cols., 2008; Widmer y cols., 2010). La propuesta de varios sitios de unión para estos metales se enfocan en los OH que se encuentran en posición 3' y 4' del anillo B (grupo catecol), el OH en posición 3 del anillo C conjuntamente con un grupo oxo en posición 4 del anillo C, otra propuesta es la presencia de un grupo hidroxilo en posición 5 del anillo A, Van Acker y cols (1996) concluyen que un flavonoide con un grupo catecol tiene una mejor contribución a la quelación de los metales. Por lo que la acción quelante de los flavonoides es muy importante ya que el hierro queda incapacitado para participar en la reacción de Fenton y en la fase de propagación de la peroxidación lipídica. En nuestro estudio, los OH^{\bullet} generados por la reacción del complejo hierro/EDTA con H_2O_2 en presencia de ácido ascórbico, nos demostraron que en todos los casos se tuvo buen atrapamiento del radical. La quercetina en particular es conocida por quelar fierro y por lo tanto inhibir directamente la lipoperoxidación (Mathew y cols., 2006). También se demostró que la quercetina, el kaempferol, el 7-hidroxi-3,4 dihidrocadaleno y el 7-hidroxicadaleno, aislados de las flores de *H. inuloides* inhiben la peroxidación lipídica (Haraguchi y cols., 1996; 1997). Estos mismos compuestos bioactivos se encuentran en ambos extractos, por lo que este efecto se puede atribuir principalmente a la donación de electrones de los sustituyentes OH, la estabilización de los radicales libres y la formación de un radical aroxil flavonoide estable.

El H_2O_2 es un agente oxidante débil que inactiva las enzimas directamente por la oxidación de los grupos tiol (-SH). En trabajos con células Jurkat donde se evaluó la capacidad de diversos flavonoides para proteger del daño al DNA causado por el H_2O_2 , se demostró que los flavonoides son capaces de unirse al hierro, principalmente por la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 y otro en posición 4 del anillo C, sin embargo la presencia de un grupo hidroxilo adicional en posición 5 en el anillo A incrementa la protección (Melidou y cols., 2005); las características para atrapar a metales como el Fe^{2+} o el Cu^+ , y prevenir la reacción de Fenton, también se han reportado por Perron N. y Lopes G (Perron N.R y cols., 2008. y Lopes G.K y cols., 1999).

El ácido hipocloroso (HOCl), se produce en el organismo por oxidación de los iones Cl^- con ayuda de la enzima mieloperoxidasa de neutrófilos y se ha demostrado que es un poderoso oxidante que reacciona fácilmente con muchas moléculas biológicamente importantes (Aruoma y cols., 1989). Se ha propuesto que una estructura característica de diversos flavonoides estudiados tiene la presencia de un grupo hidroxilo en posición 5 en el anillo A y que la presencia de más de dos grupos hidroxilos confiere mayor actividad contra el ácido hipocloroso (Firuzi y cols., 2004). Otra observación que se ha propuesto es que el grupo OH en posición 3 del anillo C probablemente tenga un mayor efecto en el atrapamiento del HOCl, ya que el bloqueo de esta posición en la quercetina baja la actividad de atrapamiento (Rice-Evans y cols., 1996; Haenen y cols., 1997; Hirose y cols., 2002). También se ha demostrado que los polifenoles pueden reaccionar con el HOCl y formar productos clorinados, ya que un análisis por espectrometría de masas indicó que la clorinación que ocurre en los carbonos 6 y 8 incrementa la capacidad antioxidante (Binsack y col., 2001).

El peroxinitrito (ONOO^-) es un compuesto biológico oxidante y nitrante muy fuerte, formado por la reacción entre el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y el óxido nítrico (NO^*), puede

fácilmente cruzar la membrana biológica e interactuar con moléculas blanco como el DNA, proteínas y lípidos (Liaudet L y cols., 2009). En este sentido, se ha demostrado la eficiencia de los flavonoides para proteger de la toxicidad del ONOO⁻. La presencia de un grupo catecol en el anillo B y un grupo OH en posición 3 del anillo C, protegen, incrementando la eficiencia por la presencia de grupos hidroxilo en posición 5 y 7 del anillo A (Heijnen C.G y cols., 2001). La habilidad de diversos flavonoides para reaccionar con el ONOO⁻, se observó indirectamente, al medir por HPLC y espectrometría de masas los productos formados por la nitración de la tirosina, concluyendo que los grupos OH en posición 3' y 4' del anillo B, el doble enlace en el carbono 2 y 3 del anillo C y el grupo carbonil en posición 4 del anillo C están fuertemente implicados en la actividad antioxidante, además de la formación de quinonas las cuales pueden reaccionar con el glutatión y formar conjugados los cuales constituyen también una ayuda en el proceso de desintoxicación (Pollar y cols., 2006)

El oxígeno singulete (¹O₂) se genera en los sistemas biológicos por una serie de procesos endógenos (por ejemplo, las reacciones enzimáticas y químicas) y estímulos exógenos (por ejemplo, UV o luz visible en la presencia de un sensibilizador); sus blancos principales son las cadenas laterales de proteínas (Davies y Truscott 2001; Gracanin y cols., 2009.). Sin embargo, hay pocos reportes en los cuales se han descrito a los flavonoides como atrapadores de estos radicales (Tournaire y cols., 1993; Nagai y cols., 2005), estos autores mencionan la importancia de un grupo catecol en la estructura del anillo B y quizá la doble unión en el anillo C, pueden ser esenciales para atrapar al ¹O₂. Estas observaciones fueron confirmadas por Huvaere K y cols., 2009, quienes mencionan que el número y disposición de los grupos hidroxilo particularmente los grupos 3' y 4' del anillo B son esenciales, el grupo oxo en posición 4 del anillo C, también favorece esta actividad (Brown y cols., 1998). Así mismo, la demostración del atrapamiento del radical superóxido por el método de EPR apoya el hecho de que ambos extractos efectivamente

redujeron la intensidad de la señal del aducto DMPO-OOH generado por el sistema Xantina/xantina oxidasa, resultados similares han sido reportado por Zang y Jin (Zang L y cols., 1999; Jin Y.S y cols., 2005, 2006). Como se mencionó anteriormente, el $O_2^{\bullet-}$ puede reducirse para formar el H_2O_2 y éste en presencia de metales de transición por medio de la reacción de Fenton produce OH^{\bullet} . Por lo tanto, el mecanismo de acción de los flavonoides es mediante la eliminación o el atrapamiento de $O_2^{\bullet-}$ por ambos extractos o por los metabolitos de *H. inuloides* logrando proporcionar eficaz protección contra el daño oxidante a las biomoléculas. La mayor parte de la información previa en relación con las propiedades antioxidantes de *Heterotheca inuloides* se generó *in vitro*. Con el fin de obtener información en el animal completo, se optó por utilizar un modelo de hepatotoxicidad en ratas intoxicadas con tetracloruro de carbono (CCl_4). La base de hepatotoxicidad CCl_4 radica en su biotransformación por el citocromo P-450 que forma dos radicales libres. El primer metabolito, CCL_3OH^{\bullet} , forma uniones covalentes con los lípidos y las proteínas, o puede interactuar con O_2 para formar un segundo metabolito, CCl_3O^{\bullet} , o puede perder átomos de hidrógeno para formar cloroformo. Estos acontecimientos producen la peroxidación lipídica en la membrana y el daño hepático consecuente (Szymonik-Lesiuk y cols., 2003; Clawson, 1989). La primera evidencia de daño hepático inducido por la administración CCl_4 se obtuvo al evaluar las enzimas AST y ALT. Las actividades de AST y ALT a 48 h del tratamiento final con CCl_4 , mostró una elevación significativa con respecto a los controles. Dado que estas enzimas entran en el sistema circulatorio, como resultado de alteraciones de la permeabilidad de las membranas, sus niveles crecientes reflejan un daño a la integridad estructural del hígado (Clawson, 1989; Raja y cols., 2007; Manna y cols., 2006). La administración de los extractos de acetona o metanol previno de manera significativa la elevación de AST y ALT, inducida por CCl_4 , indicando la actividad hepatoprotectora de los extractos de *H. inuloides*.

La peroxidación lipídica derivada de los radicales libres del CCL_4 (CCl_3^\bullet y $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$), es uno de los principales mecanismos de lesión inducida en el hígado (Nagano y cols., 2007), el aumento en el daño a la membrana por la peroxidación lipídica está relacionado con las lesiones en diferentes tejidos de muchas patologías (Halliwell B.1997).

El MDA es un aldehído muy reactivo que aparece durante la peroxidación lipídica de las membranas biológicas (Valko y cols., 2007). En el presente estudio, la toxicidad inducida en el grupo tratado con el CCl_4 , provocó un aumento en los niveles de MDA en comparación con los grupos control, el tratamiento con los extractos de acetona y metanol de *H inuloides* invirtió significativamente estos cambios. El aumento en los niveles de MDA en el hígado sugiere una mayor peroxidación de los tejidos, esto puede ser debido a una falla o disminución de los mecanismos de defensa antioxidantes para prevenir la formación de los ROS, sin embargo, los polifenoles encontrados en ambos extractos tuvieron un papel importante en la protección celular como ya se había reportado (Haraguchi y cols., 1996, 1997), dadas sus características de ser buenos atrapadores de los diferentes ROS. Silva y cols (2002), observaron que en modelos de lipoperoxidación inducidos por compuestos que generan radicales peroxilo, diversos flavonoides interfieren, tanto en la iniciación como en la propagación de la peroxidación lipídica, proponiendo que la estructura química básica con los mismos patrones de hidroxilación poseen una elevada capacidad antioxidante, como ejemplo de ellos la presencia del grupo catecol en la quercetina, la catequina y el taxifolin, los cuales presentaron un menor IC_{50} , que los flavonoides que no lo presentan como el kaemferol. La presencia de la doble ligadura en el anillo C y un sustituyente OH en la posición 3 son importantes cuando en la estructura química carece del grupo catecol (Cao y cols., 1997; Silva y cols., 2002). La quercetina en particular es conocida por quelar fierro y por lo tanto inhibir directamente la lipoperoxidación (Mathew y cols., 2006). En experimentos con lipoproteínas de baja densidad susceptibles de ser oxidadas con iones Cu^{2+} , mostraron que la presencia de

diferentes flavonoides suprimen la oxidación lipídica al interaccionar los grupo OH del anillo B directamente con el Cu^{2+} , principalmente el OH en posición 3' y 4' (Brown y cols., 1998). El efecto tóxico del CCl_4 también fue confirmado por las observaciones histológicas asociadas con la discontinuidad en la arquitectura normal y disminución en el número de cordones de hepatocitos, junto con una intensa esteatosis perivenular macrovesicular con fibrosis severa y necrosis. El pretratamiento de ratas con extractos de acetona o metanol claramente protegió del efecto hepatotóxico inducido por CCl_4 . Nuestros resultados también mostraron que ambos extractos afectaron ligeramente la arquitectura normal con algunas zonas de discontinuidad en los cordones de hepatocitos.

Teniendo en cuenta que la quercetina es un conocido agente hepatoprotector (Janbaz y cols 2004, Mandal y Das 2005) y uno de los principales componentes presentes en el extracto metanólico (tabla 1), fue incluido en los experimentos. La 3-NT es un marcador relativamente específico de daño oxidante mediado por el peroxinitrito (ONOO^-), dado por los residuos de tirosina de las proteínas nitradas dando lugar a la producción de 3-NT (Oldreive y Rice-Evans 2001). El ONOO^- causa daño a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Szabó y Oshima. 1997), que puede conducir a la apoptosis celular y a la necrosis (Blaylock y cols., 1998). La capacidad del extracto metanólico de *H. inuloides* y la quercetina para prevenir la inmunotinción de 3-NT fue muy evidente. Los resultados indican claramente que la acumulación de la 3-NT en el grupo tratado con CCl_4 fue significativamente mayor que en los grupos tratados con el extracto metanólico y quercetina. Los ensayos *in vitro* confirman la hipótesis que tanto el extracto metanólico como la quercetina poseen propiedades para capturar al ONOO^- así como al $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Otro marcador de uso común, que indica de la presencia y/o el grado de peroxidación lipídica es la 4-HNE (Zarkovic 2003). Los datos presentados aquí son consistentes con el aumento de la tinción de aductos 4-HNE en el grupo de animales tratados con CCl_4 , sin embargo, en las muestras de hígado de los grupos expuestos a extracto metanólico o

quercetina, no hay un aumento notorio lo que sugiere una mejoría del estrés oxidante por estos componentes.

El efecto de antioxidantes sobre el estrés oxidante, es medido a través de ciertos biomarcadores como las actividades enzimáticas de CAT, SOD, GPx, GR, las cuales indican indirectamente la producción de radicales libres (Halliwell y Gutteridge 2001; Valko y cols 2007). Varios estudios han demostrado que las enzimas antioxidantes como SOD, Catalasa, GPx y GR representan una protección contra el daño por la oxidación a los diferentes tejidos (Halliwell y Gutteridge 2001). El CCl₄ indujo una disminución significativa en los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx, GR, probablemente debido a su inactivación por radicales libres (Hodgson y Fridovich 1975; Kono y Fridovich 1982; Tabatabaie y Floyd 1994). De hecho, ya se ha descrito una disminución en la actividad hepática de GST en roedores tratados con CCl₄ (Aniya y Anders, 1985). El extracto metanólico y la quercetina fueron capaces de prevenir en parte la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes; este efecto preventivo se refleja en los resultados histológicos obtenidos.

En el presente estudio hemos demostrado que ambos extractos y los metabolitos aislados de *H. inuloides*, fueron más eficientes para atrapar a los ROS que los compuestos de referencia respectivos. La potencia de atrapamiento sobre los ROS reside principalmente en el extracto metanólico, en particular en D-chiro-inositol, espinasterol y quercetina, que presentaron mayores capacidades atrapadoras de radicales libres, lo que explica la protección al hígado contra el daño oxidante inducido por el CCl₄, manteniendo los niveles de enzimas antioxidantes. Se sugiere que los extractos de metanol y acetona de *H. inuloides* podrían conferir protección contra la hepatotoxicidad aguda inducida no sólo por CCl₄, sino por otros contaminantes ambientales o agentes biológicos capaces de inducir daño oxidante, además de ser una alternativa interesante para el tratamiento de enfermedades mediadas por radicales libres, la enorme diversidad de los flavonoides

sugiere conocer más a fondo la relación estructura-función, para poder seleccionar con mayor seguridad a metabolitos con una mayor actividad protectora. Los resultados reportados aquí apoyan las propiedades biomédicas de esta planta y establece las bases para una mayor investigación sobre el uso potencial como agente preventivo en la población humana.

9. REFERENCIAS.

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 105:121-126.

Ainsworth E.A., Gillespie K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc.* 2:875-877.

Albano E. 2006. Alcohol oxidative stress and free radical damage. *Proc. Nutr. Soc.* 65:278-290.

Almaguer G.J.A. 2001. Programa de Trabajo 2001-2006 de la Dirección de Medicina Tradicional. Coordinación de Salud para los Pueblos Indígenas. Secretaría de Salud. México, D.F. Manuscrito. 12 págs.

Andersen A. 2006. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *Int J Toxicol. Suppl* 1:29-127.

Aniya Y and Anders MW. 1985. Alteration of hepatic glutathione-S-transferase and release into serum after treatment with bromobenzene and carbon tetrachloride or N-nitrosodimethylamine. *Biochem Pharmacol.* 39:4239-4244.

Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 6:593-597.

Aruoma OI. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 32:671-683.

Barone E., Trombino S., Cassano R., Sgambato A., De Paola B., Di Stasio E., Picci N., Preziosi P., Mancuso C. 2009. Characterization of the S-denitrosylating activity of bilirubin. *J Cell Mol Med.* 13:2365-2375.

Bartlesghi S., Wenzel J., Trujillo M., López M., Joseph J., Kalyanaraman B., Radi R. 2010. Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes. *Chem. Res. Toxicol.* 23:821-835.

Basaga H.S. 1990. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell. Biol.* 68:989-998.

[Bayraktar N.](#), [Kilic S.](#), [Bayraktar M.R.](#), [Aksoy N.](#) 2010. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in cancerous bladder tissue and their relation with bacterial infection: a controlled clinical study. *J. Clin. Lab. Anal.* 24:25-30.

Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlefeld A.W. 1978. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* 24:1-73.

Beuchamp R., Fedovich B.C. 1976. Superoxide dismutase; improved assay and an assay applicable to acrilamide gel. *Anal. Biochem.* 10:276-310.

Binsack R., Boersma B.J., Patel R.P., Kirk M., Roger W.C., Darley-Usmar V., Barnes S., Zhou F., Parks D.A. 2001. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25:434-443.

Blaylock M.G., Cuthbertson B.H., Galley H.F., Ferguson N.R., Webster N.R. 1998. The effect of nitric oxide and peroxynitrite on apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 25:748-752.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 22: 25-30.

Brigelius-Flohè R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27:951-965.

Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 330 :1173-1178.

Burk R.F., Hill K.E. and Motley A.K. 2003. Selenoprotein Metabolism and Function: Evidence for More than One Function for Selenoprotein P. *J. Nutr.* 133: 1517S–1520S.

Cao G and Sofic, E.R.L. 1997. Prior, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.* 22:749–760.

Cárdenas-Rodríguez N. y Pedraza-Chaverrí J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química.* 17:164-173.

Carlberg I., Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250:5475-5480.

Chaudière J. and Ferrari-Iliou R. 1999. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 37:949-962.

Cheng F., Jen J., Tsai TH. 2002. Hydroxyl radical in living system and its separation methods. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 781:481-496.

Cheng L., Kellog E.W, Packer L. 1981. Photoinactivation of catalase. *Photochem. Photobiol.* 34:125-129.

Choi J.M., Yoon B.S., Lee S.K., Hwang J.K., Ryang R. 2007. Antioxidant properties of neohesperidin dihydrochalcone: inhibition of hypochlorous acid-induced DNA strand breakage, protein degradation, and cell death. *Biol. Pharm. Bull.* 30:324-330.

Chu F. F., Esworthy R. S, Doroshov J.H. 2004. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 36:1481-1495.

Clawson G. A. 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol Immunopathol. Res.* 8:104-112.

Comhair S. A., Erzurum S.C. 2005. The regulation and role of extracellular glutathione peroxidase. *Antioxid. Redox. Signal.* 7:72-79.

Conde de la Rosa L., Moshage H., Nieto N. 2008. Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 100:156-163.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61:71-76.

Cotelle N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:569-590.

Davies M. J. and Truscott R. J. 2001. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J. Photochem. Photobiol.* 63:114–125.

Delgado G., Del Socorro Olivares M., Chávez M., Ramírez-Apan T., Linares E., Bye R., et al. 2001. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J. Nat. Prod.* 64:861-64.

Diplock A.T. 1994. Antioxidants and disease prevention. *Mol. Aspects Med.* 15: 293-376.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. 1998. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *The Br. J. Nut* 80 (Suppl 1):S77-S112.

Dreher D. and Junod A.F. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer.* 32:30-38.

Duarte T.L. and Lunec J. 2005. When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin. *Free Radic. Res.* 39:671–686.

Elmore A.R. 2005. Final report of the safety assessment of L-Ascorbic Acid, Calcium Ascorbate, Magnesium Ascorbate, Magnesium Ascorbyl Phosphate, Sodium Ascorbate, and Sodium Ascorbyl Phosphate as used in cosmetics. *Int .J. Toxicol.* 24:51-111.

Elshafey A., Lanyon W., Connor J. 1994. Identification of a new missense point mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) gene in family with amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 3:363-374

Fang Y.Z. and Yang S., Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 18:872-879.

Farrell G.C., Larter C.Z. 2006. Nonalcoholic fatty liver diseases: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 43:S99-S112.

Ferrer-Sueta G., Radi R. 2009. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* 4:161-177.

Firuzi O., Mladenka P., Petrucci R., Marrosu G., Saso L. 2004. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 56:801-807.

Floriano-Sánchez E., Villanueva C., Medina-Campos O.N., Rocha D., Sánchez-González D.J., Cárdenas-Rodríguez N., Pedraza-Chaverrí J. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic. Res.* 40:523-533.

Furuno K., Akasako T., Sugihara N. 2002. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* 25:19-23.

Gené R.M., Segura L., Adzer T., Marin E. Iglesias J. 1998. *Heterotheca inuloides*: Anti-inflammatory and analgesic effect. *J Ethnopharmacol.* 60:157-162.

Glantzounis G.K., Tsimoyiannis E.C., Kappas A.M., Galaris D.A. 2005. Uric acid and oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.* 11:4145-4151.

Golbidi S. and [Laher J.](#) 2010. Antioxidant therapy in human endocrine disorders. *Med. Sci. Monit.* 16:RA9-RA24.

Goldstein S. and Merényi G. 2008. The chemistry of peroxyxynitrite: implications for biological activity. *Methods. Enzymol.* 2008. 436:49-61.

Gracanin M, Hawkins CL, Pattison DI, Davies MJ 2009. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Radic Biol Med.* 47: 92-102.

Gurtsevitch V.E. 2008. Human oncogenic viruses: hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis. *Biochemistry.* 73:504-513.

Haenen G.R., Paquay J.B., Korthouwer R.E., Bast A. 1997. Peroxyxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:591-593.

Halliwell B. 1996. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic. Res.* 25:57-74.

Halliwell B. 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxyxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett.*411:157-160.

Halliwell B., Gutteridge J.M., Aruoma O.I. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165:215-219.

Halliwell B. and Gutteridge J.M. 2001. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3rd. Ed. Oxford Science Publications. Nueva York.

Hammond C.L., Marchan R., Krance S.M., Ballatori N. 2007. Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 282:14337–14347.

Hansberg W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico.* 26:19-54.

Haraguchi H., Saito T., Ishikawa H., Sánchez Y., Ogura T., Kubo I. 1996. Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. J. Pharm. Pharmacol. 48:4441-443.

Haraguchi H., Ishikawa H., Sánchez Y., Ogura T., Kubo Y., Kubo I. 1997. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. Bioorg. Med.Chem. 5:865-871.

Harris E. D. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. FASEB J. 6:2675-2683.

Heijnen C.G., Haenen G.R., Van Acker F.A., Van der Vijgh W.J., Bast A. 2001. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. Toxicol In Vitro.15:3-6.

Hirose Y., Kakita M., Washizu T., Matsugo S. 2002. Structural determination of oxidation products of flavonoids in alcoholic aqueous solution with reactive oxygen species. J. Photosci. 9:424–426.

Hirota I, and Yasuhito N. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. Free Radic. Biol. Med. 2:145-169.

Hodgson EK. and Fridovich I.1975. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. Biochemistry. 14:5294-5299.

Huvaere K., Olsen K., Skibsted J. 2009. Quenching of Triplet-Excited Flavins by Flavonoids. Structural Assessment of Antioxidative Activity. J. Org. Chem. 74:7283–7293.

Imai H. and Nakagawa Y.2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. Free Radic. Biol. Med. 34:145-169.

IMSS. Guía de práctica clínica diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia hepática crónica. Instituto Mexicano del Seguro Social 2009. México D.F. 44pp

Janbaz K.H., Saeed S.A., Gilani A.H. 2004. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine*.11:424-430.

Janero D. 1998. Malondiadehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical. Biol. Med.* 9:515-540.

Jerga C., Merfort I., Willuhn G. 1990. Flavonoid aglycones from flowers of *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.* 56: 122-123.

Jia Z., Zhu H., Misra B.R., Mahaney J.E., [Li Y.](#), Misra H.P. 2008. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. *Mol. Cell Biochem.* 313:187-194.

Jin Y.S., Heos S.I, Lee M.J., Rhee H.I and Wang M.H. 2005. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of *Quercus aliena* acorn extract against CCl₄-induced liver. *Free Radical Research.* 39:1351–1358.

[Jin Y.S.](#), [Lee M.J.](#), [Han W.](#), [Heo S.I.](#), [Sohn S.I.](#), [Wang M.H.](#) 2006. Antioxidant effects and hepatoprotective activity of 2,5-dihydroxy-4,30-di(*b*-D-glucopyranosyloxy)-trans-stilbene from *Morus bombycis* Koidzumi roots on CCl₄-induced liver damage. *Free Radical Res.* 40:986–992.

Kaplowitz N. 2005. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev. Drug. Discov.*4:489-499.

[Khan N.](#) and [Sultana S.](#) 2005. Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sci.* 77:1194-1210.

Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J., Lee C.Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50:3713-3717.

Kondo S., Toyokuni S., Tsuruyama T., Ozeki M., Tachibana T., Echizenya M., Hiai H., Onodera H., Imamura M. 2002. Peroxynitrite-mediated stress is associated with proliferation of human metastatic colorectal carcinoma in the liver. *Cancer Lett.* 179: 87–93.

[Kono Y](#) and [Fridovich I](#). 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem.* 257:5751-5754.

Kubo I., Muroi H., Chaudhuri S. K., Sánchez Y., Ogura T., Saito T., Ishikawa H., Araguchi H. 1994. Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Plant. Med.* 60:218-221.

Kubo I., Chaudhuri S. K., Kubo Y., Sánchez Y., Ogura T., Saito T., et al. 1996. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.* 62:427-430.

Lawrence R.A., Burk R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:952-958.

Leeuwenburgh C, Ji LL. 1995. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1:316:941-949.

Liaudet L., Vassalli G. and Pacher P. 2009. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front. Biosci.* 14:4809–4814.

Liu R.H. 2003. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:517S-520S.

Liu R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J. Nutrition.* 134:3479S-3485S.

Lledías F., Rangel P., Hansberg W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273:10630–10637.

[Lopes GK](#), Schulman HM, [Hermes-Lima M](#). 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta* 1472: 142-152.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall J. L. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

[Lu J](#). and Holmgren A.J. 2009. Selenoproteins. *Biol. Chem.* 284:723-727.

Mandal A.K and Das N. 2005. Sugar coated liposomal flavonoid: a unique formulation in combating carbontetrachloride induced hepatic oxidative damage. *J. Drug Target.* 13:305-315.

Manna P, Sinha M, Sil PC. 2006. Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. *BMC Complement Altern Med.* 6:23-33.

Marklund S.L., Westman N. G., Lundgren E., Ross G. 1982. Copper-and zinc- containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42:1955-1961.

Martínez M. 1989. *Las plantas medicinales de México*. Ediciones Botas. 6th ed. México.

Martínez M. 1984. *Catalogo de Nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas*. Fondo de Cultura Económica: México. 1984; pp 145-46.

Matés J.M. and Sánchez-Jiménez F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosc.* 4:D339-D345.

Matés J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83–104.

Mathew S. and Abraham T.E. 2006. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. Food. Chem. Toxicol. 44:198-206.

Matkowski A. and Piotrowska M. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. Fitoterapia. 77:346-353.

[Matsuda Y](#), [Higashiyama S](#), [Kijima Y](#), [Suzuki K](#), [Kawano K](#), [Akiyama M](#), [Kawata S](#), [Tarui S](#), [Deutsch HF](#), [Taniguchi N](#). 1990. Human liver manganese superoxide dismutase. Purification and crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity. Eur. J. Biochem. 194:713-720.

Medina-Campos O.N., Barrera D., Segoviano-Murillo S., Rocha D., Maldonado P.D., Mendoza-Patiño N., Pedraza-Chaverri J., 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK(1) cells of potassium dichromate-induced toxicity. Food Chem. Toxicol. 45:2030-2039.

Medina-Navarro R., Durán-Reyes G., Díaz-Flores M., Vilar-Rojas C. 2010. Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function. PLoS ONE. 29:e8971-e8977.

Melidou M., Riganakos K., Galaris D. 2005. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. Free Radic. Biol. Med. 39:1591–1600.

[Moreira P.I.](#), [Sayre L.M.](#), [Zhu X.](#), [Nunomura A.](#), [Smith M.A.](#), [Perry G.](#) 2010. Detection and localization of markers of oxidative stress by in situ methods: application in the study of Alzheimer disease. Methods Mol. Biol. 610:419-434.

Muriel P. and Mourelle M. 1990. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. J. Appl. Toxicol. 10:275–279.

Mustacich D.J., Bruno R.S., Traber M.G. 2007. Vitamin E. Vitam Horm. 76:1-21.

Nagai S., Ohara K. and Mukai K. 2005. Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution . J. Phys. Chem. B. 109:4234-4240.

Nagano K., Umeda Y., Saito M., Nishizawa T., Ikawa N., Arito H., Yamamoto S., Fukushima S. 2007. Thirteen-week inhalation toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. J. Occup. Health. 49:249-259.

Nakano L.S., Kadllska M.B., Mason R.P., Grijalba M.T., and Augusto O. 2000. Metabolism of acetaldehyde to methyl acetyl and acetyl radicals: in vitro and in vivo electron paramagnetic resonance spin-trapping studies. Free. Radic. Biol. Med. 29:721–729.

Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E., Boelens P.G., Van Norren K., and Van Leeuwen P. A. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr. 74:418–425.

Novo E. and Parola M. 2008 Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. Fibrogenesis Tissue Repair. 1:1-5.

Oldreive C. and Rice-Evans C. 2001. The mechanisms for nitration and nitrotyrosine formation in vitro and in vivo: impact of diet. Free Radic Res. 35:215–231.

Otani K, Korenaga M, Beard MR, Li K, Qian T, Showalter LA, Singh AK, Wang T, Weinman SA.2005. Hepatitis C virus core protein, cytochrome P450 2E1, and alcohol produce combined mitochondrial injury and cytotoxicity in hepatoma cells. Gastroenterology. 128:96-107.

Ozer J., Ratner M., Shaw M., Bailey W., Schomaker S. 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. Toxicology. 245. 194–205.

Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease. Physiol. Rev. 87:315-424.

Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.H. and Levine M. 2003. Vitamin C as an Antioxidant. Evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 22: 18–35.

Pannala A.S., Chan T.S., O'Brien P.J., Rice-Evans C. A., 2001. Flavonoid B-Ring Chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 1161-1168.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* 333:19–39.

Pauff JM and Hille R. 2009. Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin, and curcumin. [J. Nat. Prod.](#) 2009. 72:725-31.

[Pedraza-Chaverri J](#), [Barrera D](#), [Medina-Campos ON](#), [Carvajal RC](#), [Hernández-Pando R](#), [Macías-Ruvalcaba NA](#), [Maldonado PD](#), [Salcedo MI](#), [Tapia E](#), [Saldívar L](#), [Castilla ME](#), [Ibarra-Rubio ME](#). 2005. Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity. *BMC Nephrol.* 6:4-8.

Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas JM. 2008. Medicinal properties of mangosteen *Garcinia mangostana*. *Food Chem Toxicol.* ;46:3227-3239.

Pedraza-Chaverri J., Arriaga-Noblecía G., Medina-Campos O.N., 2007. Hypochlorous acid scavenging capacity of garlic. *Phytother. Res.* 21:884-888.

Perron N.R., Hodges J.N., Jenkins N. and Brumaghim J.L. 2008. Predicting How Polyphenol Antioxidants Prevent DNA Damage by Binding to Iron. *Inorg. Chem.* 47:6153-6161.

Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants. 2000. *J. Nat. Prod.* 63:1035-1042.

Pollard S. E., Kuhnle G.C., Vauzour D., Vafeiadou K., Tzounis X., Whiteman M., Rice-Evans C., Spencer J.P. 2006. The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350:960–968.

Preethi K.C., Kuttan R. 2009. Hepato and renoprotective action of *Calendula officinalis* L. flower extract. *Indian J. Exp. Biol.* 47:163-168.

Rababah T.M., Hettiarachchy N.S., Horax R. 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and ter-butylhydroquinone. *J. Agric. Food Chem.* 52:5183-5186.

Raja S., Nazeer AKF., Kumar V., Mukherjee K., Bandyopadhyay A., Mukherjee PK. 2007. Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J Ethnopharmacol.* 109:41–47.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yan M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol* 26:1231-1237.

Recknagel R.O., Glende E.A., Dolak J.A., Waller R.L. 1989 Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther.* 43:139–154.

Redmond R. W. and Gamlin J. N. 1999. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* 70:391–475.

Rice-Evans C. 2001. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 8:797-807.

Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20:933–956.

Rice-Evans C., Miller J.N., Paganga J. 1997. Antioxidant proprieties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:156-159.

[Robak J.](#) and [Gryglewski RJ.](#) 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol.*37:837-841.

[Rodeiro I.](#), [Donato MT.](#), [Martínez I.](#), [Hernández I.](#), [Garrido G.](#), [González-Lavaut JA.](#), [Menéndez R.](#), [Laguna A.](#), [Castell JV.](#), [Gómez-Lechón MJ.](#) 2008. Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. *Toxicol In Vitro.* 22:1242-1249.

Roginsky V. 2003. Chain-breaking antioxidant activity of natural polyphenols as determined during the chain oxidation of methyl linoleate in Triton X-100 micelles. *Arch. Biochem. Biophys.* 414:261–270.

[Rubbo H.](#), Trostchansky A., O'Donnell V.B. 2009. Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* 484:167-172.

Rzedowski G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.

Sanders S.P., Harrison S.J., Kuppusamy P., Sylvester J.T., Zweier J.L. 1994. A comparative study of EPR spin trapping and cytochrome C reduction techniques for the measurement of superoxide anions. *Free Radic. Biol. Med.* 16:753-761.

Sanz-Camenol P., Medina J., García-Buey L., García-Sánchez A., Borque M.J., Martín-Vilchés S., Gamallo C., Jones E.A., Moreno-Otero R. 2002. Enhanced intrahepatic inducible nitric oxide synthase expression and Nt2.-nitrotyrosine accumulation in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Journal Hepatol.* 37:723 –729.

Segura L., Freixa B., Ringbom T., Vila R., Perera P., Adzet T., et al. 2000. Anti-inflammatory activity of dicloromethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. *Planta Med.* 66:553-555.

Seifried H.E., Anderson D.E., Fisher E., Milner J.A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* 18:567-579.

Selloum L., Reichl S., Müller M., Sebihi L., Arnhold J. 2001. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys.*395:49-56.

Sharma R., Yang Y., Sharma A., Awasthi S., Awasthi Y.C. 2004. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 6:289-300.

Sheweita S.A., Abd El-Gabar M., Bastawy M. 2001. Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants. *Toxicology.*165:217-224.

Shimizu H., Uetsuka K., Nakayama H., Doi K. 2001. Carbon tetrachloride-induced acute liver injury in Mini and Wistar rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53:11-17.

Silva MM., Santos MR., Caroço G., Rocha R., Justino G., Mira L.2002. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic Res.*36:1219-1227.

Soares D.G., Andreazza C.A., Salvador M. 2003. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological system. *J. Agric. Food Chem.* 51:1077-1080.

[Stocker R.](#), [Glazer A.N.](#), [Ames B.N.](#) 1987. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:5918-5922.

Szabó C, Oshima H.1997. DNA damage induced by peroxynitrite: Subsequent biological effects. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry.*1:373-385.

Szymonik-Lesiuk S., Czechowska G., Stryjecka-Zimmer M., Slomka M., Madro A., Celinski K., et al. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in

various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 10:309–315.

Tabatabaie T, Floyd RA.1994. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. Arch Biochem Biophys 314:112-119.

Tamayo R.P.1983. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis?. Hepatology. 3:112-120.

Tomaro M.L and Batlle A. M. de C. 2002. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. Int.J. Biochem. Cell Biol. 34:216–220.

Tournaire C., Croux S., Maurette M., Beck I., Hocquaux M., Braun M., Oliveros E. 1993. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen quenching. J. Photochem. Photobiol. B. 19:205-215.

Trautinger F. 2001. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. Clin. Exp. Dermatol. 26:573–577.

Uchida K., Szweda L., Chae H.Z., Stadtman E.R. 1993. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:8742-8746.

Valentão P., Fernandes E., Carvalho F., Andrade P.B., Seabra R.M., De Lourdes Bastos M. 2002. Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biol. Pharm. Bull. 25:1320-1323.

Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J. and Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Moll. Cell. Biochem. 266:37-56.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160:1-40

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazu M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem.Cell. Biol.* 39: 44-84.

van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.*20:331-342.

Van der Veen B.S., De Winther M.P., Heeringa P. 2009. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. [Antioxid. Redox. Signal.](#) 11:2899-2937.

Van Hoorn D.E.C., Nijveldt R.J., Van Leeuwen P.A.M., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D.B.A., Van Norren K. 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur. J. Pharmacol.* 451:111–118.

Villaseñor Ríos J. L. y F. J. Espinosa García. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Wang C.Y., Ma F.L., Liu J.T., Tian J.W., Fu F. H. 2007. Protective effect of salvianic acid a on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Biol Pharm. Bull.* 30:44-47.

Wang L., Chen Tu Y., Lian T.W., Hung J.T., Yen J.H., Wu M. J. 2006. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9798-9804.

Wang Y. and Ho C.T. 2009. Metabolism of flavonoids. *Forum Nutr.* 61:64-74.

Weber L.W., Boll M., Stampfl A. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:105-136.

Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P., Vallelian F., Schoedon G., Buehler P.W., Schaer D.J., 2010. Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxid. Redox. Signal.* 12:185-198.

Wu J., Danielsson A., Zern M.A. 1999. Toxicity of hepatotoxins: new insights into mechanisms and therapy. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 8:585-607.

Xiong Y., Rabchevsky A.G., Hall E.D. 2007. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J. Neurochem.* 100:639-649.

Yan H. and Harding J.J. 1997. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem. J.* 328: 599–605.

Zang L., Cosma G., Gardner H., Starks K., Shi X. and Vallyathan V. 1999. Scavenging of superoxide anion radical by chaparral. *Mol. Cell. Biochem.* 196:157–161.

Zarkovi N. 2003. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects of Med.* 24:281–291.

Zhishe J., Mengcheng T., Jianming W. 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry.* 64:555-559.



Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites[☆]

Elvia Coballase-Urrutia^{a,b}, José Pedraza-Chaverri^c, Rafael Camacho-Carranza^d,
Noemí Cárdenas-Rodríguez^a, Bernardino Huerta-Gertrudis^a, Omar Noel Medina-Campos^e,
Myrna Mendoza-Cruz^e, Guillermo Delgado-Lamas^f, J. Javier Espinosa-Aguirre^{d,*}

^a Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, 04530 México DF, México

^b Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México

^c Facultad de Química, Departamento de Biología, Edificio F, Segundo Piso, Laboratorio 209, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México

^d Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México

^e Jardín Botánico, Instituto de Biología, Tercer Circuito Exterior s/n, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México

^f Instituto de Química, Circuito Exterior, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2010

Received in revised form 11 June 2010

Accepted 30 June 2010

Available online 8 July 2010

Keywords:

Heterotheca inuloides

Scavenger activity

Reactive oxygen species

ABSTRACT

Arnica (*Heterotheca inuloides*) is a widely used medicinal plant in México; it has been recognized as anti-inflammatory, analgesic, cytotoxic, scavenger of superoxide anion and also as a preventive of lipid peroxidation. *In vivo* studies have demonstrated a hepatoprotective action of the methanolic extract of this plant as well as of quercetin, one of its main components, and the evidence obtained pointed out to an antioxidant mechanism. In this work, we focused on the free radical scavenging capacity of acetonic and methanolic extracts of *H. inuloides* in comparison with reference compounds. The two extracts were 2–12 times more effective (IC₅₀, µg/mL) than the reference compounds to cope with the following radicals or molecules tested: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), peroxy-nitrite (ONOO⁻), superoxide (O₂^{•-}), singlet oxygen (¹O₂), hypochlorous acid (HOCl), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl (OH[•]). Additionally, five secondary metabolites isolated from the methanolic extract displayed potent concentration-dependent antioxidant effects against reactive oxygen species produced *in vitro* (IC₅₀ values in the range of 0.018–4.31 mg/mL). *n*-Chiro-inositol showed the higher antioxidant effect against O₂^{•-}, H₂O₂ and OH[•] while spinasterol and quercetin were the most active against ¹O₂ and ONOO⁻, respectively. The antioxidant properties of the extracts and metabolites tested partially support the wide use of this plant in traditional medicine.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The potentially reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radical (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical (OH[•]), are continuously generated inside the human body as a

consequence of exposure to exogenous chemicals in our environment and/or to a number of endogenous metabolic processes involving enzymes and bioenergetic electron transfer (Halliwell and Gutteridge, 1999). Under normal circumstances, the ROS generated are detoxified by the antioxidant shield present in living organisms, thus generating equilibrium between the arisen ROS and the presence of antioxidant activity. However, owing to ROS overproduction and/or inadequate antioxidant defense, this equilibrium is hampered favoring the ROS upsurge that culminates in oxidative damage. ROS readily attacks and induces oxidative damage to several biomolecules including proteins, lipids, lipoproteins and DNA (Halliwell and Gutteridge, 1999; Basaga, 1990).

ROS contributes to the development of various diseases such as atherosclerosis, diabetes, cancer, neurodegenerative diseases, liver cirrhosis and the ageing process (Basaga, 1990). To prevent the damage caused by oxygen free radicals, organisms have developed an antioxidant defense system that includes nonenzymatic antioxidants (e.g., glutathione, uric acid, bilirubin) and enzymes such as

[☆] To Dr. Filizet Abdullaev Jafarova (in memoriam).

* Corresponding author at: Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, México DF 04510, México. Tel.: +52 56229214; fax: +52 56229182.

E-mail addresses: elcoballase@yahoo.com.mx (E. Coballase-Urrutia), pedraza@unam.mx (J. Pedraza-Chaverri), raf321@servidor.unam.mx (R. Camacho-Carranza), noemic2001@yahoo.com.mx (N. Cárdenas-Rodríguez), osger2065@yahoo.com.mx (B. Huerta-Gertrudis), omarnoelmedina@gmail.com (O.N. Medina-Campos), myma@biologia.unam.mx (M. Mendoza-Cruz), delgado@servidor.unam.mx (G. Delgado-Lamas), jjea@servidor.unam.mx (J.J. Espinosa-Aguirre).

superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (GPx) (Sorg, 2004). A second level of prevention against ROS-induced damage is constituted by other scavenging compounds present in the diet, which contribute to reduce the incidence of free radical-mediated diseases (Valko et al., 2007).

The use of antioxidants, both natural and synthetic, in the prevention and cure of various diseases is expanding, and there is considerable interest in the antioxidant activities of molecules such as vitamins E and C, plant polyphenolic and carotenoid components (Ying-Shan et al., 2005). Another potential use of plant extracts rich in phenolics is in the food industry, for the improvement of food quality by retarding lipid oxidation.

Heterotheca inuloides Cass (Asteraceae) grows abundantly in the cooler and temperate regions of México (Almaguer, 2001). The dried flowers of *H. inuloides* known as "arnica" have long been used as a folk medicine for the topical treatment of contusions and bruises, as well as postoperative thrombophlebitis (Almaguer, 2001). More frequently, this plant has been externally used for the treatment of skin wounds and injuries (Delgado et al., 2001). Its antimicrobial (Kubo et al., 1994) anti-inflammatory and analgesic (Gené et al., 1998) as well as its cytotoxic properties against tumor cell lines have also been reported (Kubo et al., 1996). *H. inuloides* has been recognized as an antioxidant (Kubo et al., 1996; Haraguchi et al., 1997) due to its inhibitory activity against lipid peroxidation in liver microsomes, mitochondria, and red blood cell *in vitro* systems (Haraguchi et al., 1996).

In previous *in vivo* experiments we observed that the acetic and methanolic extracts of *H. inuloides* displayed hepatoprotective effect against CCl₄ toxicity in rats (Coballase-Urrutia et al., 2010). Pretreatment of animals with the methanolic extract or quercetin, was associated with the prevention of 4-hydroxynonenal and 3-nitrotyrosine increase in the liver, two markers of oxidative stress. Furthermore, the decrease in the activity of several antioxidant enzymes including SOD, catalase and GPx in CCl₄-induced liver injury was alleviated by the treatment with *H. inuloides* methanolic extract or quercetin. These results suggest that the hepatoprotective capacity of *H. inuloides* is associated with its antioxidant properties, but a fully characterization of those properties had not been reported.

The plant contains several constituents such as polyacetilenes, cadinanes, triterpenes, sterols, sesquiterpenes and flavonoids. Some representative structures are presented in Fig. 1.

In this work, we examined the scavenging activity of *H. inuloides* acetic and methanolic extracts and of five secondary metabolites obtained from the methanolic extract, against a variety of ROS generated *in vitro*. Results obtained indicate that the methanolic extract and some of its main components namely D-chiro-inositol, spinasterol and quercetin, show a high efficiency in trapping ROS.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Sodium pyruvate, dimethyl thiourea (DMTU), nordihydroguaiaretic acid (NDGA), ascorbic acid, histidine, xylenol orange, ammonium iron (II) sulfate hexahydrate, 2,2'-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), bovine serum albumin (BSA), dimethylsulfoxide (DMSO), N,N-dimethyl-4-nitrosaniline (DMNA), catalase, xanthine, xanthine oxidase, nitroblue tetrazolium (NBT), potassium nitrite (KNO₂), manganese dioxide (MnO₂), diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), butylated hydroxytoluene (BHT) and DL-penicillamine were purchased to Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dihydrochloride 123 (DHR-123) was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA); potassium persulfate and sodium carbonate (Na₂CO₃) were obtained from Mallinckrodt (Paris, KY, USA). Absolute ethanol, hydrogen peroxide (H₂O₂), sulfuric acid (H₂SO₄), methanol, ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt (EDTA), sodium hypochlorite (NaOCl) and sodium nitrite (NaNO₂) were purchased to JT Baker (México City, México). All other chemicals were reagent grade and commercially available.

2.2. Preparation of crude *Heterotheca inuloides* extracts

H. inuloides Cass was collected in Zacapocetta (Puebla, México). The plant material was identified by Biol. Myrna Mendoza, and a voucher specimen (Myrna Mendoza C 15,375) is kept in the Ethnobotanical collection of the Herbarium located at Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) México. Dried and powdered plant material (2.0 kg) was extracted with acetone at room temperature (3 times/24 h) followed by methanol extraction (3 times/24 h), to afford, after solvent evaporation, 12 and 15 g of residue, respectively (Delgado et al., 2001). Acetonic extract residue was dissolved in olive oil and methanolic extract residue in phosphate buffer pH 7.4. The metabolites isolated from the methanolic extract of *H. inuloides* were provided by Dr. Guillermo Delgado (Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México).

2.3. ABTS^{•+} radical scavenging capacity

ABTS^{•+} radical was generated by the incubation of 7 mM ABTS with 2.5 mM potassium persulfate in the dark at room temperature for 12–16 h (Maldonado et al., 2005). The ABTS^{•+} solution was diluted to an absorbance of 0.70 at 734 nm in phosphate buffered saline (PBS). Ten μ L of PBS or dilutions of extracts were added to 1 mL of ABTS^{•+} solution and the absorbance was read during 60 s. The ability of *H. inuloides* extracts to scavenge ABTS^{•+} was compared to that of ascorbic acid (Maldonado et al., 2005).

2.4. DPPH[•] scavenging capacity

DPPH[•] scavenging capacity was investigated according to the method described before (Maldonado et al., 2005). Briefly, 0.05 mL of either extract at different concentrations was added to an ethanolic solution of DPPH[•] (100 μ M, 2.95 mL). The control sample contained distilled water. After incubation for 20 min at room temperature and in the dark the absorbance was recorded at 517 nm. The scavenging capacity is given as percent (%) DPPH scavenged, calculated as [(optical density of control – optical density of compound)/(optical density of control) \times 100]. The ability of *H. inuloides* extracts to scavenge DPPH[•] was compared with ascorbic acid (Maldonado et al., 2005).

2.5. O₂^{•-} scavenging capacity

Xanthine-xanthine oxidase system was used to determine the O₂^{•-} scavenging capacity of the extracts or metabolites. O₂^{•-} in the assay system and xanthine oxidase activity were measured as NBT reduction and uric acid production, respectively, using a DU-640 series Beckman spectrophotometer. This system is useful to test the O₂^{•-} scavenging capacity only when the samples used do not interfere with the xanthine oxidase activity. A compound with O₂^{•-} scavenging capacity should decrease NBT reduction without interfering with the xanthine oxidase activity measured as uric acid production. Eight hundred μ L of the following reaction mixture: 90 μ M xanthine, 16 mM Na₂CO₃, 22.8 μ M NBT, and 18 mM phosphate buffer (pH 7.0) were mixed with 100 μ L of phosphate buffer 50 mM (pH 7.0) (0% scavenging tube) or with 100 μ L of different concentrations of each extract or secondary metabolite. The reaction was started by the addition of 100 μ L of xanthine oxidase (168 U/L). Optical density was registered both at 295 nm (for uric acid production) and 560 nm (for O₂^{•-} in the assay system) (Floriano-Sánchez et al., 2006). Scavenging percent was obtained from the optical densities at 560 nm. NDGA was used as standard for O₂^{•-} scavenging in this assay (Guzmán-Beltrán et al., 2008).

2.6. Determination of H₂O₂ by the ferrous ion oxidation-xylenol orange (FOX) assay

A solution of 75 μ M H₂O₂ was mixed (1:1, v/v) with water (0% scavenging tube) or with different concentrations of either extract or metabolites and incubated for 30 min at room temperature. After this, H₂O₂ was measured by the following method. Briefly, 9 volumes of 4.4 mM BHT in HPLC-grade methanol were mixed with 1 volume of 1 mM xylenol orange and 2.56 mM ammonium ferrous sulfate in 0.25 M H₂SO₄ to give the "working" FOX reagent. Forty five μ L of the extract solutions and 45 μ L of 75 μ M H₂O₂ were dispensed in 1.5 mL Eppendorf tubes and mixed with 10 μ L of HPLC-grade methanol immediately followed by the addition of 0.9 mL of FOX reagent, mixed on a Vortex mixer for 5 s and then incubated at room temperature for 10 min. The tubes were centrifuged for 15,000 \times g for 10 min and absorbance at 560 nm was read against a methanol blank. The concentration of H₂O₂ was calculated from a standard curve prepared with increasing H₂O₂ concentrations. Pyruvate was used as standard for H₂O₂ scavenging activity (Floriano-Sánchez et al., 2006).

2.7. OH[•] scavenging capacity

The ability of extracts or metabolites isolated from *H. inuloides* methanolic extract to scavenge OH[•] was conducted in the Fe²⁺-EDTA-H₂O₂-deoxyribose system (Floriano-Sánchez et al., 2006). The reaction mixture containing deoxyribose (0.056 mM), H₂O₂ (1 mM), potassium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4), FeCl₃ (0.2 mM), EDTA (0.2 mM) and ascorbic acid (0.2 mM) was incubated in a water bath at 37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C for 1 h. The extent of deoxyribose degradation by the OH[•] formed was

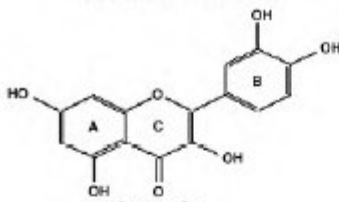
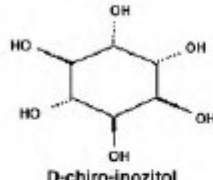
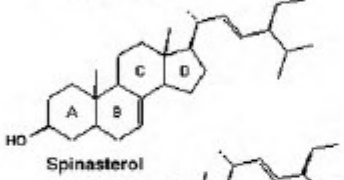
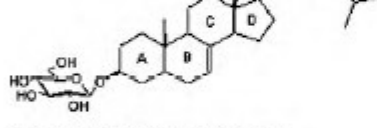
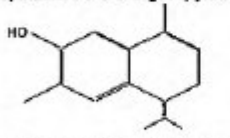
Metabolite Structure	% in Acetonic Extract	% in Methanolic Extract
 <p>Quercetin</p>	0.028	0.19
 <p>D-chiro-inositol</p>	ND*	0.09
 <p>Spinasterol</p>	ND	0.04
 <p>Spinasteril 3-O-beta-D-glucopyranoside</p>	ND	0.05
 <p>7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin</p>	0.017	0.004

Fig. 1. Secondary metabolites isolated from *H. insidiosus* extracts. Data were obtained from Delgado et al. (2001); Delgado, personal communication. *Not detected.

measured directly in the aqueous phase by the thiobarbituric acid test at 532 nm. The ability of extracts or metabolites to scavenge OH[•] was compared with that of DMTU (Roriano-Sánchez et al., 2006).

2.8. Singlet oxygen (¹O₂) assay

The production of ¹O₂ by NaOCl and H₂O₂ was determined as reported elsewhere (Medina-Campos et al., 2007) with minor modifications in which DMNA was used as selective acceptor of ¹O₂. The bleaching of DMNA was monitored spectrophotometrically at 440 nm. The assay mixture contained 45 mM Na-phosphate buffer (pH 7.1), 10 mM histidine, 10 mM NaOCl, 10 mM H₂O₂, 50 μM DMNA, and 0.1 mL of *H. insidiosus* extracts. The total volume of reaction (2.0 mL) was incubated at 30 °C for 40 min. The extent of ¹O₂ production was determined by measuring the decrease in the absorbance of DMNA at 440 nm. The relative scavenging efficiency (% inhibition production of ¹O₂) of metabolites and extracts was estimated from the difference in absorbance of DMNA with and without the addition of the samples being tested or the reference compound. Glutathione was used as standard for ¹O₂ scavenging (Roriano-Sánchez et al., 2006).

2.9. HOCl scavenging assay

This assay involves a spectral analysis of the enzyme catalase in the presence of HOCl that inactivates the antioxidant enzyme, changing its spectrum by the destruction of heme and the peak of catalase at 404 nm disappears. The HOCl scavenging capacity of metabolites, extracts or the reference antioxidant was evident by the inability of HOCl to eliminate/decrease the catalase peak in a concentration-dependent way. Experiments were carried out essentially as described before (Pedraza-Chaverri et al., 2007). A solution of 40.8 μM bovine liver catalase (16.5 μM, final concentration) was mixed with 18 mM HOCl (5 mM, final concentration) in the presence of increasing concentrations of metabolites, extracts or the reference compound.

Spectra (370–450 nm) of catalase alone, catalase plus HOCl, or catalase plus HOCl and the extracts, metabolites or the reference compound were registered and the optical densities (OD) at 404 nm were obtained. The value of the OD of catalase alone minus the OD of catalase plus HOCl was considered as 100% of degradation of catalase (or 0% of scavenging activity), and the difference of the catalase alone minus the OD of the catalase plus HOCl in the presence of either extract, metabolites or reference compound was compared against this value. The ability of samples to scavenge HOCl was compared with that of ascorbic acid (Maldonado et al., 2005).

2.10. ONOO⁻ scavenging assay

ONOO⁻ was synthesized as previously described (Roriano-Sánchez et al., 2006). Five mL of an acidic solution (0.6 M HCl) of H₂O₂ (0.7 M) was mixed with 5 mL of 0.6 M KNO₂ on an ice bath for 1 s and the reaction was quenched with 5 mL of ice-cold 1.2 M NaOH. Residual H₂O₂ was removed using prewashed granular MnO₂ and the reaction mixture was then left overnight at -20 °C. The resulting yellow liquid layer on the top of the frozen mixture was collected for the experiment.

The ONOO⁻ mediated oxidation of DHR123 was performed as described before (Roriano-Sánchez et al., 2006). A 50 μM solution of DHR123 was prepared from a 28 mM stock solution in DMSO. The solution was maintained protected from light and at 4 °C during the assay. All reaction mixtures contained 5 μM DHR123, 0.1 mM DTPA, different concentrations of metabolites or extracts and 25 μM ONOO⁻. Optical density was registered at 500 nm; the optical density of a mixture without test sample was considered as 100% and the optical densities of the mixtures containing either an extract or metabolites were compared against it. The ability of the tested samples to scavenge ONOO⁻ was compared with that of penicillamine (Roriano-Sánchez et al., 2006).

2.11. Determination of total polyphenols

Total polyphenols were determined in the acetonic and methanolic extracts by the Folin-Ciocalteu method (Ainsworth and Gillespie, 2007). Each extract solution (0.1 mL) containing 100 mg plant extract was mixed with 100 μL of Folin-Ciocalteu reagent. The mixture was incubated for 1 min at room temperature, and 300 μL of sodium carbonate (200 g/L) was added. The mixture was incubated for 15 min at 50 °C and cooled in a water ice bath. Finally, the absorbance at 765 nm was scored in a spectrophotometer (Model 2000 compliant, Helios α, Cambridge, UK). Total polyphenols were expressed as mg of catechin equivalents/g of extract after interpolating in a calibration curve obtained following the same procedure described above and using α(+)-catechin and quercetin as standard.

2.12. Analysis of flavonoid content

Total flavonoid in acetonic and methanolic extract was determined with aluminium chloride (AlCl₃) (Zhishe et al., 1999). The plant extract (0.1 mL) was added to 0.3 mL distilled water followed by NaNO₂ (0.03 mL, 5%). After 5 min at 25 °C AlCl₃ (0.03 mL, 10%) was added. The mixture was incubated for 5 min at room temperature, and 0.2 mL 1 mM NaOH. Absorption at 510 nm was scored in a spectrophotometer (Model 2000 compliant, Helios α, Cambridge, UK). Result were expressed as mg of quercetin equivalents/g of extract after interpolating in a calibration curve obtained following the same procedure described above and using quercetin as standard.

2.13. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. The data were compared against the blank tube without *H. inuloides* extracts, metabolites or the reference compounds, using one way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test (GraphPad Prism 4.0 Software, San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ was considered statistically significant. The scavenging capacity was expressed as the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) value, which denotes the concentration of *H. inuloides* extracts, metabolites or the reference compounds required to give a 50% reduction in oxidating effect relative to the blank tube.

3. Results

3.1. Phenolic and flavonoid content of *H. inuloides* extracts

Total phenolic and flavonoid contents, in acetonic and methanolic extracts of *H. inuloides* were estimated based on the method of Folin-Ciocalteu and aluminium chloride using catechine and quercetin as standards, respectively. The total amount of polyphenols contained in acetonic and methanolic extracts were of 19.35 and 50.03 mg/mL of catechine equivalents, respectively. The total flavonoids content were of 0.030 and 0.070 mg/mL of quercetin equivalents in the acetonic and methanolic extracts, respectively. These assays provide a general diagnostic tool of the antioxidant capacity of extracts.

3.2. Scavenging activity of *H. inuloides* extracts

The *H. inuloides* methanolic and acetonic extracts as well as the reference compounds, scavenged DPPH[•], ABTS^{•+}, O₂^{•-}, HOCl, H₂O₂, ONOO⁻, ¹O₂, and OH[•] in a concentration-dependent way (Fig. 2). The IC₅₀ values, calculated from the linear portion of the

dose-response curve, are shown in Table 1. The analysis of the IC₅₀ values indicated that the methanolic extract displays a higher scavenging activity compared to the acetonic extract and, with the exception of DPPH[•] and OH[•], a greater capacity in the scavenging of all the radicals tested was observed with the *H. inuloides* extracts than with the reference compounds. For ABTS^{•+}, the scavenging ability of *H. inuloides* methanolic and acetonic extracts was 12.3- and 6.3-fold higher respectively than that of ascorbic acid (Table 1, Fig. 2A); the decrease in the level of ABTS^{•+} is related to the concentration of the extracts. On the other hand, the methanolic and acetonic extracts also displayed DPPH[•] radical scavenging ability, although it was less efficient (37 and 66%, respectively) than ascorbic acid (Table 1, Fig. 2B).

O₂^{•-} radical scavenging abilities of *H. inuloides* methanolic and acetonic extracts were 3- and 2.6-fold higher than that of NDGA, respectively (Table 1, Fig. 2C). The extracts also scavenged HOCl with more efficiency (2.7- and 2.5-fold, respectively) than ascorbic acid (Table 1, Fig. 2D). Additionally, H₂O₂ scavenging abilities of *H. inuloides* methanolic and acetonic extracts were 1.8- and 1.3-fold higher than that of sodium pyruvate (Table 1, Fig. 2E).

With respect to OH[•], the scavenging ability of the methanolic extract was similar to that exhibited by DMTU and the acetonic extract was fairly less active than DMTU (Table 1, Fig. 2F). The two extracts were 10 times more efficient in trapping ONOO⁻ than penicillamine (Table 1, Fig. 2G), and GSH scavenged singlet oxygen with a 27 and 45% lower capacity than methanolic and acetonic extracts, respectively (Table 1, Fig. 2H).

3.3. Scavenging activity of *H. inuloides* bioactive compounds

In an attempt to obtain more information concerning the nature of the active molecules related to the scavenging activity detected in the extracts, we included in the analysis the following secondary metabolites identified previously in the methanolic extract (Delgado, personal communication): spinasteryl 3-O-β-D-glucopyranoside, D-chiro-inositol, quercetin, 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin and spinasterol.

Regarding the O₂^{•-} scavenging ability of the secondary metabolites, their antioxidant capacity decreased in the following order: D-chiro-inositol > quercetin > spinasteryl 3-O-β-D-glucopyranoside > spinasterol > 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin; all of them were better antioxidants than NDGA (Table 2, Fig. 3A). Spinasterol followed by quercetin and spinasteryl 3-O-β-D-glucopyranoside showed to possess the higher scavenging ability against HOCl, all these metabolites displayed a dose-dependent scavenging activity (Table 2, Fig. 3B). The IC₅₀ value of D-chiro-inositol and 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin exceeded the values of the concentrations tested which were limited by the available amount of the compounds. The H₂O₂ scavenging ability of the metabolites showed the following decreasing order: D-chiro-inositol > spinasterol > spinasteryl 3-O-β-D-glucopyranoside > quercetin > 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin (Table 2, Fig. 3C). Once again, D-chiro-inositol and quercetin showed the greatest ability to cope with OH[•] followed by 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin. The IC₅₀ values of spinasterol and spinasteryl 3-O-β-D-glucopyranoside were higher than the concentrations used in this experiment (Table 2, Fig. 3D). The ONOO⁻ scavenging capacity of quercetin and spinasteryl 3-O-β-D-glucopyranoside was 11 and 2 times more efficient, respectively than penicillamine. At the concentrations used in this experiment, we were unable to calculate the IC₅₀ value for the other metabolites (Table 2). Finally, the ¹O₂ radical scavenging ability of the metabolites in decreasing order was: spinasterol > 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin > quercetin > spinasteryl 3-O-β-D-glucopyranoside > D-chiro-inositol (Table 2, Fig. 3F).

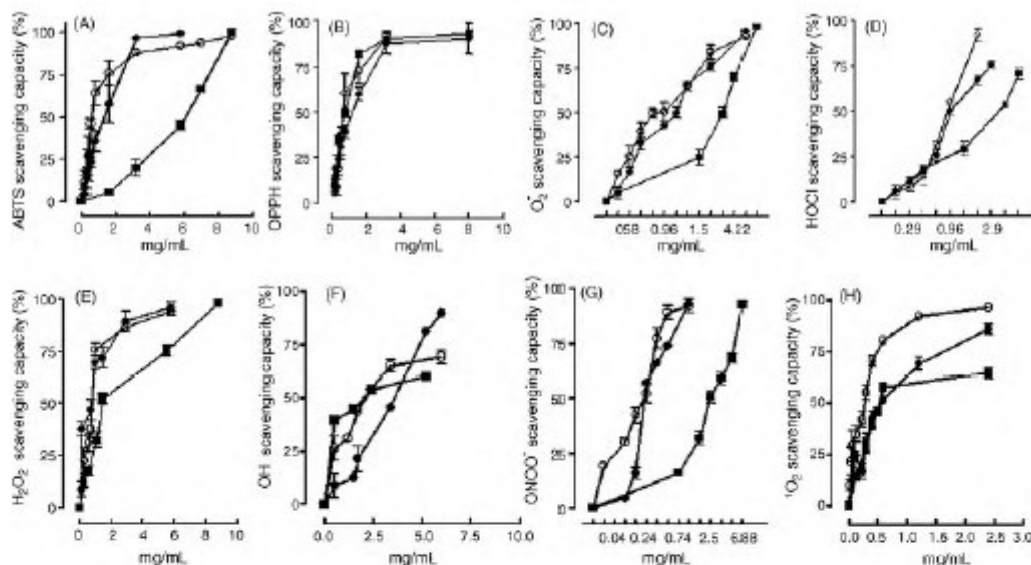


Fig. 2. Antioxidant properties of methanolic and acetic extracts of *H. tinctoria*. ABTS^{•+} (panel A), DPPH[•] (panel B), O₂^{•-} (panel C), HOCl (panel D), H₂O₂ (panel E), OH[•] (panel F), ONOO[•] (panel G), ¹O₂[•] (panel H), scavenging capacity of the acetic extract (●), methanolic extract (○) and reference compounds (■): ascorbic acid for ABTS^{•+}, DPPH[•] and HOCl, NDGA for O₂^{•-}, Pyruvate for H₂O₂, DMTU for OH[•], penicillamine for ONOO[•] and GSH for ¹O₂. Data are presented as mean ± SEM of 6 assays.

Table 1
Scavenging capacity of the acetic and methanolic extracts from *Heterotheca tinctoria* and reference compounds.

Species	Acetic extract IC ₅₀ (mg/mL)	Methanolic extract IC ₅₀ (mg/mL)	Reference compound	IC ₅₀ (mg/mL)
ABTS ^{•+}	1.02 ± 0.16 ^c	0.52 ± 0.70 ^d	Ascorbic acid	6.38 ± 0.56
DPPH [•]	1.38 ± 0.24	1.14 ± 0.16	Ascorbic acid	0.83 ± 0.09
O ₂ ^{•-}	1.16 ± 0.040 ^d	0.98 ± 0.30 ^d	NDGA	3.02 ± 0.45
HOCl	0.95 ± 0.12 ^c	0.88 ± 0.20 ^d	Ascorbic acid	2.34 ± 0.23
H ₂ O ₂	1.01 ± 0.15 ^c	0.73 ± 0.20 ^a	Pyruvate	1.35 ± 0.02
OH [•]	3.72 ± 0.20 ^c	2.13 ± 0.10 ^a	DMTU	2.53 ± 0.13
ONOO [•]	0.26 ± 0.30 ^c	0.24 ± 0.10 ^c	Penicillamine	2.46 ± 0.08
¹ O ₂ [•]	0.33 ± 0.010 ^c	0.20 ± 0.14 ^c	GSH	0.74 ± 0.10

Data represent: mean ± SE of six independent assays.

^a p < 0.001 vs. reference compound.

^b p < 0.01 vs. reference compound.

^c p < 0.001 vs. acetic extract.

^d p < 0.05 vs. acetic extract.

Table 2
Scavenging capacity of metabolites isolated from *Heterotheca tinctoria* methanolic extract.

Specie	Quercetin K50 (mg/mL)	7-Hydroxy-3,4-dihydrocadalin K50 (mg/mL)	Spinasterol IC50 (mg/mL)	Spinasteril 3-O-β-D-glucopyranoside IC50 (mg/mL)	D-Chiro-inositol IC50 (mg/mL)	Reference compound	K50 (mg/mL)
O ₂ ^{•-}	0.052 ± 0.024 ^d	0.26 ± 0.053 ^d	0.029 ± 0.003 ^a	0.183 ± 0.026 ^b	0.030 ± 0.004 ^a	NDGA	3.02 ± 0.3
HOCl	0.070 ± 0.020 ^d	>1.0	0.032 ± 0.003 ^d	4.31 ± 0.052 ^{c,b}	>0.666	Ascorbic acid	1.655 ± 0.014
H ₂ O ₂	0.167 ± 0.058 ^d	0.947 ± 0.039 ^{a,b}	0.057 ± 0.005 ^{b,c}	0.070 ± 0.0028 ^{c,d}	0.018 ± 0.002 ^{c,d}	Pyruvate	0.1870 ± 0.15
OH [•]	0.258 ± 0.015 ^d	0.680 ± 0.015 ^c	>0.833	>4.0	0.156 ± 0.014 ^{c,d}	DMTU	2.306 ± 0.120
ONOO [•]	0.191 ± 0.013 ^d	>1.0	>0.833	0.977 ± 0.001 ^d	>0.666	Penicillamine	2.059 ± 0.340
¹ O ₂ [•]	0.325 ± 0.038 ^d	0.047 ± 0.006 ^c	0.002 ± 0.0003 ^d	0.113 ± 0.0022 ^{c,d}	0.338 ± 0.024 ^{c,d}	GSH	0.74 ± 0.066

Data represent: the mean ± SE of six independent assays.

^a p < 0.001 vs. reference compound.

^b p < 0.001 vs. quercetin.

^c p < 0.05 vs. quercetin.

^d p < 0.001 vs. spinasterol.

^e p < 0.001 vs. 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin.

^f p < 0.001 vs. spinasteril 3-O-β-D-glucopyranoside.

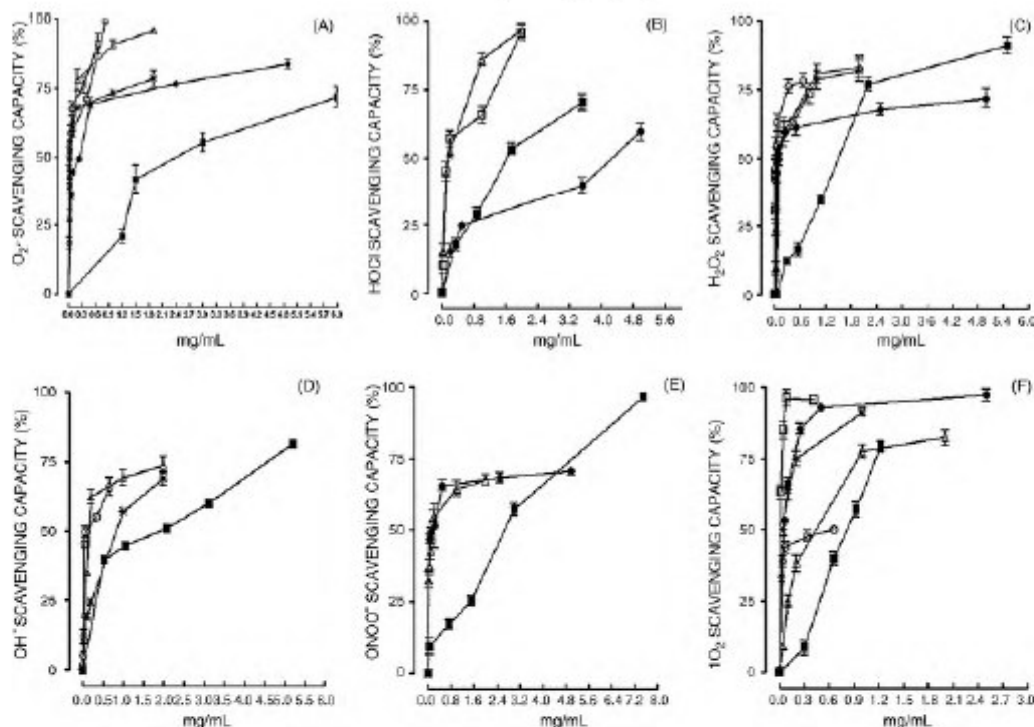


Fig. 3. Antioxidant properties of metabolites present in the methanolic extract of *H. inuloides*. $O_2^{\cdot-}$ (panel A), HOCl (panel B), H_2O_2 (panel C), OH^{\cdot} (panel D), $ONOO^{\cdot}$ (panel E), 1O_2 (panel F) scavenging capacity of metabolites in the methanolic extract: quercetin (Δ), 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalen (∇), spinasterol (\square), 3-O- β -D-glucopyranoside-spinasterol (\circ), D-chiro-Inositol (\square) and reference compounds: (■): NDCA for $O_2^{\cdot-}$, pyruvate for H_2O_2 , DMTU for HO^{\cdot} , penicillamine for $ONOO^{\cdot}$ and CSH for 1O_2 . Data are presented as mean \pm SEM of 6 assays.

4. Discussion

ROS contributes to the development of various diseases such as atherosclerosis, diabetes, cancer, neurodegenerative diseases, liver cirrhosis and the ageing process (Halliwell and Gutteridge, 1999; Basaga, 1990). It is well established that lipid peroxidation is one of the end-points resulting as a consequence of the formation of ROS in cells and tissues (Basaga, 1990). The use of antioxidant compounds, such as radical scavengers, might contribute to prevent those diseases and maintain health.

H. inuloides is a recognized plant with several beneficial health effects that has been used in México for the treatment of post-operative thrombophlebitis and externally for acne, bruises and muscle aches. Several constituents of *H. inuloides* have been identified, mainly flavonoids, sesquiterpenoids, triterpenoids and sterols. Although some reports concerning the antioxidant properties of this plant as well as some of its components have been published, a systematic characterization of its ROS scavenging properties has not been described. Such a characterization is part of the bio-evaluation of the effectiveness of traditional medicines and helps to identify the molecules with pharmacologic potential.

The antioxidative molecules present in biological systems are classified as preventive antioxidants and chain-breaking ones (Halliwell and Gutteridge, 1990), the former scavenge

reactive oxygen species and chain-breaking antioxidants act by combining with chain-propagating radicals. Flavonoids from *H. inuloides* would be included among the preventive antioxidants, while sesquiterpenoids would be classified as chain-breaking antioxidants (Haraguchi et al., 1997). Our results agreed well with this classification, quercetin displayed a higher scavenging capacity than 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin and the flavonoid rich methanolic extract, is more efficient than the acetonic one in quenching H_2O_2 and OH^{\cdot} (Table 2).

The reported levels of quercetin in the methanolic extract (Fig. 1) may constitute an important factor contributing to its antioxidant capacity. Polyphenols are very important plant constituents with scavenging abilities associated to their hydroxyl groups and to their capacity to chelate transition metal ions (Rice-Evans et al., 1997). Data in the literature corroborate the structural features of flavonoids that are important for its free radical scavenging activities (Soobrattee et al., 2005), including: (i) an *o*-diphenolic group in ring B; (ii) a 2–3 double bond conjugated with 4-oxo function; and (iii) the presence of hydroxyl groups in positions 3 and 5, and quercetin (Fig. 1) fulfill these structural requirements.

Although some flavonoids from *H. inuloides* individually exert an anti-inflammatory action, the major anti-inflammatory activity was found in the acetonic extract, detected by the inhibition of edema in mouse ear induced by TPA (Delgado et al., 2001).

Sesquiterpenoids from *H. inuloides* exhibited potent DPPH[•] scavenging activity but showed no activity against O₂^{•-} generated enzymatically or non-enzymatically; conversely, flavonoids are efficient in scavenging both types of radicals (Haraguchi et al., 1997). DPPH[•] scavenging activity exerted by 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin could be due to the presence of a hydroxyl group adjoined to a methyl group in this molecule (Fig. 1), since β-naphthol, a structural related compound, also showed a similar pattern in DPPH[•] quenching effect (Haraguchi et al., 1997).

As mentioned before, the catechol group in the ring B of flavonoids is among the major structural features behind its antioxidant activity due to the favorable reduction potential (Jovanovic et al., 1996). The predominant mechanism of action of catechols is probably via donation of a single electron to the radical cation resulting in the formation of a semiquinone, which can donate a further electron to form the quinone (Pannala et al., 2001).

Evidences from Binsack et al. (2001) indicate that the reaction between flavonoids like quercetin and HOCl may lead to the production of a stable chlorinated compound with greater antioxidant potency. It has been demonstrated also that flavonoids are good scavengers of ONOO⁻ and nitric oxide (Haenen et al., 1997) and that quercetin and kaempferol dose-dependently inhibited nitrite release in LPS-stimulated RAW 264.7 cells through the down regulation of iNOS mRNA expression (Wang et al., 2006). Regarding the ¹O₂ scavenger activity of *H. inuloides* extracts, it could be partially explained by the powerful ¹O₂ quenching activity displayed by the terpenoid chain of terpenoids (Wang and Jiao, 2000). Our results showed that among the metabolites tested, spinasterol and 7-hydroxy-3,4-dihydrocadalin were active scavengers of singlet oxygen (Table 2). It is important to note that substituting the OH-moiety from ring A of spinasterol with a glucosyl radical, lead to a substantial decrease in O₂^{•-}, HOCl and ¹O₂ quenching activity (Fig. 1; Table 2).

There is scarce information concerning the antioxidant properties of D-chiro-inositol. Nascimento et al. (2006) demonstrated that D-chiro-inositol and 3-O-methyl D-chiro-inositol dose-dependently reduced reactive oxygen species to basal, being 3-O-methyl D-chiro-inositol more effective than D-chiro-inositol with endothelial cells incubated in high glucose. On the other hand, both compounds have already been shown to have insulin-like metabolic effects in diabetic animals, primates and humans, decreasing hyperglycemia and hyperlipidemia (Ortmeyer et al., 1995; Fonteles et al., 1996; Nestler et al., 1999). Structure-activity relationships between D-chiro-inositol homologues are underway in our laboratory to establish the important molecular features for the antioxidant activity.

In the present study, we have shown that both extracts and the metabolites isolated from *H. inuloides* methanolic extract as well as the reference compounds, scavenged O₂^{•-}, HOCl, H₂O₂, ONOO⁻, ¹O₂, and OH[•] in a concentration-dependent way; all extracts and metabolites were more efficient than the respective reference compounds. We can conclude that the scavenging properties of *H. inuloides*, described in this paper, could explain some of the health beneficial effects attributed to this plant since the excessive production of O₂^{•-}, HOCl, H₂O₂, ONOO⁻, ¹O₂ and OH[•] are involved in several pathologies. The major scavenging potency resides in the methanolic extract in which polyphenols are abundantly present. Particularly, D-chiro-inositol, spinasterol and quercetin, showed the highest free radical scavenging properties and further investigation on their potential use as chemopreventive agents in animal models is guaranteed.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We appreciate the technical assistance of Biol. Sandra Hernández Ojeda. This work was partially supported by DGAPA (UNAM) IN214908; IN201910 and CONACyT 129838. The advice of Dr. Regina Montero Montoya in the preparation of this manuscript is gratefully acknowledged.

References

- Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2, 875–877.
- Almaguer, G.J.A., 2001. Programa de Trabajo 2001–2006 de la Dirección de Medicina Tradicional. Coordinación de Salud para los Pueblos Indígenas. Secretaría de Salud, México, D.F. p. 12.
- Basaga, H.S., 1990. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell Biol.* 68, 989–998.
- Binsack, R., Boersma, B.J., Patel, R.P., Kirk, M., Roger, W.C., Darley-Usmar, V., Barnes, S., Zhou, F., Parks, D.A., 2001. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 434–443.
- Cobalase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Certrudis, B., García-Cruz, M.E., Ramírez-Morales, A., Sánchez-González, D.J., Martínez-Martínez, C.M., Camacho-Carranza, R., Espinosa-Aguirre, J.J., 2010. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* doi:10.1016/j.etp.2010.02.012.
- Delgado, G., Olivares, M., Chávez, M., Ramírez-Apañ, T., Linares, E., Bye, R., Espinosa-García, J., 2001. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J. Nat. Prod.* 64, 861–864.
- Floriano-Sánchez, E., Villanueva, C., Medina-Campos, O.N., Rocha, D., Sánchez-González, D.J., Cárdenas-Rodríguez, N., Pedraza-Chaverri, J., 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic. Res.* 40, 523–533.
- Fonteles, M.C., Huang, L.C., Larner, J., 1996. Infusion of pH 2.0 D-chiro-inositol glycan insulin putative mediator normalizes plasma glucose in streptozotocin diabetic rats at a dose equivalent to insulin without inducing hypoglycemia. *Diabetologia* 39, 731–734.
- Gené, R.M., Segura, L., Adzer, T., Marín, E., Iglesias, J., 1998. *Heterotheca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effect. *J. Ethnopharmacol.* 60, 157–162.
- Guzmán-Beltrán, S., Orta-co-Ibarra, M., González-Cuahuatencos, O., Victoria-Mares, S., Merchand-Reyes, G., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., 2008. Neuroprotective effect and reactive oxygen species scavenging capacity of mangosteen pericarp extract in cultured neurons. *Curr. Top. Nutraceut. Res.* 6, 149–158.
- Haenen, G.R., Paquay, J.B., Korthouwer, R.E., Bast, A., 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 591–593.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 280, 1–8.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford Sciences Publication, Oxford, USA, pp. 617–783.
- Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Sánchez, Y., Ogura, T., Kubo, I., 1996. Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *J. Pharm. Pharmacol.* 48, 441–443.
- Haraguchi, H., Ishikawa, H., Sánchez, Y., Ogura, T., Kubo, Y., Kubo, I., 1997. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorg. Med. Chem.* 5, 871–885.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Hara, Y., Simic, M.C., 1996. Reduction potentials of flavonoids and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2497–2504.
- Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., Chaudhuri, S.K., Sánchez, Y., Ogura, T., 1994. Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.* 60, 218–221.
- Kubo, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., Sánchez, Y., Ogura, T., Saito, T., Ishikawa, H., Haraguchi, H., 1996. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.* 62, 427–430.
- Maldonado, P.D., Bivero-Cruz, I., Mata, R., Pedraza-Chaverri, J., 2005. Antioxidant activity of A-type proanthocyanidins from *Geranium niveus* (Ceramiales). *J. Agric. Food Chem.* 53, 1995–2001.
- Medina-Campos, O.N., Barrera, D., Segoviano-Murillo, S., Rocha, D., Maldonado, P.D., Mendoza-Patiño, N., Pedraza-Chaverri, J., 2007. S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2030–2039.
- Nascimento, N.R.F., Lessa, L.M.A., Kerntopf, M.R., Souza, C.M., Alves, R.S., Queiroz, M.G.R., Price, J., Heimark, D.B., Larner, J., Du, X., Brownlee, M., Gow, A., Davis, C., Fonteles, M.C., 2006. Inositols prevent and reverse endothelial dysfunction in diabetic rat and rabbit vasculature metabolically and by scavenging superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 218–223.
- Nestler, J.E., Jakubowicz, D.J., Reamer, P., Gunn, R.D., Allan, G., 1999. Ovarian and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 340, 1314–1320.
- Ortmeyer, H.K., Bodkin, N.L., Hansen, B.C., Larner, J., 1995. In vivo D-chiroinositol activates skeletal muscle glycogen synthase and inactivates glycogen phosphorylase in rhesus monkeys. *J. Nutr. Biochem.* 6, 499–503.

- Pannala, A.S., Chan, T.S., O'Brien, P.J., Rice-Evans, C.A., 2001. Flavonoid B-Ring Chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1161–1168.
- Pedraza-Chaverri, J., Ariaga-Noblecia, G., Medina-Campos, O.N., 2007. Hypochlorous acid scavenging capacity of garlic. *Phytother. Res.* 9, 884–888.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Pagana, J., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152–159.
- Soubraitee, M.A., Neergheen, V.S., Luthmon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahoran, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat. Res.* 579, 200–213.
- Sorg, O., 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C.R. Biol.* 327, 640–662.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Wang, S.Y., Jiao, H., 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5677–5684.
- Wang, L., Chen Tu, Y., Lian, T.W., Hung, J.T., Yen, J.H., Wu, M.J., 2006. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9798–9804.
- Ying-Shun, J., Seong-il, H., Min-jae, L., Hae-ik, R., Myeong-Hyeon, W., 2005. Free radical scavenging and hepatoprotective action of *Quercus aliena* acorn extract against CCl₄-induced liver. *Free Radic. Res.* 39, 1351–1358.
- Zhishe, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559.



Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats[☆]

Elvia Coballase-Urrutia^{a,b}, José Pedraza-Chaverri^c, Noemí Cárdenas-Rodríguez^a, Bernardino Huerta-Gertrudis^a, Mercedes Edna García-Cruz^a, Aline Ramírez-Morales^a, Dolores Javier Sánchez-González^d, Claudia María Martínez-Martínez^d, Rafael Camacho-Carranza^e, Jesús Javier Espinosa-Aguirre^{e,*}

^a Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, 04530 México D.F., México

^b Pasgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

^c Facultad de Química, Departamento de Biología, Edificio F, Segundo Piso, Laboratorio 209, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

^d Departamento de Biología Celular, Escuela Médica Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 México D.F., México

^e Departamento de Medicina Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 September 2009
Accepted 24 February 2010

Keywords:
Heterotheca inuloides
Mexican amaranth
Hepatotoxicity
Antioxidant enzyme marker
Hepatoprotective effect

ABSTRACT

A model of hepatotoxicity by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats was used in order to evaluate the protective potential of the acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides*. Pretreatment with the two *H. inuloides* extracts attenuated the increase in the activity of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) observed in CCl₄-induced liver injury. The protective effect was confirmed by the analysis of tissue slides stained with hematoxylin-eosin and periodic acid/Schiff's reagent. Additionally, the two extracts are scavengers to the superoxide radical as was observed by electron paramagnetic resonance. Due to the fact that the methanolic extract resulted in a better protective effect in the previous experiments, it was used to investigate in more detail the mechanism of hepatoprotection. Quercetin, one of the main components of the extract, with known hepatoprotective and antioxidant activity was used as a positive control. Pretreatment of animals with the methanolic extract or quercetin, was associated with the prevention of 4-hydroxynonenal and 3-nitrotyrosine increase in the liver, two markers of oxidative stress. Furthermore, the decrease in the activity of several antioxidant enzymes including superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in CCl₄-induced liver injury was alleviated by the pretreatment with *H. inuloides* methanolic extract or quercetin. These results suggest that the hepatoprotective capacity of *H. inuloides* methanolic extract is associated with its antioxidant properties, which would also explain the biomedical properties attributed to this plant.

© 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The potentially reactive oxygen species, ascribed as ROS, such as superoxide radical (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical (OH[•]), are continuously generated inside the human body as a consequence of the exposure to exogenous chemicals in our environment and/or to a number of endogenous metabolic processes involving redox enzymes and bioenergetic electron transfer (Halliwell and Gutteridge, 2007). Under normal circumstances, the ROS generated are detoxified by the antioxidant defenses leading

to equilibrium between these two processes. However, owing to ROS overproduction and/or inadequate antioxidant defenses, this equilibrium is hampered, thus favoring a surge of ROS that culminates in oxidative stress. The ROS readily attack and induce oxidative damage to several biomolecules including proteins, lipids, lipoproteins and DNA (Valko et al., 2007; Seifried et al., 2007), contributing to the development of various diseases such as atherosclerosis, diabetes, cancer, neurodegenerative diseases, hepatic diseases and the ageing process (Halliwell and Gutteridge, 2007; Seifried et al., 2007).

To prevent the damage caused by ROS, living organisms have developed an antioxidant defense system that includes the presence of nonenzymatic antioxidants (e.g. glutathione, uric acid, bilirubin, and vitamins C and E) and enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (Gpx) (Valko et al., 2007). It has been proposed that

[☆] To Dr. Filaret Abdullayev (aforosa in memoriam).

* Corresponding author. Tel.: +52 56229214; fax: +52 56229182.

E-mail addresses: jjea@servidor.unam.mx, jjea69@gmail.com (J. Javier Espinosa-Aguirre).

0940-2993/\$ - see front matter © 2010 Elsevier GmbH. All rights reserved.
doi:10.1016/j.etp.2010.02.012

Please cite this article as: Coballase-Urrutia E, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* (2010). doi:10.1016/j.etp.2010.02.012

in addition to these natural antioxidant systems, other synthetic or natural ROS scavengers may reduce the incidence of free radical-mediated diseases. The use of antioxidants in the prevention and cure of various diseases is expanding, and there is considerable interest in the study of the antioxidant activities of molecules such as plant polyphenolic and carotenoid components (Valko et al., 2007; Fang et al., 2002). In the absence of reliable hepatoprotective drugs in modern medicine, a large number of phytochemicals and extracts prepared from folk medicinal plants with proven hepatoprotective properties, could be an alternative in the treatment of liver diseases resulting from high alcohol consumption, exposure to xenobiotics and therapeutic agents and other factors leading to the onset of chronic liver diseases which are very often related to oxidative stress (Novo and Parola, 2008; Gurtsevitch, 2008; Conde de la Rosa et al., 2008; Farrell and Larter, 2006; Albano, 2006; Otani et al., 2005).

Heterotheca inuloides (Asteraceae) grows abundantly in the cooler and temperate regions of Mexico (De Rzedowski and Rzedowski, 2001). The dried flowers of *H. inuloides* known as "amica" have long been used as a folk medicine for the topical treatment of contusions, bruises and postoperative thrombophlebitis (Martínez, 1984, 1989). More frequently, this plant has been used externally for the treatment of skin wounds and injuries (Gené et al., 1998). Furthermore, *H. inuloides* have been recognized as an antioxidant (Kubo et al., 1996; Haraguchi et al., 1997), for its inhibitory activity against lipid peroxidation and oxidative haemolysis (Haraguchi et al., 1996) and for its antimicrobial (Kubo et al., 1994), anti-inflammatory, analgesic and cytotoxic effects against several solid tumor cell lines (Gené et al., 1998; Kubo et al., 1996; Segura et al., 2000; Delgado et al., 2001). Acetonic and methanolic extracts of the plant have been previously characterized and are known to contain several constituents such as polyacetylenes, cadinanes, triterpenes, sterols, sesquiterpenes, flavonoids and flavonoid glycosides (Table 1). Due to the antioxidant potential and capacity to inhibit lipid peroxidation of its components, we hypothesized that *H. inuloides* extracts could alleviate hepatotoxicity resulting from oxidative stress. To prove this, we chose the carbon tetrachloride (CCl_4) hepatotoxicity model in the rat. CCl_4 is a potent lipid-soluble hepatotoxic agent which produces peroxidative degeneration of many tissues (Szymonik-Lesiuk et al., 2003). The toxicity of CCl_4 probably depends on the formation of the trichloromethyl radical ($\text{CCl}_3\cdot$) which in the presence of oxygen forms the more toxic

trichloromethyl peroxy radical ($\text{CCl}_3\text{O}\cdot$) (Recknagel et al., 1989). Lipid peroxidation is initiated by the interaction of these reactive radicals with unsaturated fatty acids of membrane lipids (Szymonik-Lesiuk et al., 2003; Recknagel et al., 1989; Clawson, 1989).

As far as we know, a comprehensive study of the potential protective capabilities of this plant in an animal model had not been reported. With this goal in mind, we first used general biochemical and histological parameters to examine the protective action of *H. inuloides* acetonic and methanolic extracts. We also identified their scavenging $\text{O}_2^{\cdot-}$ capacity using electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometry and came to the conclusion that the methanolic extract displays a higher protective effect. Additional experiments to explore the possible mechanism of action indicated that the methanolic extract and one of its main components, quercetin, prevented the elevation of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and 3-nitrotyrosine (3-NT) as well as the reduction in the activity of hepatic antioxidant enzymes resulting from CCl_4 treatment. These results indicate that *H. inuloides* extracts protect liver from CCl_4 damage through the scavenging of free radicals.

Materials and methods

Chemicals

Xanthine, nitroblue tetrazolium (NBT), 3,3-diaminobenzidine, bovine serum albumin, xanthine oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), oxidized glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH), trimethoxypropane, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO), hypoxanthine, glutathione reductase (GR), and 2,4-dinitrophenylhydrazine, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) ammonium sulfate, and copper chloride were purchased from JT Baker (Mexico City, México). H_2O_2 , formaldehyde, and sodium carbonate were purchased from Mallinckrodt (Paris, KY, USA). Sodium azide was purchased from Merck (Mexico City, México). Rabbit anti-3-nitrotyrosine polyclonal antibodies were purchased from Upstate (Lake Placid, NY, USA). Mouse anti-4-hydroxynonenal monoclonal antibodies were purchased from Oxis International Inc. (Portland, OR, USA). Goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase antibody and goat anti-mouse IgG conjugated with

Table 1
Chemical and pharmacological properties of the natural products of *Heterotheca inuloides* extracts.

Product name	Chemical composition (% in extract)	Pharmacological properties	References
<i>Heterotheca inuloides</i> acetonic extract	Cadalen-15-oic acid, 3,7-dihydroxy-3-(4H)-isocadalen-4-one, dicadalenol, 7-hydroxycadalenone, 7-hydroxy-4 α H-3,4-dihydro-cadalenone, 1 α , hydroxy-1(4H)-isocadalen-4-one, 1 α -hydroxy-4 α H-1,2,3,4-tetrahydrocadalen-15oic acid, 7-(3,3-dimethylallyloxy)coumarin, Caryolan-1,9 β -diol, Quercetin, Stigmastanol, β -sitosterol	Antiinflammatory COX-1 and COX-2 inhibitory effect Antioxidant Inhibition of lipid peroxidation	Haraguchi et al., 1997; Segura et al., 2000; Delgado et al., 2001
<i>Heterotheca inuloides</i> methanolic extract	Quercetin (0.19), Quercetin 3-O-glucoside, kaempferol, kaempferol-3-O-glucoside, kaempferol-oxaphoside, D-chiro-inositol (0.09), Spinastrol (0.04), 3-O- β -D-epinastrol glycosid (0.05), 7-hydroxy-4 α H-3,4-dihydro-cadalenone (0.004), 7-hydroxycadalenone (0.002)	Inhibition of tyrosinase activity Antioxidant Inhibition of lipid peroxidation Antiinflammatory	Delgado et al., 2009, personal communication, Haraguchi et al., 1997, Kubo et al., 1994

Please cite this article as: Coballase-Urrutia E, et al. Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl_4 -induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* (2010), doi:10.1016/j.etp.2010.02.012

horseradish peroxidase antibody were purchased from Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, England). Donkey anti-goat IgG conjugated with horseradish peroxidase antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). All other chemicals were reagent grade and commercially available.

Plant material

Flowers from aerial parts of *H. inuloides* were collected in Zacapoaxtla, Puebla, México. The plant material was authenticated by Biol. Myrna Mendoza at the Department of Medicinal Plants of Jardín Botánico (Instituto de Biología, UNAM) and a voucher specimen (Myrna Mendoza C 15,375) is kept in the Ethnobotanical collection of the National Herbarium at Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Mexico City).

Preparation of the extract

Dried and powdered plant material (2.0 kg) was extracted with acetone at room temperature (3 times/24 h) followed by methanol extraction (3 times/24 h) to afford, after solvent evaporation, 12 and 15 g of residue, respectively (Delgado et al., 2001). Acetone extract residue was dissolved in olive oil and methanolic extract residue in phosphate buffer pH 7.4 prior to oral administration to rats.

CCl₄-induced hepatotoxicity model in rats

Thirty six male Wistar rats weighing 180–220 g were used in the present study. Experimental protocol followed the Norma Oficial Mexicana guidelines for the use and care of laboratory animals (NOM-062-200-1999) and for the disposal of biological residues (NOM-087-ECOL-1995). Housing room was maintained under constant temperature conditions ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), relative humidity (50–60%) and lighting (12-h light/dark cycle). Filtered air (5 mm particles) was exchanged 18 times/h. Animals were provided with a standard commercial rat chow diet (Harlan Teklad Global diet 2018S sterilized, Harlan Teklad, Madison, WI, USA) and reverse osmosis filtered water was used. Liver damage was induced with CCl₄ in a 1:1 (v/v) mixture with olive oil. The animals were divided into seven groups of three rats each one. Group 1 received olive oil (0.1 mL/kg) orally (p.o.) for 6 days (OO group). Group 2 received phosphate buffer pH 7.4 (0.1 mL/kg p.o.) for 6 days (PB group). Group 3 received 100 mg/kg of the acetic extract p.o. for 6 days (AcE group). Group 4 received 100 mg/kg of the methanolic extract p.o. for 6 days (MeE group). Groups 1–4 were considered as negative control groups. Group 5 was injected with CCl₄/olive oil (1.5 mL/kg i.p.) the last 3 days of the experiment. Group 6 received acetic extract 100 mg/kg p.o. for 6 days in combination with CCl₄/olive oil (1.5 mL/kg i.p.) for the last 3 days of treatment. Group 7 received methanolic extract 100 mg/kg of p.o. for 6 days in combination with CCl₄/olive oil (1.5 mL/kg i.p.) for the last 3 days of treatment. In a second experiment, we repeated groups 2, 4, and 7 together with the following two groups (n=3): a group of animals received quercetin (100 mg/kg body weight) p.o. during 6 days and another group of rats exposed to the combination of quercetin 100 mg/kg p.o. during 6 days and CCl₄ 1.5 mL/kg i.p. for the last 3 days of treatment. The animals were anesthetized with pentobarbital (0.6 µL/kg) and the blood collected by heart puncture 48 h after the end of the 6 days of treatment. The liver was excised immediately, and a portion was fixed by immersion in buffered formalin and the rest was stored at -70°C for the analysis of antioxidant enzymes.

Preparation of liver homogenates

Hepatic tissue was homogenized in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, with 0.1% Triton X-100. The tissues were homogenized in a Brinkman Polytron model PT 2000 (Westbury, NY, USA) and centrifuged at 19,000g for 10 min. The supernatant was used for the determination of total protein (Lowry et al., 1951) and the activity of the following antioxidant enzymes: SOD, CAT, GPx, GR, and glutathione transferase (GST) (Pedraza-Chaverri et al., 2005).

Determination of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities as markers of liver damage

The blood collected from each animal was allowed to clot for 45 min at room temperature. Blood serum was separated by centrifugation at 600g for 15 min and the samples were stored at -20°C . The AST and ALT activities were measured by adaptation of the methodology recommended by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) (Bergmeyer et al., 1978), with an autoanalyzer (Dimension AR, Dade Behring Inc., Newark, DE, USA).

Histopathological analyses

Liver tissue was fixed by immersion in buffered formalin (pH 7.4) and embedded in paraffin. For histological analysis, section (3 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or with periodic acid Schiff's (PAS) in order to demonstrate polysaccharides, neutral mucopolysaccharides and glycoproteins from hepatocyte membranes. The histological profile of the liver lobes from 5 randomly selected fields (3 rats per experimental group) was recorded using KS-300 software (Carl Zeiss, Jena, Germany). With this same program, the percentage of damaged areas with histopathological alterations was obtained (magnification 400×).

Immunohistochemical analyses of 4-HNE and 3-NT

For immunohistochemistry, liver section (3 µm) were deparaffined and then boiled in Declere (Cell Marque, Hot Springs, AR, USA) to unmask antigen sites; the endogenous activity of peroxidase was quenched with 0.03% H₂O₂ in absolute methanol. Liver sections were incubated overnight at 4 °C with a 1:200 dilution of anti 4-HNE and 1:70 dilution of anti 3-NT antibodies in phosphate buffered saline (PBS). Following removal of the primary antibodies and repetitive rinsing with PBS, slides were incubated with a 1:500 dilution of biotinylated goat anti-IgG secondary antibody. Bound antibodies were detected with avidin biotinylated peroxidase complex ABC-kit Vectastain and diaminobenzidine substrate. After appropriate washing in PBS, slides were counterstained with hematoxylin. All sections were incubated under the same conditions with the same concentration of antibodies and at the same time; so the immunostaining was comparable among the different experimental groups. For the negative control, preimmune goat serum was used instead of the primary antibodies. All specimens were examined by light microscopy Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Jena, Germany). For automated morphometric analysis, the percentage of positive cells (brown staining) was determined with a computerized image analyzer KS-300 3.0 (Carl Zeiss, Jena, Germany). This equipment automatically detects positive cells determining their percentage per field. Five random fields per liver were studied at a 100× magnification (total area 1584,000 µm²) comparing the different groups. Results were expressed as percentage.

Please cite this article as: Cobalase-Urrutia E, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* (2010), doi:10.1016/j.etp.2010.02.012

Activity of antioxidant enzymes

CAT assay

CAT activity was assayed at 25 °C by a method based on the disappearance of H₂O₂ (Pedraza-Chaverri et al., 2005). An aliquot of 5 µl of homogenate dilution (1:40) was added to 720 µl of 30 mM H₂O₂ in 10 mM potassium phosphate solution; the reaction was followed at 240 nm. Under the conditions described, the decomposition of H₂O₂ by CAT contained in the samples follows a first-order kinetics as given by the equation $k = 2.3 \log A_0/A$ where k is the first-order reaction rate constant, t is the time over which the decrease of H₂O₂ due to CAT activity was measured (15 s), and A_0/A is the optical density at times 0 and 15 s, respectively. The results were expressed in U/mg protein.

SOD assay

SOD activity was assayed by using a previously reported method (Pedraza-Chaverri et al., 2005). A competitive inhibition assay was performed using xanthine-xanthine oxidase system to reduce NBT. The mixture of reaction contained in a final volume of 166 µl was 0.122 mM EDTA, 30.6 µM NBT, 0.122 mM xanthine, 0.006% bovine serum albumin and 48 mM sodium carbonate. 33 µl of liver homogenate (1:50 dilution) were added to the reaction mixture followed by 30 µl of a xanthine oxidase solution to get a final concentration of 2.5 U/L and all was incubated at room temperature for 30 min. The reaction was stopped with 66 µl of 0.8 mM cupric chloride and the optical density was read at 560 nm. 100% of NBT reduction was obtained in a tube in which the sample was replaced by distilled water. The amount of protein that inhibited 50% of NBT reduction was defined as one unit of SOD activity. Results were expressed as U/mg protein.

GPx assay

GPx activity was assayed by a method previously described (Pedraza-Chaverri et al., 2005). The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate solution pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide, 0.2 mM NADPH, 25 U/ml of GR, and 1 mM GSH at 25 °C. 100 µl of liver homogenate diluted 1:10 were added to 800 µl of the reaction mixture and allowed to incubate for 5 min at room temperature before initiating the reaction by the addition of 32 µl of 2.5 mM H₂O₂ solution. Absorbance at 340 nm was recorded for 3 min and the activity was calculated from the slope of these curves as µmoles of NADPH oxidized per min taking into account that the millimolar absorption coefficient for NADPH is 6.22. Blank reactions with homogenates replaced by distilled water were subtracted from each assay. One unit of GPx was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 µmol of NADPH/min. The results were expressed as U/mg protein.

GR assay

GR activity was spectrophotometrically assayed using GSSG as substrate and measuring the disappearance of NADPH at 340 nm (Pedraza-Chaverri et al., 2005). The reaction mixture consisted of 0.1 M potassium phosphate pH 7.6, 0.5 mM EDTA, 1.25 mM NADPH, and 0.5 mM GSSG at 25 °C. 25 µl of diluted homogenate (1:5) were added to 475 µl of reaction mixture. Absorbance at 340 nm was recorded for 3 min and the activity was calculated from the slope of the curves as µmoles of NADPH oxidized per min taking into account that the millimolar absorption coefficient for NADPH is 6.22. One unit of GR was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 µmol of NADPH/min. Data were expressed as U/mg protein.

GST assay

The reaction mixture consisted of 0.05 M phosphate buffer solution pH 6.5, 0.05 M GSH, 0.02 M CDNB. 20 µl of diluted homogenate (1:10) were added to 980 µl of the reaction mixture (Pedraza-Chaverri et al., 2005). The changes in the absorbance due to conjugation of the thiol group of GSH to the CDNB substrate were recorded for 3 min at 340 nm and enzyme activity was calculated as µmoles of CDNB conjugate formed/min/mg protein using a molar extinction coefficient of 9.6.

Assay of O₂^{•-} scavenging activity

O₂^{•-} generated by the reaction of xanthine with xanthine oxidase were measured by EPR spectroscopy using the spin trap DMPO (Sanders et al., 1994). The capacity of *H. imuloides* extracts to trap O₂^{•-} and interfere with DMPO-OOH formation was studied. The reaction mixture contained 100 µl of 150 mM potassium dihydrogen phosphate solution (pH 7.4), 200 µl of 0.50 mM hypoxanthine, 100 µl of 150 mM NBT, 50 µl of crude extracts and 80 µl of 600 mM DMPO. Reactions were initiated by adding 25 units of xanthine oxidase in 50 µl to each sample. After 2 min, the spin adduct DMPO-OOH was measured with an EPR spectrometer (Bruker Elecsys E500, Germany). EPR spectra were recorded at 21 °C with the field set at 3470 ± 50 Gauss, for O₂^{•-}, modulation frequency 100,000 G, modulation amplitude 0.0005 G, response time 0.0025 s, sweep time 0.0102 s, microwave power 10 mW, receiver mode 1st. Xanthine oxidase reaction was incubated at 36 °C for 2 min, and the EPR spectra were recorded at room temperature within 2 min after incubation.

Statistics

Data are expressed as mean ± SD and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad Prism 4.0 Software, San Diego, CA, USA). A $p < 0.05$ value was considered statistically significant.

Results

Activity of serum AST and ALT

Fig. 1 shows ALT and AST serum activities in treated and control groups from the first experiment. After CCl₄ treatment, ALT and AST serum activities increased five and six times, respectively, compared with groups that received olive oil and phosphate buffer solution. The acetic extract produced a twofold increase of AST over the olive oil group; this was an unexpected result that needs further investigation. Administration of either of the extracts 3 days before and 3 days during CCl₄ treatment, protected against the elevation of ALT and AST activities observed in the group treated with CCl₄ only. The methanolic extract showed the highest protection, reducing in a 70% and 75% the levels of AST and ALT seen in the CCl₄ treated group and maintaining the basal level of AST and ALT seen in the group treated with phosphate buffer. These results indicate that acetic and methanolic extracts significantly protected against increased ALT and AST activities induced by CCl₄.

Histopathological changes

To investigate whether the alteration of hepatic transaminases detected in the previous experiment would reflect in the alteration of tissue integrity, we performed histological analyses in liver slices stained with H&E and PAS (Fig. 2). Liver sections from rats treated with olive oil and phosphate buffer showed the typical lobular

Please cite this article as: Coballase-Urrutia E, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca imuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* (2010), doi:10.1016/j.etp.2010.02.012

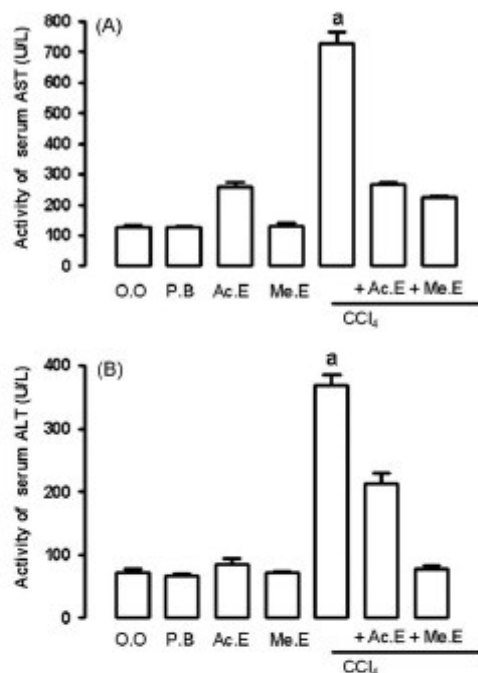


Fig. 1. Effect of the acetic and methanolic extracts of *H. inuloides* on the activities of (A) AST and (B) ALT in the animal groups studied ($n=3$): O.O, olive oil; P.B, phosphate buffer; Ac.E, acetic extract; Me.E, methanolic extract; CCl₄, CCl₄-treated; CCl₄+Ac.E, CCl₄ plus acetic extract; CCl₄+Me.E, CCl₄ plus methanolic extract. Rats were sacrificed 48 h after the end of treatment. Each enzyme activity determination was performed six times, in triplicate and the values represent the mean \pm SD of 18 determinations. * $p < 0.001$ vs. all groups.

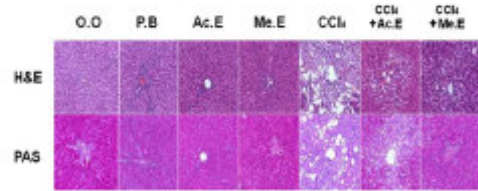


Fig. 2. Histological (H&E and PAS) analyses from liver section (3 μ m) of animals in all the groups studied obtained 48 h after last day of treatment ($n=3$): O.O, olive oil; P.B, phosphate buffer control; Ac.E, acetic extract; Me.E, methanolic extract; CCl₄, CCl₄-treated; CCl₄+Ac.E, CCl₄ plus acetic extract; CCl₄+Me.E, CCl₄ plus methanolic extract.

architecture under light microscopy (H&E and PAS, magnification 100 \times), normal hepatocyte cords and cell wide radiating out from hepatic venules towards portal tracts and sinusoids. The acetic and methanolic extracts did not alter the normal architecture although a few areas of discontinued hepatocyte cords were observed. The CCl₄-treated livers showed extensive perivascular macrovesicular steatosis with severe fibrosis and necrosis. Treatments with 100 mg/kg of the acetic and methanolic extracts of *H. inuloides* for 6 days, in which the last 3 days were combined with CCl₄, significantly attenuated these pathological changes. Table 2 shows the quantitative data of the

Table 2
Area of liver damage (%) calculated from the histological study.

Group	EAH (%)	PAS (%)
O.O	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
P.B	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 1.0
Ac.E	1.1 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0
Me.E	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
CCl ₄	99.3 \pm 4.1*	99.2 \pm 3.9*
Ac.E+CCl ₄	52.0 \pm 5.2	50 \pm 4.3
Me.E+CCl ₄	21.85 \pm 6.6	22.04 \pm 5.9

Olive oil (O.O), 0.1 ml/kg; phosphate buffer (P.B), 0.1 ml/kg; acetic extract (Ac.E) 100 mg/kg p.o.; methanolic extract (Me.E) 100 mg/kg p.o.. These four groups were considered as negative control groups, CCl₄/olive oil (1.5 ml/kg i.p.) the last 3 days of treatment (positive control group). Ac.E+CCl₄ corresponded to acetic extract for 6 days in combination with CCl₄ (100 mg/kg p.o.; 1.5 ml/kg i.p.) for the last 3 days of treatment. Me.E+CCl₄ corresponded to methanolic extract for 6 days in combination with CCl₄ (100 mg/kg p.o.; 1.5 ml/kg i.p.) for the last 3 days of treatment ($n=3$). The values represent the mean \pm SD of percentages found in five random fields studied.

* $p < 0.0001$ vs. all groups.

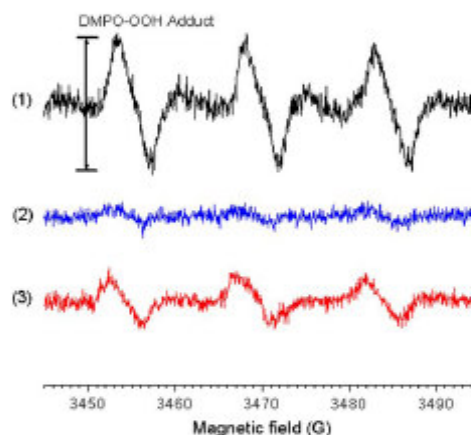


Fig. 3. EPR signals of the DMPO-OOH measured by EPR spectrometry. Methanolic (panel 2) and acetic (panel 3) extracts of *H. inuloides* at 0.5 μ g/ml, diminished the DMPO-OOH signal. The O₂⁻ signal generated by xanthine/xanthine oxidase system is observed in panel 1.

histological analysis in all the groups studied which confirm that acetic and methanolic extracts of *H. inuloides* prevented from liver damage induced by CCl₄.

Determination of O₂⁻ scavenging activity of the *H. inuloides* extracts by EPR

Both O₂⁻ and OH[•] can lead to the formation of hydroperoxides by the autoxidation of unsaturated fatty acids. Previous studies have reported that the reducing capacity of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity (Jeong et al., 2004). The O₂⁻ scavenging activity of the two extracts was evaluated by EPR using DMPO as spin trapping. The O₂⁻ was generated *in vitro* by the xanthine/xanthine oxidase system. Fig. 3 shows how the EPR signal of the O₂⁻ adduct generated *in vitro* (DMPO-OOH) was reduced when the acetic and methanolic extracts of *H. inuloides* were present at 0.5 μ g/mL.

Please cite this article as: Coballase-Urutiá E, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* (2010), doi:10.1016/j.etp.2010.02.012

Markers of oxidative stress

In order to explore if the free radical trapping effect detected in an *in vitro* system could take place *in vivo*, we estimated the production of 3-NT and 4-HNE adducts in rat liver exposed to phosphate buffer, methanolic extract and quercetin (Fig. 4). Immunohistochemistry for methanolic extract and quercetin does not show any visible change in the level of both cellular markers compared to their respective controls. On the other hand, a 99- and 24-fold increase in 4-HNE and 3-NT label, respectively, was

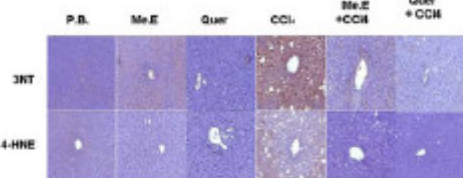


Fig. 4. Immunohistochemical detection of 4-HNE and 3-NT in liver section (3 μ m) from treated and control animals obtained 48 h after last day of treatment ($n=3$): PB phosphate buffer; MeE, methanolic extract; Quer, quercetin; CCl_4 , carbon tetrachloride; MeE+ CCl_4 , methanolic extract plus CCl_4 ; Quer+ CCl_4 , quercetin plus CCl_4 , magnification 100 \times .

Table 3
Area of liver damage (%) calculated from the immunohistochemistry study.

Group	3NT%	4-HNE%
PB	3.5 \pm 1.2	1.0 \pm 1.0
MeE	4.3 \pm 0.7	1.0 \pm 0.0
Quercetin	2.7 \pm 1.1	2.1 \pm 0.5
CCl_4	85.3 \pm 4.8*	99.2 \pm 3.9*
MeE+ CCl_4	15.55 \pm 3.5	22.04 \pm 5.9
Quercetin+ CCl_4	7.93 \pm 2.7	12.01 \pm 1.8

Phosphate buffer (PB), 0.1 ml/kg; Methanolic extract (MeE), 100 mg/kg p.o.; Quercetin/PB (100 mg/kg/200 μ l p.o.); CCl_4 /olive oil (1.5 ml/kg l.p.); MeE+ CCl_4 , corresponded to methanolic extract for 6 days in combination with CCl_4 (100 mg/kg p.o.; 1.5 ml/kg l.p.) for the last 3 days of treatment. Quercetin+ CCl_4 (100 mg/kg/200 μ l p.o.; 1.5 ml/kg l.p.) corresponded to quercetin for 6 days in combination with CCl_4 for the last 3 days of treatment ($n=3$). 3-NT: 3-nitrotyrosine; 4-HNE: 4-hydroxy-nonenal. The values represent the mean \pm SD of percentages found in five random fields studied.

* $p < 0.0001$ vs. all groups.

Table 4
Effect of the methanolic extract of *H. insuloides* and quercetin on the hepatic antioxidant enzyme activities in CCl_4 -treated rats.

Group	CAT U/mg protein	SOD U/mg protein	GPx U/mg protein	GR U/mg protein	GST*
First set of determinations					
PB	0.6 \pm 0.8	107.7 \pm 8.9	0.11 \pm 0.016	0.048 \pm 0.004	0.20 \pm 0.03
MeE	0.56 \pm 0.10	87.3 \pm 9.30	0.11 \pm 0.01	0.054 \pm 0.002	0.17 \pm 0.025
CCl_4	0.16 \pm 0.29*	55.1 \pm 5.19*	0.052 \pm 0.019*	0.033 \pm 0.003*	0.075 \pm 0.030*
MeE+ CCl_4	0.42 \pm 0.95	81.64 \pm 1.91	0.052 \pm 0.003	0.052 \pm 0.003	0.14 \pm 0.015
Second set of determinations					
PB	0.25 \pm 0.016	82.27 \pm 0.046	0.14 \pm 0.07	0.025 \pm 0.003	0.27 \pm 0.07
Quercetin	0.38 \pm 0.012	69.13 \pm 0.013	0.13 \pm 0.018	0.018 \pm 0.008	0.23 \pm 0.19
CCl_4	0.054 \pm 0.050*	46.33 \pm 0.042*	0.088 \pm 0.045*	0.010 \pm 0.001*	0.093 \pm 0.12*
Quer+ CCl_4	0.38 \pm 0.048	65.10 \pm 0.06	0.17 \pm 0.055	0.017 \pm 0.001	0.22 \pm 0.015

* Activity is expressed as μ moles of CDNB conjugate/min/mg protein. Each determination was performed twice, in triplicate and the values represent the mean \pm SD. Phosphate buffer (PB), 0.1 ml/kg; Methanolic extract (MeE) 100 mg/kg p.o.; CCl_4 /olive oil (1.5 ml/kg l.p.); MeE+ CCl_4 , corresponded to methanolic extract for 6 days in combination with CCl_4 (100 mg/kg p.o.; 1.5 ml/kg l.p.) for the last 3 days of treatment (first experiment, $n=3$). Quercetin/PB, (100 mg/kg/200 μ l p.o.); Quer+ CCl_4 (100 mg/kg/200 μ l p.o.; 1.5 ml/kg l.p.) corresponded to quercetin for 6 days in combination with CCl_4 for the last 3 days of treatment (second experiment $n=3$).

* $p < 0.0001$ vs. all groups.

promoted by the exposure to CCl_4 ; these deleterious effects were reduced by approximately 80–90% when methanolic extract or quercetin were administered along with the toxic agent (Table 3).

Antioxidant enzymes in CCl_4 -induced acute liver injury in rats

In an attempt to obtain more information on the mechanism of protection against CCl_4 hepatotoxicity by the methanolic extract, we monitored the natural antioxidant cell defenses including the enzymes CAT, SOD, GPx, GR and GST in livers of animals from the second experiment (Table 4). Results from a first enzyme activity determination, showed that CCl_4 administration produced a marked decrease in the levels of all antioxidant enzymes compared with the control group that received phosphate buffer. CAT was more affected than the others with a 74% reduction followed by GST with a 62% reduction, SOD and GPx showed a 50% reduction and GR was less affected with a 31% reduction. Methanolic extract decreased the toxicity of CCl_4 , showing 8–50% amelioration in enzymatic activities.

A second set of enzyme activity determination was also done to evaluate the effect of quercetin. The result obtained show that quercetin maintains the levels of hepatic enzymatic activity even in the presence of CCl_4 . Quercetin abolished the toxicity of CCl_4 , showing 30–100% amelioration of enzymatic activity.

Discussion

ROS contribute to the development of various diseases such as atherosclerosis, diabetes, cancer, neurodegenerative diseases, liver cirrhosis and the ageing process (Valko et al., 2007; Seifried et al., 2007). The use of antioxidant compounds, either natural or synthetic, might help to prevent those conditions and maintain human health. The use of ROS scavengers is a good option to cope with those diseases. It is well established that lipid peroxidation is one of the key reactions resulting from the interaction of free radicals and biological membranes (Niki et al., 2005). The one-electron reduction products of oxygen: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and OH^{\cdot} actively participate in the initiation of lipid peroxidation, resulting in tissue injury (Valko et al., 2007; Seifried et al., 2007). We demonstrated the *in vitro* $O_2^{\cdot-}$ scavenging activity of *H. insuloides* extracts by the EPR method, this evidence is provided by the fact that both extracts effectively reduced the intensity of the DMPO-OOH adduct signal generated in the xanthine-xanthine oxidase system. The major components of acetic and

Please cite this article as: Coballase-Urrutia E, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca insuloides* against CCl_4 -induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* (2010), doi:10.1016/j.etp.2010.02.012

methanolic extracts of *H. inuloides* have been previously characterized, and some of their components are presented in Table 1. Sesquiterpenes and flavonoids are important constituents, several of which display antioxidant and ROS scavenging properties. The methanolic extract is rich in flavonoids and glycoside derivatives, whereas in the acetonetic extract, sesquiterpenoids prevail.

Our results with the methanolic extract agree with previous reports showing that some flavonoids from *H. inuloides* were potent $O_2^{\cdot-}$ scavengers using the xanthine oxidase system (Haraguchi et al., 1997). Moreover, several studies have shown that the pharmacological effects of flavonoids like quercetin are related to their antioxidant activity, which can be due to their ability to scavenge OH^{\cdot} and $O_2^{\cdot-}$, to chelate metal ions, and to exert a synergistic effect with other antioxidant metabolites (Jeong et al., 2004; Niki et al., 2005; Pietta, 2000; Cotelle, 2001; Raja et al., 2007; Manna et al., 2006). Our results in conjunction with others mentioned above, suggest that flavonoids could constitute one of the active principles in the methanolic extract.

Most of the previous information related to the antioxidant properties of *H. inuloides* were generated in isolated *in vitro* systems. In order to obtain information in living animals, we chose the hepatotoxicity model of rat intoxication with carbon tetrachloride (CCl_4). The basis of CCl_4 hepatotoxicity lies in its biotransformation by the cytochrome P-450 system giving rise the trichloromethyl radical (CCl_3^{\cdot}) which is further converted to the trichloromethyl peroxy radical ($CCl_3O_2^{\cdot}$). CCl_4 metabolites react with polyunsaturated fatty acids and form covalent adducts with lipids and proteins. These events lead to lipid peroxidation and destruction of cell membranes with the consequent liver injury (Szymonik-Lesiuk et al., 2003; Clawson, 1989).

A first indication of hepatic damage induced by CCl_4 was obtained by the evaluation of enzymatic markers of unspecific hepatic injury such as AST and ALT. The activities of AST and ALT 48 h after the last administration of CCl_4 were significantly elevated over controls. Since these enzymes enter the circulatory system due to altered permeability of membranes, their increased levels reflected a severe damage to the structural integrity of the liver (Clawson, 1989; Raja et al., 2007; Manna et al., 2006). Administration of the acetonetic or methanolic extracts significantly prevented CCl_4 induced elevation of AST and ALT indicating the hepatoprotective activity of *H. inuloides* extracts.

The toxic CCl_4 effect was also confirmed by histological observations associated with discontinuity in the normal architecture and decrease in the number of hepatocyte cords, along with an intense perivenular macrovesicular steatosis with severe fibrosis and necrosis. The pretreatment of rats with acetonetic or methanolic extracts clearly was protected from CCl_4 induced hepatotoxicity. Our results also showed that the acetonetic and methanolic extracts alone, only slightly affected the normal architecture with a few areas of discontinuity of hepatocyte cords.

Results from EPR analysis (Fig. 3) gave us the first evidence concerning the mechanism of protection of the extracts and experiments focusing on their scavenging activity were undertaken. Considering that quercetin is a well known hepatoprotective agent (Janbaz et al., 2004; Mandal and Das, 2005) and one of the main components present in the methanolic extract (Table 1), it was included in the experiments. 3-NT is thought to be a relatively specific marker of oxidative damage mediated by peroxynitrite ($ONOO^-$) which is produced by the reaction between $O_2^{\cdot-}$ and nitric oxide (NO^{\cdot}) (Oldreive and Rice-Evans, 2001). $ONOO^-$ causes damage to proteins, lipids, and nucleic acids (Szabó and Oshima, 1997), which may lead to cellular apoptosis and necrosis (Blaylock et al., 1998). The nitrated tyrosine residues of proteins result in the production of 3-NT which is considered a biological marker of liver damage induced

by reactive nitrogen species. The ability of the methanolic extract of *H. inuloides* and quercetin to prevent 3-NT immunostaining (Fig. 4) may be related to its $ONOO^-$ scavenging capacity. Results from our laboratory (manuscript in preparation) confirm this hypothesis demonstrating that the methanolic extract and quercetin possess $ONOO^-$ trapping properties. Another commonly used marker for the occurrence and/or the extent of lipid peroxidation is 4-HNE (Zarkovic, 2003) that results from the damage to linoleic and arachidonic acids. Since CCl_4 is a well-known initiator of lipid peroxidation *in vivo*, this agent should mediate formation of 4-HNE. Data presented here are consistent with that idea, since an increase of staining for 4-HNE adducts was observed in the animal group treated with CCl_4 , while in liver samples of animals treated with the methanolic extract or quercetin, there was not a noticeable increase, suggesting an amelioration of oxidative stress by these components. The use of 3-NT and 4-HNE tissue markers afforded evidence of the ROS scavenging properties of the *H. inuloides* methanolic extract *in vivo*.

It has been reported that SOD, CAT and GST constitute a mutually supportive defense against ROS (Halliwell and Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007; Seifried et al., 2007). In the present study, we demonstrated that CCl_4 induced a significant decrease in the levels of activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD, GPx, GR and GST probably due to protein inactivation by ROS (Kono and Fridovich, 1982; Hodgson and Fridovich 1975; Tabatabaie and Floyd, 1994). In fact, a decrease of hepatic GST activity in CCl_4 treated rodents has been reported before (Aniya and Anders, 1985). The methanolic extract and quercetin were able to partially prevent CCl_4 induced decay of antioxidant enzyme activities; this preventive effect could also be observed at the histological level (Fig. 2).

In summary, it can be said that *H. inuloides* contains free radical scavengers that effectively protect the liver against oxidative damage induced by CCl_4 , avoiding the oxidation of detoxifying enzymes like GST, GP, GR, CAT and SOD. Both methanolic and acetonetic extracts of the plant could be protective against similar effects by other hepatotoxic chemicals capable of inducing free radicals. The mechanism described here is consistent with the pharmacological properties attributed to this plant.

Acknowledgements

This work was partially supported by DGAPA (UNAM) IN214908; IN201910. The spectral analysis by EPR was supported by CONACYT 41128-Q. We appreciate the collaboration of Dr. Guillermo Delgado, Dr. Alejandro Solano, Biol. Sandra Hernández Ojeda, Biol. Myra Mendoza, M. en C. Omar Noel Medina-Campos, QFB Manuel Rodríguez, and Dr. Daniel Santamaría. The advice of Dr. Regina Montero Montoya in the preparation of this manuscript is gratefully acknowledged.

References

- Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006;65:278–90.
- Aniya Y, Anders MW. Alteration of hepatic glutathione-S-transferase and release into serum after treatment with benzobenzene and carbon tetrachloride or N-nitrosodimethylamine. *Biochem Pharmacol* 1985;30:4239–44.
- Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem* 1978;24:1–73.
- Blaylock MG, Guthbertson BH, Galley HF, Ferguson NR, Webster NR. The effect of nitric oxide and peroxynitrite on apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Biol Med* 1998;25:748–52.
- Clawson GA. Mechanisms of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pathol Immunopathol Res* 1989;8:104–12.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001;1:569–90.

Please cite this article as: Coballase-Urrutia E, et al. Hepatoprotective effect of acetonetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl_4 -induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* (2010), doi:10.1016/j.etp.2010.02.012

- Conde de la Rosa I, Moshage H, Nieto N. Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2008;100:156–63.
- Delgado G, del Socorro Olivares M, Chávez M, Ramírez-Agán T, Linares E, Bye R, et al. Anti-inflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J Nat Prod* 2001;64:361–4.
- De Rzedowski GC, Rzedowski J. *Heterotheca inuloides*. In: De Rzedowski GC, Rzedowski J, editors. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Michoacán, México: Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad; Pátzcuaro; 2001. p. 1406.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002;18:372–9.
- Farell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver diseases: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:999–112.
- Gené RM, Segura I, Adzer T, Marin E, Iglesias J. *Heterotheca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effect. *J Ethnopharmacol* 1998;60:157–62.
- Gurtsevich VE. Human oncogenic viruses: hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis. *Biochemistry* 2008;73:504–13.
- Halliwel B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nueva York: Oxford University Press; 2007.
- Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, Sánchez Y, Ogura T, Kubo I. Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *J Pharm Pharmacol* 1996;48:441–3.
- Haraguchi H, Ishikawa H, Sánchez Y, Ogura T, Kubo Y, Kubo I. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorg Med Chem* 1997;5:865–71.
- Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 1975;14:5294–9.
- Jainba K, Saied SA, Ghani AH. Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine* 2004;11:424–30.
- Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, et al. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J Agric Food Chem* 2004;52:3380–93.
- Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982;257:5751–4.
- Kubo I, Muroi H, Kubo A, Chaudhuf SK, Sánchez Y, Ogura T, et al. Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med* 1994;60:218–21.
- Kubo I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sánchez Y, Ogura T, Saito T, et al. Cytotoxic and antioxidant sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med* 1996;62:427–30.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JJ. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- Mandal AK, Das N. Sugar coated liposomal flavonoid: a unique formulation in combating carbon tetrachloride induced hepatic oxidative damage. *J Drug Target* 2005;13:305–15.
- Manna P, Sinha M, Sill PC. Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. *BMC Complement Altern Med* 2006;6:33.
- Martínez M. *Las Plantas Medicinales De México*, 6th ed. México: Ediciones Botas; 1989.
- Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica; México 1984:145–6.
- Niki E, Yoshida Y, Saito I, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:668–76.
- Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008;1:5.
- Oliveira C, Rice-Evans C. The mechanisms for nitration and nitrotyrosine formation in vitro and in vivo: impact of diet. *Free Radic Res* 2001;35:215–31.
- Otani K, Kosenaga M, Beard MR, Li K, Qian T, Showalter LA, et al. Hepatitis C virus core protein, cytochrome P450 2E1, and alcohol produce combined mitochondrial injury and cytotoxicity in hepatoma cells. *Gastroenterology* 2005;128:96–107.
- Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Medina-Campos CN, Carvajal RC, Hernández-Pando R, Macías-Ruvalcaba NA, et al. Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in $K_2Cr_2O_7$ -induced nephrotoxicity. *BMC Nephrol* 2005;6:4.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63:1035–42.
- Raja S, Nazeer Ahmed KF, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Mulhejee PK. Antioxidant effect of *Cyrtus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J Ethnopharmacol* 2007;109:41–7.
- Recknagel RO, Glende EA, Duda JA, Walter RL. Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 1989;43:139–54.
- Sanders SP, Hartson SJ, Ruppasamy P, Sylvester JT, Zweier JL. A comparative study of EPR spin trapping and cytochrome C induction techniques for the measurement of superoxide anions. *Free Radic Biol Med* 1994;16:753–61.
- Segura I, Freixa B, Ringheim T, Vila R, Pezera P, Adzer T, et al. Anti-inflammatory activity of diclonmethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. *Planta Med* 2000;66:553–5.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher B, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007;18:562–79.
- Szabó C, Oshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1997;1:373–85.
- Szymonił-Lesiuk S, Czechowska G, Strajczyk-Zimmer M, Siomka M, Madro A, Celinski K, et al. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:309–15.
- Tabatabaie T, Royd RA. Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. *Arch Biochem Biophys* 1994;314:112–9.
- Vallo M, Leibfritz D, Mazon J, Cronin MT, Mazur M, Teiser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84.
- Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* 2008;24:281–91.

Please cite this article as: Coballase-Urrutia E, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl_4 -induced toxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* (2010), doi:10.1016/j.etp.2010.02.012