



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

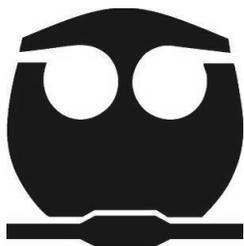
FACULTAD DE QUÍMICA

“Efecto de diferentes extractos de la corteza del árbol *Brosimum alicastrum* (ramón blanco) sobre las alteraciones bioquímicas y morfológicas que se inducen en un modelo de neurodegeneración”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SARAÍ PAOLA DE LA CRUZ GÓMEZ



México DF

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado

Presidente:	Perla Carolina Castañeda López
Vocal:	Perla Deyanira Maldonado Jiménez
Secretario:	Laura Carmona Salazar
1er. Suplente:	Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. Suplente:	José Fausto Rivero Cruz

Lugar donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

Asesor

Dra. Perla D. Maldonado Jiménez

Supervisor Técnico

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Saraí Paola de la Cruz Gómez

**Este trabajo fue apoyado por un donativo de CONACYT No.
103527**

Se agradece a la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad por la beca PROBEI (Programa de Becas de Inicio a la Investigación) otorgada a la alumna durante el desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos

A Dios, por ser el amigo invisible presente en todo momento, por poner en mi camino a todas estas personas increíbles y por darme tantas oportunidades.

A mi madre, por ser la “mamá más mala del mundo”, ¿te acuerdas? Sin ti este logro no habría sido posible, me diste todo lo que estuvo al alcance de tus posibilidades e incluso más, me regañaste cuando tenías que hacerlo, me escuchaste cuando lo necesité y me diste consejo a todo momento. Me enseñaste las bases, me diste los valores y me mostraste el valor de lo que obtienes con tu esfuerzo. Gracias por todo, por tu empeño, por tus desvelos, por tus enojos y por tus silencios. Siempre dijiste que querías darme lo mejor y me diste ¡más que eso! ¡Gracias!

A mi papá, que en la medida de sus posibilidades estuvo ahí para ayudarme, que siempre me sacó de apuros, me auxilió en muchos problemas y me cumplió uno que otro capricho. Gracias por apoyarme justo en esos momentos donde las cosas se veían muy complicadas y por estar al pendiente de mi mamá y de mí.

A Erik, porque aunque hace no mucho llegaste a mi vida, tu compañía, tu paciencia, tu amor y tu amistad han sido un apoyo increíble en este momento de mi vida. Gracias por escucharme exponer hasta el cansancio y por escuchar mis planes una y otra vez.

A Marene, por ser mi amiga de tantos años. Juntas hemos crecido y cambiado, pero lo importante es que nuestra amistad sigue ahí.

A mis amigos de la Facultad, en especial a Lalo, Monse, Pancha, Karla, Deja, Vera, Susana, Mariel y Paco. Gracias por su amistad y por todas las horas que perdimos riendo en la jardinera, esas horas de relajación fueron invaluable.

A la Dra. Perla Maldonado, por haberme dado la oportunidad de completar esta etapa de mi vida en su laboratorio y permitirme realizar este proyecto con su total apoyo y su gran paciencia.

Al Dr. Fausto Rivero, porque aunque no soy parte oficial de su equipo de trabajo, me recibió como si lo fuera, la mitad de éste trabajo experimental lo hice en su laboratorio y sin su apoyo, su ayuda y su tiempo esto no habría sido posible.

A los chicos del Instituto, Carlos, Ana, Ricardo y Frida; por responder las mil dudas que tenía cuando llegué, por enseñarme a trabajar, por ayudarme a encontrar las cosas cada vez que no las encontraba y por las horas de plática mientras esperábamos para seguir trabajando.

A la UNAM, por haberme regalado estos años de formación. Es un gran orgullo poder pertenecer a esta casa de estudios.

Por mi raza hablará el espíritu

México D.F., 2012

Índice de abreviaturas

8OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
AcOEt	Acetato de Etilo
CAT	Catalasa
CCF	Cromatografía en Capa Fina
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EEM	Error Estándar de la Media
EH	Enfermedad de Huntington
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
EtOH	Etanol
GGT	Gama Glutamil Transferasa
GPX	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación
LPO	Lipoperoxidación
MDA	Malonaldehído
MeOH	Metanol
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol
QUIN	Ácido quinolínico
Rf	Factor de retención
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido Tiobarbitúrico

Índice General

1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Enfermedades neurodegenerativas.....	3
2.2 Estrés oxidante.....	4
2.3 Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	5
2.3.1 ¿Cómo reaccionan los radicales?.....	5
2.3.2 Reactividad del estrés oxidante	6
2.4 Estrés oxidante en la neurodegeneración	9
2.4.1 Estrés oxidante y Enfermedad de Huntington (EH)	9
2.5 Antioxidantes	11
2.5.1 Fenoles.....	13
2.6 Defensas antioxidantes en el cerebro	15
2.6.1 SOD y enzimas removedoras de peróxidos.....	15
2.6.2 Glutación.....	16
2.6.3 Carotenoides y flavonoides.....	17
2.7 Medición de especies reactivas.....	18
2.7.1 Diacetato de diclorofluoresceína (DCFH ₂ -DA).....	18
2.7.2 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)	19
2.7.3 Viabilidad celular.....	20
2.8 “ramón blanco” (<i>Brosimum alicastrum</i> Swartz)	21
2.8.1 Generalidades.....	21
2.8.2 Distribución geográfica	22
2.8.3 Sinonimia popular	23
2.8.4 Usos comunes	23
2.8.5 Usos y propiedades medicinales	23
2.8.6 Composición química.....	24
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general.....	25

4.2	Objetivos particulares	25
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1	Material vegetal.....	26
5.2	Análisis cromatográficos.....	26
5.3	Estudio químico preliminar de la corteza de <i>B. alicastrum</i>	26
5.4	Estudio químico a mediana escala de la corteza seca y la madera de <i>B. alicastrum</i>	27
5.5	Fraccionamiento primario del extracto obtenido de la corteza seca de <i>B. alicastrum</i>	28
5.6	Fraccionamiento secundario de las fracciones obtenidas a partir de la corteza seca y madera de <i>B. alicastrum</i>	29
5.6.1	Fracción MeOH-In	29
5.6.2	Fracción AcOEt-SM.....	30
5.7	Actividad inhibidora de radicales libres. Ensayo cualitativo con 2,2 difenil-2- picrilhidrazil (DPPH) en CCF	30
5.8	Actividad de la infusión de <i>B. alicastrum</i> obtenida en el estudio químico preliminar en un modelo de neurodegeneración con QUIN.....	31
5.8.1	Animales	31
5.8.2	Diseño del experimento.....	31
5.8.3	Análisis histológico	33
5.8.4	Conteo Celular	33
5.8.5	Determinación de ERO.....	34
5.8.6	Determinación de lipoperoxidación (LPO).....	34
5.8.7	Estimación de la capacidad reductora mitocondrial.....	35
5.8.8	Análisis estadístico.....	35
6.	RESULTADOS	36
6.1	Análisis histológico	36
6.1.1	Conteo Celular	37
6.2.1	Lipoperoxidación.....	38
6.2.2	Viabilidad Mitocondrial.....	39
6.2.3	Formación de ERO.....	40
6.3	Fracciones primarias obtenidas por métodos de partición.....	41
6.3.1	Lipoperoxidación.....	42

6.3.2 Viabilidad Mitocondrial	46
6.3.3 Formación de ERO.....	50
6.4 Fraccionamiento secundario con Sephadex L-20	54
6.4.1 Lipoperoxidación.....	54
6.5 Análisis químico	58
6.5.1 Elucidación estructural de la (-) epicatequina	59
6.5.2 Elucidación estructural del ácido gálico	61
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
8. CONCLUSIONES.....	70
9. PERSPECTIVAS	70
10. REFERENCIAS	71

1. RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas comprenden un amplio grupo de desórdenes neurológicos. Los síntomas clínicos pueden incluir pérdida de la memoria, debilitamiento de las funciones cognitivas, pérdida del movimiento, pérdida del control del movimiento y pérdida de la sensación. Los síntomas comienzan principalmente en la edad adulta (aunque en casos severos pueden comenzar en la adolescencia) y son un reflejo de la pérdida de células neuronales y gliales en el sistema nervioso central.

Mediante la administración del ácido quinolínico (QUIN) en el estriado del cerebro de rata es posible reproducir algunas características bioquímicas, conductuales y patológicas de algunas enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Huntington (EH).

El QUIN actúa sobreactivando al receptor N-metil-D-aspartato disparando una cascada de eventos que llevan a la entrada de Ca^{2+} , lo cual induce un estado de estrés oxidante-nitrosante que resulta en la muerte celular, ya que las especies oxidantes dañan moléculas como lípidos, proteínas y el ADN. Por otro lado, el QUIN puede contribuir a ese estado oxidante debido a que forma complejos con el Fe (II) y genera el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) en el estriado. Además, se ha visto que la inyección de QUIN disminuye el estado antioxidante endógeno.

Debido a que el estrés oxidante juega un papel importante en la muerte neuronal durante las enfermedades neurodegenerativas, la búsqueda de nuevos antioxidantes con efecto terapéutico está justificada. En este contexto se evaluó el efecto de los extractos y fracciones de la corteza del árbol *Brosimum alicastrum*.

B. alicastrum, conocido popularmente en México como “ramón blanco”, es un árbol utilizado comúnmente en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias, siendo el asma el padecimiento para el cual se usa con mayor frecuencia. También es frecuente su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus y de problemas ginecológicos como la infertilidad, la falta de leche materna y la regulación de la menstruación.

En este trabajo se emplearon ratas Wistar macho que se trataron durante 5 días con infusiones de la corteza de *B. alicastrum* (2 y 4 mg/mL, vía oral) en esquemas pre- y post-tratamiento a la inyección de QUIN. El tratamiento con las infusiones de *B. alicastrum* fue capaz de prevenir el daño histológico en ambos esquemas. Posteriormente, los extractos, fracciones primarias y fracciones secundarias estudiadas *in vitro* fueron capaces de prevenir la lipoperoxidación (LPO) y la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO); además de ser capaces de aumentar la viabilidad mitocondrial en los tejidos estudiados. Se encontraron dos compuestos presentes en las fracciones más activas: la (-) epicatequina y el ácido gálico; por lo que el efecto protector de los extractos de *B. alicastrum* podría estar asociado a la presencia de éstos compuestos antioxidantes en los extractos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas comprenden un amplio grupo de desórdenes neurológicos. Los síntomas clínicos pueden incluir pérdida de la memoria, debilitamiento de las funciones cognitivas, pérdida del movimiento, pérdida del control del movimiento y pérdida de la sensación. Los síntomas comienzan principalmente en la edad adulta (aunque en casos severos pueden comenzar en la adolescencia) y son un reflejo de la pérdida de células neuronales y gliales en el sistema nervioso central (SNC) (Ambegaokar *et al*, 2010).

Por definición, una enfermedad neurodegenerativa es aquella en la que hay pérdida *selectiva* y *progresiva* de poblaciones específicas de neuronas por razones que en la mayoría de los casos permanecen desconocidas. Uno de los objetivos de las investigaciones acerca de las enfermedades neurodegenerativas es determinar las bases moleculares de la vulnerabilidad selectiva y finalmente las rutas comunes que conducen a la pérdida neuronal progresiva (Dickson, 2009). En la mayoría de los desórdenes neurodegenerativos hay cambios bioquímicos en una proteína específica que en ocasiones produce cuerpos de inclusión característicos en las neuronas, la glia, o en ambas. La población específica de neuronas que es vulnerable en cada desorden determina los síntomas clínicos; y cada desorden está definido por una combinación de características clínicas, patológicas y bioquímicas. Hay fundamentos genéticos en la mayoría de los desórdenes neurodegenerativos comunes, pero solo una pequeña fracción de los casos son debidos a mutaciones en genes específicos.

2.2 Estrés oxidante

El estrés oxidante es causado por el desbalance entre la producción de ERO y la incapacidad biológica del sistema para detoxificar estas especies y reparar el daño resultante. Los efectos del estrés oxidante dependen de su impacto en el sistema celular y de si el sistema es capaz de manejarlo bien y recuperar su estado original o no. Sin embargo, altos niveles de estrés oxidante pueden causar necrosis, depleción de los niveles de ATP y prevención de la apoptosis controlada (Beal, 2005). En condiciones normales muchas de las células son mantenidas en un ambiente reductor preservado por enzimas. No obstante, cualquier desbalance en el estado normal de oxidación/reducción puede conducir a toxicidad vía la producción de radicales libres, peróxidos o ERO que daña proteínas, lípidos y el ADN celular.

Las ERO juegan un papel importante en la señalización celular en un proceso denominado señalización por oxidación/reducción. Así, para mantener la homeostasis celular apropiada, debe mantenerse un balance entre la producción y el consumo de las ERO. Un exceso de ERO o de radicales libres necesita ser inactivado mediante la conversión metabólica de estos en moléculas no destructivas o ser neutralizadas justo después de su formación. Este mecanismo protector tiene como función prevenir el daño celular que puede conducir a diversas enfermedades y/o al envejecimiento (Yu, 1994).

2.3 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

2.3.1 ¿Cómo reaccionan los radicales?

Si dos radicales libres se encuentran, pueden unir sus electrones desapareados para formar un enlace covalente. Así, el hidrógeno atómico forma hidrógeno diatómico:

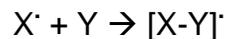


Un ejemplo biológico relevante es la rápida reacción del óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) para formar una molécula no radical, el peroxinitrito (ONOO^-): (Lane, 2002).

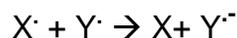


Sin embargo, la mayoría de las moléculas biológicas son no radicales. Cuando un radical libre reacciona con una molécula no radical, un nuevo radical se genera y puede ocurrir una reacción en cadena:

- 1) Un radical ($\text{X}\cdot$) puede añadirse a otra molécula. El aducto puede seguir teniendo un electrón desapareado:



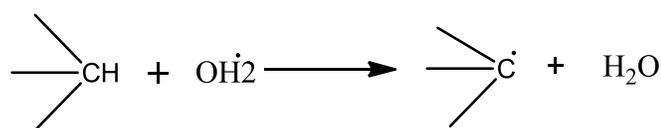
- 2) Un radical puede actuar como un agente reductor, donando un único electrón a una molécula no radical. El receptor ahora tiene un electrón desapareado:



- 3) Un radical puede actuar como un agente oxidante, tomando un electrón de una molécula no radical. El no radical tiene ahora un electrón desapareado:



- 4) Un radical puede abstraer un átomo de hidrógeno de un enlace C-H. Como H[·] tiene un solo electrón, un electrón desapareado debe quedar en el carbono:



Entonces, una reacción en cadena puede ocurrir debido a que los radicales que contienen carbono pueden reaccionar con O₂ para producir peroxiradicales, que se pueden propagar en una reacción en cadena de LPO:



2.3.2 Reactividad del estrés oxidante

Las ERO son moléculas derivadas del O₂ con gran capacidad de reacción por su gran inestabilidad química. Las más importantes son el O₂^{·-}, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el [·]OH y el ONOO[·]. Se generan durante la reducción univalente del O₂ a H₂O, en la cual se incorporan cuatro electrones al O₂ en diversas etapas, generándose los radicales libres como moléculas intermedias (Figura 1). También

en este proceso y como consecuencia de la interacción del $O_2^{\cdot-}$ con el óxido nítrico NO^{\cdot} se genera el $ONOO^{\cdot}$.

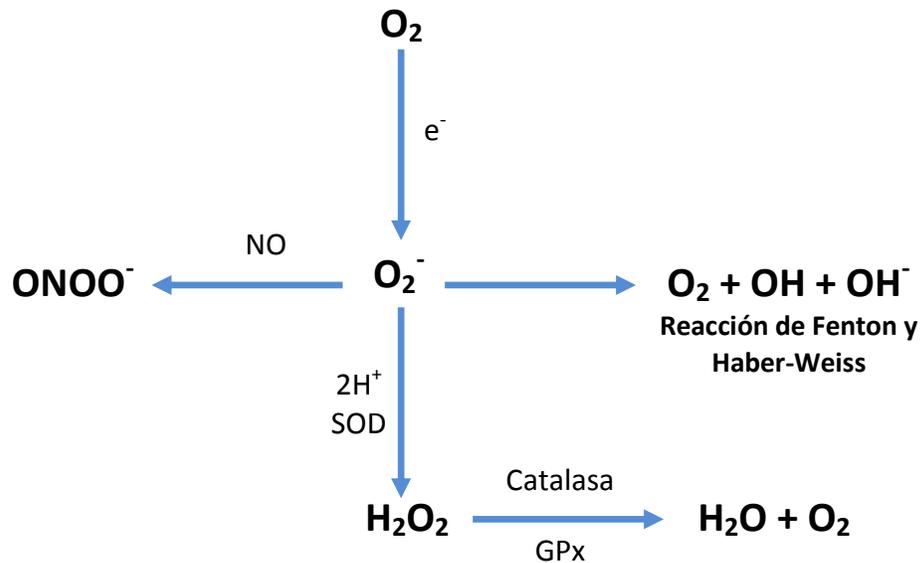


Figura 1. Esquema de la formación de las ERO.

Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$): Es producido principalmente en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. El $O_2^{\cdot-}$ es mucho menos reactivo que el radical $\cdot OH$ y no reacciona del todo con la mayoría de las moléculas biológicas en solución acuosa. Sin embargo, reacciona rápidamente con otros radicales como el NO^{\cdot} , con quelantes de hierro-azufre en ciertas enzimas y con algunos radicales fenoxilo. La reactividad de este tipo de radicales está altamente influenciada por el pH y por el disolvente en el que se lleva a cabo la reacción (Foote y Clennan, 1995).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): Es producido por la mayoría de los tejidos *in vivo*. No es un radical libre pero, al ser un oxidante débil, puede formarlos por interacción con metales en una reacción no enzimática (Reacción de Fenton):



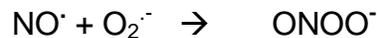
El H_2O_2 se mezcla fácilmente con H_2O y difunde dentro y entre las células (Coyle y Kader, 2007). Puede ser citotóxico y causar daño celular directo al provocar, por ejemplo, la inactivación de enzimas como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, lo cual conduce a la oxidación del ADN, las proteínas y los lípidos (Spencer *et al*, 1996).

Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$): Es el radical libre más reactivo que existe sobre las moléculas biológicas; puede producirse por la reacción de algunos iones metálicos con H_2O_2 o por la ruptura homolítica del enlace O-O en el H_2O_2 :



Este radical reacciona rápidamente con moléculas orgánicas pudiendo llevar a cabo 3 tipos de reacción: de transferencia de electrones, la adición o la abstracción de un hidrógeno (Von Sonntag, 1987).

Peroxinitrito (ONOO^-): Se forma de la reacción entre NO^\cdot y $\text{O}_2^{\cdot-}$



La producción de este radical en las células, los tejidos o los fluidos corporales conduce a su rápida protonación, seguida de la depleción de grupos $-\text{SH}$ y otros antioxidantes, oxidación y nitración de lípidos, ruptura de las cadenas de ADN y nitración y desaminación del DNA; además de la nitración de residuos aromáticos de aminoácidos en las proteínas (Beckman y Koppenol, 1996)

2.4 Estrés oxidante en la neurodegeneración

Uno de los órganos que metabólicamente es más activo en el cuerpo es el cerebro, el cual, incluso en reposo, utiliza aproximadamente el 20% del O₂ total consumido. Durante su estado activo, este porcentaje aumenta sustancialmente y para llevar a cabo correctamente todas sus funciones fisiológicas, requiere de un suministro ininterrumpido de sangre rica en O₂. Cualquier bloqueo o privación de este suministro de O₂, incluso por unos segundos, puede tener severas e irreparables consecuencias para las células cerebrales (neuronas y glia). El consumo de O₂ conduce a la producción de radicales libres y el alto consumo de O₂ por el cerebro conduce a una mayor producción de ERO.

Aunque el SNC requiere de grandes cantidades de O₂, es relativamente deficiente en enzimas que metabolizan las ERO a especies inocuas (Nunomura *et al*, 2006). Por el contrario, el SNC está altamente enriquecido con ácidos grasos polinsaturados, los cuales pueden ser fácilmente oxidados por derivados tóxicos del O₂. Una desventaja adicional es la presencia de la barrera hematoencefálica, la cual originalmente está diseñada para proteger al cerebro de toxinas limitando su difusión a las neuronas y a la glia pero que también reduce su capacidad de adquirir algunos antioxidantes como la vitamina E. Todas estas características hacen a las neuronas y a la glia altamente susceptibles a la destrucción por las ERO. La pérdida o daño de la estructura y función de estas células es llamada neurodegeneración.

2.4.1 Estrés oxidante y Enfermedad de Huntington (EH)

La EH es una afección neurodegenerativa de carácter autosómico dominante con penetrancia completa. Las manifestaciones clínicas aparecen con mayor frecuencia entre los 35 y los 59 años de edad y se caracterizan por un cuadro progresivo de movimientos anormales e involuntarios de tipo coreico, que afectan con mayor frecuencia a los miembros inferiores y a la cara, relacionado con

trastornos psiquiátricos y deterioro progresivo e irreversible de las funciones cognitivas (Deus-Yela *et al*, 1997). Patológicamente, la EH se caracteriza por la pérdida de las proyecciones largas neuronales, resultando en una atrofia progresiva del núcleo caudado, putamen y globus pallidus (Davies y Ramsden, 2001).

La EH se debe a la expansión anómala de un triplete CAG en el gen HTT, situado en el cromosoma 4 (locus 4p16.3). Este gen codifica para una proteína denominada huntingtina. Las repeticiones CAG se transcriben como un trecho ininterrumpido de residuos de glutamina que, cuando supera la longitud normal, altera las propiedades bioquímicas y estructurales de la proteína.

En condiciones normales, el número de repetidos de este triplete es de 26 o menos y constituye un polimorfismo estable del DNA; los alelos intermedios (entre 27 y 35 repeticiones CAG) no causan patología; sin embargo, son inestables a la hora de transmitirse y pueden expandirse a una mutación en el rango patológico en la siguiente generación. Las repeticiones de 36 o más CAG se consideran patológicas e implican riesgo de desarrollar la enfermedad. Varias líneas de investigación indican que una de las mayores consecuencias de la expansión de genes podrían ser defectos metabólicos mitocondriales que resultan en un deterioro del metabolismo energético. Este defecto podría conducir a una mayor producción de ERO que a su vez podrían conducir a un incremento del daño oxidativo.

Los defectos en el metabolismo energético pueden ser detectados en pacientes con EH mediante técnicas de imagen. Caídas en la actividad de los complejos II, III y la aconitasa se han reportado en tejidos post-mortem posiblemente debido a que la huntingtina anormal se ha asociado con daño a la mitocondria. En efecto, la inyección de inhibidores del complejo II como el ácido nitropropiónico o el malonato en animales, causa daño en el estriado que se asemeja al causado en la EH, además de que es bien conocido que la inhibición del complejo II incrementa la producción de ERO mitocondriales (Brouillet *et al.*, 2005).

¿Cuál es la contribución del daño oxidativo en la EH? Se sabe que, aunque el daño es menor que el que se presenta en pacientes con la enfermedad de Alzheimer o Parkinson, existen estudios que reportan un aumento en los niveles de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG), un marcador de daño oxidativo al ADN, así como un incremento en el nivel de F₂-isoprostanos. El incremento en los niveles de 8OHdG, el incremento en la LPO, la formación de 3-nitrotirosina y la disfunción mitocondrial fueron reportadas en un modelo de la EH en ratones transgénicos, mismos que al ser administrados con antioxidantes como el ácido lipoico, la cistamina y la molécula BN82451 mostraron una mayor supervivencia, un mayor desempeño motor y un decremento en la velocidad de la muerte neuronal (Klivenyi *et al*, 2003).

2.5 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar o impedir la oxidación de los lípidos, los ácidos nucleicos, o de otras moléculas, inhibiendo la propagación de las reacciones en cadena de oxidación (Wang y Lin, 2000). Bajo una consideración biológica, se define como antioxidante a cualquier sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones comparada con la de cualquier sustrato oxidable, detiene o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell, 2007). El término *sustrato oxidable* incluye casi cualquier molécula encontrada *in vivo*.

Podemos dividir a los antioxidantes en 2 grandes grupos, según su origen:

- Antioxidantes enzimáticos: Se encuentran presentes en el organismo de los seres vivos y los protegen frente a las ERO producidas durante el metabolismo. Dentro de éstos, encontramos a 3 principales: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX):

Superóxido Dismutasa (SOD): Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides que contienen cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial. La que contiene manganeso (Mn-SOD) se localiza en la matriz mitocondrial y la que contiene hierro (Fe-SOD) se localiza en el espacio periplasmático de la *E. coli*. Estas enzimas dismutan el $O_2^{\cdot-}$ para formar H_2O_2 y su principal función es la protección contra el $O_2^{\cdot-}$.

Catalasa (CAT): Tiene una amplia distribución en el organismo humano; su concentración es alta en hígado y riñón, baja en el tejido conectivo y epitelios, y es prácticamente nula en tejido nervioso. Se localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas y en el citosol de los eritrocitos. Presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 .

Glutación Peroxidasa (GPX): Es una enzima selenio-dependiente que cataliza la reducción de H_2O_2 o lipoperóxidos (L-OOH). Usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH) y se localiza en el citosol (eritrocitos) y en los lisosomas (neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune). Existen 3 formas de GPX: GPX-c o forma celular, tiene mayor afinidad por el H_2O_2 que por el lipoperóxido; GPX-p o forma extracelular, presenta afinidad semejante para ambos sustratos y la GPX-PH que tiene afinidad específica para los lipoperóxidos.

- Antioxidantes no enzimáticos: Los antioxidantes no enzimáticos se dividen a su vez en endógenos y en exógenos.

Antioxidantes no enzimáticos endógenos: Son aquellos que se encuentran presentes en el organismo, como es el caso del GSH, el ácido úrico, el ubiquinol y la melatonina.

Antioxidantes no enzimáticos exógenos: Son aquellos que provienen de los alimentos ingeridos; como es el caso de las vitaminas (Vitamina E, Vitamina C, α -tocoferol y β -caroteno), los carotenos, los flavonoides y ácidos fenólicos simples y algunos compuestos organoazufrados (dialil-disulfuro).

2.5.1 Fenoles

Un fenol es cualquier compuesto que contiene un grupo –OH unido a un anillo de benceno. Los *monofenoles* tienen un grupo –OH unido al anillo aromático, los *difenoles* dos y los *polifenoles*, más de dos. Diversas especies vegetales contienen una amplia variedad de fenoles (Tabla 1), incluyendo a los tocoferoles y a los tocotrienoles. La mayoría de los fenoles muestran actividad antioxidante *in vitro*, inhibiendo la LPO y eliminando radicales peroxilo. Además, en ocasiones los fenoles también inhiben otras especies radicales, como el $\cdot\text{OH}$, el dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), el óxido nitroso (N_2O_3), el ácido peroxinitroso (ONOOH) y el ácido hipocloroso (HOCl). Algunos pueden reaccionar con $\text{O}_2\cdot^-$, principalmente los difenoles y los polifenoles (Taubert *et al*, 2003).

Así pues, muchos polifenoles hallados en las plantas son excelentes antioxidantes *in vitro*, los cuales pueden ser ampliamente hallados en la dieta humana (Tabla 1). Sin embargo, la absorción de muchos de ellos no es completa y depende de cada individuo y del compuesto. Por ejemplo, en humanos la quercetina y las catequinas son mejor absorbidas que las antocianinas (Taubert *et al*, 2003).

Tabla 1. Alimentos y bebidas que contienen fenoles

Compuesto	Fuente
Flavanoles	
Epicatequina	Té verde
Catequina	Vino tinto
Epigallocatequina	Cacao, chocolate
Flavanonas	
Naringenina	Frutos cítricos
Taxifolina	
Flavonoles	
Quercetina	Cebolla, lechuga, brócoli, arándano, olivo, té, vino tinto
Miricetina	
Flavonas	
Apigenina	Apio, perejil
Antocianinas	
Malvidina	Uva roja, vino tinto
Cianidina	Cereza, frambuesa, fresa, uva
Derivados del ácido hidroxicinámico	
Ácido cafeico	Uva blanca, vino blanco, aceite de olivo, espinaca, espárrago, café
Ácido <i>p</i> -cumárico	
Ácido clorogénico	Uva blanca, jitomate, espinaca, col, espárrago
	Manzana, pera, cereza, durazno, jitomate

En plantas, los fenoles actúan como importantes precursores biosintéticos, que son usados con distintos fines protectores que van desde la disminución del daño por los rayos UV hasta la disminución de la oxidación en organelos como las vacuolas. Sin embargo, en humanos la respuesta aún no está clara. Existen dos importantes observaciones que respaldan la teoría de que los fenoles presentan actividad antioxidante *in vivo*. Una de ellas, llamada la *Paradoja Francesa*,

relaciona la baja incidencia de accidentes cardiovasculares en ciertas áreas de Francia, a pesar de la alta prevalencia de factores de riesgo, gracias al consumo de vino tinto (Frankel *et al*, 1995). Sin embargo, el debate acerca de la veracidad de esta teoría continúa, pues el alcohol por sí mismo, consumido en dosis bajas, presenta propiedades cardioprotectoras que podrían ser la causa de este efecto. La segunda observación, llamada el *estudio Zutphen*, sugiere la correlación inversa entre la incidencia de enfermedades coronarias e infartos y la ingesta de alimentos y bebidas con flavonoides (especialmente quercetina), los cuales provienen de alimentos como el té, las manzanas y las cebollas en la población examinada (Keli *et al*, 1996).

2.6 Defensas antioxidantes en el cerebro

2.6.1 SOD y enzimas removedoras de peróxidos

Todas las partes del SNC contienen CuZnSOD, MnSOD, GSH (a niveles mM), GPx y el sistema tioredoxina/peroxiredoxina (Patenaude *et al*, 2005). El cerebro también contiene glutatión-S-transferasas, cuyas isoformas difieren entre las neuronas y la glia. La MnSOD mitocondrial es esencial, ratones carentes de ella sufren de neurodegeneración después del nacimiento; la cual está marcada especialmente por la muerte celular en la corteza y el tallo cerebral y por severas discapacidades motoras (Melov *et al*, 1998). Tales problemas no existen en ratones carentes de CuZnSOD, mientras que los ratones que la sobreexpresan son más resistentes a la isquemia-reperfusión y a ciertas neurotoxinas. En efecto, las neuronas de los ratones con una sobreexpresión de CuZnSOD sobreviven un tiempo mayor tras el trasplante a otros animales y la sobreexpresión de CuZnSOD en neuronas normales retrasa la apoptosis dependiente de ERO.

Los ratones carentes de GPX1 no muestran evidencias de anormalidades a los 2 o 3 meses de vida, pero el daño causado por la administración de toxinas mitocondriales (malonato, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), ácido

nitropropiónico) se exagera. Así pues, parece que la carencia de GPX1 puede ser compensada bajo condiciones normales, pero no cuando la mitocondria es dañada (Klivenyi *et al*, 2000). El cerebro es un órgano privilegiado con respecto al selenio, pues lo retiene eficientemente y mantiene la actividad de GPX1 y la tioredoxina aun bajo condiciones de severa deficiencia alimenticia. La selenoproteína P es importante en la liberación de selenio al cerebro; los ratones carentes de esta proteína mueren con severa degeneración de las neuronas motoras a menos de que su dieta sea enriquecida con selenio.

2.6.2 Glutación

Generalmente se piensa que los niveles de GSH neuronales son más bajos que en la glia, y que la glia podría asistir a las neuronas en una eficiente degradación del H_2O_2 extracelular. Los astrocitos podrían liberar GSH, el cual es degradado por la γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GT) en la superficie celular para producir cys-gly, el cual también puede ser degradado por una enzima presente en la membrana neuronal como para tomar la cisteína y usarla en la conversión de GSH (Dringen *et al*, 2005). En general, la glia parece ser menos sensible a las ERO (incluyendo el $ONOO^-$) que las neuronas y es capaz de acelerar la síntesis de GSH bajo estrés. Sin embargo, muchas de estas conclusiones están basadas en estudios con células aisladas y el proceso de aislamiento por sí mismo genera estrés que podría incrementar los niveles de GSH en la glia.

Un gran decremento en los niveles de GSH en ratones mediante la administración de L-butionin sulfoximina causa daño neuronal y degeneración mitocondrial, lo cual puede ser un indicador de la especial importancia del GSH proveniente de la mitocondria. Paradójicamente, un exceso de cisteína puede resultar neurotóxico (Wong *et al*, 2006). La cisteína parece ser fuertemente excitotóxica y puede actuar sinérgicamente con el glutamato. Adicionalmente, la cisteína se oxida fácilmente para formar O_2^- , H_2O_2 y radicales tiol, aunque la contribución de éstos últimos a la neurotoxicidad es desconocida.

2.6.3 Carotenoides y flavonoides

Existe poca información disponible acerca de los niveles de carotenoides o flavonoides en el cerebro (Halliwell, 2006). Ningún tipo de carotenoide fue detectable en el tallo cerebral humano o en cerebro de rata, incluso después de suplementarlos en la dieta. No obstante, existe evidencia de que algunos compuestos fenólicos pueden cruzar la barrera hematoencefálica. Múltiples estudios en animales muestran que monofenoles como el ácido ferúlico y flavonoides como la epigallocatequina, la hesperidina y la naringenina también pueden atravesar esta barrera (Spencer *et al*, 2004).

2.7 Medición de especies reactivas

2.7.1 Diacetato de diclorofluoresceína (DCFH₂-DA)

Esta es una de las pruebas más populares para medir ERO. El DCFH₂-DA entra a las células y se acumula en su mayoría en el citosol, donde es deacetilado por esterasas y convertida por varios tipos de ERO en fluoresceína (DCF); misma que puede ser visualizada por fluorescencia a 480 nm de emisión y 521 nm de excitación (Figura 2).

En esta prueba se miden radicales como el O₂[·], el RO₂[·], el RO[·], el NO₂[·] y el [·]OH. Por tanto, este ensayo es generalizado para la producción de ERO y no es un ensayo directo para alguna especie reactiva en particular. Para evitar la citotoxicidad, las células deben ser “cargadas” con DCFH-DA a bajas concentraciones (1-10 μM por 45 min - 1 h)n. Niveles más altos de DCFH-DA o exposición a luz pueden provocar oxidación fotoquímica artificial que puede conducir a la medición equivocada de ERO.

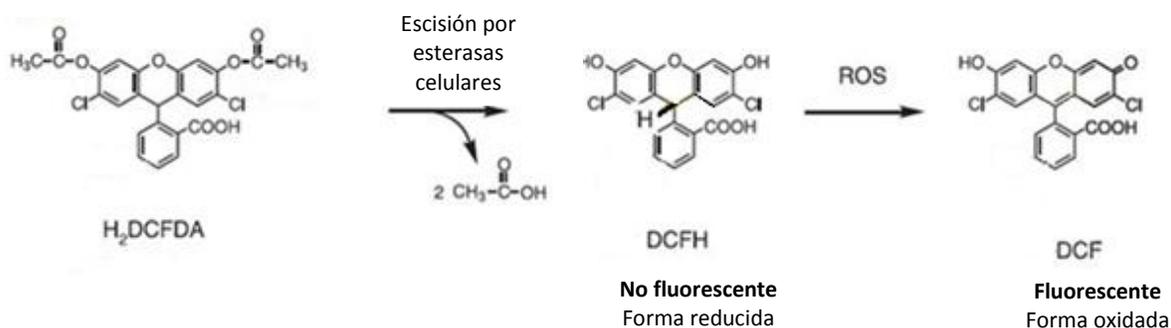


Figura 2. Oxidación de DCFH a DCF

2.7.2 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Este ensayo es uno de los métodos más antiguos y más frecuentemente usados para medir LPO. Proviene de la industria alimenticia, donde es usado para detectar rancidez. El método es sorprendentemente sencillo, basta con calentar un fluido biológico o un tejido con TBA ácido hasta ver la aparición de un color rosa. Sin embargo, la química de la prueba encierra cierta complejidad; pues pequeñas cantidades de malonaldehído (MDA) “libre” se forman durante la peroxidación de la mayoría de los sistemas membranales, especialmente de los microsomas. El MDA reacciona con el TBA para generar un producto colorido, un aducto (TBA)₂-MDA, como se muestra en la Figura 2.

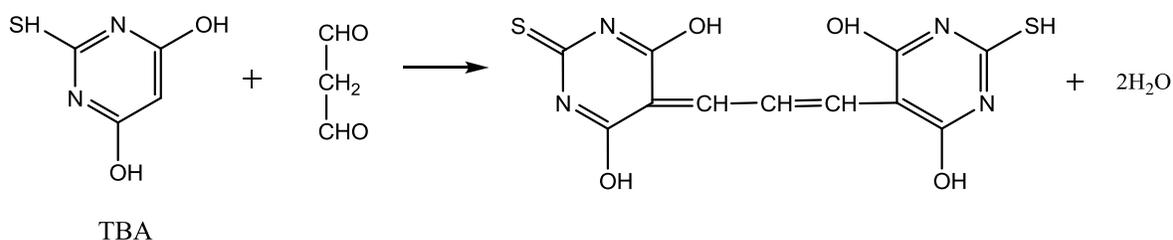


Figura 3. Reacción del TBA con el MDA

En solución ácida, el aducto (TBA)₂-MDA absorbe luz a 533 nm y es extraíble mediante solventes orgánicos como el 1-butanol.

2.7.3 Viabilidad celular

Uno de los métodos usados para determinar la actividad metabólica de las células viables son los ensayos colorimétricos. Es por ello que este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, la cual pertenece a la cadena respiratoria mitocondrial y es activa solamente en células viables. Es interesante, sin embargo, que evidencias recientes (Bennington, 2010) sugieren que este transporte mitocondrial de electrones puede jugar un rol menor en la reducción celular del MTT a formazán; ya que la mayor parte de la reducción celular ocurre en el citoplasma y probablemente involucra al NADH y al NADPH (Figura 5); por lo que este ensayo ya no es considerado únicamente un ensayo de actividad mitocondrial.

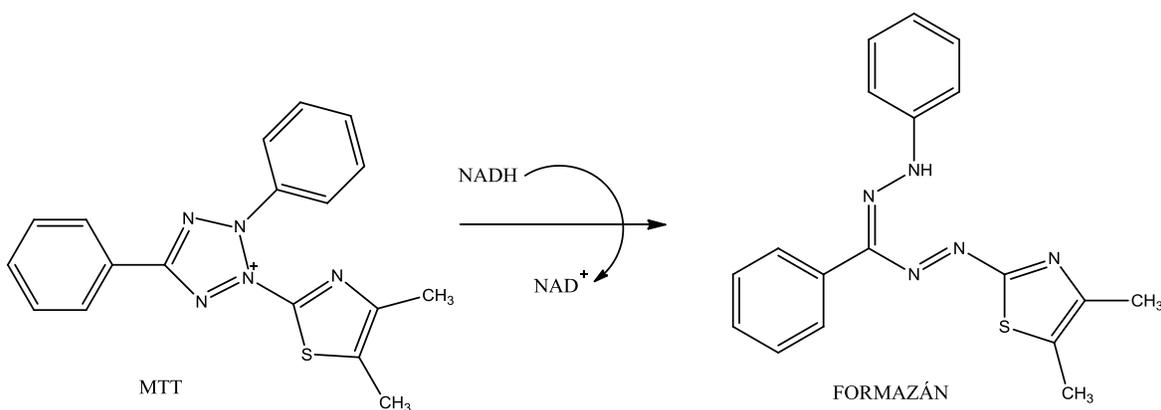


Figura 4. Reducción del MTT a formazán.

2.8 “ramón blanco” (*Brosimum alicastrum* Swartz)

2.8.1 Generalidades

B. alicastrum Swartz, mejor conocido como “ramón blanco”; es un árbol de 20 a 40 m de altura y con un diámetro de hasta 1.50 m (Figura 2A). Se presenta como un árbol recto de corteza café y escamosa, con un jugo lechoso en las hojas y el tallo. Las hojas son más largas que anchas, el soporte que une a la hoja con el tallo es corto y tienen una textura similar a la del cuero. Sus flores son de color crema o blanco-verdosas y pequeñas. Los frutos son verdes y carnosos; cuando maduran se tornan amarillos o anaranjados y contienen una semilla. La corteza externa del árbol es lisa, parda grisácea con tonos amarillentos; mientras que la corteza interna es de color crema amarillento y fibrosa o granulosa (Figura 2B). (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

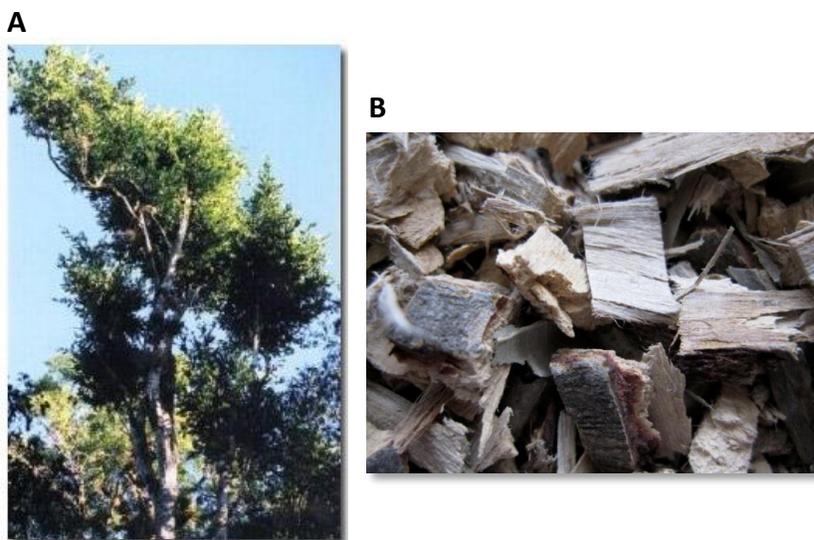


Figura 5. A: Árbol *B. alicastrum* Swartz. **B:** Corteza seca de *B. alicastrum* Swartz

2.8.2 Distribución geográfica

B. alicastrum Swartz es una especie originaria de Mesoamérica y el Caribe; habita áreas de clima cálido, semicálido y templado desde los 20 hasta los 1000 metros sobre el nivel del mar. Suele crecer de manera silvestre, encontrándosele de esta manera en el bosque tropical caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio, bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino y de pino.

En México es posible encontrarlo en los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, San Luis Potosí, Tabasco, Tampico, Veracruz y Yucatán (Figura 3).



Figura 6. Localización de *B. alicastrum* en la República Mexicana

2.8.3 Sinonimia popular

A *B. alicastrum* se le conoce con otros nombres dependiendo del estado; por ejemplo: en Michoacán: huge, hujemojo; en Puebla: cupsap (otomí); en Yucatán: ox, oxotzin, Ramón; en San Luis Potosí: ojos, jos, ojite; en Querétaro: ramón blanco, ramón colorado; en Jalisco: capomo; en Oaxaca: samaritano, rechinador. También en Sudamérica se le conoce con el nombre de guáimaro. Los nombres más comunes utilizados en México son ramón, ramón blanco y ojite (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.8.4 Usos comunes

B. alicastrum es una especie ampliamente útil, de la que se aprovechan las semillas, el látex, la madera, el forraje y la corteza. Las semillas, tostadas y molidas, se usan para preparar una bebida similar al café; con ellas también se puede preparar una harina negra con la que se elabora una especie de pan o tortilla pues la semilla contiene una gran cantidad de grasas, azúcares y triptófano, un aminoácido esencial deficiente en las dietas a base de maíz. El látex que fluye del tronco es utilizado para adulterar el chicle; la madera se utiliza para la confección de muebles e implementos dispuestos en interiores y finalmente el forraje se utiliza como alimento para el ganado (Ayala *et al*, 1972).

2.8.5 Usos y propiedades medicinales

A pesar de que no se conoce la composición química exacta de la planta; ésta es ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para aliviar diversas enfermedades. Su principal aplicación medicinal es en el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias, siendo el asma el padecimiento para el cual se usa con mayor frecuencia; aunque también es frecuente su uso en el

tratamiento de la diabetes mellitus (Sánchez-Recalde *et al*, 2010) y problemas ginecológicos como la infertilidad, la falta de leche materna y la regulación de la menstruación.

En ambos casos, se prepara una infusión con la corteza seca para obtener una solución de color ámbar a rojiza. No existe una dosis recomendada para su consumo, la tradición popular indica que ésta preparación debe consumirse como “agua de uso”, lo que significa que debe consumirse en lugar del agua simple que se bebe normalmente durante el día, durante el tiempo que sea necesario hasta que desaparezca el padecimiento (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.8.6 Composición química

No existen estudios contundentes en los que se haya identificado con precisión la composición química de la corteza o de la madera de *B. alicastrum*. Sin embargo, se ha encontrado que la corteza de *B. alicastrum* contiene flavonoides, resinas, compuestos reductores, taninos y saponinas (García *et al*, 2006). En otro estudio, se describe la presencia de 1-4, 2-6-dimetoxi benzoquinona, un compuesto glicólico que se presenta como metabolito secundario de la planta (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

3. HIPÓTESIS

Si las infusiones de la corteza de *B. alicastrum* son usadas en la medicina tradicional como tratamiento eficaz para enfermedades relacionadas con el estrés oxidante como el asma y la diabetes mellitus, entonces es posible que los extractos y fracciones obtenidos de la corteza de *B. alicastrum* sean capaces de reducir las alteraciones morfológicas que se inducen en un modelo de neurodegeneración, donde el estrés oxidante juega un papel importante.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los extractos y fracciones acuosas y orgánicas obtenidas a partir de la corteza seca de *B. alicastrum* sobre las alteraciones morfológicas que se generan en el modelo experimental con QUIN.

4.2 Objetivos particulares

Evaluar el efecto de los extractos de *B. alicastrum* sobre:

4.2.1 Las alteraciones histológicas que se inducen por la administración intraestriatal de QUIN.

4.2.2 La LPO inducida en homogenados de cerebro total.

4.2.3 La viabilidad mitocondrial en homogenados de cerebro total.

4.2.4 La formación de ERO en homogenados de cerebro total.

4.2.5 Fraccionar los extractos estudiados con el fin de aislar el o los compuestos responsables de la actividad antioxidante.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

La corteza seca y madera de *B. alicastrum* fue proporcionada por la Dra. Irma Bernal Lugo, quien la obtuvo del estado de Sinaloa. Una muestra de referencia del material vegetal se guarda en el laboratorio 111 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

5.2 Análisis cromatográficos

Los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando distintos sistemas de elución y placas de aluminio de diversas dimensiones recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 ASTM) de 0.25 mm de espesor. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm) y posteriormente fueron reveladas con vainillina sulfúrica y anisaldehído seguido de calentamiento hasta la visualización completa de los compuestos con DPPH. La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre Sephadex utilizando diversos sistemas de elución (MeOH, MeOH/H₂O y H₂O).

5.3 Estudio químico preliminar de la corteza de *B. alicastrum*

Para este estudio, se realizaron cuatro extracciones a pequeña escala mediante los métodos de decocción, infusión simple, maceración con EtOH y maceración con diclorometano, según las cantidades reportadas en la siguiente tabla:

Tabla 2. Materiales utilizados en el estudio químico preliminar de la corteza de *B. alicastrum*.

Método	Disolvente	Cantidad (mL)	Material vegetal (g)
Maceración	Etanol	100	10.24
Maceración	Diclorometano	150	10.06
Decocción	Agua desionizada	200	10.06
Infusión Simple	Agua desionizada	200	10.02

De manera independiente, los extractos resultantes se concentraron a presión reducida y se llevaron a sequedad en un rotaevaporador Büchi R-215.

5.4 Estudio químico a mediana escala de la corteza seca y la madera de *B. alicastrum*

Para el estudio químico a mediana escala de la corteza y madera de *B. alicastrum* se elaboraron tres extractos a mediana escala utilizando como métodos de extracción maceración, infusión y extracción continua con un aparato Soxhlet y como disolventes EtOH y H₂O.

La extracción continua en un aparato tipo Soxhlet se realizó tanto para la corteza seca (497.7 g) como para la madera (300.2 g) más próxima a la misma utilizando EtOH (1.5 L) como disolvente en cada caso. Los extractos resultantes se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador Büchi R-215, obteniéndose así 11.29 g y 10.91 g de extracto seco respectivamente.

Por otra parte, la extracción por infusión simple se realizó utilizando corteza seca de (509.1 g) de *B. alicastrum* y 5 L de H₂O desionizada como disolvente. El extracto resultante se concentró a presión reducida, obteniéndose así 31.06 g de extracto seco.

Finalmente, la extracción por maceración se realizó utilizando corteza seca (663.5 g) de *B. alicastrum* y 1.5 L de EtOH como disolvente. El extracto resultante se

concentró a presión reducida en un rotaevaporador Büchi R-215, obteniéndose así 11.2922 g de extracto seco. En la Tabla 3, se muestran los rendimientos obtenidos para las primeras 4 extracciones a mediana escala.

Tabla 3. Rendimiento obtenido en el proceso de extracción.

Extracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
Maceración	11.59	1.75
Infusión	31.06	6.10
Sohxlet / Corteza	11.29	2.26
Sohxlet / Madera	10.91	3.63

5.5 Fraccionamiento primario del extracto obtenido de la corteza seca de *B. alicastrum*

De manera independiente, cada uno de los extractos secos obtenidos en el estudio químico a mediana escala de la corteza de *B. alicastrum* fue disuelto en una mezcla de MeOH/H₂O 1:1. Posteriormente, se filtraron para separar el material insoluble. Los extractos filtrados se fraccionaron por separado utilizando métodos de partición líquido-líquido y AcOEt y H₂O como disolventes. Las fracciones de AcOEt de cada extracto se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida hasta obtener un residuo sólido. Por último, las fracciones acuosas se concentraron a sequedad. Como resultado de este proceso se obtuvieron las fracciones orgánicas y acuosas de cada extracto.

Por otra parte, se obtuvo una interfase que se presentó como un residuo sólido insoluble durante el fraccionamiento por partición líquido-líquido del extracto de *B. alicastrum* obtenido por infusión, al cual se le asignó la clave Interfase-In y que se separó para su posterior evaluación biológica *in vitro*

5.6 Fraccionamiento secundario de las fracciones obtenidas a partir de la corteza seca y madera de *B. alicastrum*

5.6.1 Fracción MeOH-In

Se pesaron 5 g de la fracción seca, los cuales fueron disueltos en una mezcla de MeOH/H₂O 2:1 para posteriormente proceder al fraccionamiento en una columna abierta de Sephadex-LH20 (3.5 × 45 cm), usando como eluyente MeOH, MeOH/H₂O 1:1 y H₂O. Se obtuvieron un total de 12 fracciones de 50 mL, cada una de las cuales se analizó por CCF. Aquellas que presentaron similitud cromatográfica fueron mezcladas hasta obtener un total de 6 fracciones primarias, tal y como se muestra en la Figura 7.

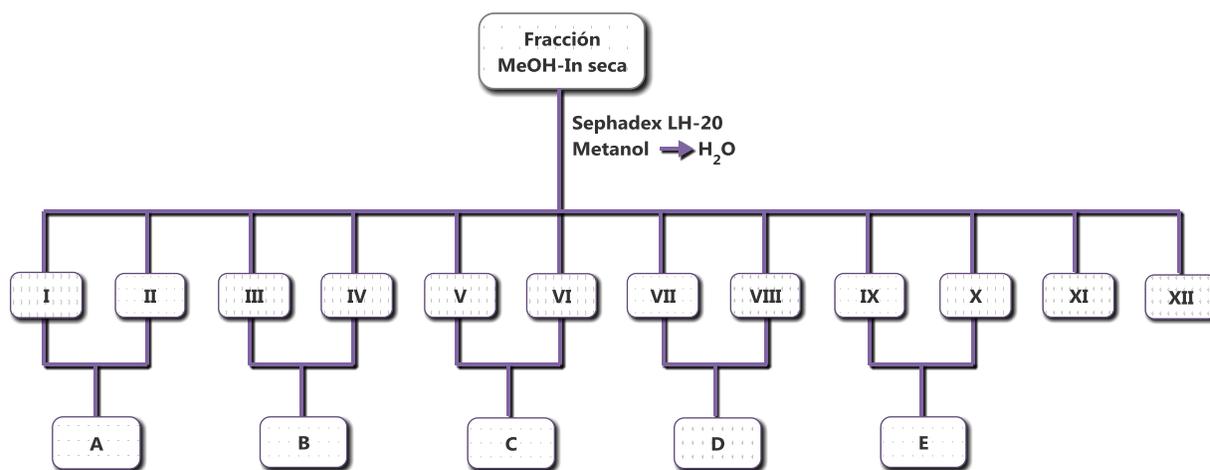


Figura 7. Fraccionamiento de la partición MeOH/H₂O Infusión de *B. alicastrum*.

5.6.2 Fracción AcOEt-SM

Las fracciones AcOEt-SoC y AcOEt-Ma se analizaron por CCF y se combinaron por su similitud cromatográfica en la fracción AcOEt-SM. Posteriormente, se pesaron 3 g de la fracción seca, los cuales fueron disueltos en una mezcla de MeOH/H₂O 2:1 para posteriormente proceder al fraccionamiento en una columna abierta de Sephadex-LH20 (3.5 × 45 cm), usando como eluyente MeOH, MeOH/H₂O 1:1 y H₂O. Se obtuvieron un total de 20 fracciones secundarias de 50 mL, cada una de las cuales fue analizada por CCF. Aquellas que presentaron similitud cromatográfica, fueron mezcladas hasta obtener un total de 6 fracciones combinadas, tal y como se muestra en la Figura 8.

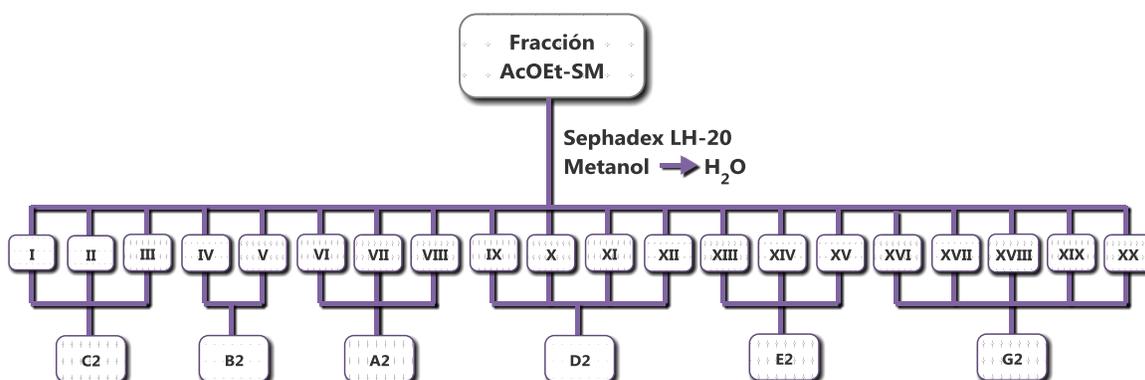


Figura 8. Fraccionamiento secundario de la fracción AcOEt-SM obtenida a partir de la corteza seca de *B. alicastrum*.

5.7 Actividad inhibidora de radicales libres. Ensayo cualitativo con 2,2 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) en CCF

Los compuestos presentes en los extractos fueron analizados mediante CCF. Las cromatoplasmas se secaron en una campana de extracción y se rociaron con DPPH al 0.2% en MeOH para identificar la presencia de compuestos antioxidantes mediante puntos o bandas amarillos contra un fondo púrpura.

5.8 Actividad de la infusión de *B. alicastrum* obtenida en el estudio químico preliminar en un modelo de neurodegeneración con QUIN

5.8.1 Animales

Se emplearon ratas macho Wistar con un peso de 250 a 300 g. Los animales se colocaron en cajas de acrílico en condiciones constantes de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) y humedad ($50\% \pm 10\%$). Se mantuvieron en ciclos de 12 h luz/oscuridad con libre acceso al agua y al alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales estuvieron apegados a las “Guidelines for the Care and use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research” Institute for Laboratory Animal, Research, National Research Council of the National Academies (www.nap.edu); además, se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

5.8.2 Diseño del experimento

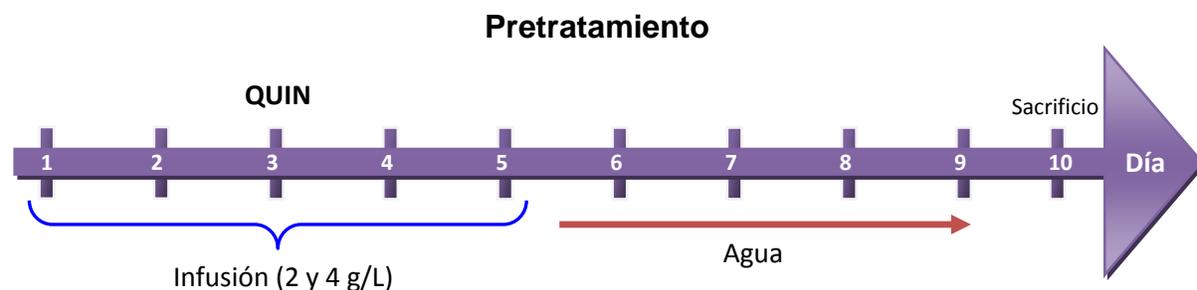
Se emplearon cuatro grupos de animales ($n=3$), divididos al azar y dispuestos como se menciona a continuación:

- Control negativo (CT) a los que se les administró solución salina isotónica (SSI);
- Control positivo (QUIN) a los que se les administró QUIN.
- Pretratamiento 2 (Pre-2), tratados con una infusión de la corteza a 2 g/L y con QUIN;
- Pretratamiento 4 (Pre-4), tratados con una infusión de la corteza a 4 g/L y con QUIN;
- Postratamiento 2 (Pos-2), tratados con una infusión de la corteza a 2 g/L y con QUIN;
- Postratamiento 4 (Pos-4), tratados con una infusión de la corteza a 4 g/L y con QUIN.

La infusión de *B. alicastrum* se administró por vía oral en sustitución del agua de beber de las ratas, según lo indicado en los esquemas de tratamiento (Figuras 8A y 8B). El QUIN y la SSI fueron administradas intraestrialmente con un equipo estereotáxico (Stoelting Co., Wood Dale, USA) por medio de una microjeringa (Hamilton Co., Reno, USA) en las siguientes coordenadas estereotáxicas: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y -4.5 mm ventral a la dura, de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos (Paxinos y Watson, 2008).

Para la administración del QUIN, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.2 mL/250 g) vía intraperitoneal. Una vez anestesiados, se les administró la solución de QUIN en el hemisferio derecho a razón de 1 μ L/2 min, manteniendo la microjeringa *in situ* por 2 min para permitir la difusión pasiva. Al término de éste tiempo, la jeringa fue retirada cuidadosamente y la herida fue suturada. Los animales se mantuvieron en observación hasta que se recuperaron de la anestesia.

A.



B.

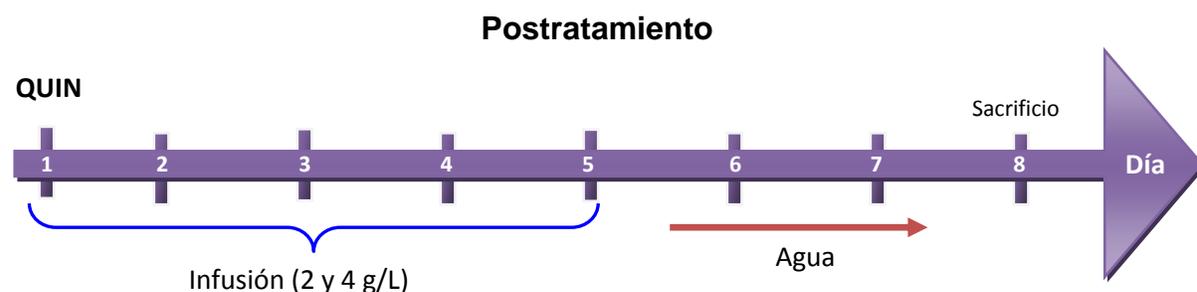


Figura 8. Esquema de administración de la infusión de *B. alicastrum* a 2 y 4 g/L. **A:** Pretratamiento

B: Postratamiento.

5.8.3 Análisis histológico

Los tejidos fueron procesados utilizando la metodología descrita por Maldonado *et al.* (2010). Transcurridos siete días de la administración del QUIN, los animales fueron anestesiados con 0.5 mL de pentobarbital sódico y perfundidos transcardialmente con SSI y heparina (200/1 v/v) seguido de una solución de p-formaldehído al 4%. Los cerebros fueron extraídos y conservados durante 7 días en una solución de p-formaldehído al 4% para posteriormente ser deshidratados gradualmente en soluciones de EtOH y xilol para su posterior inclusión en parafina.

Una vez incluidos, se realizaron cortes coronales de 5 µm de grosor, en el sitio de la lesión, usando un microtomo histo-STAT (American Instrument Exchange Inc., Haverhill, USA). Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para permitir la observación de los cuerpos celulares.

5.8.4 Conteo Celular

A partir de los cortes histológicos obtenidos, se realizó un conteo celular según la metodología descrita por Maldonado *et al.* (2010). Los cortes se observaron en un microscopio Leica IM100 a 40x. Las imágenes observadas fueron capturadas con una cámara Leica DFC-300 FX. Los criterios utilizados para determinar el daño celular fueron: presencia de núcleos picnóticos, vacuolización citoplasmática, atrofia neuronal, edema intersticial y necrosis. Se contaron el número de neuronas dañadas y preservadas en 5 campos seleccionados al azar, obtenidos de 3 cortes por tejido cubriendo el estriado en la zona lesionada. La cuantificación fue realizada por una persona en ciego y los datos obtenidos se expresan como porcentaje de neuronas dañadas por campo.

5.8.5 Determinación de ERO

Las ERO fueron detectadas mediante la fluorescencia de la DCF, según la metodología descrita por Silva- Adaya *et al* (2008). Los homogenados de cerebro (400 μ L) fueron incubados con FeSO_4 5 μ M, solución fisiológica de Krebs-Ringer y soluciones de los extractos a 0.25 y 0.5 mg/mL durante 2 h a 37°C en baño María con agitación, protegidos de la luz. Transcurrido dicho tiempo, a cada tubo se le añadieron 100 μ L de DCFH-DA (7.53×10^{-5} M) y posteriormente fueron incubados por 30 min más. Al final de la incubación, las muestras fueron protegidas de la luz, colocadas en hielo y centrifugadas a 8000 rpm por 10 min. Las ERO fueron detectadas en el sobrenadante por espectroscopía de fluorescencia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer LS50 a 480 nm de emisión y 521 nm de excitación. Los resultados se expresan como porcentaje de formación de ERO vs. Control.

5.8.6 Determinación de lipoperoxidación (LPO)

Para la determinación de la LPO, los homogenados de cerebro (250 μ L) fueron incubados con FeSO_4 5 μ M, solución fisiológica de Krebs-Ringer y los extractos de *B. alicastrum* a 0.25 y 0.5 mg/mL durante 2 h a 37°C en baño María con agitación. La LPO en los homogenados fue evaluada mediante la estimación de las sustancias reactivas con el TBA, de acuerdo a la metodología descrita por Pérez-de la Cruz *et al* (2010). Transcurrido este tiempo, 500 μ L de TBA (que contenían 0.75 g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 mL de HCl) fueron añadidos a cada tubo y posteriormente se colocaron en baño María a ebullición, hasta la aparición de un color rosa. Las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y centrifugadas a 10000 rpm por 10 min. Se estimó la densidad óptica de los sobrenadantes a 532 nm en un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8. Los resultados se expresan como porcentaje de LPO vs. Control.

5.8.7 Estimación de la capacidad reductora mitocondrial

La capacidad reductora mitocondrial fue evaluada mediante el ensayo de reducción del MTT, según la metodología descrita por Pérez-de la Cruz *et al.* (2006). Alícuotas (300 μ L) de los homogenados de cerebro se incubaron con FeSO_4 5 μ M, solución fisiológica de Krebs-Ringer y soluciones de los extractos a 0.25 y 0.5 mg/mL durante 2 h a 37°C en baño María con agitación. Transcurrido este tiempo, 10 μ L de MTT (0.012 M) fueron añadidos a cada tubo y posteriormente fueron incubados por 1 h más bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se centrifugaron a 12 000 rpm por 3 min. El botón resultante se resuspendió en 500 μ L de isopropanol ácido y se dejó reposar por 4 h. Tras este tiempo, los tubos se centrifugaron y se estimó la densidad óptica de los sobrenadantes a 570 nm en un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8. Los resultados se expresan como porcentaje de reducción de MTT vs. Control.

5.8.8 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los datos se analizaron con una ANOVA de una vía y como método *post hoc* se usó la prueba de Dunnet utilizando el software Prism 5.02 (GraphPad; San Diego, USA). Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis histológico

En la figura 9 se observan las fotografías representativas del estriado de cada grupo. El grupo con QUIN muestra el mayor daño, mientras que la administración de la infusión de la corteza de *B. alicastrum* pre y post tratamiento con QUIN, previó parcialmente las alteraciones morfológicas observadas con QUIN sólo.

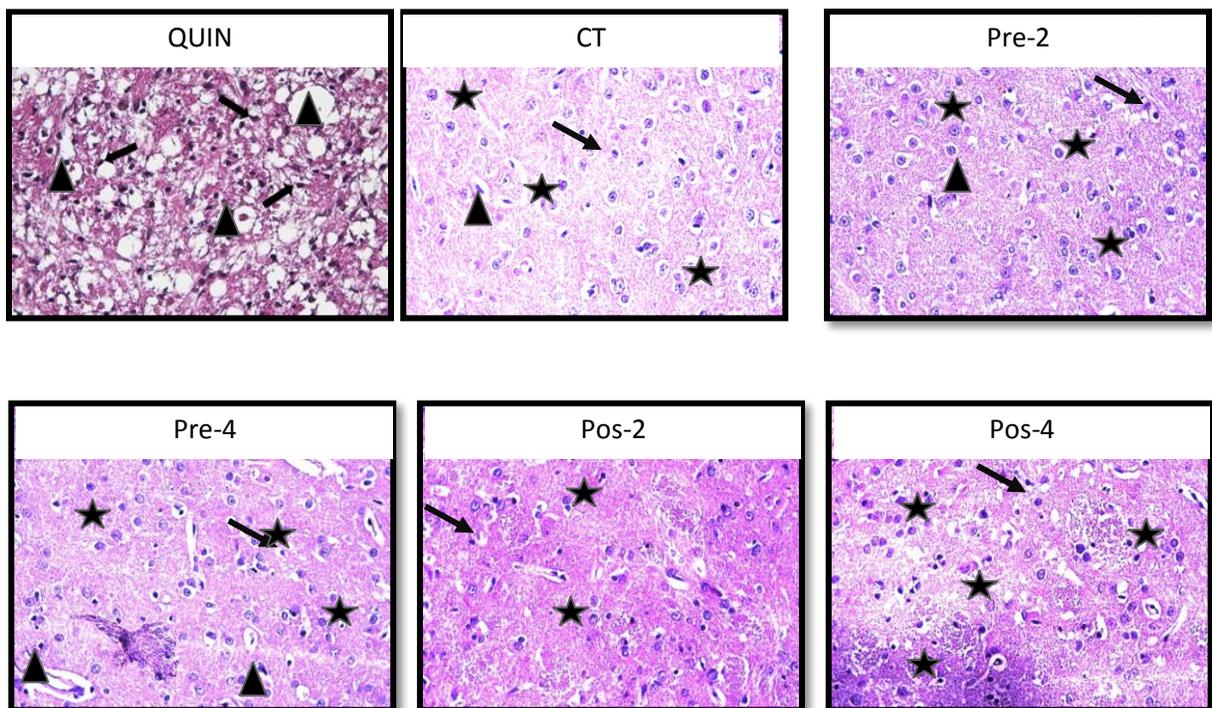


Figura 9. Efecto de la infusión de *B. alicastrum* sobre el daño histológico inducido por el QUIN. Los cortes de 5 μ m de estriado se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Se presentan microfotografías representativas de cada grupo: QUIN, CT, Pre-2, Pre-4, Pos-2 y Pos-4. Se señalan el edema y la retracción del neuropilo (triángulos), la presencia de picnosis citoplasmática (flechas) y las células preservadas (estrellas).

6.1.1 Conteo Celular

Se realizó un conteo celular a partir de los cortes histológicos obtenidos. Se cuantificó el porcentaje de células dañadas por campo, obteniéndose así que el grupo con QUIN presentó diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo CT, siendo éste el grupo donde se observa una mayor cantidad de células dañadas. Por otro lado, en los grupos donde se administró la infusión elaborada a partir de la corteza del árbol tanto previa como posteriormente a la lesión intraestriatal, se observó una importante disminución en la cantidad de células dañadas (Figura 10).

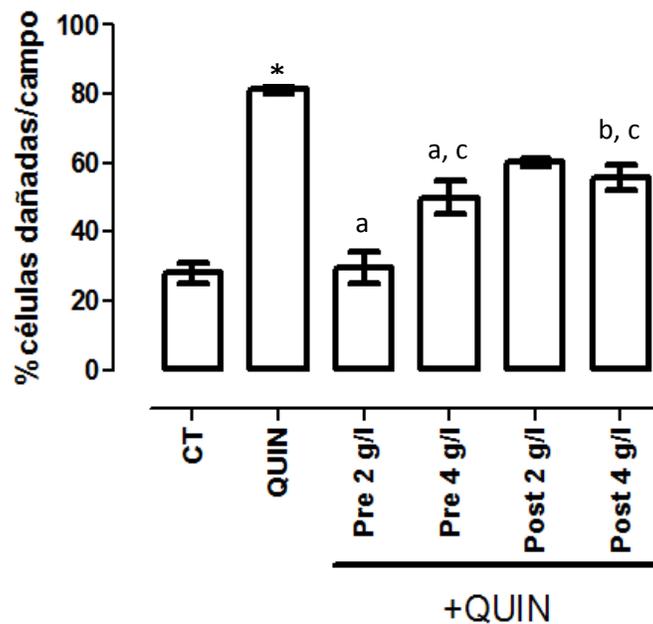


Figura 10. Conteo de células dañadas en el daño inducido por QUIN. Se presenta el promedio \pm EEM.. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.001 y ^bP < 0.05 respecto a QUIN, ^cP < 0.05 respecto a CT y *P < 0.001 respecto a CT. n=3.

6.2 Métodos de extracción

Se obtuvieron un total de 4 extractos secos de color café oscuro, de los cuales se descartó el extracto obtenido por maceración con diclorometano. Los 3 extractos restantes fueron totalmente solubles en H₂O destilada y se ensayaron posteriormente en las pruebas de LPO, reducción de MTT y formación de ERO.

6.2.1 Lipoperoxidación

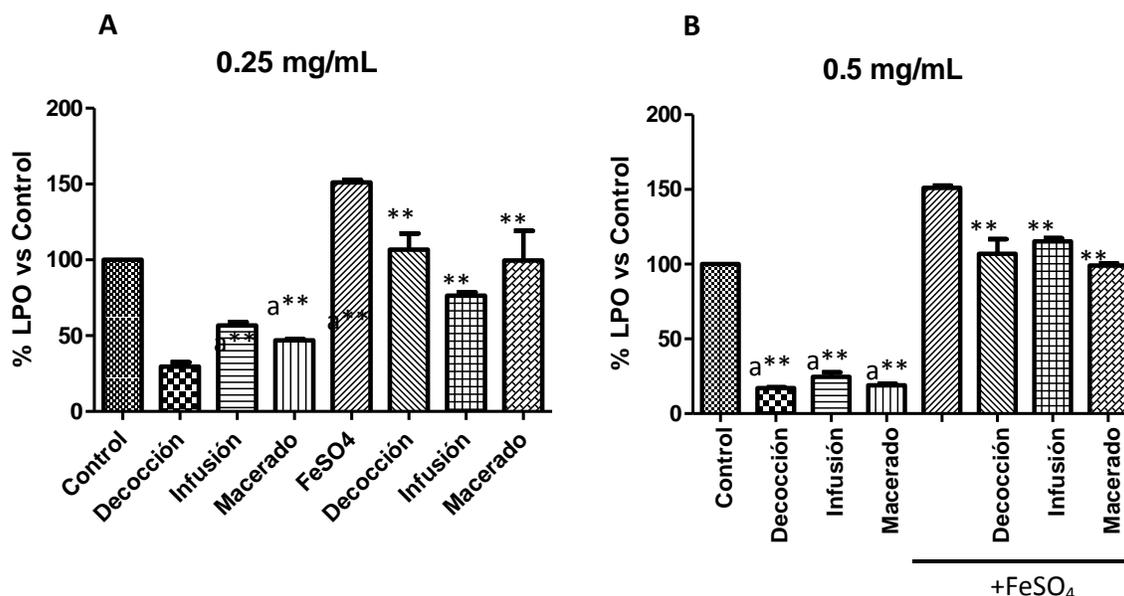


Figura 11A y 11B. Efecto de los diferentes métodos de extracción a 0.25 (A) y 0.5 (B) mg/mL sobre la lipoperoxidación inducida por el FeSO₄. Los resultados se muestran como la media ± EEM. . ^aP < 0.05 respecto a Control y ^{**}P < 0.01 respecto a Control FeSO₄.

Las figuras 11A y B muestran la disminución de la LPO producida por el FeSO₄ en las muestras tratadas con los extractos de la corteza de *B. alicastrum* a 0.25 y 0.5 g/mL. El método de extracción que presentó una mayor actividad contra la LPO fue el realizado mediante la infusión a 0.25 mg/mL y la maceración etanólica a 0.5

mg/mL. Es importante señalar que los controles de los extractos presentan una LPO menor a la observada en el CT.

6.2.2 Viabilidad Mitocondrial

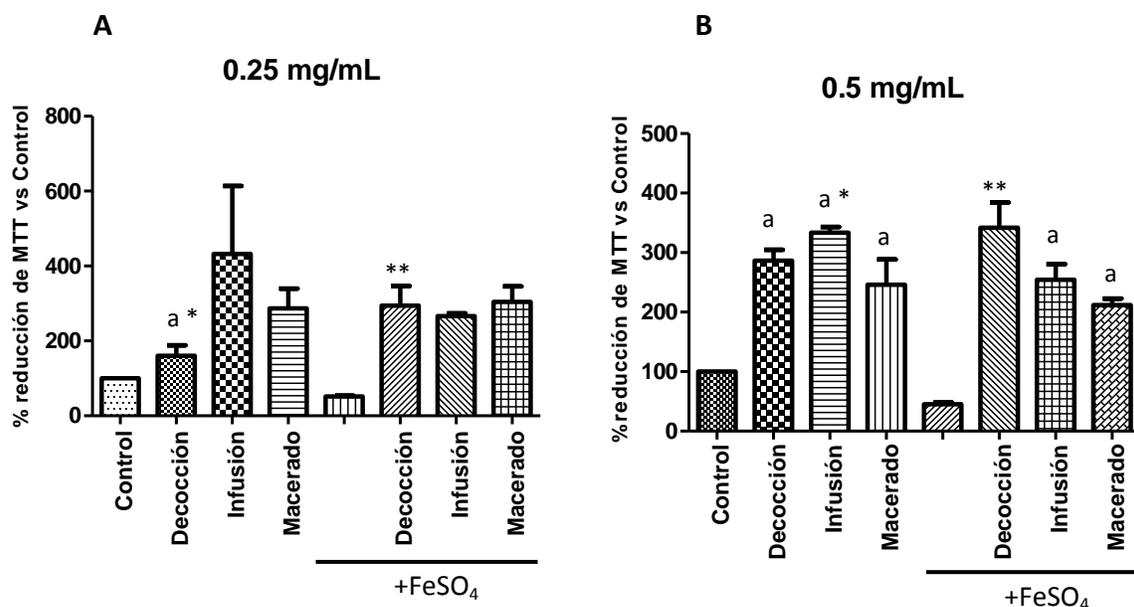


Figura 12A y B. Efecto de los diferentes métodos de extracción a 0.25 (A) y 0.5 (B) mg/mL sobre la capacidad reductora del MTT. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control; *P < 0.05 y **P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 12A y B, se observa que la viabilidad mitocondrial, que se manifiesta como la capacidad de reducir el MTT a formazán de acuerdo a lo mostrado en la Figura 5, aumenta significativamente en comparación con el Control con FeSO₄. La mejor protección se observa en las muestras tratadas con una concentración de 0.5 mg/mL; aunque es importante resaltar que a 0.25 como 0.5 mg/mL, tanto los controles como las pruebas muestran una viabilidad mayor a la del Control. Para esta prueba, el extracto que proporciona una mayor protección es el obtenido por decocción a 0.5 mg/mL, lo que indica una protección dosis dependiente.

6.2.3 Formación de ERO

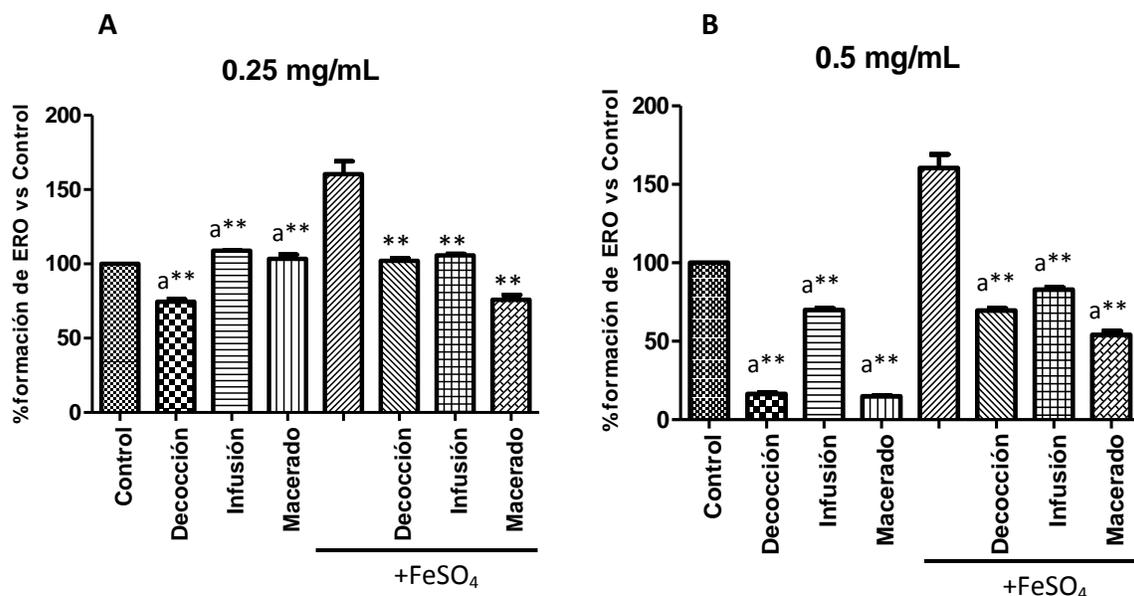


Figura 13A y B. Efecto de los diferentes métodos de extracción a 0.25 (A) y 0.5 (B) mg/mL sobre la formación de ERO. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. . ^aP< 0.05 respecto a Control; **P<0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 13A y B se observa la disminución en la formación de ERO inducida por el FeSO₄ en las muestras tratadas con los extractos de *B. alicastrum*. Todos los extractos proporcionan protección ya sea a 0.25 o 0.5 mg/mL; aunque la mejor protección se observa a la concentración de 0.5 mg/mL, en especial al ensayar el macerado etanólico donde la formación de ERO es incluso menor que la presentada por las muestras del control negativo. La concentración de 0.5 mg/mL ofrece una mejor protección contra la formación de ERO inducida por el FeSO₄. A esta concentración, el método de extracción que presentó la mayor protección fue el obtenido mediante maceración etanólica. Es importante resaltar que a 0.25 y 0.5 mg/mL la formación de ERO para los controles y las pruebas es incluso menor que la observada en el Control de la prueba.

6.3 Fracciones primarias obtenidas por métodos de partición

Se obtuvieron un total de 9 extractos secos de color café oscuro provenientes de las particiones líquido-líquido realizadas a los extractos primarios. Los extractos obtenidos se clasificaron de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4. Fracciones obtenidas con sus claves asignadas

Método de extracción	Fracciones obtenidas (AcOEt o MeOH/H₂O)	Clave	Serie
Sohxlet (corteza)	AcOEt	AcOEt-SoC	2
	MeOH/H ₂ O	MeOH-SoC	1
Macerado	AcOEt	AcOEt-Ma	1
	MeOH/H ₂ O	MeOH-Ma	1
Infusión	AcOEt	AcOEt-In	2
	MeOH/H ₂ O	MeOH-In	1
	Interfase de particiones	Interfase-In	2
Sohxlet (madera)	AcOEt	AcOEt-SoM	1
	MeOH/H ₂ O	MeOH-SoM	2

Las fracciones obtenidas fueron ensayados en las pruebas de LPO, viabilidad mitocondrial y formación de ERO, a concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/mL según lo descrito en la metodología. Las pruebas se dividieron en dos series para hacer más sencillo su manejo y se les definió como Serie 1 y Serie 2 tal como se muestra en la Tabla 4.

6.3.1 Lipoperoxidación

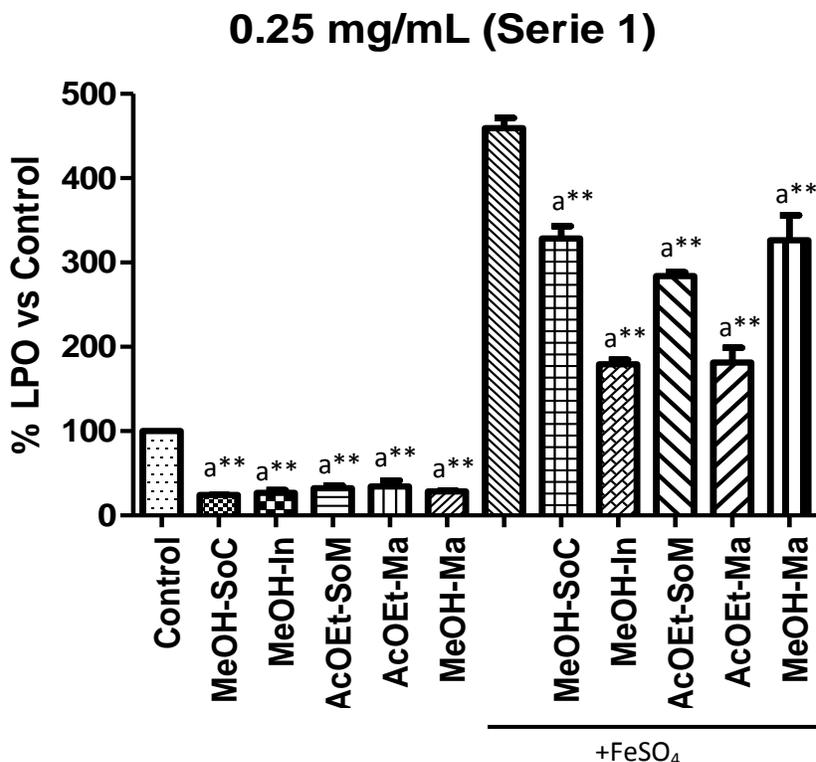


Figura 14. Efecto de las fracciones obtenidas a 0.25 mg/mL por partición líquido-líquido sobre la lipoperoxidación (LPO) inducida por FeSO_4 . Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^a $P < 0.05$ respecto a Control y ^{**} $P < 0.01$ respecto a Control FeSO_4 . La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 14 se observa que la LPO inducida por el FeSO_4 disminuye en las muestras tratadas con los extractos de *B. alicastrum* a 0.25 mg/mL. Aunque todas las fracciones mostraron actividad protectora, las que presentan mayor actividad a esta concentración fueron MeOH-In y AcOEt-Ma. Es importante resaltar que los controles de las fracciones presentaron una LPO menor a la observada en el Control.

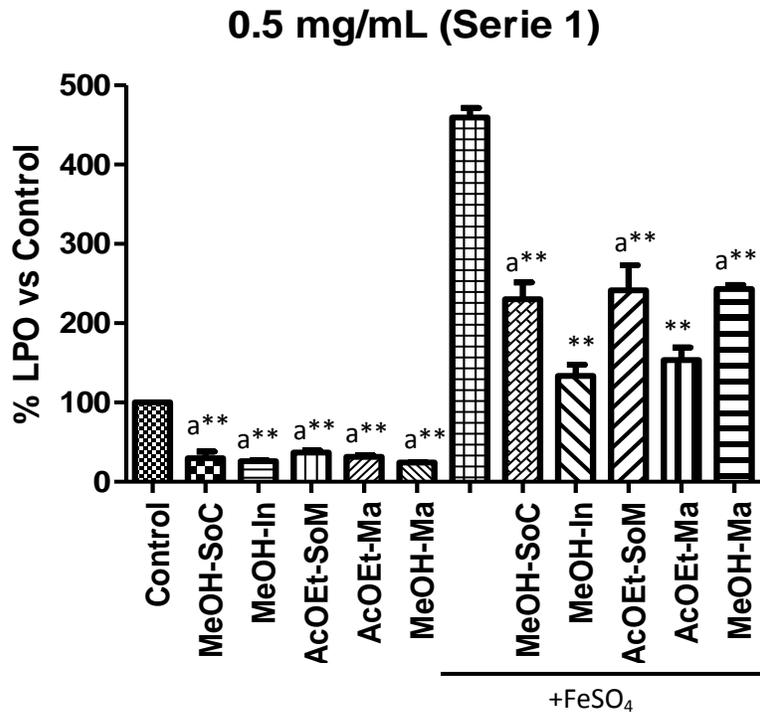


Figura 15. Efecto de las fracciones obtenidas a 0.5 mg/mL por partición líquido-líquido sobre la lipoperoxidación (LPO) inducida por FeSO₄. Los resultados se muestran como la media ± EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control; *P < 0.05 y **P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 15 se observa que la LPO inducida por el FeSO₄ disminuyó en las muestras tratadas con las fracciones de *B. alicastrum* a 0.5 mg/mL. Aunque todas las fracciones mostraron actividad protectora, las que presentaron mejor actividad a esta concentración fueron MeOH-In y AcOEt-Ma. Es importante resaltar que los controles de las fracciones presentaron una LPO menor a la observada en el Control.

Al comparar las figuras 14 y 15, se observa que todas las fracciones a 0.25 y 0.5 mg/mL presentaron actividad protectora contra la LPO, pero la mejor se observó a 0.5 mg/mL; lo que indica una probable protección dosis-dependiente. Las fracciones que ofrecen la mejor protección a esta concentración fueron MeOH-In y AcOEt-Ma.

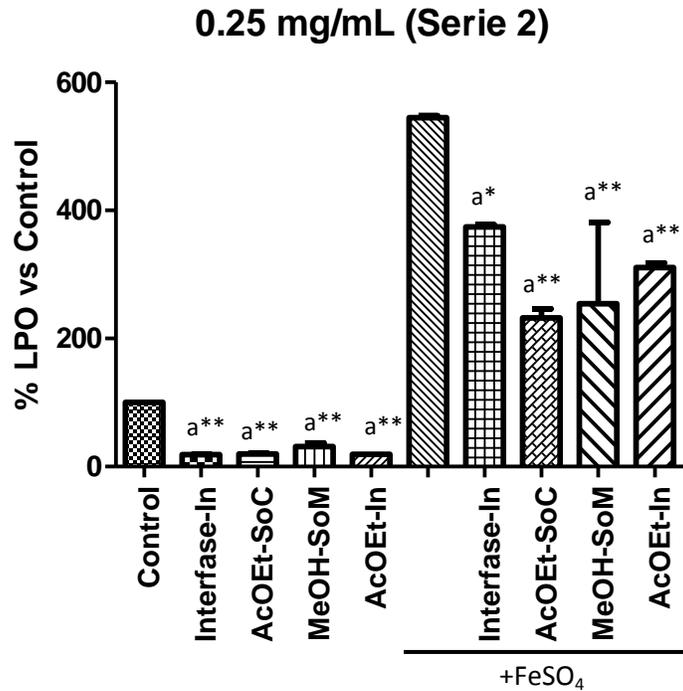


Figura 16. Efecto de las fracciones obtenidas a 0.25 mg/mL por partición líquido-líquido sobre la lipoperoxidación (LPO) inducida por el FeSO₄. Los resultados se muestran como la media ± EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control; *P < 0.05 y **P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 16 se observa que la LPO inducida por el FeSO₄ disminuyó en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum* a 0.25 mg/mL. Aunque todas las fracciones mostraron actividad protectora, la que presentó mejor actividad a ésta concentración fue AcOEt-SoC. Es importante resaltar, sin embargo, que los controles de las fracciones presentaron una LPO menor a la observada en el Control.

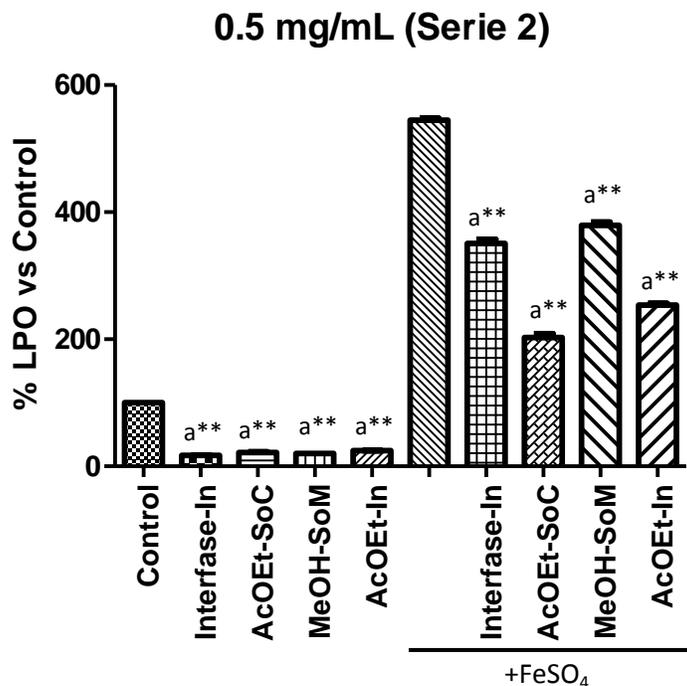


Figura 17. Efecto de las fracciones obtenidas a 0.5 mg/mL por partición líquido-líquido sobre la lipoperoxidación (LPO) inducida por el FeSO₄. Los resultados se muestran como la media ± EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control y ^{**}P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 17 se observa que la LPO inducida por el FeSO₄ disminuyó en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum* a 0.5 mg/mL. Aunque todas las particiones mostraron actividad protectora, las que presentaron mejor actividad a ésta concentración fueron Soxhlet en AcOEt e Infusión en AcOEt. Es importante resaltar que los controles de las particiones presentaron una LPO menor a la observada en el Control.

6.3.2 Viabilidad Mitocondrial

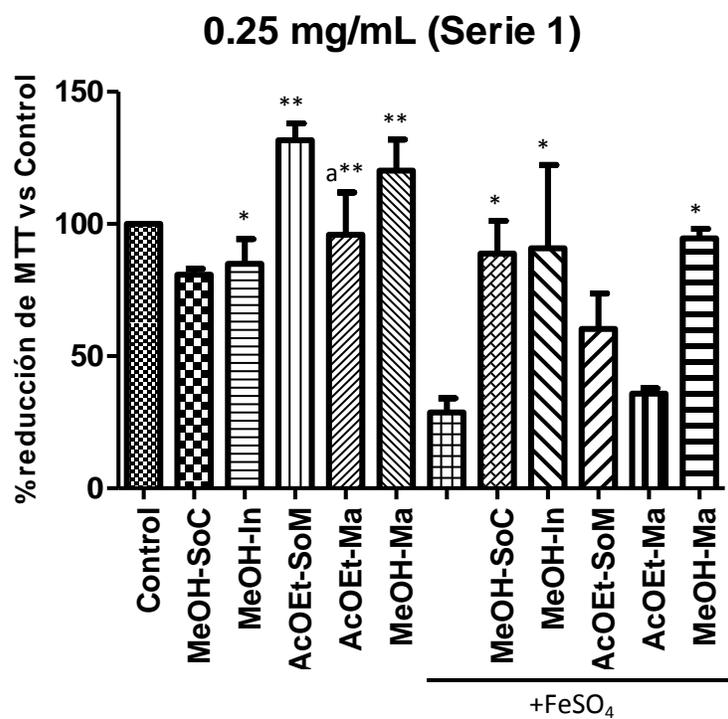


Figura 18. Efecto de las fracciones obtenidas a 0.25 mg/mL por partición líquido-líquido sobre la capacidad reductora del MTT. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control; *P < 0.05 y **P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

La figura 18 muestra que la viabilidad mitocondrial, manifestada como la capacidad mitocondrial de reducir el MTT a formazán, se incrementó considerablemente en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de la corteza de *B. alicastrum* a 0.25 mg/mL. Aunque todas las fracciones mostraron actividad protectora, las que presentaron mejor actividad a ésta concentración fueron MeOH-SoC, MeOH-In y MeOH-Ma, con una viabilidad similar a la del Control. Es importante resaltar que en el caso de los controles AcOEt-SoM y AcOEt-Ma la viabilidad es incluso ligeramente mayor que la observada en el Control.

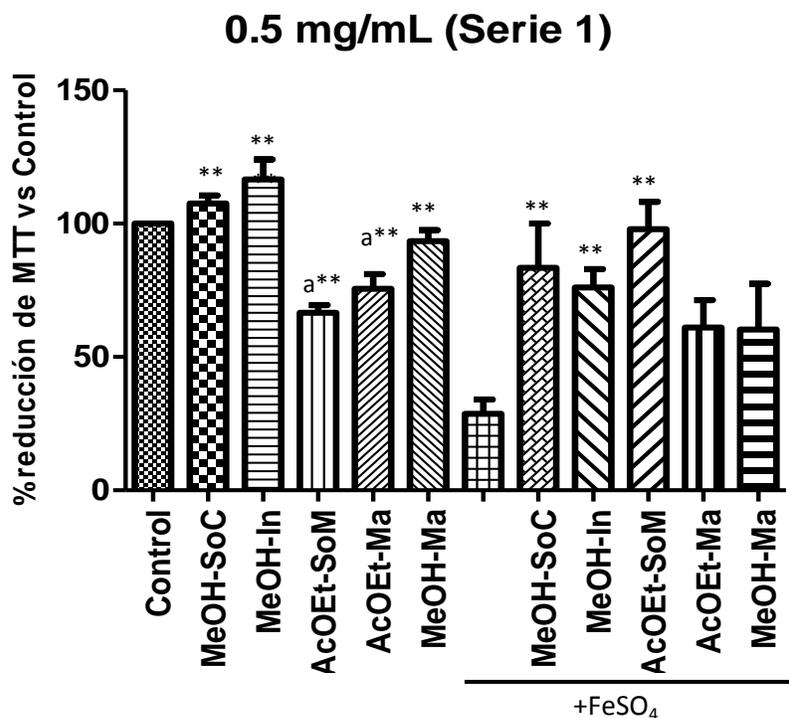


Figura 19. Efecto de las fracciones obtenidas a 0.5 mg/mL por partición líquido-líquido sobre la capacidad reductora del MTT. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control y ^{**}P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 19 se observa que la viabilidad mitocondrial se incrementó considerablemente en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum* a 0.5 mg/mL. Aunque todas las fracciones mostraron actividad protectora, las que presentaron mejor actividad a ésta concentración fueron MeOH-SoC y AcOEt-SoM, mismas que presentaron viabilidad similar a la del Control. Es importante resaltar que la viabilidad de los controles MeOH-SoC y MeOH-In es incluso mayor a la observada en el Control.

Al comparar las figuras 18 y 19, se observa que todas las fracciones a 0.25 y 0.5 mg/mL presentan actividad protectora. En este caso, se observa un ligero aumento de la capacidad protectora al usar la dosis de 0.5 mg/mL. A ésta concentración, las fracciones con mejor actividad protectora fueron MeOH-SoC y AcOEt-SoM, aunque la actividad mostrada por la partición MeOH-Ma a 0.25

mg/mL fue similar a la presentada por las particiones antes mencionadas a 0.5 mg/mL.

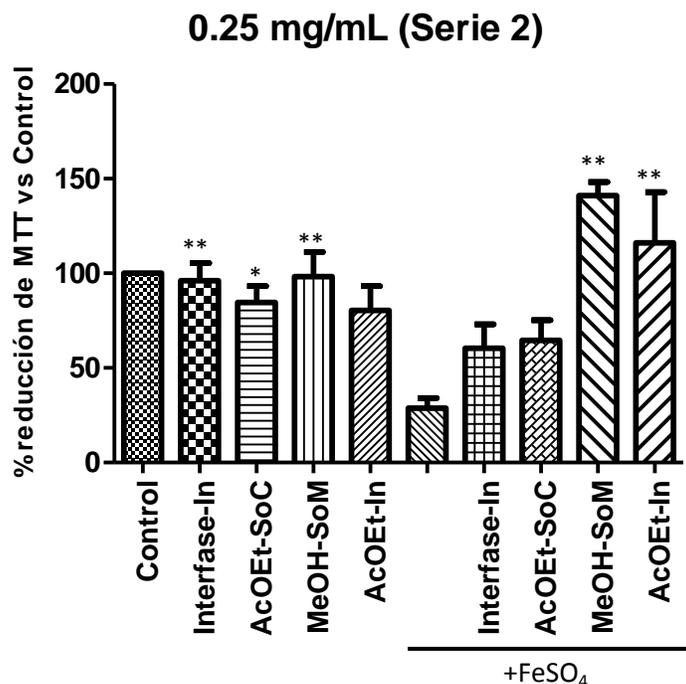


Figura 20. Efecto de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido a 0.25 mg/mL sobre la capacidad reductora del MTT. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control y ^{**}P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 20 se observa que la viabilidad mitocondrial se incrementó considerablemente en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum* a 0.25 mg/mL. Aunque todas las fracciones mostraron actividad protectora, las que presentaron mayor actividad a esta concentración fueron MeOH-SoM y AcOEt-In, mismas que presentaron viabilidad mayor a la del Control. Es importante resaltar que la viabilidad de los controles Interfase-In y MeOH-SoM fue similar a la del Control.

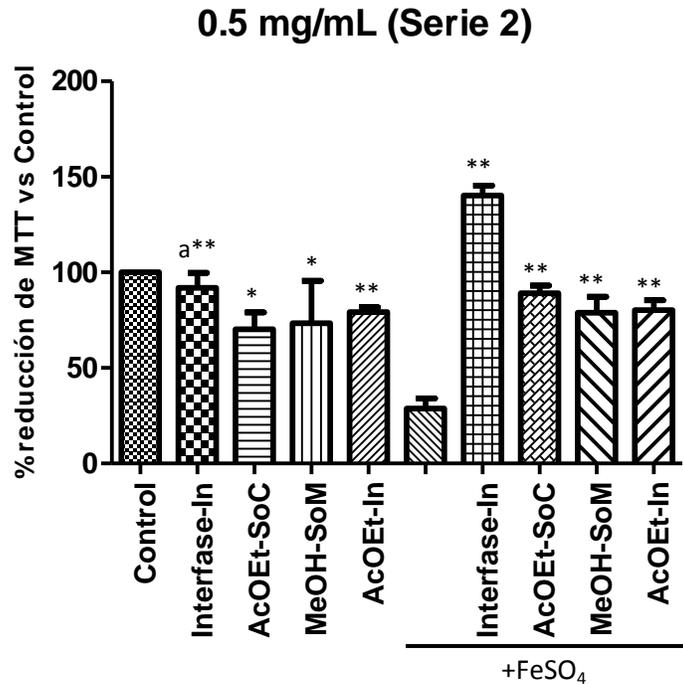


Figura 21. Efecto de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido a 0.5 mg/mL sobre la capacidad reductora del MTT. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control; *P < 0.05 y **P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 21 se observa que la viabilidad mitocondrial se incrementó en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum* a 0.5 mg/mL. Aunque todas las fracciones mostraron actividad protectora, las que presentaron mayor actividad a esta concentración fue Interfase-In. Cabe resaltar que ésta fracción mostró viabilidad superior a la observada en el Control.

Al comparar las figuras 20 y 21 se observa que todas las fracciones a 0.25 y 0.5 mg/mL presentaron actividad protectora. No se observó ninguna relación entre la dosis utilizada y el efecto protector, pues para algunas fracciones se observó mayor protección al usar una dosis de 0.25 mg/mL. A ésta concentración, las fracciones con la mejor actividad protectora fueron MeOH-SoM e AcOEt-In. Por otro lado, para la concentración de 0.5 mg/mL la fracción con mejor actividad protectora fue Interfase-In. En ambos casos, tanto las fracciones con mejor

actividad como los controles de las mismas mostraron una viabilidad que supera a la observada en el Control.

6.3.3 Formación de ERO

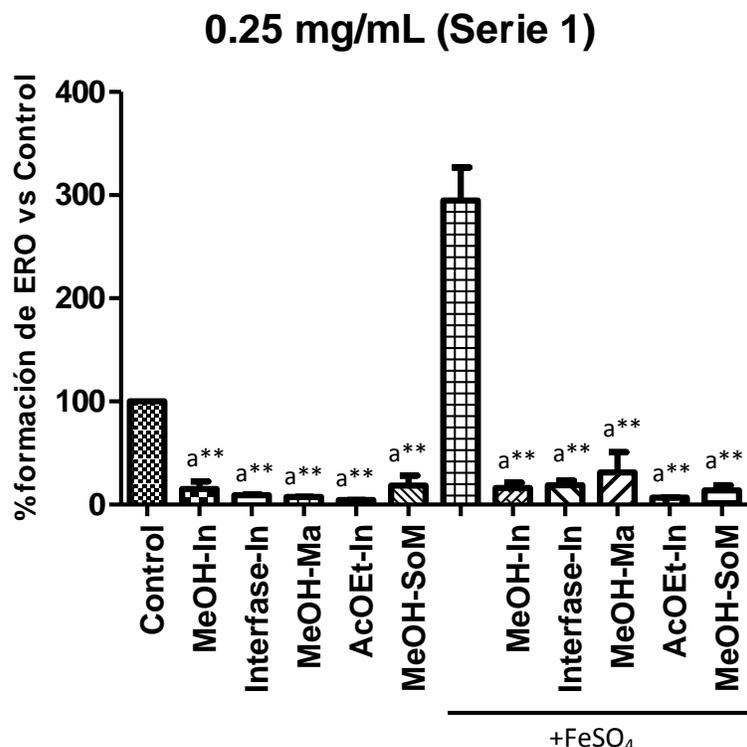


Figura 22. Efecto de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido a 0.25 mg/mL sobre la formación de ERO. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control y ^{**}P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 22 se observa la disminución en la formación de ERO en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum*. Todas las fracciones proporcionaron una protección importante, pues tanto los controles como las pruebas de las fracciones mostraron una formación de ERO muy por debajo a la observada en el Control FeSO₄, e incluso por debajo a la mostrada por el Control.

0.5 mg/mL (Serie 1)

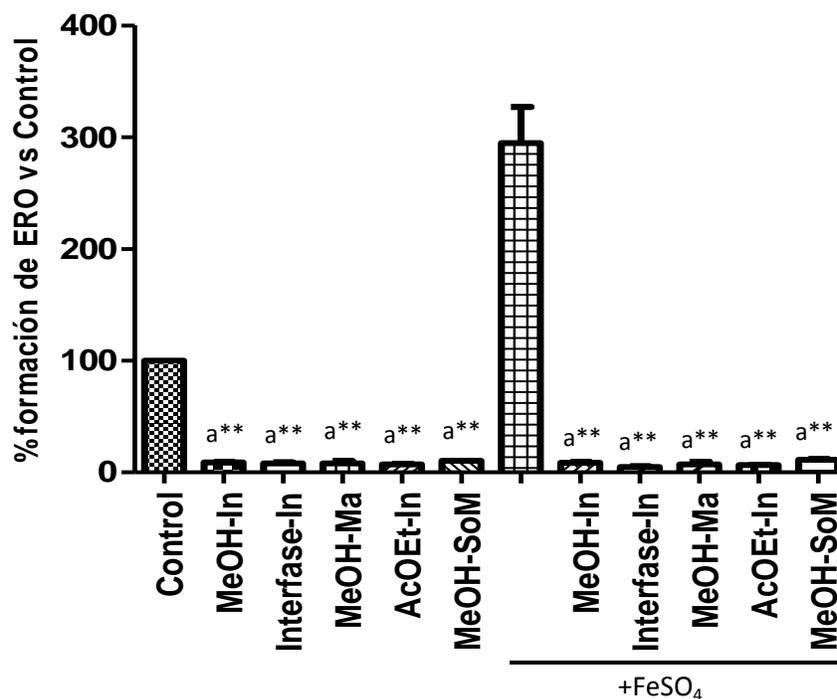


Figura 23. Efecto de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido a 0.5 mg/mL sobre la formación de ERO. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control y ^{**}P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la Figura 23 se observa la disminución en la formación de ERO en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum*. Todas las fracciones proporcionaron protección importante, pues tanto los controles como las pruebas de las fracciones mostraron una formación de ERO muy por debajo a la mostrada por el Control FeSO₄, e incluso por debajo a la mostrada por el Control.

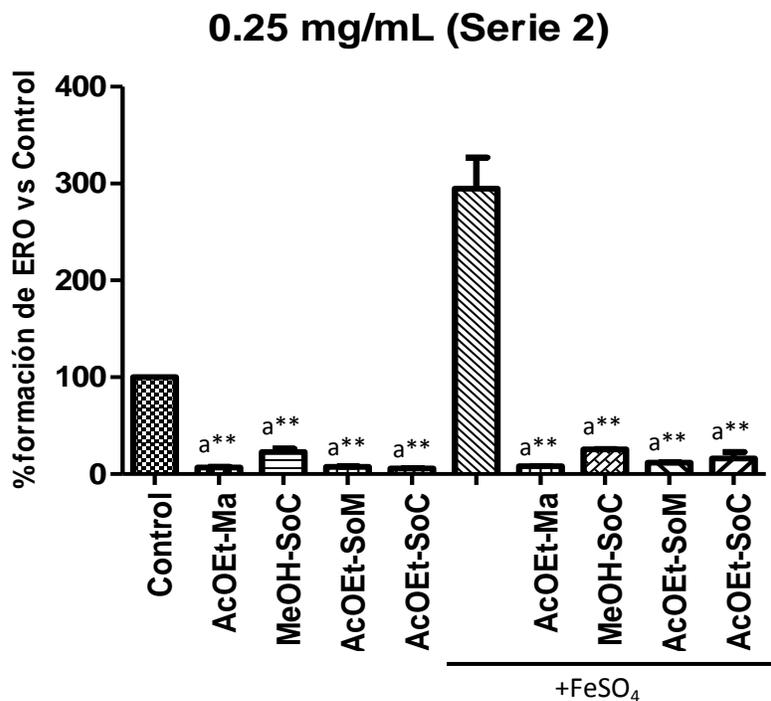


Figura 24. Efecto de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido a 0.25 mg/mL sobre la formación de ERO. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control y ^{**}P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 24 se observa la disminución en la formación de ERO en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum*. Todas las fracciones proporcionaron una protección importante, pues tanto los controles como las pruebas de las fracciones mostraron una formación de ERO muy por debajo a la mostrada por el Control FeSO₄, e incluso por debajo a la mostrada por el Control.

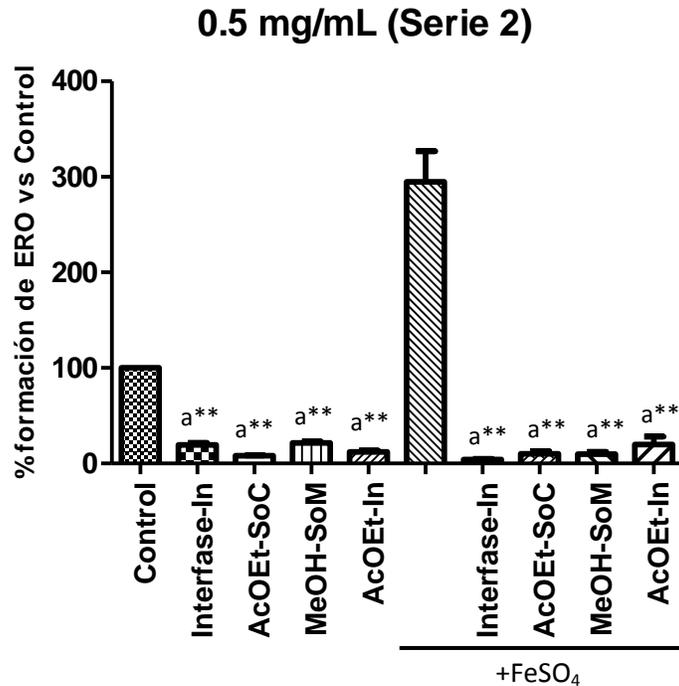


Figura 25. Efecto de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido a 0.5 mg/mL sobre la formación de ERO. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP< 0.05 respecto a Control y ^{**}P<0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 25 se observa la disminución en la formación de ERO en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum*. Todas las fracciones proporcionaron una protección importante, pues tanto como los controles como las pruebas de las fracciones mostraron una formación de ERO muy por debajo a la mostrada por el Control FeSO₄, e incluso por debajo a la mostrada por el Control.

6.4 Fraccionamiento secundario con Sephadex L-20

Se obtuvieron un total de 12 fracciones combinadas a partir de los dos fraccionamientos secundarios realizados con una columna de Sephadex L-20. De ellas, se descartaron 6 fracciones debido a su poca solubilidad (en MeOH, H₂O y mezclas) o a su bajo poder antioxidante al realizarse placas con DPPH.

Las 6 fracciones restantes fueron ensayadas sólo en la prueba de LPO a concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/mL debido a los bajos rendimientos obtenidos tras el fraccionamiento. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 26 y 27.

6.4.1 Lipoperoxidación

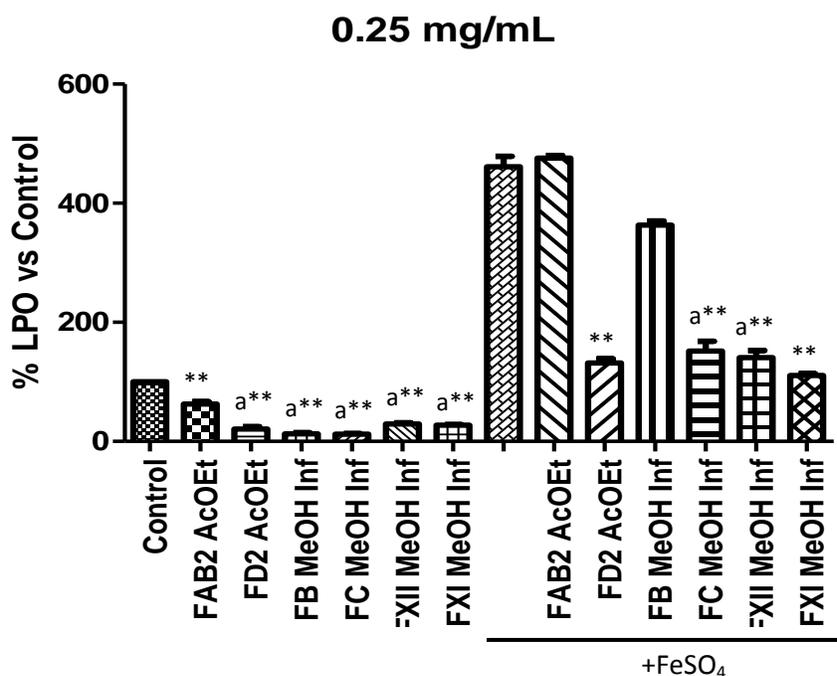


Figura 26. Efecto de las diferentes fracciones obtenidas por fraccionamiento en columna a 0.25 mg/mL sobre la lipoperoxidación (LPO) inducida por el FeSO₄. Los resultados se muestran como la media \pm EEM. ^aP < 0.05 respecto a Control y ^{**}P < 0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la Figura 26 se observa que la LPO inducida por el FeSO_4 disminuyó considerablemente en las muestras tratadas con los extractos de *B. alicastrum* a 0.25 mg/mL. Se observa que las fracciones FAB2 en AcOEt y FB en MeOH Inf no mostraron protección, ya que la LPO fue similar a la del Control con FeSO_4 , debido quizás a la poca solubilidad de estas fracciones así como a su baja concentración en el medio de reacción. Por otro lado, las fracciones FC en MeOH Inf, FD2 en AcOEt, FXII en MeOH Inf y FXI en MeOH Inf mostraron protección, con una LPO muy por debajo a la observada en el Control FeSO_4 y ligeramente superior a la observada en el Control. Es importante resaltar que los controles de las fracciones presentaron una LPO menor a la observada en el Control.

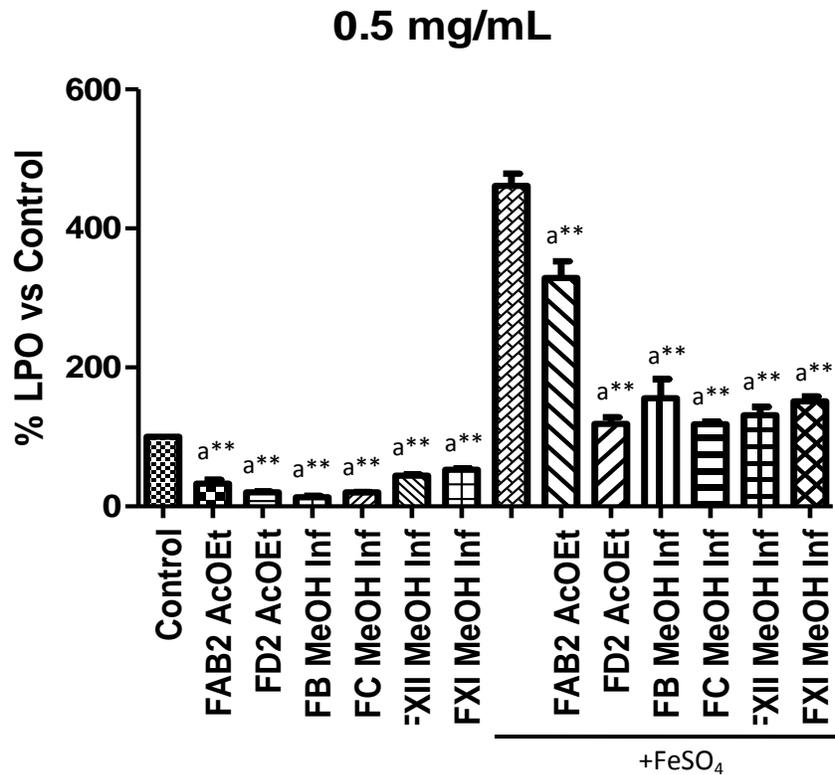


Figura 27. Efecto de las diferentes fracciones obtenidas por fraccionamiento en columna a 0.5 mg/mL sobre la lipoperoxidación (LPO) inducida por el FeSO₄. Los resultados se muestran como la media ± EEM. . ^aP< 0.05 respecto a Control y ^{**}P<0.01 respecto a Control FeSO₄. La preparación de las muestras se detalla en la página 32 de este texto.

En la figura 27 se observa que la LPO inducida por el FeSO₄ disminuyó considerablemente en las muestras tratadas con las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum* a 0.25 mg/mL. Se observa que la fracción FAB AcOEt mostró baja protección, con una LPO ligeramente por debajo de Control con FeSO₄ debido a la poca solubilidad de esta fracción en el medio de reacción. Por otro lado, el resto de las fracciones mostraron protección, con una LPO muy por debajo a la observada en el Control con FeSO₄ y ligeramente superior a la observada en el Control. Es importante resaltar que los controles de las fracciones presentaron una LPO menor a la observada en el Control.

Al comparar las figuras 26 y 27, se observa que la concentración utilizada al realizar el ensayo influye en la protección mostrada por las fracciones de la corteza de *B. alicastrum*. Un claro ejemplo es el caso de la fracción FAB2 en AcOEt, pues a la concentración de 0.25 mg/mL no mostró protección contra la LPO; mientras que a la concentración de 0.5 mg/mL mostró protección a pesar de no ser completamente soluble en el medio de reacción. Lo mismo sucede con la fracción FB en MeOH Inf, donde se observa mayor protección al utilizar la dosis más alta.

6.5 Análisis químico

De las fracciones estudiadas, las fracciones D2 AcOEt, C MeOH Inf y B MeOH Inf fueron las que presentaron mejor actividad biológica *in vitro*; por lo que se procedió a compararlas mediante CCF con estándares de los fenoles más comunes encontrados en plantas: ácido gálico, ácido elágico y (-) epicatequina. No se encontró ácido elágico en las muestras estudiadas; sin embargo, se comprobó la presencia tanto de (-) epicatequina como de ácido gálico al obtenerse valores de Rf de las muestras similares a los Rf's de los estándares usados; según se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de Rf para las muestras estudiadas.

Muestra	Rf
Estándar (-) epicatequina	1.04
Fracción C MeOH Inf	1.02
Fracción D2 AcOEt	1.04
Estándar ácido gálico	0.84
Fracción B MeOH Inf	0.81
Fracción D2 AcOEt	0.81

En la tabla 4 se observa que los Rf obtenidos de las muestras son similares a los Rf obtenidos en los estándares de (-) epicatequina y de ácido gálico. Por tanto, es posible afirmar que la fracción D2 AcOEt contiene ácido gálico y (-) epicatequina, mientras que la fracción C MeOH Inf sólo tiene (-) epicatequina y la fracción B MeOH Inf sólo tiene ácido gálico.

Debido a la importante actividad biológica y a los resultados obtenidos por CCF, se procedió a confirmar la presencia de estos compuestos en las fracciones D2 AcOEt, C MeOH Inf y B MeOH Inf mediante técnicas espectrométricas y espectroscópicas.

6.5.1 Elucidación estructural de la (-) epicatequina

De las fracciones combinadas D2 AcOEt y B MeOH Inf, obtenidas del fraccionamiento secundario en una columna de Sephadex LH-20, se aisló un sólido café oscuro soluble en una mezcla de EtOH/H₂O que previamente fue purificado mediante lavados sucesivos con MeOH. La fórmula molecular del compuesto se estableció como C₁₅H₁₄O, correspondiente a la (-) epicatequina, por comparación de sus características espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas en la literatura (De Martino *et al*, 2012) y por comparación con un estándar de Sigma-Aldrich en CCF (Tabla 4). En las figuras 28 y 29 se muestran los espectros de RMN correspondientes al compuesto aislado y en la Figura 30 se muestra la estructura química de la (-) epicatequina.

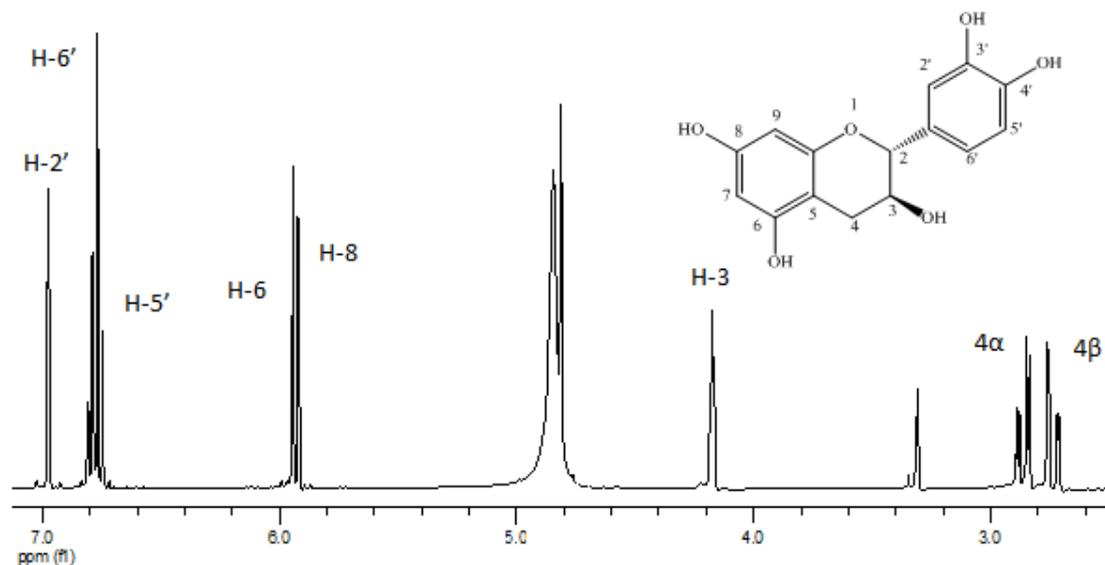


Figura 28. Espectro de RMN-¹H de la (-) epicatequina (MeOH-*d*₆, 400 MHz).

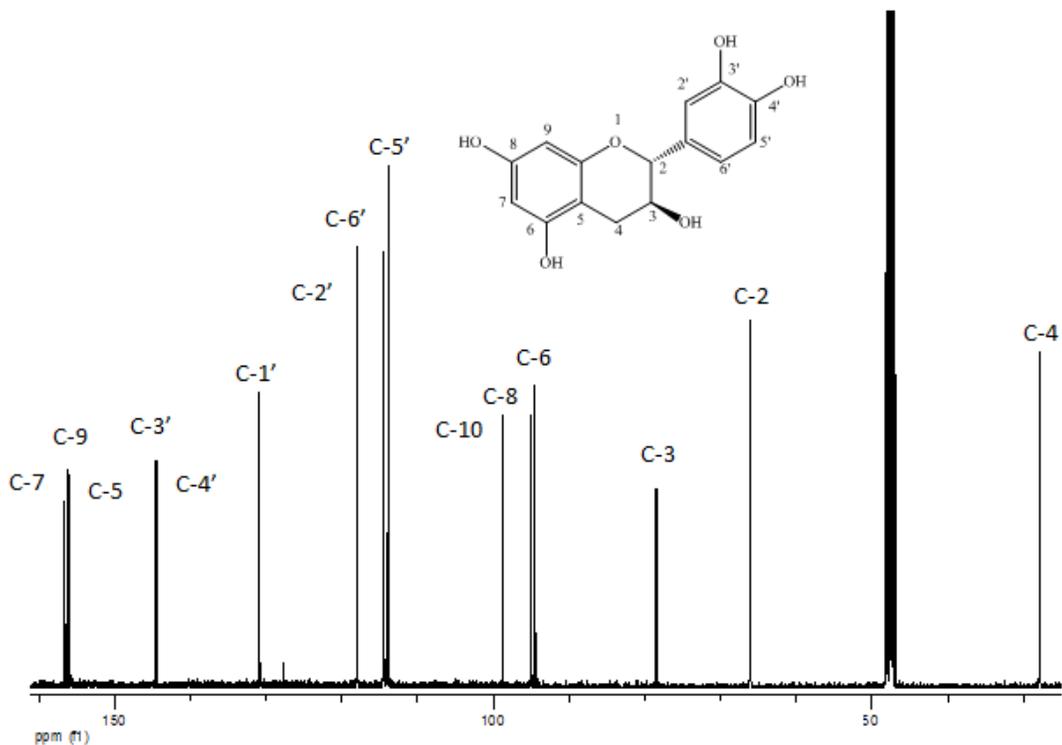


Figura 29. Espectro de RMN- ^{13}C de la (-) epicatequina (MeOH- d_6 , 75 MHz).

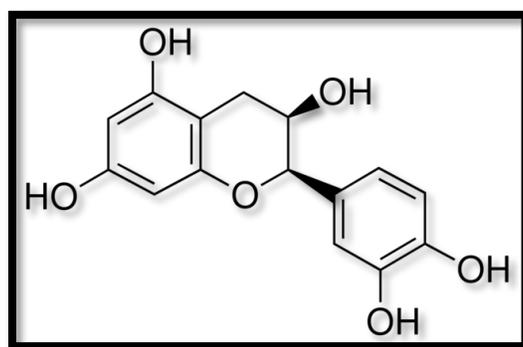


Figura 30. Estructura química de la (-)epicatequina.

6.5.2 Elucidación estructural del ácido gálico

De las fracciones combinadas D2 AcOEt y C MeOH Inf, obtenidas del fraccionamiento secundario en una columna de Sephadex LH-20, se aisló un sólido café oscuro soluble en una mezcla de EtOH/H₂O que previamente fue purificado mediante lavados sucesivos con MeOH. La fórmula molecular del compuesto se estableció como C₆H₂(OH)₃COOH, correspondiente a la del ácido gálico, por comparación de sus características espectroscópicas y espectrométricas con las reportadas en la literatura (Chanwitheesuk *et al*, 2007) y por comparación con un estándar de Sigma-Aldrich en CCF (Lua *et al*, 2007) . En las figuras 31 y 32 se muestran los espectros de RMN correspondientes al compuesto aislado, y en la figura 33 se muestra la estructura química del ácido gálico.

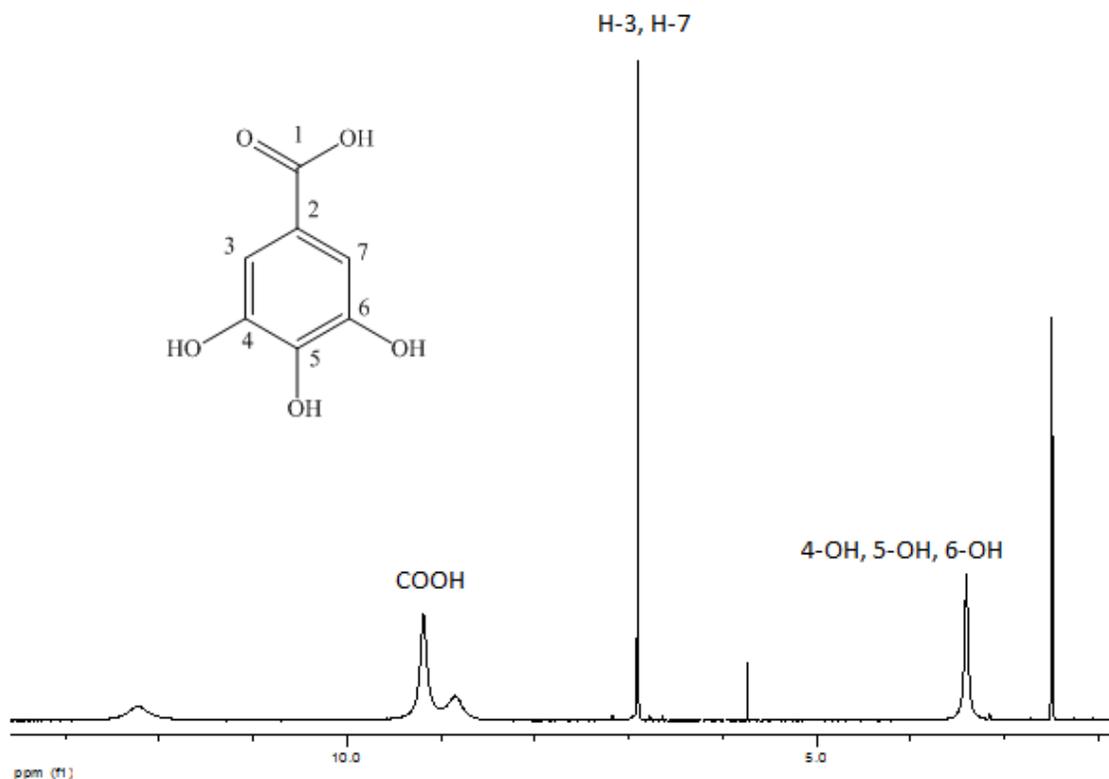


Figura 31. Espectro de RMN-¹H del ácido gálico (DMSO-*d*₆, 400 MHz).

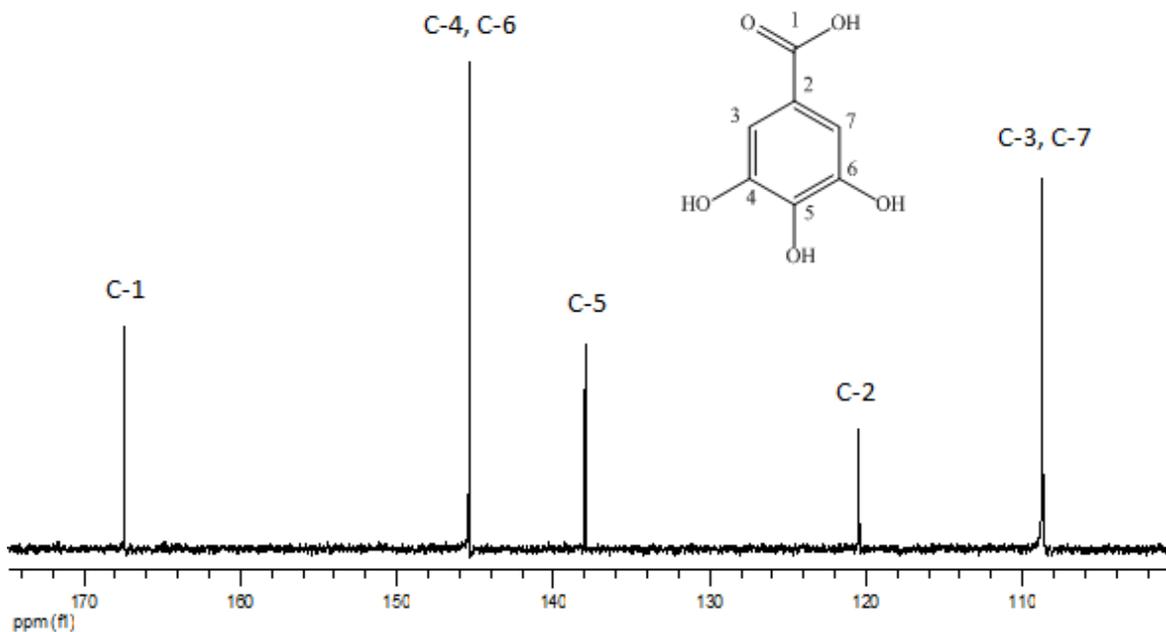


Figura 32. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido gálico (DMSO- d_6 , 75 MHz).

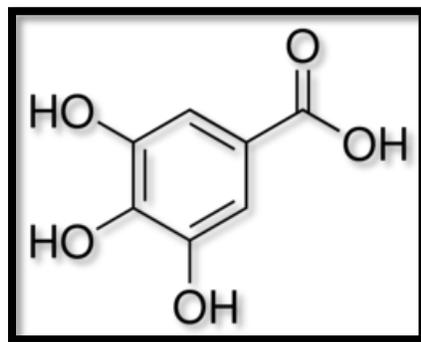


Figura 33. Estructura química del ácido gálico.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El QUIN actúa sobreactivando al receptor N-metil-D-aspartato (Santamaría y Ríos, 1993) lo que dispara una cascada de eventos que llevan a la entrada de Ca^{2+} , que induce un estado de estrés oxidante-nitrosante que resulta en la muerte celular, ya que las moléculas oxidantes dañan moléculas como lípidos, proteínas y el ADN. Por otro lado, el QUIN puede contribuir a ese estado oxidante debido a que forma complejos con el Fe (II) y genera el radical hidroxilo en el estriado. Además, se ha visto que la inyección de QUIN disminuye el estado antioxidante endógeno (Maldonado *et al*, 2010), por lo que la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes motivó este estudio.

La corteza de *Brosimum alicastrum* fue seleccionada con base en el amplio uso de sus infusiones en la medicina tradicional para el tratamiento de varias enfermedades como el asma (Hicks-Gómez *et al*, 2005) y la diabetes mellitus (Sánchez-Recalde y Kaski, 2001). Por otro lado, tal como se describe en la sección de antecedentes, la información existente sobre las propiedades y la composición química de esta corteza es escasa, por lo cual el objetivo principal de este estudio fue determinar algunas de estas cuestiones.

Análisis histológico y conteo celular

El QUIN es capaz de inducir un estado de estrés oxidante-nitrosante que a su vez provoca alteraciones bioquímicas y morfológicas a nivel neuronal que ocasionan muerte celular. Se ha reportado que altos niveles de estrés oxidante pueden causar necrosis, depleción de ATP y prevención de la apoptosis controlada (Beal, 2005).

Cuando una célula sufre necrosis, se observan cambios morfológicos notoriamente diferentes a los que sufre en un proceso de apoptosis. A diferencia del proceso apoptótico, en la necrosis se observan cambios como hinchazón de la

mitocondria, dilatación del retículo endoplásmico, extensa vacuolización del citoplasma y lisis de la célula sin formación de vesículas (Syntichaki y Tavernarakis, 2003). Algunos de estos cambios se observan en las neuronas de los animales tratados con QUIN (Figura 9). Estas alteraciones se encuentran en las células del estriado y están acompañadas por daño al neurópilo. Cuando la célula muere debido a un proceso necrótico, la lisis de la célula es inevitable, y se libera el contenido de ésta al espacio extracelular desencadenando procesos inflamatorios, lo cual justifica la presencia de eosinófilos y células de la microglia en la zona de la lesión. El tratamiento con los extractos de *B. alicastrum* previene el daño que se induce tras la inyección de QUIN.

En la figura 9, se observa la histología de los controles y los diferentes esquemas de tratamiento utilizados en el estudio. La administración de los extractos de *B. alicastrum* previene (esquema de Pretratamiento) y disminuye el daño histológico (esquema de Postratamiento), pues se observa que el número de células picnóticas y el daño al neurópilo se reduce considerablemente en comparación con el tejido dañado tras la inyección con QUIN.

A partir del conteo celular realizado, se confirmó el efecto protector de los extractos de *B. alicastrum*. El número de células dañadas en las muestras tratadas con los extractos es hasta un 70% como se observa en el esquema de Pretratamiento y hasta un 40% menor para el caso del esquema Postratamiento.

Sin embargo, aunque se observó un marcado efecto neuroprotector por parte de los extractos de *B. alicastrum*, no es posible hablar sobre el o los mecanismos responsables de esta protección; pues si bien se comprobó la presencia de (-) epicatequina y ácido gálico, compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes demostradas *in vitro*, estos compuestos pueden estar sometidos a procesos de metabolización al ser utilizados *in vivo*.

Lipoperoxidación (LPO)

Como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que generalmente son neutralizados por antioxidantes endógenos y exógenos. Sin embargo, si éste equilibrio se altera, las ERO pueden interaccionar con los lípidos membranales presentes provocando su LPO. La LPO juega un papel importante en la patogénesis y la gravedad de diversas enfermedades.

Como resultado de esta LPO, se forman productos de degradación como isoprostanos y aldehídos (Lazzarino *et al*, 1995). Sin embargo, son éstos últimos los que son objeto de cuantificación. El MDA es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación y para su cuantificación, el método analítico usado con mayor frecuencia se basa en la reacción de éste con el TBA; pues en condiciones de bajo pH y alta temperatura, reacciona con el TBA dando lugar a un aducto (TBA)₂-MDA colorido que es detectable por espectrofotometría (Figura 4).

Como se observa en las figuras 11A, 11B, 14, 15, 16, 17, 26 y 27; las muestras que fueron tratadas con un oxidante (FeSO₄) muestran una LPO elevada en comparación con las que no se les añadió el oxidante. En las muestras que se trataron además con alguno de los extractos de *B. alicastrum*, la LPO disminuyó hasta un 200% (Figura 26) en comparación con el Control FeSO₄ y resultó comparable a la observada en el Control (Figura 27). Estos resultados indican la actividad protectora contra la LPO gracias a los extractos de *B. alicastrum*. Estos resultados pueden deberse a la presencia de los grupos –OH unidos al anillo fenólico de la (-) epicatequina y el ácido gálico encontrados en los extractos, los cuales les confieren la capacidad de “atrapar” ERO que podrían ser responsables de la LPO.

Viabilidad Mitocondrial

La viabilidad celular puede ser definida como el número de células “sanas” en una muestra, sin importar si éstas están en proceso de división o en reposo.

Aunque el método más sencillo para determinar el número de células viables es el conteo directo de las mismas en un hemocitómetro, un método alternativo es la determinación de la actividad metabólica como un indicador de la viabilidad celular. Si existe daño celular, éste resultará inevitablemente en la pérdida de la habilidad de la célula para mantener y proveer energía para el crecimiento y las funciones metabólicas celulares. Los ensayos de actividad metabólica se basan en esta premisa y usualmente lo que se mide es la viabilidad mitocondrial, donde las células son incubadas con un sustrato colorimétrico las sales de tetrazolio (MTT, XTT, WST-1) para formar un producto colorido mediante la actividad metabólica (Figura 5).

El MTT es transformado a formazán por la succinato-deshidrogenasa, sistema que pertenece a la cadena respiratoria mitocondrial y que se encuentra activa solamente en células viables. Sin embargo, algunas evidencias recientes también sugieren que ésta conversión puede llevarse a cabo en el citoplasma usando los cofactores NADH y NADPH. El MTT, al ser un producto colorido, puede cuantificarse por espectrofotometría. A mayor absorbancia, mayor será la cantidad de MTT convertida a formazán y por tanto, mayor será la viabilidad celular observada en la muestra.

Así pues, observamos en las figuras 12A, 12B, 18, 19, 20 y 21 que las muestras que fueron tratadas con alguno de los extractos de la corteza de *B. alicastrum* presentaron una viabilidad mucho mayor en comparación con el Control de FeSO₄, llegando a ser hasta un 350% mayor (Figura 12) a la observada en el Control. Aunque no todos los extractos, particiones y fracciones mostraron resultados tan contundentes, todas las pruebas presentaron una viabilidad de al menos el doble a la observada en el control con FeSO₄, lo que indica preservación

de la actividad metabólica de la célula gracias al efecto protector de los extractos provenientes de *B. alicastrum*. En adición, es importante resaltar que en muchos casos, como se observa en las figuras 18 y 21, la viabilidad mitocondrial fue incluso mayor a la observada en el Control. Todos estos resultados indican la posible preservación de las células tratadas con estos extractos gracias a la acción de los compuestos presentes en los diferentes extractos de *B. alicastrum*.

Formación de ERO

El cerebro y el sistema nervioso son susceptibles al estrés oxidativo, además de estar pobremente equipados con sistemas de defensas antioxidantes capaces de “defenderlos” contra el estrés oxidante originado en algunas enfermedades neurodegenerativas (Halliwell, 2006). En el ser humano, existe un balance entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes; sin embargo, el desbalance de este equilibrio o la producción excesiva de ERO conduce al desarrollo de enfermedades crónicas.

Existen varios procesos por los cuales el cerebro se ve dañado en presencia de ERO. Entre ellos se incluyen la excitotoxicidad, originada por el daño de las ERO a las neuronas que provoca la liberación de aminoácidos excitatorios que conducen al deterioro rápido y a la posterior necrosis de la célula; la generación de O_2^- por parte de las mitocondrias neuronales y el hecho de que muchos neurotransmisores, como la dopamina y la serotonina, pueden reaccionar con el O_2 para generar O_2^- , mismo que puede reaccionar con otros neurotransmisores para generar más ERO en un círculo vicioso. Por este motivo, se verificó la capacidad de los extractos provenientes de *B. alicastrum* para prevenir y/o disminuir la formación de éstas ERO cuando se encuentra presente un agente oxidante. El método utilizado para verificar ésta capacidad se basa en la medición de la intensidad de fluorescencia que emite la DFC, la cual es visualizada a 480 nm de emisión y 521 nm de excitación. A mayor absorbancia, mayor será la

presencia de ERO; mientras que a menor absorbancia menor será la presencia de ERO.

En esta prueba, se obtuvieron resultados sumamente favorables para todas las muestras tratadas con los extractos de *B. alicastrum*. En las figuras 13A, 13B, 22, 23, 24 y 25 se observa que en las muestras tratadas con los extractos de *B. alicastrum* la cantidad de ERO detectada fue mucho menor en comparación con la detectada en el Control de FeSO₄, llegando a ser casi 300% menor (Figura 25) e incluso un 90% menor a la observada en el Control (Figura 24). Todos los extractos, particiones y fracciones mostraron una alta efectividad, y es importante destacar que en todas las pruebas, la formación de ERO en los Controles de los extractos fue mucho menor a la detectada en el Control de cada prueba. Esto indica que los extractos podrían incluso disminuir la presencia de cantidades “basales” de ERO, por lo que es probable que éstos extractos puedan funcionar como terapia preventiva en enfermedades relacionadas con el estrés oxidante.

Análisis químico

Para elegir los extractos, fracciones y particiones que se estudiaron *in vitro*, uno de los criterios utilizados fue la capacidad de éstos para neutralizar al DPPH, un radical libre estable que presenta una coloración violeta, pero que al ser neutralizado presenta una coloración amarilla. De esta manera, todos los extractos que neutralizaron al radical libre en CCF se eligieron para continuar los estudios *in vitro*.

En el caso del análisis químico, de las fracciones obtenidas en el fraccionamiento secundario mediante permeación en gel (sephadex LH-20), se eligieron aquellas que, además de neutralizar al radical libre en CCF, presentaron una buena solubilidad en MeOH y sus mezclas con H₂O. Las fracciones D2 AcOEt, B MeOH Inf y C MeOH Inf fueron las que presentaron la mayor neutralización del radical DPPH y la mejor solubilidad en estas mezclas.

En las fracciones D2 AcOEt y B MeOH Inf se aisló el ácido gálico. El ácido gálico es un componente que se encuentra naturalmente libre o en forma de ésteres y

que pertenece a un grupo de polifenoles conocido como galotaninos. Se reporta que los el ácido gálico y sus derivados poseen múltiples actividades biológicas como anticancerígenos, antioxidantes, antimicrobianos y cardioprotectores (Snehal y Ramesh, 2011).

Por otro lado, en las fracciones D2 AcOEt y C MeOH se aisló la (-) epicatequina, un flavonoide que pertenece a la familia de los polifenoles. En general, se reporta que las catequinas poseen una amplia gama de propiedades terapéuticas como antimicrobianos, antiinflamatorios, antineoplásicos y especialmente como antioxidantes (Narayana *et al*, 2001).

Así pues, tanto el ácido gálico como la (-) epicatequina reportan actividad antioxidante gracias a la presencia de sustituyentes –OH en el anillo fenólico, lo cual les confiere la capacidad de “atrapar” fácilmente radicales libres (Weisburg *et al*, 2004). Es posible que éste sea el mecanismo por el cual los extractos de *B. alicastrum* poseen actividad protectora *in vitro*; sin embargo, es necesario realizar estudios que revelen el mecanismo de acción *in vivo* de estos extractos y los compuestos identificados.

En resumen, los resultados obtenidos en estos ensayos apuntan a la presencia de polifenoles con potencial uso en la profilaxis y tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidante, como las enfermedades neurodegenerativas, al ser capaz de resistir el pH gástrico y posiblemente atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, se recalca la necesidad de realizar nuevos estudios encaminados a la elucidación de el o los mecanismos responsables de la neuroprotección, es decir, si estos compuestos son los responsables de la protección observada *in vivo*.

8. CONCLUSIONES

1. Los extractos, particiones y fracciones obtenidas a partir de la corteza seca de *B. alicastrum* disminuyeron las alteraciones morfológicas inducidas por el QUIN.
2. El efecto protector de los extractos, particiones y fracciones podría estar asociado a su composición, misma que les confiere propiedades antioxidantes ya que disminuyó la LPO y la formación de ERO e incrementó la viabilidad mitocondrial.
3. El consumo de infusiones elaboradas a partir de la corteza de *B. alicastrum* podría ser una alternativa terapéutica en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas.

9. PERSPECTIVAS

1. Determinar si los compuestos antioxidantes encontrados en la corteza de *B. alicastrum* [(-) epicatequina y ácido gálico] son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.
2. Determinar el mecanismo por el que los extractos, particiones y fracciones obtenidos a partir de la corteza de *B. alicastrum* proveen neuroprotección.
3. Realizar un análisis químico más detallado que permita conocer la composición exacta de las fracciones obtenidas a partir de *B. alicastrum* que otorgan neuroprotección.

10. REFERENCIAS

Ambegaokar SS, Roy B, Jackson GR. 2010. **Neurodegenerative Models in *Drosophila*: Polyglutamine disorders, Parkinson disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis.** *Neurobiol Dis.* 2010, 40(1): 29–39.

Ayala A, Sandoval SM, Berg CC. 1972. ***Brosimum alicastrum* Sw. subsp. *Alicastrum*.** *Flora Neotropica.* Monograph 7: 170-171.

Beal MF. 2005. **Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration.** *Annals of Neurology* 58:495-505.

Beckman JS, Koppenol WH. 1996. **NO[•], O₂^{•-} and ONOO⁻ : the good, the bad and the ugly.** *Am. J. Physiol* 271:C1424-1437.

Bennington JL. 2000. **Diccionario Enciclopédico del Laboratorio Clínico.** Editorial Médica Panamericana. pp 820.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana 2009. Recuperado en junio de 2012 de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>

Brouillet E, Jaquard C, Bizat N, Blum D. 2005. **3-NPA: a mitochondrial toxin to uncover physiological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease.** *J. Neurochem* 98:1521-1540.

Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn D, Rakariyatham N. 2007. **Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk.** *Food Chem* 100:1044-1048.

Coyle CH, Kader KN. 2007. **Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells.** *Free Rad Bio Med* 53(1):17-22.

Davies S, Ramsden DB. 2001. **Huntington's disease.** *J Clin Pathol* 54(6):409-413.

De Martino L, Mencherini T, Mancini E, Aquino RP, De Almeida LF, De Feo V. 2012. **In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids.** *Int J Mol Sci* 13(5):5406-5419.

Deus-Yela J, Pujol J, Espert R. 1997. **Deterioro neuropsicológico en la enfermedad de Huntington.** *Rev Neurol* 25(144):1257-1268.

Dickson DW. 2009. **Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders.** *Int J Clin Exp Pathol* 3(1):1-23.

Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. 2005. **Peroxide detoxification by brain cells.** *J Neuroscience Res* 79(1-2):157-165.

Foot CS, Clennan EL: 1995. **Properties and Reactions of Singlet Dioxygen.** In: Active Oxygen in Chemistry Vol 2. Foot CS, Valentine JS.(Eds) Chalmers & Hall, UK 105-193.

Frankel NE, Waterhouse AL, Teissedre PL. 1995. **Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human LDL.** *J Agric Food Chem* 43(4):890-894.

García H, Martell O, Guyat MA, Capote V, Aguirre B. 2006. **Caracterización química del follaje, la corteza y la madera de cinco especies forestales de la sierra maestra.** *Revista Forestal Baracoa.* 25(1):57-64.

Halliwell B. 2006. **Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?** *J Neurochem* 97(6):1634-1658.

Halliwell B. 2007. **Antioxidant defenses.** In: **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford New York pp 80- 82.

Hicks-Gómez J, Sierra-Vargas M, Olivares-Corichi I, Torres-Ramos Y, Guzmán-Grenfell A. 2005. **Estrés oxidante en asma.** *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 18(1):70-78.

Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. 1996. **Dietary flavonoids, antioxidants vitamins and incidence of stroke. The Zutphen study.** *Arch Int Med* 156(6):637-642.

Klivenyi P, Andreassen OA, Ferrante RJ, Dedeoglu A, Mueller G, Lancelot E, Bogdanov M, Andersen JK, Jiang D, Beal MF. 2000. **Mice deficient in cellular GPx show increased vulnerability to malonate, 3-nitropropionic acid, and MPTP.** *J Neuroscience* 2000 20(1):1-7.

Klivenyi P, Ferrante RJ, Gardian G, Browne S, Chabrier PE, Beal MF. 2003. **Increased survival and neuroprotective effects of BN82451 in a transgenic mouse model of HD.** *J Neurochem* 87(1):272.

Lane N. 2002. **Oxygen, the Molecule That Made the World.** Oxford University (Eds), Oxford, UK. pp 2,3.

Lazzarino G, Tavazzi B, Di Pierro D, Vagnozzi R, Penco M, Giardina B. 1995. **The relevance of malondialdehyde as a biochemical index of lipid peroxidation of postischemic** *Biol Trace Elem Res* 47(1-3):165-170.

Lua, J, Weib, Y, Yuan, Q. 2007. **Preparative separation of gallic acid from Chinese traditional medicine by highspeed counter-current chromatography and followed by preparative liquid chromatography.** *Separation and Purification Technology* 57:40-43.

Maldonado P, Molina E, Villeda J, Galván S, Santamaría A, Pedraza J 2010. **NAD(P)H oxidase contributes in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: Protective role of apocynin.** *J. Neurosci Res* 88(3):620-9.

Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, Crapo JD, Wallace DC. 1998. **A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial MnSOD.** *Nature Genet* 18(2):159-63.

Narayana R, Sripal M, Chaluvadi MR, Krishna DR. 2001 **Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential.** *Indian Journal of Pharmacology* 33: 2-16.

Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, Perry G. 2006. **Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases.** *J Biomed Biotechnol* 2006(3):82323.

Patenaude A, Murthy MR, Mirault ME. 2005. **Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the CNS.** *Cell Mol Lif Sci* 62(10):1063-1080.

Paxinos G, Watson C. 2008 **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 6th edition. London, UK: *Academic Press*.

Pérez-de la Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A. 2010. **Huntington's disease and mitochondrial alterations: emphasis on experimental models.** *J Bioenerg Biomembr* 42(3):207-15.

Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Andrés-Martínez L, Santamaría A. 2006. **Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes.** *Brain Res Bul* 68(5):379-383.

Sánchez-Recalde R, Kaski JC. 2001. **Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria.** *Rev Esp Cardiol.* 54(6):751-763.

Santamaría A, Ríos C. 1993. **MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum.** *Neurosci Lett.* 159(1-2):51-54.

Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z, Ali SF, Santamaría A. 2008. **Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine.** *J Neurochem* 105(3):677-689.

Snehal P, Ramesh G. 2011. **Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats.** *Pharmacognosy Res* 3(4):239–245.

Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C. 2004. **Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity.** *Arch. Biochem. Biophys* 423(1):148-161.

Spencer JP, Jenner A, Aruoma OI, Cross CE, Wu R, Halliwell B. 1996. **Oxidative DNA damage in human respiratory tract epithelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 224(1):17-22.

Syntichaki P, Tavernarakis N. 2003. **The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?** *Nat Rev Neurosci* 4(8):672-684.

Taubert D, Breitenbach T, Lazar A, Censarek P, Harlfinger S, Berkels R, Klaus W, Roesen R. 2003. **Reaction rate constants of O₂⁻ scavenging by plant antioxidants.** *Free Radic Biol Med* 35(12):1599-1607.

Von Sonntag C. 1989. **The chemical basis of Radiation Biology.** Taylor and Francis (Eds), London. pp 114-125.

Wang, SY Lin, HS. 2000. **Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage.** *J Agric Food Chem* 48(2):140-146.

Weisburg JH, Weissman DB, Sedaghat T, Babich H. 2004. **In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95(4):191–200.

Wong PT, Qu K, Chimon GN, Seah AB, Chang HM, Wong MC, Ng YK, Rumpel H, Halliwell B, Chen CP. 2006. **High plasma cysteine level may indicate poor clinical outcome in acute stroke patients: possible involvement of H₂S.** *J Neuropathol Exp Neurol* 65(2):109-115.

Yu BP. 1994. **Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.** *Physiol Rev* 74(1):139-162.