



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Evaluación del efecto biológico de diferentes extractos de la *Tilia americana* en la expresión de SOD1, SOD2 y GPx (enzimas antioxidantes), en cerebro de rata, en un modelo de daño neurotóxico inducido por tetracloruro de carbono”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GONZÁLEZ GARCÍA MARÍA CAROLINA

ASESOR DE TESIS:

DRA. LILIANA CARMONA APARICIO

CO-ASESORES:

DRA. NOEMÍ CÁRDENAS RODRÍGUEZ

DR. ESAÚ FLORIANO SÁNCHEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del efecto biológico de diferentes extractos de la *Tilia americana* en la expresión de SOD1, SOD2 y GPx (enzimas antioxidantes) en cerebro de rata, en un modelo de daño neurotóxico inducido por tetracloruro de carbono.

Que presenta la pasante: María Carolina González García
Con número de cuenta: 305272539 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Marzo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	Dra. Liliana Carmona Aparicio	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

Este trabajo que presento ha sido un gran esfuerzo, apoyo, desvelos, risas, lágrimas y aprendizajes de las personas que me han rodeado en este largo camino de mi formación académica y personal.

En primer lugar a la Dra. Lili, por adoptarme como su hija académica sin conocerme y depositando una gran confianza en mí. Gracias por su apoyo, aprendizajes, a papachos, risas, consejos, por ser parte de mi guía en la vida y ver que no hay límites. Porque si el camino no nos hubiera unido, no hubiera logrado todo esto sin usted.

Quiero agradecer a dos grandes personas que ahorita no están a mi lado: a mi papá Vicente (†) y a mi abuela Josefina (†). Los cuales fueron unos de mis grandes pilares y motivaciones por la cual seguir luchando y me enseñaron que el camino es difícil pero no imposible de disfrutarlo.

A mis papás Marina García y Rosalio González, por tan solo el hecho de darme la vida y seguirmela dando. Porque no podría pagarles con toda la fortuna del mundo todo lo que me han dado: apoyo, amor, respeto, aprendizaje y alegrías.

A mi hermana Estefanía González, por ella he luchado y seguiré luchando porque es mi pilar y seré su pilar en esta vida. Y sin ella no seríamos lo que somos ahora mi familia.

A mi hermano Jorge González, porque es mi ejemplo a seguir de persona, por cuidarme y protegerme.

A mi mamá Loy, la cual me crio, me apapacho, me cuido, me ama como su hija y yo la amo como mi mamá.

A mi abuelo Toño, por el solo hecho de estar a nuestro lado y querernos.

A mi tía Ede y mi hermana del alma Elisa, las cuales les agradezco por quererme y apoyado tanto en mi vida.

A mi tío Ricardo por quererme como su hija y recibirme con un gran abrazo, te quiero Tío.

A mi Cintli, ha sido un gran apoyo, consejera, guía, hermana, te quiero.

A mis tíos: Rosa, Rocío, Darío, Luisa, Luis y Leonel. Por mantener unida a la familia.

A mis primos Kimberli, Angie, Saúl y José Luis; me enseñaron a divertirme y querernos como una familia sin divisiones.

A mis cachorros: Zeus (†), el cual fue mi compañero gran parte de mi vida; Bola, Nina y Chester los cuales fueron y son esenciales en mi camino. Por su compañía, amor hacia mí, los amo.

A mis amigos: Fabiola García, Ana Pantaleón, Maricela Hernández, Alejandra Camacho, Daphne Fragoso, Kristal García, Adriana Gudiño, Ángeles Pacheco, Jenny Santamaría, Yarely Cruz, Gabriela Díaz, Karenina González, Moisés Monson, Guillermo Cano, Alejandro Aguilar y Eithan Núñez. Aprendí a reír, llorar, disfrutar cada reto de la vida y a quererlos como familia. Sin ellos no sería lo que soy ahora.

A mis asesores Dra. Noemí y Dr. Esau. Por haberme permitido participar en este proyecto en el cual aprendí grandes cosas de ustedes.

A la Dra. Elvia por apoyarme desde un principio sin conocerme en todo momento, por sus consejos, por las risas y a papachos que me dio.

A mis amigos que conocí en este proyecto: Berenice Prestegui, Alla, Eduardo Beltrán, Alejandro Márquez y David Comoto. Fueron unos grandes maestros y amigos.

A todos ellos Gracias.

INDICE

RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Generalidades del Cerebro.....	14
1.1.1. Anatomía.....	14
1.1.2. Fisiología.....	19
1.1.3. Trastornos que afectan al Cerebro: Principales mecanismos.....	20
1.1.4. Mecanismos asociados a daño neurológico.....	24
1.2. Generalidades de estrés oxidante	26
1.2.1. Definición de estrés oxidante.....	26
1.2.1.1. Radicales libres.....	27
1.2.1.2. Especies reactivas de oxígeno.....	28
1.2.1.3. Otros agentes oxidantes.....	30
1.2.1.4. Tetracloruro de Carbono (CCl ₄).....	30
1.2.2. Sistema antioxidante.....	21
1.2.2.1. Superóxido dismutasa SOD.....	32
1.2.2.2. Glutación peroxidasa GPx.....	33
1.2.2.3. Enzimas antioxidantes en daño neurológico.....	34
1.3. Estrategias terapéuticas en base al uso de antioxidantes.....	34
1.4. Uso de plantas medicinales en enfermedades neurológicas con relación a estrés oxidante.....	36
1.5. Generalidades de la Tilia.....	38
1.5.1. Familia de Tiliaceae.....	39

1.5.2. Aspectos químicos.....	39
1.5.3. <i>Tilia americanavar. mexicana</i>	40
1.5.4. Usos de la Tilia.....	41
1.5.5. Aspectos farmacológicos.....	41
2. JUSTIFICACIÓN.....	42
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
4. HIPÓTESIS.....	44
5. OBJETIVOS.....	45
5.1. Objetivo general.....	45
5.2. Objetivos particulares.....	45
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
6.1. METODOLOGÍA.....	46
6.1.1. Sitio de colecta de la planta.....	46
6.1.2. Preparación y obtención de los extractos de la planta.....	47
6.1.3. Animales de experimentación.....	47
6.1.4. Determinación de la expresión génica de SOD1, SOD2 y GPx.....	48
6.1.4.1. Aislamiento de RNA total.....	48
6.1.4.2. Diseño de oligonucleótidos (“primers”).....	49
6.1.4.3. Cuantificación de RNA por RT-PCR.....	50
6.1.4.4. Limpieza de muestra mediante Exo-SAP.....	51
6.1.4.5. Purificación de fragmentos de ADN por QIAEX.....	51
6.1.5. Análisis estadístico.....	52
7. RESULTADOS.....	52
8. DISCUSIÓN.....	62
9. CONCLUSIONES.....	69
10. ANEXO.....	70
Materiales.....	70
Reactivos.....	70
Equipos.....	70

11. REFERENCIAS.....	71
----------------------	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Actividad de la enzima SOD1 en corteza de rata.....	56
Gráfico 2. Actividad de la enzima SOD1 en hemisferio de rata.....	57
Gráfico 3. Actividad de la enzima SOD2 en corteza de rata.....	58
Gráfico 4. Actividad de la enzima SOD2 en hemisferio de rata.....	59
Gráfico 5. Actividad de la enzima GPx en corteza de rata.	60
Gráfico 6. Actividad de la enzima GPx en hemisferio de rata.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Meninges del cerebro.....	16
Figura 2. Anatomía del encéfalo.....	16
Figura 3. Localización de los ventrículos.....	17
Figura 4. Cerebro.....	18
Figura 5. Morfología de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	38
Figura 6. Electroforesis de RNA de Corteza y Hemisferio de rata.....	53
Figura 7. Gel de agarosa de productos de PCR.....	54
Figura 8. Gel de agarosa de gen endógeno.....	54
Figura9. Curva Melt de SOD1 del tejido de hemisferio (PCR-Tiempo Real).....	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales enfermedades que afectan al cerebro (descripción).....	20
Cuadro 2. Principales mecanismos de daño neurológico (descripción).....	24
Cuadro 3. Especies reactivas de oxígeno	27
Cuadro 4. Diseño experimental.....	47
Cuadro 5. Secuencias de "primers".....	50
Cuadro 6. Incubación de fragmentos de ADN.....	52
Cuadro 7. Materiales utilizados en la fase experimental.....	70
Cuadro 8. Reactivos utilizados en la fase experimental.....	70
Cuadro 9. Equipos utilizados en la fase experimental.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>T. americana</i>	<i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SN	Sistema Nervioso
BHE	Barrera Hematoencefalica
SOD1	Superoxido dismutasa 1(Cu-Zn)
SOD2	Superoxido dismutasa 2 (Mn)
GPx o GSH-Px	Glutación Peroxidasa
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
ERC	Especies Reactivas de Cobre
ERI	Especies Reactivas de Hierro
RL	Radical libre
CAT	Catalasa
GSH	Glutación Reducido
H₂O	Agua
GSSG	Glutación oxidado
G6PDH o G6PD	Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa
mRNA	Ácido Ribonucléico mensajero
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
IL-1	Interleucina-1
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA-kainato	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
EDTA	Ácido Etildiaminotetraacético
TBE	Tris Boratos EDTA
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qRT-PCR	Transcriptasa Reversa Cuantitativa de la PCR
RT-PCR	PCR-tiempo real
AO	Aceite de Oliva
H	Hexano
M	Metanol
Ac	Acuoso
AcE	Acetato de Etilo
<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>

RESUMEN

El cerebro es el órgano de procesamiento general que almacena la información y memoria. Es la base de la conciencia, el intérprete de las sensaciones, coordinador y regulador de nuestras acciones por su capacidad de acelerar o inhibir numerosos actos reflejos de apariencia involuntaria. Este órgano es considerado altamente sensible al daño oxidante, lo que puede explicarse por el hecho de que contiene una gran cantidad de ácidos grasos fácilmente oxidables, altamente oxigenado y bajas defensas antioxidantes. Por mucho tiempo se ha tratado de incrementar el uso de plantas medicinales, con el propósito de disminuir la incidencia de enfermedades. Las plantas son fuentes de nuevos y más eficientes antioxidantes, a los que la farmacología puede recurrir para neutralizar los radicales libres, que están vinculados a diversas enfermedades, como lo son el caso de Parkinson, Alzheimer, epilepsia, esclerosis múltiple, traumas craneoencefálicos y tumores cerebrales entre otros. Una de estas plantas que se ha buscado, para tener un efecto protector a tal daño, es la *Tilia americana* var. *mexicana* (planta endémica de México, *T. americana*), la cual ejerce efectos tranquilizante, antiinflamatorio, analgésico, antiepiléptico, ansiolítico, antidepresivo y como antioxidante, sin embargo se desconoce si este efecto puede ser a nivel génico. Por lo que, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes extractos de la *Tilia americana* en la expresión génica de enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2 Y GPx), en cerebro de rata, en un modelo de daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄). Para la elaboración del trabajo se utilizaron diferentes grupos experimentales a los cuales se les administró CCl₄ (i.p.), aceite de oliva (v.o.), y los extractos metanólico, acetato de etilo, acuoso y hexánico de las inflorescencias de *T. americana* (v.o.) en un lapso de 6 días. Al término de los tratamientos los animales fueron sacrificados y el cerebro (corteza y hemisferio) fue extraído para posteriormente ser almacenado a -80°C, hasta ser sometido a los procedimientos de extracción de RNA. Para la determinación de la expresión génica se realizó la técnica de RT-PCR (PCR-tiempo real). Los datos obtenidos se expresaron en número de copias dependiendo del tratamiento asignado. Resultados: En corteza, las enzimas SOD1 y SOD2 presentaron diferencia significativa en el nivel de expresión génica contra el grupo de CCl₄ y AO, con respecto a GPx los únicos que presentaron

diferencia significativa fueron M y AcE contra el grupo CCl₄ y AO. En la región del Hemisferio las tres enzimas (SOD1, SOD2 y GPx) de los cuatro extractos presentaron una diferencia significativa entre el nivel de expresión génica contra el grupo de CCl₄ y AO, en la mayoría. La evidencia que se presentó con estos resultados sugiere que los extractos de la *T. americana* tiene un efecto protector al daño de estrés oxidante en las regiones de corteza y hemisferio cerebral. Esto pudiera deberse a sus metabolitos, en este caso los flavonoides (quercetina y kaempferol), los cuales actúan como antioxidantes naturales, ya sea como atrapadores de radicales libres o promotores de estas enzimas antioxidantes. Esto nos indica que la *T. americana* puede ser utilizada como un fitofármaco complementario de la terapia farmacológica, en enfermedades relacionadas con estrés oxidante en cerebro.

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades del cerebro

El encéfalo adulto presenta cuatro porciones: el tronco encefálico (o tallo cerebral), el cerebelo, el diencéfalo y el cerebro (la parte más grande del encéfalo; Tortora, 2006).

Al cerebro se le considera como el órgano de almacén de recuerdos de experiencias previas o sea de la memoria asociativa. En el centro que gobierna todas nuestras actividades mentales, razón, inteligencia, voluntad y memoria. Este es la base de la conciencia, el intérprete de las sensaciones, el coordinador de nuestros asientos voluntarios y regulador, tanto por su capacidad de acelerar o inhibir numerosos actos reflejos de apariencia involuntaria, como el llanto, risa, micción, defecación y otros (Gutiérrez, 2004).

El cerebro está formado por células de diversos tipos, las funciones más características surgen de las propiedades de unas células especializadas, las neuronas, las cuales se comunican entre sí y con el resto del organismo (Paulles-López, 2008).

1.1.1. Anatomía

Desde un punto de vista estructural el SN está formado por unas células altamente especializadas, que son las neuronas. Las neuronas constan de un cuerpo o soma neuronal, que contiene el núcleo y la mayoría de organelos citoplasmáticos, y por unas prolongaciones ramificadas que son de dos tipos: a) las dendritas, generalmente numerosas; y b) el axón (Jiménez-Castellanos, *et al.*, 2002).

El cráneo encierra al encéfalo, que contiene alrededor de 100 millones de neuronas. Un nervio es un haz de cientos de miles de axones, a los que suman el tejido conectivo y los vasos sanguíneos que se encuentran por fuera del cerebro y la médula espinal (Tortora, 2006).

Los ganglios son masas pequeñas de tejido nervioso, constituidas principalmente por cuerpos de células nerviosas, que se localizan por fuera del cerebro y la médula espinal.

Los ganglios se hallan estrechamente relacionados con los nervios craneales y espinales (Tortora, 2006).

La estructura de protección de la medula espinal está representada por dos tipos de cubiertas de tejido conectivo (vertebras), y conectivo (meníngeo) más un amortiguador, el líquido cefalorraquídeo es producido en el encéfalo, que rodea y protege al delicado tejido nervioso (Tortora, 2006).

Las meninges son tres capas de tejido conectivo que revisten a la medula espinal y el encéfalo. Las meninges espinales rodean a la medula y se continúa con las meninges craneales, las cuales envuelven al encéfalo. La más superficial de las tres meninges espinales es la duramadre, compuesta por tejido conectivo denso irregular. Forma un saco desde el nivel del *foramen magnum* donde se continúa con la duramadre cerebral. La duramadre craneal tiene dos capas las cuales están fusionadas en toda su extensión, salvo en ciertas regiones en las que les separan para rodear a los senos venosos duros que drenan la sangre venosa del encéfalo y la llevan a venas yugulares internas (Tortora, 2006).

La meninge media es una membrana vascular denominada aracnoides, que presenta las delicadas fibras colágenas y algunas elásticas. Se encuentra por dentro de la duramadre y se continúa con la aracnoide del cerebro. Entre ellas se halla el estrecho espacio subdural, que contiene líquido intersticial (Tortora, 2006).

La más interna de las meninges es la piamadre, una fina y transparente capa de tejido conectivo que se adhiere a la superficie de la medula espinal y al encéfalo. En la piamadre hay gran cantidad de vasos sanguíneos que abastecen de oxígeno y de nutrientes a la medula espinal (Tortora, 2006).

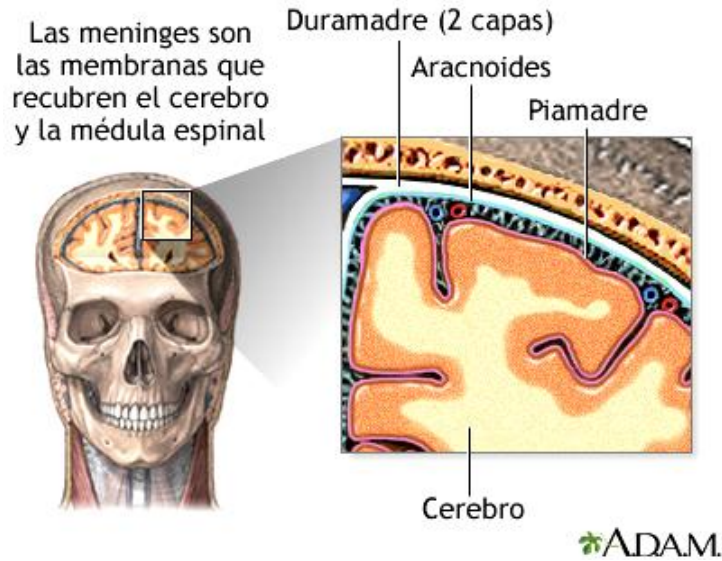


Figura 1. Meninges del cerebro (Tomada de http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19080.htm).

El encéfalo y la médula espinal derivan de una estructura tubular del ectodermo denominada tubo neuronal. La parte neuronal anterior del tubo neural se expande y se divide en tres regiones por la aparición de dos constricciones, conocidas como vesícula encefálicas primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. El prosencéfalo se diferencia en telencéfalo y diencefalo. El telencéfalo forma el cerebro, la parte más grande del encéfalo, y los ventrículos laterales (Tortora, 2006).

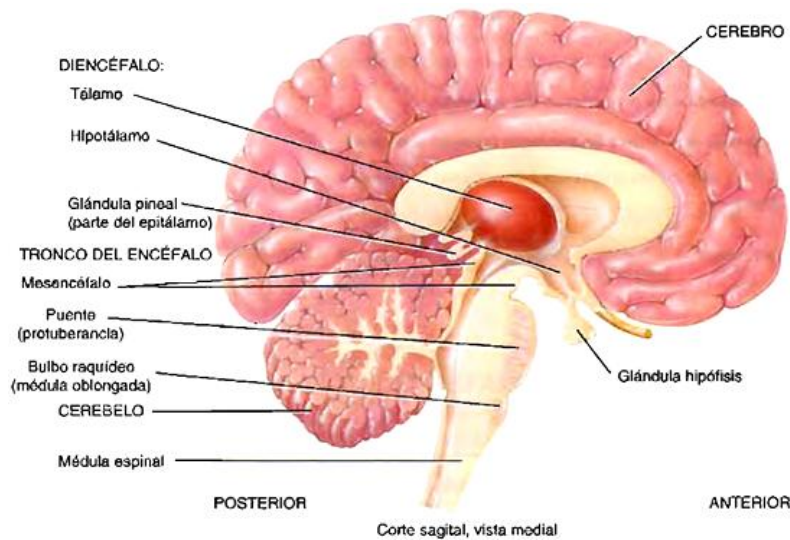


Figura 2. Anatomía del encéfalo (Tomada de Tortora, 2006).

La barrera hematoencefálica protege a las neuronas de sustancias nocivas y de microorganismos, esto impide el paso de muchas sustancias de la sangre al tejido nervioso. Está se forma por uniones estrechas que cierran el espacio entre las células endoteliales de los capilares encefálicos y por una membrana basal gruesa que los rodea (Tortora, 2006).

El líquido cefalorraquídeo es un líquido claro e incoloro que protege al encéfalo. El cual circula continuamente a través de las cavidades del encéfalo, denominadas ventrículos laterales, que se localizan en cada uno de los hemisferios cerebrales. Los ventrículos laterales están separados por adelante por una membrana fina, el *septum pellucidum*. El tercer ventrículo es una cavidad estrecha a lo largo de la línea media superior del hipotálamo y entre las mitades derecha e izquierda del tálamo. El cuarto ventrículo yace entre el tronco del encéfalo y el cerebelo (Tortora, 2006).

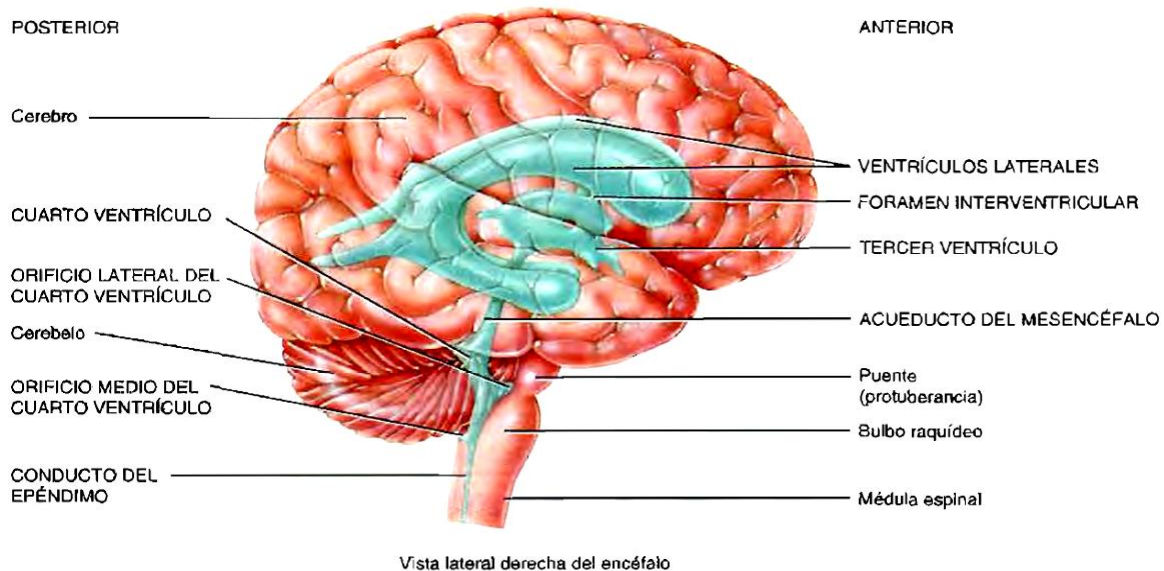


Figura 3. Localización de los ventrículos en un "encéfalo transparente" (Tomada de Tortora, 2006).

Las mitades derecha e izquierda del cerebro se conocen como hemisferios cerebrales y se encuentran separados por la hoz del cerebro. Los hemisferios consisten en una capa externa de sustancia gris y una región interna de sustancia blanca con núcleos grises en su interior. La capa externa de sustancia gris es la corteza cerebral. Por dentro de la corteza cerebral se encuentra la sustancia blanca (Tortora, 2006).

La corteza cerebral forma un revestimiento completo de los hemisferios cerebrales. Está compuesta por sustancia gris y se ha estimado que contiene aproximadamente 10 000 millones de neuronas. La superficie de la corteza esta aumentada por su plegamiento en circunvoluciones separadas por fisuras o surcos. La corteza cerebral, al igual que la sustancia gris de cualquier otro sitio del SNC, consiste en una mezcla de células nerviosas, fibras nerviosas y vasos sanguíneos (Snell, 2007; Gutiérrez, 2004).

Las grietas más profundas entre las circunvoluciones se denominan fisuras; las más superficiales se conocen como surcos. La presión más profunda, la fisura longitudinal, divide al cerebro en una mitad derecha y una mitad izquierda llamadas hemisferios cerebrales. Los hemisferios se conectan internamente mediante el cuerpo caloso, una ancha banda de sustancia blanca que contiene axones que se extienden de uno a otro hemisferio (Tortora, 2006).

Cada hemisferio cerebral se divide en lóbulos: frontal, parietal, temporal y occipital. Un quinto lóbulo, la isla de Reil, o ínsula, se encuentran en la profundidad del cerebro y por lo tanto no es visible. El surco central separa los lóbulos frontal y parietal, la circunvolución precentral del lóbulo central y la circunvolución postcentral del lóbulo parietal. El surco lateral se ubica en la parte posterior al lóbulo frontal en la superficie lateral (Donnersberger, 2002).

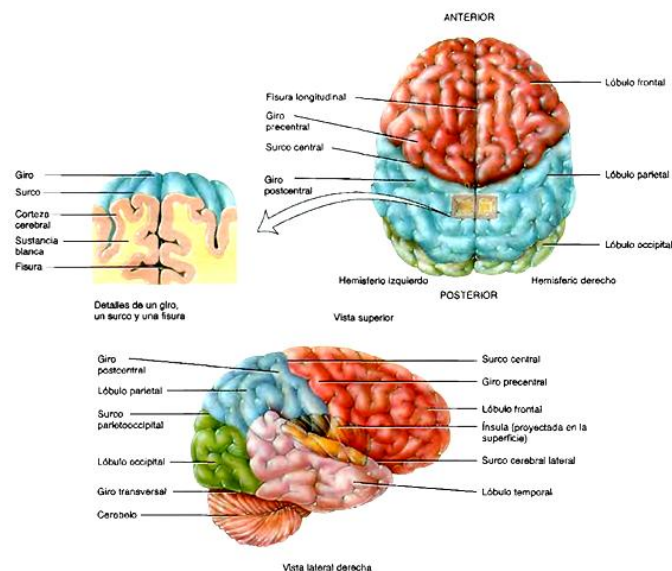


Figura 4. Cerebro (Tomada de Tortora, 2006)

1.1.2. Fisiología

La compleja estructura celular (neuronal) de sus gruesas paredes está conectada con el resto del cuerpo por nervios aferentes (que traen información del exterior al cerebro) y eferentes (que emiten señales nerviosas para el control de las funciones corporales y de la conducta; Paulles-López, 2008). En determinadas regiones de la corteza cerebral se procesan señales específicas de la naturaleza sensitiva, motora y de asociación. Las áreas sensitivas suelen recibir información de las características y están vinculadas con la percepción, el conocimiento consciente de una sensación, las áreas motoras inician los movimientos y las áreas de asociación se relación con funciones de integración más complejas, como la memoria, las emociones, el razonamiento, la voluntad, el juicio, los rasgos personales y la inteligencia (Snell, 2007; Donnersberger, 2002; Tortora, 2006).

La información sensitiva llega principalmente a la mitad posterior de ambos hemisferios cerebrales, a regiones situadas por detrás del surco central. En la corteza, las áreas primarias presentan las conexiones más directas con los receptores sensitivos periféricos. La corteza cerebral es la receptora de la información enviada desde los ojos y los oídos y los órganos de sensibilidad en general. De esta forma las aferencias sensitivas enriquecidas presumiblemente son descartadas, almacenadas o transformadas en acciones (Snell, 2007; Donnersberger, 2002; Tortora, 2006).

Las áreas de asociación del cerebro comprenden principalmente las áreas motoras y sensitivas, estas se relacionan entre sí por los tractos de asociación (Tortora, 2006).

El cerebro en base a la división de tejido denominada fisura longitudinal, se divide en dos hemisferios cerebrales, cada uno se especializa en funciones particulares (Tortora, 2006). El hemisferio izquierdo recibe información sensitiva somática y controla los músculos de la mitad derecha del cuerpo (Donnersberger, 2002; Tortora, 2006), este coordina funciones como razonamiento, habilidades numéricas y científicas, lenguaje escrito y capacidad de usar y comprender el lenguaje (Tortora, 2006). Mientras que, el hemisferio derecho hace lo mismo con la mitad izquierda del cuerpo (Donnersberger, 2002; Tortora, 2006), este se especializa en las aptitudes musicales y artísticas, en la percepción espacial y de patrones, el reconocimiento de rostros y el contenido emocional del lenguaje, la

discriminación de diferentes olores y la generación de imágenes visuales, sonora, táctiles, gustativas y olfatorias con fines comparativos (Snell, 2007; Tortora, 2006)

1.1.3. Trastornos que afectan al Cerebro: Principales mecanismos

Existe una amplia gama de trastornos neurológicos que afectan tanto al SNC como al periférico. En particular, los que afectan al cerebro pueden ir desde accidentes cerebrovasculares, traumatismos cerebrales (Guimarães, 2009), enfermedades neurológicas, como el Parkinson, el Alzheimer, las encefalopatías, la epilepsia, así como infecciones de tipo viral, bacterianas, parasitarias o fúngicas (Snell, 2007).

En general existen dos patrones lesivos presentes en los trastornos neurológicos: 1) un daño primario, consecuencia temprana del episodio patológico primario; y 2) una degeneración neuronal secundaria, un grupo de episodios patológicos que inducen la degeneración tardía en las células que no están afectadas por el daño primario o que sólo lo están parcialmente (Guimarães, 2009).

La degeneración neuronal secundaria es un mecanismo patológico relevante que contribuye al déficit funcional, por lo que es el objetivo de enfoques terapéuticos (Guimarães, 2009). Existen varios factores implicados en la etiología de la degeneración neuronal secundaria, incluyendo la excitotoxicidad, la inflamación y el estrés oxidante (Guimarães, 2009).

Cuadro 1. Principales enfermedades que afectan al cerebro (descripción).

Padecimiento	Generalidades	Fisiopatología	Referencia
Epilepsia	La incidencia de la epilepsia es particularmente alta en los niños menores y en personas mayores. Esta se define por un estado recurrente, convulsivo espontáneo (no provocado), que pueden ser episodios convulsivos o no convulsivos. Se caracteriza por una sincronizada actividad eléctrica anormal resultante de un grupo de neuronas cerebrales.	Hiperexcitabilidad neuronal debida a desbalance del sistema excitador mediado principalmente por glutamato y el sistema inhibitor, mediado principalmente por GABA. Estrés oxidante que deriva en alteraciones de las funciones fisiológicas de señalización de Ca ²⁺ que se asocia con el aumento de la producción de radicales libres, la disfunción	Fisher, <i>et al.</i> , 2005; Martinc, 2012; Azevedo de Lima, 2014; Volcy-Gomez, 2004; Kaila, <i>et al.</i> , 2014.

		mitocondrial, el daño celular y en consecuencia la epilepsia.	
Parkinson	Pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y la concomitante pérdida de terminales nerviosas dopaminérgicas en el caudoputamen, que es la principal área de proyección de las neuronas de la sustancia <i>nigra</i> . Los pacientes con enfermedad de Parkinson presentan tremor en reposo, movimientos lentos (bradiquinesia), rigidez e inestabilidad postural.	Existen anomalías macroscópicamente con despigmentación de la <i>sustancia negra</i> y microscópicamente con el incremento de depósitos de hierro oxidante (Fe^{2+}) en dicho núcleo y la presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos, los llamados cuerpos de Lewy.	Martínez-Lazcano, 2010; Angoa-Pérez, 2007; Segovia de Arana, <i>et al.</i> , 2002; Guimarães, <i>et al.</i> , 2009; Mejía-Toiber, <i>et al.</i> , 2009
Alzheimer	Relacionado con la edad, está caracterizada clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria y las funciones cognitivas como: trastornos del lenguaje afasia, pérdida de adquisiciones motoras o apraxia, del reconocimiento de texturas, sonidos, formas, caras o agnosia y finalmente de las funciones ejecutivas que son abstracción, secuenciación y planeación.	Acumulación del péptido β -amiloide extracelular depositado en las placas seniles, algunas mutaciones en su proteína precursora y la presencia del alelo e4 de la apolipoproteína E son eventos que favorecen el daño oxidante.	Martínez-Lazcano, 2010; Angoa-Pérez, 2007; Dorado-Martínez, <i>et al.</i> , 2003; Escobar-Izquierdo, 2001; Jordan, 2003
Esclerosis lateral amiotrófica	Enfermedad degenerativa de curso progresivo que afecta a las células del asta anterior y a la vía corticoespinal y que se manifiesta principalmente con debilidad muscular combinada con espasticidad, amiotrofia, hiperflexia y signo de Babinski debida a la afectación de motoneuronas superiores, calambres y fasciculaciones por afectación de motoneuronas inferiores.	Es un desorden heredado de las neuronas motoras, que se encuentran asociado con mutaciones sin sentido en el gen de la enzima superóxido dismutasa tipo 1 (Cu, Zn-SOD). Se ha demostrado que la formación del radical hidroxilo esta incrementada con la mutante.	Martínez-Lazcano, 2010; Angoa-Pérez, 2007; Rodríguez-Violante, <i>et al.</i> , 2010; Jordan, 2003; Rojas, <i>et al.</i> , 2010.
Huntington	Es un trastorno neurodegenerativo, autosómico dominante caracterizado por movimientos involuntarios como la corea, así como anomalías del movimiento voluntario. Hay pérdida cognoscitiva y trastornos psiquiátricos	Esto a causa de una mutación genética en el cromosoma 4, que produce una expansión anormal de repeticiones CAG en la región codificante del gen que codifica la proteína "huntingtina". Las evidencias apuntan a una ganancia de función de la huntingtina, la cual involucra defectos energéticos, daño oxidante y excitotoxicidad.	Martínez-Lazcano, 2010; Angoa-Pérez, 2007; Rodríguez-Violante, <i>et al.</i> , 2010; Segovia, <i>et al.</i> , 2001; Segura, <i>et al.</i> , 2003
Síndrome de Guillain Barré	Constituye la principal causa de parálisis flácida aguda en los países desarrollados, en los cuales la poliomielitis ha sido erradicada.	Polirradículo-neuropatía aguda monofásica sensitivo motora adquirida, post infecciosa, mediada inmunológicamente, por lo general de naturaleza desmielinizante.	Erazo-Torricelli, 2009

Herpes zóster	Neuropatía motora somática (craneal o periférica), la neuropatía motora visceral, la neuralgia preherpética, la mielitis, la encefalitis (arteritis cerebral), la meningitis, el síndrome de Guillain-Barré o <i>el zoster sine herpete</i> .	Enfermedad primaria de los ganglios espinales, más frecuentemente una reactivación del virus varicela-zóster. Después de invadir un ganglio, el virus produce un dolor fuerte en el dermatoma inervado por el nervio afectado.	Laguna del Estal, 2000; Moore, 2007
Tumores cerebrales	Aumento de la presión intracraneal debido a la masa encefálica. Cefaleas, vómitos, edema de papila, síntomas mentales como: trastornos del comportamiento, falta de memoria, crisis epilépticas.	El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales, con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, amenazando la vida de los pacientes. Puede originarse a partir de cualquier tipo de célula.	Cheng, <i>et al.</i> , 2014; Díaz-Rubio, 2000
Meningitis	Su clínica es insidiosa. Se caracteriza por lenta evolución, con cefalea, febrícula o fiebre intermitente; compromiso del contenido de la conciencia (alucinaciones, delirio, etc.) y desarrollo paulatino de elementos focales (que pueden comenzar con los pares craneanos). En ocasiones se genera un síndrome de hipertensión endocraneana que puede dar paso a un deterioro de la conciencia.	La presencia de los gérmenes en el espacio subaracnoideo produce una reacción inflamatoria desencadenada por los lipopolisacáridos (LPS) de las paredes y cápsulas bacterianas generando la producción de citoquinas inflamatorias, especialmente interleucina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE),	Medina, <i>et al.</i> , 2003; Fernández-Viladrich, <i>et al.</i> , 2010
Absceso cerebral	Hay fiebre, signos focales y deterioro del estado de conciencia.	Es más una manifestación de infección en el SNC como extensión de un foco contiguo (mastoiditis, sinusitis, etc.) que la complicación de una meningitis. Los agentes etiológicos son diversos y suelen ser una asociación de gérmenes que incluye los anaerobios.	Medina, <i>et al.</i> , 2003; Fernández-Viladrich, <i>et al.</i> , 2010
Toxoplasmosis cerebral	Suele comenzar con elementos difusos del SNC se acompaña de pronta focalización (hemiparesia, síndromes hemisensitivos, hemianopsia, etc.) y rápido deterioro de nivel de conciencia.	Presencia de toxoplasmosis en pacientes VIH positivo.	Medina, <i>et al.</i> , 2003; Casanova-Sotolongo, <i>et al.</i> , 2000

Neurocisticercosis	La epilepsia es la manifestación más frecuente sobre todo en individuos de mediana edad, con antecedente epidemiológico positivo y examen neurológico normal; sin embargo, se han descrito signos neurológicos focales motores, sensitivos, cerebelosos, compromiso de los pares craneales, síndrome mental orgánico, hidrocefalia e hipertensión endocraneana.	Ingesta accidental de huevos de <i>T. solium</i> en alimentos de origen vegetal o animal, aquellos atraviesan la pared intestinal y se diseminan por vía hematógica a los diferentes tejidos en donde adquieren su forma quística, una vesícula que contiene el escólex del parásito. Los quistes pueden ubicarse en diversos tejidos, el SNC, los músculos y globo ocular son los más comprometidos.	Medina, <i>et al.</i> , 2003
Citomegalovirus	Meningoencefalitis es descrita en pacientes inmunocompetentes, así como en inmunocomprometidos	Con daño preferente sobre la sustancia blanca. Las neuronas presentan menor cantidad de partículas, ubicadas fundamentalmente en la cromatina periférica.	Salamano, 2001
Encefalopatía hepática	Alteración en la función del SNC que refleja una serie de manifestaciones neuropsiquiátricas, neuromusculares y de conducta.	Se debe a la incapacidad del hígado enfermo para la metabolización de las neurotoxinas que se acumulan en el cerebro y que afectan a los neurotransmisores, atribuido al efecto tóxico del amonio sobre el tejido cerebral.	Mesejo, <i>et al.</i> , 2008
Traumatismo craneoencefálico	Un traumatismo produce una alteración en el nivel de conciencia que se evalúa mediante la escala de coma de Glasgow, indicador de la gravedad del traumatismo. Tras un periodo variable de pérdida de la conciencia después de un traumatismo grave aparece un periodo de confusión, pérdida de memoria conocido como amnesia postraumática o laguna amnésica, alteraciones cognitivas (atención, memoria, comunicación, habilidades de planificación, irritabilidad, desinhibición, apatía).	La lesiones más habituales son las contusiones por golpe y contragolpe, las contusiones por el roce con las estructuras óseas de la base del cráneo y la lesión axonal difusa.	Muñoz-Céspedes, <i>et al.</i> , 2001
Encefalopatía esponjiforme bovina	Clínicamente, está dominada por ataxia cerebelosa, disartria, temblor, movimientos oculares anormales, movimientos coreoatetósicos y finalmente un estado de invalidez en el que fallecen tras unos 12 meses de evolución. El cuadro clínico suele ser rápidamente progresivo, y cursa con demencia, mioclonías, otros movimientos anormales y ataxia cerebelosa.	La proteína del príon es una modificación de una glucoproteína de membrana normal, llamada PrP celular (PrPc) cuya función fisiológica, aunque podría tener relación con el metabolismo del cobre. Presenta tendencia a polimerizar y es resistente a las proteasas. Lo realmente asombroso de la PrPsc, y aún no bien entendido, es su capacidad de transformar la	Zarranz, 2007

		PrPc en nueva PrPsc. Mediante este mecanismo es posible la transmisión de las enfermedades priónicas.	
Rabia	Padece síntomas de encefalitis: dolor de cabeza, malestar general, fiebre, anorexia, náuseas, vómitos, hidrofobia, dificultad para deglutir, agitación, ansiedad, alucinaciones, hiper-salivación, comportamiento extraño, tendencia a morder, contracciones entrecortadas y violentas del diafragma.	Es en forma de bala, encapsulado, RNA sencillo perteneciente al género <i>Lysavirus</i> en la familia <i>Rabdoviridæ</i> . Las glicoproteínas virales se unen al receptor de acetilcolina, induce anticuerpos citotóxicos e induce inmunidad celular T, e interferón gamma que puede retardar el desarrollo del cuadro clínico. Esos anticuerpos son protectores.	Shors, 2009

1.1.4. Mecanismos asociados al daño neurológico

Cuadro 2. Principales mecanismos de daño neurológico (descripción).

Mecanismos de daño neurológico	Descripción	Referencias
Estrés oxidante	<p>El cerebro es una estructura altamente oxigenada, tiene dependencia en el metabolismo aeróbico de carbohidratos y su compleja composición de lípidos de membrana, por lo que es susceptible a presentar estrés oxidante. Este aumenta gradualmente durante la respiración anaeróbica en un marco de isquemia y revascularización. Existen múltiples factores que hacen a este tejido particularmente vulnerable al daño oxidativo con relación a otros tejidos del organismo, por una parte, tiene muy baja actividad de las enzimas antioxidantes, así como la disminución en la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN, la proteólisis, y la pérdida de regulación del sistema inmune, además presenta elevadas concentraciones de Fe^{3+}, vía su acción catalizadora y otros substratos fácilmente oxidables, como ácidos grasos poliinsaturados (lipoperoxidación) y catecolaminas. La reactividad del oxígeno y de las especies derivadas de este, debido a su naturaleza electrofílico, son la base de una fracción importante de los eventos tóxicos que ocurren en los sistemas aeróbicos.</p> <p>Una de las especies radicales más agresivas y nocivas es el $HO\bullet$, el cual puede producirse en el cerebro bajo condiciones fisiológicas. El $HO\bullet$, puede ser producido de nuevo por las células a partir de la transformación del radical $O_2^{\bullet-}$ y del H_2O_2 a través de la reacción de</p>	González-Fraguela, <i>et al.</i> , 2007; Angoa-Pérez, <i>et al.</i> , 2007; Martínez-Lazcano, <i>et al.</i> , 2010; Bernhardt, 2005; Guimarães, <i>et al.</i> , 2009

	Fenton, o bien, a partir de la descomposición del ONOO ⁻ . Diversas vías metabólicas pueden producir O ₂ ⁻ o H ₂ O ₂ en el cerebro.	
Calcio	Un aumento en la concentración de Ca ²⁺ intracelular activa la liberación de neurotransmisores, y cuando es constante durante un prolongado tiempo induce la excitabilidad de membrana, la reorganización del citoesqueleto, la extensión de procesos neuronales, la plasticidad sináptica, la adhesión celular, la inflamación, la regulación del ciclo celular, el crecimiento y la muerte celular, además se activan proteasas, lipasas, y endonucleasas. La activación de proteasas dependientes de Ca ²⁺ puede dañar al citoesqueleto y a las proteínas de membrana. El calcio intracelular participa en los mecanismos de apoptosis y es reconocido como un efector central de la necrosis. El retículo endoplasmático parece jugar un papel importante en la regulación del calcio, y de hecho, su capacidad de secuestrar calcio libre en las neuronas disminuye con la edad. Otro organelo subcelular importante para la regulación del calcio, es la mitocondria. En numerosos tipos de células también sirven como tampón de Ca ²⁺ . En los últimos años, se ha visto que estas respuestas son mediadas, al menos parcialmente, a través de la regulación de la expresión génica por la cascada de señalización del calcio. Varios genes que regulan el metabolismo energético mitocondrial se encuentran disminuidos, correlacionándose positivamente con alteraciones del comportamiento.	Bernhardi, 2004; Dorado Martínez, 2003; Martinc, 2012; Bernhardi, 2005; Escobar-Izquierdo, 2001
Neurotransmisores	La elevada concentración de neurotransmisores de naturaleza excitadora como el glutamato, en eventos que afectan al SNC (como traumatismo o daño isquémico) en el SNC, tiene como resultado una activación elevada de los receptores ionotrópicos glutamatérgicos (N-metil-D-aspartato (NMDA); AMPA-Kainato) y, por consiguiente, la disfunción de la bomba de sodio y potasio con una entrada de iones de sodio y cloruro, lo cual origina un aumento de la absorción de agua y un incremento del volumen del cuerpo celular. Esta entrada o liberación de reservas intracelulares iónicas puede aumentar su nivel celular, sobrepasando así la capacidad de sus mecanismos reguladores. Tales episodios pueden causar un trastorno metabólico, con la consiguiente activación de varios enzimas, lo cual afecta directamente a la estructura celular e induce la formación de radicales libres que pueden mediar en la muerte celular. La activación de los receptores NMDA lleva a la liberación de H ₂ O ₂ y de NO [•] . El NO [•] juega un papel importante en este proceso al regular la liberación de glutamato.	Dorado Martínez, 2003; Guimarões, <i>et al.</i> , 2009; Segura, <i>et al.</i> , 2003; Bernhardi, 2005; Jordan, 2003
Procesos de neuroinflamación	En las enfermedades neurodegenerativas, la inflamación ocurre como una respuesta localizada, en la cual los astrocitos y la microglia activada desempeñan un papel fundamental. Aún no está claro, cuando en	Angoa-Pérez, <i>et al.</i> , 2007; Bernhardi, 2004; Dorado Martínez, 2003; Guimarões, <i>et al.</i> ,

	estas patologías la respuesta inflamatoria pierde su regulación y deja de ser un proceso de defensa y reparación para convertirse en un factor poderoso de destrucción neuronal. Todas estas respuestas son y se mantienen activadas durante el estado de estrés oxidante que lleva a las neuronas a un círculo vicioso de muerte, destrucción y estrés oxidante, que por la pérdida de la capacidad de las defensas antioxidantes se vuelve imposible de romper.	2009;Cañas-Fernández, 2008
--	---	----------------------------

En la actualidad, existe un gran interés en la relación entre el estrés oxidante resultado de las alteraciones en la señalización de Ca^{2+} y el aumento de la producción de radicales libres, la disfunción mitocondrial y el daño celular (Martinc, 2012).

Los iones de Ca^{2+} , así como las especies reactivas de oxígeno, en condiciones fisiológicas funcionan como efectores positivos y moléculas de señalización celulares dentro de las vías de señalización mitocondrial, mientras que su sobrecarga puede conducir a la disfunción mitocondrial, el estrés oxidante y daño celular, los cuales son componentes muy importantes en varios tipos de neuropatologías (Martinc, 2012; Dorado Martínez, 2003).

1.2. Generalidades de estrés oxidante

1.2.1 Definición de estrés oxidante

En los últimos 30 años ha crecido el interés por estudiar la participación del estrés oxidante, los radicales libres, las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes, en la fisiopatología de las principales enfermedades sistémicas como la obesidad (Rodríguez-Rodríguez, *et al.*, 2009; Barbosa, *et al.*, 2008; Zulet, *et al.*, 2007), la diabetes (Barbosa, *et al.*, 2008; Furukawa, *et al.*, 2004; Ramos-Ibarra, *et al.*, 2006), el cáncer (Elejalde-Guerra, 2001; Peinado, *et al.*, 2000; Goldkorn, *et al.*, 2014), así como, aquellas que afectan al SNC (Bernhardi, 2005; Ferrer-Viant, *et al.*, 1999), como Alzheimer (Peinado, *et al.*, 2000; Martinez-Lazcano, *et al.*, 2010; Rojas, *et al.*, 2010), Parkinson (Peinado, *et al.*, 2000; Martinez-Lazcano, *et al.*, 2010; Rojas, *et al.*, 2010), epilepsia (Martinc, *et al.*, 2012;

Rowley, *et al.*, 2013; Waldbaum, *et al.*, 2010), encefalopatías (Seyan, *et al.*, 2010; Görg, *et al.*, 2010; Samarghandian, *et al.*, 2014), entre otras.

El daño o estrés oxidante se define como el estado de desequilibrio en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, este es inducido por una amplia variedad de factores y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno, que llevan a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular (Halliwell, 2014; Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013; Venereo-Gutiérrez, 2002; Pérez-Gastell, *et al.*, 2000).

1.2.1.1. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón no apareado, esta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas transformándolas a su vez en moléculas muy reactivas, una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos (Dorado-Martínez, *et al.*, 2003). Estos son generados por: a) la pérdida de un electrón a un no radical; b) la adquisición de un electrón de un no radical; o c) la ruptura homolítica de una molécula (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013).

El término "especies reactivas de oxígeno" es un término colectivo que implica radical libre derivados del oxígeno, así como los no radicales derivados de la reducción de oxígeno molecular (O₂). (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Especies reactivas de oxígeno (Dorado-Martínez, *et al.*, 2003; Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013).

Radical libre	No Radical	Reacción más común que los origina
Superóxido (O ₂ ^{•-})	Oxígeno singulete (O ¹)	$NADPH + 2 O_2 \rightarrow NADPH^+ + H^+ + 2 O_2^{\bullet-}$
Oxígeno monoatómico(O [•])	Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂)	$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Hidroxilo (HO [•])	Ozono (O ₃)	$UQ^+ + H_2O_2 \rightarrow UQ + \cdot OH + HO\cdot$

Peroxilo (RO_2^{\bullet})	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)	$LH + RO_2^{\bullet} \rightarrow LO^{\bullet} + H_2O$
Alcoxilo o fenoxilo (RO^{\bullet})	Ácido hipocloroso ($HOCL$)	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO^{\bullet}$
Hidroperoxilo (HO_2^{\bullet})	Ácido hipobromoso ($HOBBr$)	
Radical peróxido lípido (LO^{\bullet})		$LO_2^{\bullet} + LH \rightarrow LOOH + L^{\bullet}$
Radical de óxido nítrico ($^{\bullet}NO_2$)		$HO^{\bullet} + NO_2^- \rightarrow OH^- + ^{\bullet}NO_2$

1.2.1.2. Especies reactivas de oxígeno

Las ERO son usadas para describir una variedad de moléculas y radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado) derivados del oxígeno molecular (Turrens, 2003).

El oxígeno molecular en el estado fundamental es un bi-radical, que contiene dos electrones no apareados en la capa exterior (este a su vez es conocido como un estado de triplete). Puesto que los dos electrones individuales tienen el mismo espín, donde el oxígeno sólo puede reaccionar con un electrón a la vez y por lo tanto no es muy reactivo con los dos electrones en un enlace químico (Turrens, 2003).

Por otro lado, si uno de los dos electrones desapareados es excitado y cambia su giro, las especies resultantes (conocidas como oxígeno singulete) se convierte en un agente oxidante ya que los dos electrones con espines opuestos pueden reaccionar rápidamente con otros pares de electrones, especialmente doble bonos (Turrens, 2003).

La mayoría de las ERO que normalmente se producen en los sistemas biológicos provienen del metabolismo oxidante mitocondrial, de la actividad de la enzima xantina oxidasa y en menor proporción de la autoxidación de catecolaminas y hemoproteínas que ocurren en el citoplasma, membrana nuclear, retículo endoplásmico y peroxisomas. Las ERO de las mitocondrias y otras fuentes celulares son consideradas como subproductos tóxicos del metabolismo con el potencial de causar daños a los lípidos, proteínas y ADN. Se denomina ERO al radical hidroxilo (HO^{\bullet}), al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo (ROO^{\bullet}), el hidroperóxido orgánico ($ROOH$) y los lípidos peroxidados. Otro grupo de radicales libres que participan en procesos de transformación de las macromoléculas orgánicas son las

ERN entre las que se ubica principalmente al óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$). Las especies reactivas de oxígeno pueden interactuar con el $\text{NO}\bullet$ formando nuevas especies como lo es el anión peroxinitrito (ONOO^-), con alto poder oxidante (Martínez-Lazcano, *et al.*, 2010; Elejalde-Guerra, 2001; Thannickal, 2000).

La reducción del oxígeno por un electrón a la vez produce intermedios relativamente estables. El anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el producto de una reducción de un electrón de oxígeno, es el precursor de la mayoría de especies reactivas de oxígeno y un mediador en reacciones en cadena. La dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$, sea de manera espontánea o a través de una reacción catalizada por la superóxido dismutasa, produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez puede estar completamente reducido a agua o parcialmente reducido a radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), uno de los oxidantes más fuertes en naturaleza, dado que su presencia, aunque sea solamente una fracción de segundo, es capaz de destruir enzimas proteolíticas, de provocar la ruptura de polisacáridos y de causar peroxidación lipídica de la membrana, alterando su permeabilidad y las funciones asociadas atacando también las bases de DNA (Ferrer-Viant, 1999; Dorado-Martinez, *et al.*, 2003). La formación de $\text{HO}\bullet$ es catalizada por metales de transición reducidos, que a su vez pueden ser reducidos por $\text{O}_2^{\bullet-}$, que se propagan a este proceso. Además, $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con otros radicales, incluyendo óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) en una reacción controlada por la velocidad de difusión de ambos radicales. El producto ONOO^- también es un oxidante muy potente provocando nitración y desanimación (en adenina, guanina y citosina), lo que ocasiona alteraciones en la codificación y transcripción del material genético (Turrens, 2003, Dorado-Martinez, *et al.*, 2003).

La reactividad del oxígeno y de las especies reactivas derivadas de este, debido a su naturaleza electrofílica, son la base de una fracción importante de los eventos tóxicos que ocurre en los sistemas aeróbicos. No obstante, múltiples evidencias experimentales sugieren que las ERO no actúan solamente como agentes nocivos, además forman parte de los mecanismos fisiológicos de señalización intracelular. Por lo tanto, el mantenimiento del equilibrio entre la generación y el consumo de oxidantes es imprescindible para el mantenimiento de la viabilidad celular (González-Fraguela, *et al.*, 2007).

1.2.1.3. Otros agentes oxidantes

Los agentes oxidantes pueden ser exógenos (fármacos o venenos) o endógenos (entre los más dañinos están las especies reactivas del oxígeno y los peróxidos lipídicos) (Benítez-Zequeira, 2006).

Las especies reactivas incluyen a las: las especies reactivas de oxígeno (ERO), las especies reactivas de hierro (ERI), las especies reactivas de cobre (ERC), así como a las especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Núñez-Sellés, 2011; Dorado-Martinez, *et al.*, 2003).

Las especies reactivas se forman como productos del mecanismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células. Existen otro grupo de radicales libres donde el electrón no apareado tienen como centro a átomos de carbono o azufre (Núñez-Sellés, 2011; Dorado-Martinez, *et al.*, 2003).

Estas especies reactivas dañan tanto al DNA como a las proteínas transportadoras. Las de cobre a través de las proteínas detectoras específicas de oxidación, estas pueden alterar la expresión genética; y causan daño en las enzimas reparadoras, en las polimerasas y dejan pasar mayor cantidad de errores a nivel génico. Aunado a esto los productos finales de la lipoperoxidación provocan daño a las proteínas y al DNA (Dorado-Martinez, *et al.*, 2003).

1.2.1.4. Tetracloruro de Carbono (CCl₄)

Cuando una dosis de CCl₄ vía oral entra al organismo, en un tiempo de tres horas alcanza niveles máximos en sangre, hígado, riñón, cerebro y músculo. Ciertas sustancias aumentan la biotransformación de CCl₄ y refuerzan su intoxicación. El CCl₄ metabólicamente activa el citocromo P450 para formar el radical triclorometilo (CCl₃•), y radical triclorometil peróxido (CClO•); la unión covalente de estos radicales con las proteínas y lípidos celulares son considerados como el paso inicial de una cadena de

eventos que conducen a la lipoperoxidación de la membrana y finalmente a la necrosis celular. Este proceso de transformación se realiza en el hígado (Calderon, *et al.*, 2013; Wang, *et al.*, 1999).

La relación de este fenómeno con los procesos neurodegenerativos puede estar asociado con las propias características del cerebro; un órgano que presenta altos niveles de ácidos grasos fácilmente peroxidables, consume el 20% del oxígeno incorporado en el torrente sanguíneo y, no está específicamente enriquecido con enzimas antioxidantes (Calderon, *et al.*, 2013).

1.2.2. Sistema antioxidante

Un antioxidante, es cualquier sustancia que presente en bajas concentraciones, retrasa o inhibe las reacciones de oxidación con estructuras biológicas, el cual estimula los mecanismos de reparación endógenos al daño causado por el ataque de ERO o suministra entidades químicas que aumentan la capacidad endógena de secuestro de radicales libres formados en exceso en el organismo y el cual protege a los tejidos de los efectos que ellos producen (Dorado-Martínez, 2003; Chihuailaf, *et al.*, 2001; Ferrer-Viant, *et al.*, 1999; Núñez-Sellés, 2011).

Estos pueden actuar en las siguientes formas siguientes:

1. Disminuyen la concentración de oxidantes.
2. Evitan la iniciación de la reacción en cadena al “barrer” (cubrir o detener una reactividad química muy alta), los primeros radicales libres que se forman.
3. Unen a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas.
4. Transforman los peróxidos en productos menos reactivos.
5. Detienen la propagación y el aumento de radicales libres.

(Dorado-Martínez, 2003; Chihuailaf, *et al.*, 2001; Ferrer-Viant, *et al.*, 1999; Núñez-Sellés, 2011).

El sistema antioxidante del organismo humano está constituido por enzimas exógenas y endógenas (Venereo-Gutiérrez, 2002). El sustrato oxidable se encuentra en casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas de las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de DNA. La acción del antioxidante es sacrificar su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas de relevancia fisiológica, como los lípidos, proteínas, ADN, etc. (Benítez-Zequeira, 2006; Venereo-Gutiérrez, 2002).

Los antioxidantes actúan como eliminadoras, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen (Benítez-Zequeira, 2006; Venereo-Gutiérrez, 2002).

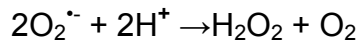
Las enzimas de la fase de desintoxicación son las de mayor relevancia para combatir el estrés oxidante generado por las ERO. Las principales son: superóxido dismutasa (SOD), encargada de dismutar el anión superóxido; catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), encargadas de degradar H_2O_2 ; y antioxidantes como el glutatión reducido (GSH), el ascorbato o vitamina C y el α -caroteno, precursor de la vitamina A (Vargas-Caraveo, 2009; Martínez-Lazcano, 2010).

Enzimas antioxidantes

1.2.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)

La SOD pertenece al grupo de metaloenzimas (metaloproteína), presente en las células aerobias y fluidos extracelulares. Esta enzima se encuentra en el citoplasma (Cu-Zn SOD1), que es un homodímero de 32,5 kDa, que contiene Cu^{2+} y Zn^{2+} en el sitio activo, para formar un puente con imidazol o histidina. Mn-SOD2 se encuentra en la matriz mitocondrial y es un homotetrámero 95 kDa que contiene Mn^{2+} en su sitio activo. Es codificada por un gen nuclear localizado en el cromosoma 6q25, debe ser transportado en la matriz después de la traducción. Su función es catalizar la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , lo que no requiere de cosustratos. La biosíntesis de esta enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa (Cardenas-

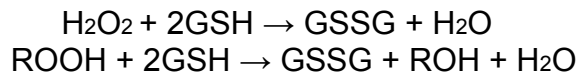
Rodríguez, *et al.*, 2013; Chihuailaf, *et al.*, 2002; Vargas-Caraveo, 2009; Turrens, 2003; Prestegui-Martel, 2013).



1.2.2.2. Glutación peroxidasa (GPx)

Esta enzima cataliza la reducción de dos moléculas de peróxido (H_2O_2 , los peróxidos lipídicos, hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol) utilizando glutación reducido (GSH) en moléculas inofensivas antes de que se formen radicales libres (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013; Ferrer-Viant, *et al.*, 1999; Chihuailaf, *et al.*, 2002).

Al igual que otras selenoproteínas, el sitio activo de GSH-Px contiene selenio bajo la forma de residuos de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica conformada por aminoácidos. Los productos de la reacción se oxida glutación (GSSG) y agua (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013; Ferrer-Viant, *et al.*, 1999; Chihuailaf, *et al.*, 2002).



Esta selenoenzima (selenoproteína) se encuentra en varias isoformas. Citosólica GPx (cGPx, GPx 1) está presente en el citosol de todos los tejidos, aunque en diferente distribución. Puede reducir el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres y convertirlos en agua y alcoholes (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013; Chihuailaf, *et al.*, 2002).

GPx plasmática (PGPX, GPx-3) es una glicoproteína purificada, caracterizada a partir de plasma humano que se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón, existe en los fluidos extracelulares de diversos tejidos, y en alta concentración en el riñón (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013; Chihuailaf, *et al.*, 2002).

GPx membranal (PHGPx, GPx-4) situado en la capa de fosfolípidos y el citosol de diversos tejidos cuya función biológica primaria es proteger contra lipoperóxidos (LPO) reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares, esto previene la

oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Esta es la única isoforma cuya estructura es monomérica; es decir, contiene un solo residuo de selenocisteína. Es abundante en los testículos (Cardenas-Rodriguez, *et al.*, 2013; Chihuailaf, *et al.*, 2002).

GPx gastrointestinal (GI-GPx, GPx-2) está presente en el citosol del hígado y el tracto intestinal en los seres humanos. Representa la principal peroxidasa dependiente de glutatión en el tracto gastrointestinal. Es importante en la reducción de hidroperóxidos de colesterol y en la protección contra la toxicidad por ingestión de hidroperóxidos lipídicos (Cardenas-Rodriguez, *et al.*, 2013; Chihuailaf, *et al.*, 2002).

1.2.2.3. Enzimas antioxidantes en daño neurológico

Entre las células del cerebro, las neuronas son particularmente vulnerables a la presencia del estrés oxidante debido a los bajos niveles de enzimas antioxidantes, especialmente la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), y de antioxidantes no enzimáticos, a saber, la vitamina E y glutatión (GSH). Es importante tener en cuenta que los antioxidantes endógenos y la capacidad de reparación se disminuyen con el envejecimiento (Martinc, *et al.*, 2012).

1.3. Estrategias terapéuticas en base al uso de antioxidantes

Los avances en el estudio de los radicales libres, estrés oxidante y su participación en el desarrollo de enfermedades, han permitido identificar a moléculas que tienen la capacidad de inhibir o modular sus efectos en la célula. Se ha propuesto que la dieta rica en antioxidantes puede prevenir o disminuir el deterioro celular y funcional del organismo, generado por el exceso de estrés oxidante (Sánchez-Valle, *et al.*, 2013).

El estrés oxidante y su asociación con trastornos neurológicos, ha desviado la atención a un conjunto de sustancias antioxidantes, a las cuales anteriormente no se les reconocía su importancia. La vitamina E es una de ellas, considerándose como un factor protector en estas enfermedades por sus acciones fundamentales como agente antioxidante y en el mantenimiento de la integridad de las membranas (Pita-Rodríguez, 1997).

Las terapias antioxidantes han demostrado numerosos beneficios y efectos protectores después de las lesiones en los modelos animales, pero estos resultados no se han podido reproducir de manera satisfactoria en ensayos humanos (Gil, *et al.*, 2008).

Se han realizado múltiples estudios empleando terapias antioxidantes con resultados positivos, o también resultados negativos con el uso de éstos (Sánchez-Valle, *et al.*, 2013).

Esos resultados contradictorios pueden deberse a múltiples causas, como al inicio precoz o tardío de la intervención, intervenciones poblacionales reducidas o con riesgo elevado, mezcla de intervenciones profilácticas, prevención de enfermedades, dosis insuficientes, monoterapia o combinaciones, variabilidad biológica o clínica, estudios experimentales sobre tejidos animales o humanos, entre otros (Sánchez-Valle, *et al.*, 2013).

A continuación describo dos ejemplos, de antioxidantes utilizados en daño neurológico:

Diversos estudios sugieren que los estrógenos pueden ser una herramienta en la terapia o prevención de enfermedades neurológicas inducidas principalmente por la presencia de radicales libres en el SNC, como fue demostrado al evaluar el efecto antioxidante del esteroide sintético (4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona) en cerebro de ratas adultas (Calderón-Guzmán, *et al.*, 2007).

Existe una importante evidencia científica que avala la efectividad de la melatonina como antioxidante depurador de ERO, quelante de metales, además de regular la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR y G6PD (Romero, *et al.*, 2008; Acuña-Castroviejo, *et al.*, 2009). En especial atraviesa la barrera hematoencefálica y entra a los compartimientos citoplasmáticos y nucleares de la célula, por su propiedad lipofílica (Gil, *et al.*, 2008).

1.4. Uso de plantas medicinales en enfermedades neurológicas con relación a estrés oxidante

Diversas enfermedades del hombre como cáncer, arteriosclerosis, artritis reumatoide, Alzheimer, trauma cerebral isquémico e inclusive la vejez, son producto del estrés oxidante, esto ha sugerido la búsqueda de nuevas terapias alternativas, evaluándose extractos de plantas con resultados satisfactorios (Calderón, *et al.*, 2013).

La historia de la humanidad en los últimos 5000 años ha demostrado la versatilidad terapéutica de plantas y sus metabolitos secundarios, así incrementando el uso de estas con el propósito de disminuir la incidencia de enfermedades (Martínez-García, *et al.*, 2007; Calderón, *et al.*, 2013).

Las plantas medicinales son fuentes de nuevos y más eficientes antioxidantes, a los que la farmacología puede recurrir para neutralizar los radicales libres, producidos por el metabolismo celular y que están vinculados a diversas enfermedades (Calderón, *et al.*, 2013).

El estudio de las sustancias que componen estas plantas y sus posibles mecanismos en beneficios para la salud es un área de gran interés, junto con los mecanismos de las enfermedades que aquejan a los seres humanos (Carmona-Aparicio, *et al.*, 2013).

Las plantas son una rica fuente de fitoquímicos bioactivos, más de 5.000 de ellos se han caracterizado en frutas, verduras y granos. Si se recurre a la fitoterapia, como alternativa terapéutica, encontraremos a los flavonoides, los cuales ocupan un lugar cimero en nuestros tiempos, por reconocidas propiedades antioxidantes (Selema de la Morena, *et al.*, 1999; Carmona-Aparicio (árnica), *et al.*, 2014).

En una dieta normal, el uso de hierbas puede contribuir significativamente a la ingesta total de antioxidantes de las plantas e incluso ser una mejor fuente de antioxidantes en la dieta que muchos otros grupos de alimentos. Por lo tanto, mucha atención de la investigación en medicina preventiva y la industria alimentaria se centra en antioxidantes naturales (Lasagni-Vitar, *et al.*, 2014).

El creciente interés en antioxidantes naturales se ha desarrollado debido a la necesidad de efectivos antioxidantes más eficaces, menos tóxicos y de costos, y las plantas medicinales parecen tener estas ventajas deseadas. Por otra parte, la medicina tradicional ha generado una demanda de alternativas terapéuticas en América Latina, el Caribe y los países industrializados, debido a la posibilidad de que el impacto negativo de varios agentes en las células se puede mejorar o prevenirse mediante el aumento de la ingesta dietética de hierbas naturales con propiedades antioxidantes (Lasagni-Vitar, *et al.*, 2014).

En México se sabe que hay alrededor de 30.000 especies de plantas registradas en 1997 por el Instituto Nacional Indigenista, con 3000 usos documentados en la medicina tradicional para las personas que viven en comunidades rurales y urbanas (Carmona-Aparicio, *et al.*, 2013).

Las siguientes plantas presentan propiedades terapéuticas, en patologías relacionadas al estrés oxidante en cerebro:

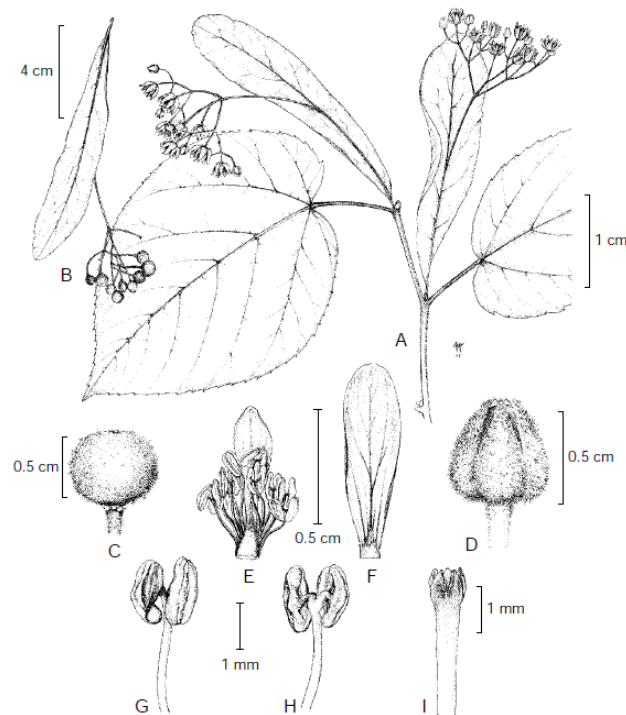
- *Rubia cordifolia*, *Fagoniacretica* Linn y *Tinospora cordifolia* han sido reportados para contener una amplia variedad de antioxidantes y han estado en uso en el sistema de la medicina oriental para diversos trastornos (Rawal, *et al.*, 2004).
- *Terminaliacatappa* L. "almendro de la india" ha sido utilizada para el tratamiento de dermatitis y la hepatitis, con actividades antiinflamatorias, bactericidas, antivirales y antiparasitarias, antidiabéticas, antifúngicas, antimetastásicas y antioxidante en cerebro de rata (Calderón, *et al.*, 2013).
- *Hetherotheca inuloides* (árnica mexicana) es utiliza en diversas presentaciones (comprimidos, bebidas, ungüentos) para fines terapéuticos debido a su anti-inflamatorio, antimicrobiano, analgésico, y efectos antioxidantes (Carmona-Aparicio (árnica), *et al.*, 2014).
- *Aloysiatriphylla* (L'Her), vulgarmente conocido como "cedrón", se utiliza en la medicina popular en el tratamiento del asma, frío, fiebre, cólico, diarrea e indigestión, insomnio, ansiedad y antioxidante (Lasagni-Vitar, *et al.*, 2014).

- *Plectranthus amboinicus* (orégano francés) efecto antioxidante (García-Salmán, *et al.*, 1996).

Actualmente, existen otras plantas con efectos a nivel del SNC que han despertado el interés en base a sus efectos terapéuticos, como es el caso de Tilia que ejerce efectos ansiolíticos (Aguirre-Hernández, *et al.*, 2007), antinociceptivo (Martínez, *et al.*, 2009), y actualmente se ha determinado que tienen efectos como anticonvulsivo, y que uno de los mecanismos es su capacidad como antioxidante (Carmona-Aparicio, *et al.*, 2014).

1.5. Generalidades de la Tilia

Las especies de Tilia se caracterizan por árboles de hasta 35 m de altura y 1 m de diámetro, con madera blanca y suave. Las flores son fragantes en amarillo y blanco los colores, unidos por brácteas foliares pedúnculo (Martínez, *et al.*, 2009).



Tilia americana L. var. *mexicana* (Schtdl.) Hardin. A. rama con inflorescencias; B. bráctea con infrutescencia; C. fruto; D. botón; E. estambres y estaminodio; F. pétalo; G. antera en vista ventral; H. antera en vista dorsal; I. región apical del estilo y estigmas. Ilustrado por Karin Douthit y reproducido de la fig. 18 de Flora Novo-Galiciana 3: 88. 2001, con autorización de los editores.

Figura 5. Morfología de *Tilia americana* var. *mexicana* (Tomada de Pérez-Calix, 2009).

La *Tilia* en México se distribuye desde el norte de Chihuahua y Coahuila, hasta al sur de Guerrero y Oaxaca. A pesar de que una distribución geográfica relativamente es grande, las poblaciones de esta especie son confinadas en la parte inferior del bosque de la montaña, que cubre menos del 1% de México (Aguirre-Hernández, *et al.*, 2010). Pátzcuaro en el Estado de Michoacán es una de las regiones más populares con los bosques montañosos bajos en el que la biodiversidad vegetal incluye árboles de *Tilia*. Por otra parte en Michoacán, es la región donde se han reunido las colecciones más importantes de la taxonomía de esta especie (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008).

1.5.1. Familia de Tiliaceae

Taxonómicamente, *Tilia* (*Tiliaceae*) es un género complejo de cerca de 25 especies de las cuales 17 especies están presentes en el este de Asia, seis en Europa y uno en América del Norte. Bush describió 15 especies de *Tilia* en México basado en características morfológicas foliares de las hojas. Según Jones, las *Tilias* de México pertenecen a *Tilia mexicana*. Esta delimitación se basa en las diferencias en la cantidad y el tipo de pubescencia en el envés de la superficie de la hoja, de acuerdo con Jones reconoció la *Tilia mexicana* como una de las cuatro variedades de *Tilia americana*: *Tilia americana* L. var. *mexicana* (Aguirre-Hernández, *et al.*, 2010).

1.5.2. Aspectos químicos

Estudios fitoquímicos han demostrado que las especies de *Tilia* sintetizan hidrocarburos, ésteres, ácidos alifáticos, polifenoles, terpenoides y flavonoides (quercetina y kaempferol) (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008; Aguirre-Hernández, *et al.*, 2010).

Por otra parte, es bien sabido que los flavonoides se encuentran entre los principales metabolitos secundarios que caracterizan el género *Tilia*. Estudios fitoquímicos de *Tilias* europeos han demostrado que a partir de *Tilia argentea*, *Tilia cordata*, *Tilia phatyphyllos*, y *Tilia rubra* se han aislado varios flavonoides, terpenoides, ácidos fenólicos en flores, brácteas, y hojas (Aguirre-Hernández, *et al.*, 2010; Martínez, *et al.*, 2009).

1.5.3. *Tilia americana* var. *mexicana*

En México, *Tilia americana* var. *mexicana* o *Tilia americana* es conocida por varios nombres dependiendo de la región de cultivo. Nombres comunes registrados en la zona: cirimo, flor de tilia, jonote, jonoteblanco, sirimu, tila, tzirimo. Nombres comunes registrados fuera de la zona de estudio: achique, cyrimbo, flor de tila, sirima, tirimo, zirimi, zirimo (lengua purépecha) (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008; Martínez, *et al.*, 2009; Pérez-Calix, 2009).

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de esta especie:

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridaeplantae</i>
Phylum	<i>Tracheophyta</i>
Subphylum	<i>Euphyllophytina</i>
Infraphylum	<i>Radiatopses</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Dilleniidae</i>
Superorden	<i>Malvanae</i>
Orden	<i>Malvales</i>
Familia	<i>Tiliaceae</i>
Subfamilia	<i>Tilioideae</i>
Tribu	<i>Tilieae</i>
Género	<i>Tilia</i>
Especie	<i>Tilia americana</i>
Variedad	<i>mexicana</i>

1.5.4. Usos de la Tilia

Además de los usos medicinales la planta ha sufrido sobre explotación debido a que su madera es muy suave y se elaboran con ellas artesanías como guitarra, utensilios de cocina y herramientas. Los árboles son derribados completamente para obtener las flores y las brácteas que se comercializan para la elaboración de infusiones con actividad antidepressiva (Avilés-Montes, 2008).

1.5.5. Aspectos farmacológicos

Tilia americana es una especie endémica de México, esta carece de descripción científica farmacológica. Recientemente, metabolitos de *Tilia americana* se describen como responsable de los efectos terapéuticos reportados en la medicina tradicional. Tilia es un árbol utilizado en la medicina tradicional, principalmente como sedante no narcótico para los trastornos del sueño o la ansiedad, remedio para tratar la inflamación y el dolor de artritis, entre otros tipos de afecciones asociadas con el dolor (antinociceptiva), como la enterocolitis, gastroenteritis, hepáticos y calambres nefríticos, calambres menstruales y dolor de cabeza. Infusiones de flores (té) de esta especie por lo general han sido considerados como no tóxicos; infusiones diluidas se les suele administrar a los niños excesivamente ansiosos como un sedante suave (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008; Martínez, *et al.*, 2009; Carmona-Aparicio, *et al.*, 2014).

En un estudio preliminar, se demostró que la administración intraperitoneal de extractos de hexano y metanol de sus inflorescencias producen efectos sedantes y ansiolíticos en ratones; sin embargo, las dosis efectivas estaban cerca a los efectos tóxicos (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008). Aunque se ha demostrado que facilita la respuesta inhibitoria por la modulación del sistema GABAérgico y el sistema serotoninérgico, aún se desconoce si este es el único mecanismo por el cual ejercen sus efectos terapéuticos.

Además la *T. americana* tienen propiedades antioxidantes debido a su capacidad para atrapar las especies reactivas de radicales $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , $HOCl$, H_2O_2 y 1O_2 (Carmona-Aparicio, *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Alrededor del mundo, las especies de *Tilia* se han utilizado por sus propiedades tranquilizantes en la medicina tradicional. Las infusiones de las inflorescencias de las especies de *Tilia* son ampliamente utilizadas en América Latina, como sedante y tranquilizante (Aguirre-Hernández, 2007).

Actualmente, estudios realizados por el grupo de trabajo determinaron que el extracto de acetato de etilo, de la *Tilia* posee propiedades como citotóxico y como antioxidante (Carmona-Aparicio, 2014). Por lo que, las propiedades terapéuticas de la *Tilia* pueden estar mediadas por su capacidad de modular el estrés oxidante.

Como es conocido el efecto de tetracloruro de carbono (CCl_4) está mediado por la formación de radicales libres (Selema de la Morena, 1999). La biotransformación hepática del CCl_4 genera metabolitos tóxicos (triclorometilo y peroxitriclorometilo) (Chávez-Morales, 2006). La exposición a altos niveles de CCl_4 afecta al SN, incluyendo al cerebro. Una exposición de esta naturaleza puede ser fatal. Puede ocurrir aturdimiento o un coma, y daño permanente de las células nerviosas (ATSDR, 2005). La formación de radical libre *in vivo* ocurre en la vía catalítica de enzimas, durante los procesos de transferencia de electrones que ocurre en el metabolismo celular, o por la exposición a factores exógenos. Durante el estrés oxidante o desequilibrio redox la producción de radicales libres y los daños que estos pueden generar, sobrepasan la capacidad de las células para eliminarlos y promover una eficiente reparación de sus principales moléculas: DNA, proteínas y lípidos. La relación de este fenómeno con los procesos neurodegenerativos puede estar asociado con las propias características del cerebro; un órgano que presenta altos niveles de ácidos grasos fácilmente peroxidables, consume el 20% del oxígeno incorporado en el torrente sanguíneo y, no está específicamente enriquecido con enzimas antioxidantes (Calderon, *et al.*, 2013).

El cerebro es uno de los principales órganos que debe protegerse de neurotoxinas que altera al SN, o enfermedades que llegan a producir una alteración en los radicales libres; porque es deficiente de enzimas antioxidantes. Para prevenir o contrarrestar este tipo de problemas que afecta al cerebro, se han utilizado medios naturales, como lo es

la *Tilia*, que ejerce acción antioxidante. Por lo que, en este estudio se propone investigar el efecto de diferentes extractos de esta planta en diferentes secciones del cerebro (cortezas y hemisferios), posterior de la inducción del daño neurotóxico inducido por CCl₄ y determinar si la administración sistémica de los diferentes extractos de *Tilia* pueden regular la expresión génica de las principales enzimas que regulan el estrés oxidante en este órgano.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estado de estrés oxidante juega un papel crucial en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas, en el cual se ha observado un incremento de marcadores de daño oxidante, los cuales involucran oxidación de proteínas, lípidos, DNA e incluso de RNA (Angoa-Perez, 2007).

El estrés oxidante lleva a una pérdida de regulación de los niveles de calcio, por un aumento masivo de entrada de este ion a la célula, produciendo falla mitocondrial y liberación de calcio secuestrado en la mitocondria. Como resultado de las alteraciones en la homeostasis del calcio, activa de manera excesiva una variedad de respuestas tales como la excitabilidad de membrana, reorganización del citoesqueleto y extensión de procesos neuronales, plasticidad sináptica, adhesión celular, inflamación, regulación del ciclo celular, crecimiento y muerte celular. Se ha visto que estas respuestas son mediadas a través de la regulación de la expresión génica por la cascada de señalización del calcio. Estos cambios en la expresión génica no son una respuesta tardía a la degeneración, sino que se asocian al inicio de las alteraciones cognitivas (Bernhardi, 2005).

Por lo que terapéuticamente se busca evitar la producción de radicales libres y así influir en los mecanismos fisiopatológicos que subyacen las enfermedades neurológicas. Esto mediante la administración de diferentes sustancias, de origen sintético o natural, como el uso de extractos de plantas con efectos antioxidantes, como es el caso de la *Tilia americana*.

4. HIPÓTESIS

El cerebro es una estructura altamente oxigenada con baja actividad de enzimas antioxidantes, el cual lo hace un tejido vulnerable al daño oxidante, una alternativa para disminuir este efecto es la administración *Tilia americana* var. *mexicana* que inducirá un efecto neuroprotector.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

5.1. Evaluar el efecto de diferentes extractos de la *Tilia americana* en la expresión génica de enzimas antioxidantes, en cerebro de rata, en un modelo de daño oxidante inducido por CCl₄.

5.2. Objetivos particulares

En cerebro de rata con daño cerebral inducido por CCl₄.

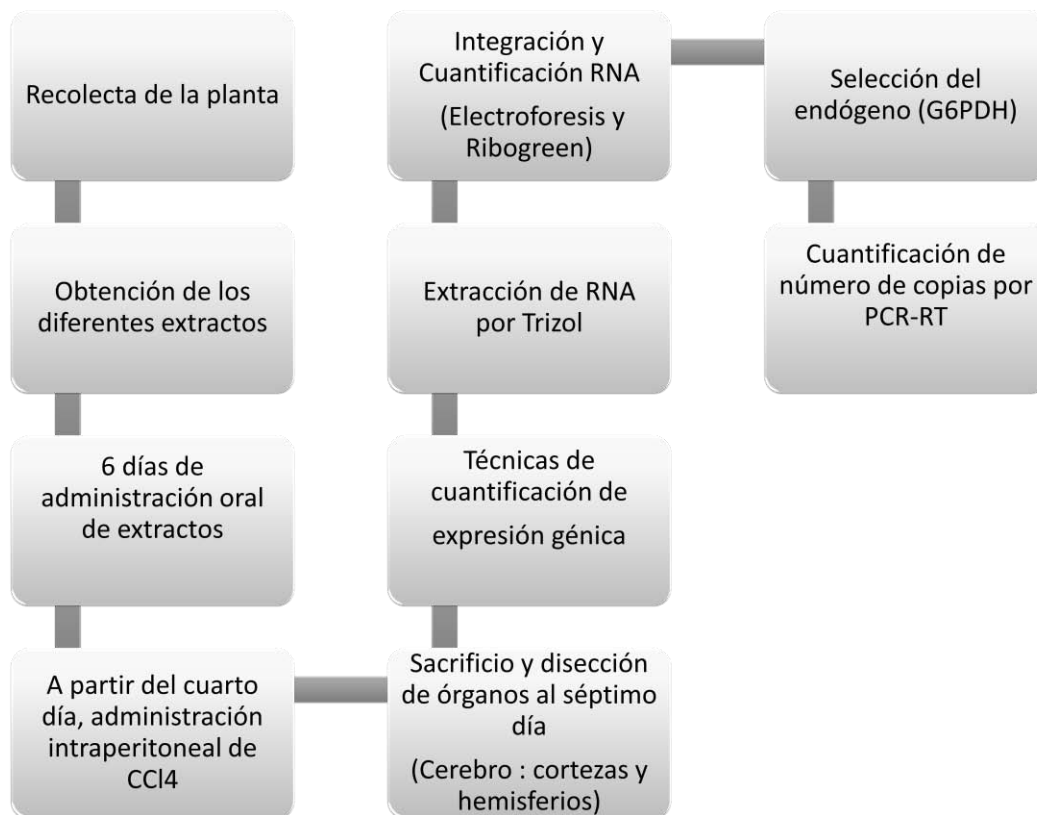
1.- Implementar los procedimientos moleculares para determinar la expresión génica de SOD1, SOD2 y GPx.

2.- Evaluar el efecto de diferentes extractos de *Tilia* en la expresión génica de SOD1, SOD2 y GPx, en diferentes secciones de cerebro de las ratas con tratamiento.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este fue un estudio prospectivo, transversal, analítico y experimental, el cual se realizó en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) y en la Escuela Médico Militar (EMM).

6.1. METODOLOGÍA



6.1.1. Sitio de colecta de la planta

Las inflorescencias de *Tilia americana* se recolectaron en Omiltemi, Chilpancingo, Guerrero, en los meses de mayo y junio. Un espécimen de la planta se depositó en el herbario de la Instituto Mexicano del Seguro Social, México, Distrito Federal, para referencias futuras (No. de catálogo: 131613).

6.1.2. Preparación y obtención de los extractos de la planta

Las inflorescencias se secaron y trituraron, para posteriormente realizar extractos por maceración con diferentes solventes, de polaridad creciente: 1) hexano (3 x 4 L); 2) acetato de etilo (3 x 4 L); 3) metanol (3 x 4 L); a temperatura ambiente (22°C); y por infusión con agua, donde a una cantidad de 10 g de las inflorescencias se hirvieron en 500 mL, durante una hora. Los disolventes se separaron de los residuos por filtración por gravedad y luego se evaporó en vacío. El extracto final se obtuvo en porcentaje del peso seco.

6.1.3. Animales de experimentación

Los animales utilizados fueron ratas Wistar macho (200 g), que se dividieron aleatoriamente en 6 grupos (n=3). Estas se mantuvieron en condiciones estándar, con ciclos luz/oscuridad de 12/12h, con alimentación y toma de agua *ad libitum*.

El daño neurotóxico se indujo al provocar estrés oxidante, mediante la administración de CCl₄ (i.p. 1.5 mL/Kg), en los animales de experimentación. El CCl₄ se disolvió con aceite de oliva 1:1 (v/v). Los grupos experimentales fueron sujetos a diferentes regímenes, los cuáles son descritos a continuación en el siguiente cuadro.

Cuadro 4. Diseño experimental

Grupo	Aceite de oliva (0,1 ml / kg) v.o. por 6 días	Extracto (100 mg / kg) v.o. por 6 días	CCl ₄ (1.5 ml / kg) i.p. 3 días antes de terminar el experimento
1	X		X
2		Acetato de etilo	X
3		Metanólico	X
4		Hexano	X
5		Acuoso	X
6			X

Al término de los tratamientos los animales se sacrificaron y el cerebro fue extraído, diseccionando la corteza y hemisferio, y conservado a -70°C, hasta las determinaciones de la expresión génica.

6.1.4. Determinación de la expresión génica de SOD1, SOD2 y GPx

Para evaluar el nivel de expresión génica de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2 y GPx, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa en tiempo real.

Para llevar a cabo este paso, se utilizó el marcador fluorescente SYBR[®] Green. La principal limitación de este marcador, es que al unirse al total de ácidos nucleicos en la reacción de la PCR, emite una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son ("primer-dimers"), producto potencial de PCR, consta de cebadores moleculares que se han adherido (hibridado) entre sí, causa de las cadenas de bases complementarias de los cebadores. Para hacer frente a esta situación se realizó un análisis de los resultados en la curva de fusión (curva melting).

6.1.4.1. Aislamiento de RNA total

Para el aislamiento, se utilizó por cada 100 mg de tejido en 1mL de Trizol y se homogenizó con un rotor, lavando cada cambio con agua destilada estéril (2 veces) y con agua grado biología molecular estéril (1 sola vez). Las muestras homogenizadas se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 x g durante 10 min a 4°C. Se obtuvieron 2 fases, de las cuales solamente se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 950 µl) y se agregaron 200 µl de Cloroformo, se mezcló fuertemente por 10 segundos con ayuda de un vórtex. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugó durante 10 min a 12,000 x g a 4°C.

De nuevo se recuperó la fase acuosa (alrededor de 450 µl) y se agregaron 200 µl de cloroformo nuevamente, hasta ver limpio el RNA, se centrifugó durante 10 min a 12,000 x g a 4°C y se recuperó la fase acuosa (alrededor de 370 µl). Se agregaron 500 µl de isopropanol a -20°C mezclando fuertemente con ayuda de un vórtex, centrifugando durante 10 min a 8,000 x g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Por inversión, se lavó el pellet (RNA) con 1 mL de etanol al 75%. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 7,600 x g a 4°C. Por último, se dejó secar el pellet (RNA) evitando deshidratación total. Se resuspendió el pellet (RNA) con 60-80 µl de agua libre de nucleasas y RNAsas, y se conservó a -80°C, hasta su uso (mediante el uso de alícuotas).

Para verificar la integridad del mRNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (con amortiguador Tris-Borato EDTA 0.5X). Se preparó al 1% un gel de agarosa: en 13 mL de TBE 0.5X se agregaron 0.13 g de agarosa, en adición de 1µl de bromuro de etidio, al formarse el gel, éste se colocó en la cámara de electroforesis con Buffer "TBE" 1X. Se colocó en el primer pozo del gel: 1µl de Buffer de carga ("Cyan Orange Loading Buffer". Invitrogen, USA), más 2 µl de marcador de peso molecular (1Kb) y 3 µl de agua libre de nucleasas; en los siguientes pozos se colocaron las muestras, 5 µl de éstas, más 1µl de Buffer de carga. Para el corrimiento se utilizó Buffer de "TBE" a 1X, a ± 70 Volts, con 24-29 mA durante 25 min. Posteriormente se reveló el gel en el fotodocumentador Kodak®.

6.1.4.2. Diseño de oligonucleótidos

Para el desarrollo de la técnica de PCR para identificar la expresión génica de los genes problema SOD1, SOD2 y GPx fueron diseñados los pares de los iniciadores correspondientes, conocidos como "primers" o cebador (hebra de ácido nucleico que sirve como un punto de partida para la síntesis del ADN). Además fueron diseñados los "primers" para el gen endógeno (G6PDH). Se tomaron las secuencias de mRNA de la base de datos "GenBank", las cuales corresponden a los números de acceso siguientes: SOD1 NM_000454, SOD2 NM_000636, GPxNM_000581 y G6PDH NM_000402. Para el diseño de cada par de "primers" se emplearon los programas "pDraw", "OligoExplorer" y "OligoAnalyzer". La búsqueda de las secuencias fue realizada en "BLAST", Herramienta de Búsqueda Básica de Alineación Local (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para verificar la especificidad de cada una. Los "primers" fueron sintetizados libres de sales, a concentración de 25 N y optimizados a una temperatura de alineamiento de 60°C (Invitrogen, Life Technologies).

Cuadro 5. Secuencias de "primers", temperatura de alineamientos y tamaño del amplicón para los genes propuestos y para el gen endógeno para el presente estudio.

Gen	Secuencia de Primers	Temperatura de alineamiento	Tamaño del amplicón (pb)
SOD1	F 5'-CGGATGAAGAGAGGCATGTT-3' R 5'-TACTCTTGTTTCTCGTGGACC-3'	59.7°C	152
SOD2	F 5'-TGGAGGCTATCAAGCGTGAC-3' R 5'-TCCTGATTAGAGCAGGCGG-3'	59.8°C	152
GPx	F 5'-GCTTTTGAGTGGTTCGCAGA-3' R 5'-CTTTCTCCTCATCGTGGTGC-3'	59.4°C	152
G6PDH	F 5'-GATGATCCAGCCTCCTACAAG-3' R 5'-GGGCTTCTCCACTATGATGC-3'	59.8°C	152

6.1.4.3. Cuantificación de RNA por RT-PCR

Las condiciones para las reacciones de qRT-PCR fueron optimizadas con el termociclador de gradiente ("CorbettLifeScience", Sydney, Australia) empleando el Kit "KAPPA SYBR FAST One-StepqRT-PCR" ("Kappa Biosystems", EUA). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µL.

Las condiciones de reacción en el termociclador se programaron como sigue: un ciclo de 50°C por 3 min para activar a la M-MuIV transcriptasa reversa, un ciclo de 95°C por 2 min para desactivar a la enzima transcriptasa reversa, 35 ciclos de 95°C por 3 s para la desnaturalización de ADN y una fase a 60°C por 10 s para la etapa de alineamiento y extensión. Las condiciones de temperatura y volúmenes fueron transferidas al protocolo de amplificación del sistema de detección "Rotor Gene 6.0" ("CorbettLifeScience", Sydney, Australia).

Los productos de PCR se verificaron, visualizando su tamaño en pares de bases (pb) por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, utilizando un marcador de 100 pb DNA "Ladder" ("Invitrogen", EUA) y se estudió con el sistema de análisis de electroforesis (Bio-Rad, China). Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado.

6.1.4.4. Limpieza de muestra mediante “Exo-SAP”

Los productos de la “RT-PCR” se limpiaron con el reactivo de “ExoSAP”, Exonucleasa - Camarón de Fosfatasa Alcalina, por medio de la relación de 2 µl de solución de “ExoSAP” por cada 5 µl de producto de PCR. Se llevaron al termociclador con las condiciones siguientes: 37°C/15 min, 80°C/15 min y se enfriaron a 4°C. Para la extracción de fragmentos de DNA de 40–50 kb de los productos limpios de la “RT-PCR” se utilizó el reactivo de “QIAEX”, purificación de fragmentos de DNA. Las muestras se almacenaron a -20°C.

6.1.4.5. Purificación de fragmentos de DNA por “QIAEX”

Para la extracción de fragmentos de DNA de 40–50 kb, se realizó un gel de agarosa al 2.5% en un volumen de 20 mL de “TBE”, disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA, 0.5X. Se colocó todo el producto de PCR (limpiado con “ExoSAP” previamente) más 1 µl de buffer de carga en el pozo. Se corrió el gel a 90 Volts hasta que las bandas se fueron separando. Se cortó la banda del gel de agarosa y se colocó en tubo eppendorf. Para observar el corrimiento de las bandas y el corte de las mismas se utilizó luz UV. Se pesó el gel y se agregaron volúmenes de buffer “QX1” por un volumen de gel: 300µl de buffer “QX1” por cada 100 mg de gel. Se agregó “QIAEX” mediante reglas: <2µg ADN+10 µl “QIAEX”, 2-10µg ADN+30 µl “QIAEX”, >10µg ADN adicional+30 µl “QIAEX”; y re-suspendió con ayuda de un vórtex.

Se incubó a 50°C durante 10 min para solubilizar la agarosa, agitándolo cada 2 min. El color de la mezcla tiene que ser amarillo (si no es así se debe agregar 10 µl de acetato de sodio 3M a pH 5, se mezcló e incubó por 5 min más). Se centrifugó a 17,900 x g durante 30 s y se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó nuevamente con 500 µl de buffer “QX1” y se centrifugó a 17,900 x g durante 30 s para eliminar el sobrenadante. Se lava el pellet 2 veces más con 500 µl de buffer “PE”, tampón de lavado para su uso en procedimientos de limpieza de ADN, y se mezcla, para posteriormente centrifugar a 17,900 x g durante 30 s, se elimina el sobrenadante para dejarlo secar de 10 a 15 min. Por último, se realizó una elución, se agregaron 20µl de Tris-HCl pH 8.5 o H₂O libre de nucleasas y se mezcló.

Cuadro 6. Incubación de fragmentos de DNA

Fragmento de ADN	Temperatura	Tiempo (min)
<4kb	Ambiente	5
4-10kb	50°C	5
>10kb	50°C	10

Por último, se centrifugó a 17,900 x g durante 30 s, se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo.

6.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se analizaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de rangos múltiples de Dunn. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

7. RESULTADOS

Para llevar a cabo la obtención de la expresión génica de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2 y GPx, se realizó un método de estandarización, el cual se siguió paso a paso como se mencionó en la sección de metodología.

Este estudio se dividió en 6 grupos diferentes, los cuales fueron conformados por: grupo control sin tratamiento (CCl_4), grupo con tratamiento (AO) y 4 grupos con tratamiento de extractos de la planta *T. americana* (H, M, Ac y AcE).

El RNA de las muestras biológicas de los diferentes grupos experimentales fue extraído y se evaluó su integridad, para ello, se utilizó un gel de agarosa de acuerdo a la metodología descrita previamente. De este se observaron la presencia de bandas en los diferentes carriles del gel de agarosa, dependiendo del tratamiento aplicado, nótese que las bandas son definidas y corresponden al peso molecular esperado para el RNA total (800-900 pB), prueba de su integridad.

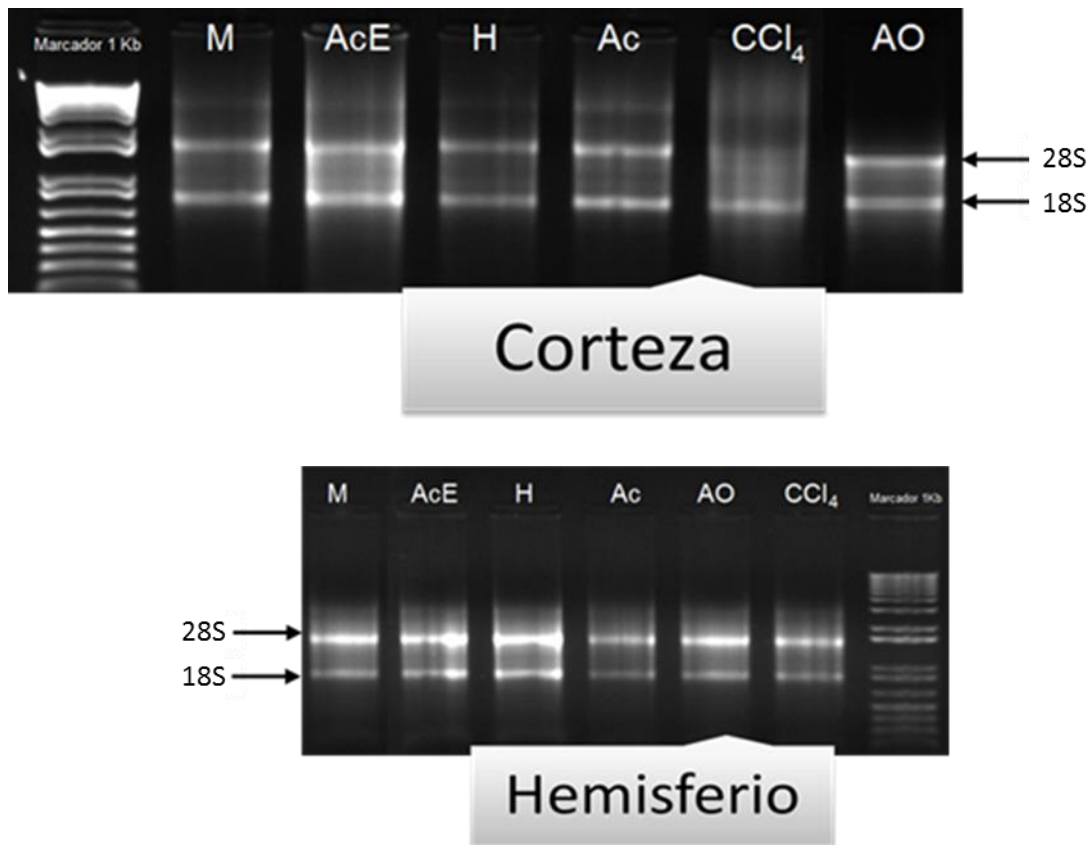


Figura 6. Electroforesis del material genético (RNA) extraído de Corteza y Hemisferio de rata, en los diferentes grupos de estudio: Tetracloruro de carbono (CCl_4), Aceite de Oliva (AO), Extracto Hexánico (H), Extracto Metanólico (M), Acuoso (Ac) y Acetato de Etilo (AcE) de inflorescencias de *T. americana*. Nota: El marcador de peso molecular utilizado es un marcador de ADN, de doble cadena, el cual fue usado solo como referencia. Nótese, que la expresión de RNA deriva a dos bandas, lo que nos permite sugerir la presencia de RNA ribosomal y mensajero, lo que demuestra su integridad.

Productos de PCR

Los productos de PCR de los genes propuestos se observan en la figura 7, mediante su expresión en medio de las bandas que corresponden a 100-200 pb. Cabe mencionar que las muestras fueron elegidas aleatoriamente de corteza y hemisferio. Los tamaños de los amplicones corresponden a los esperados (Figura 7).

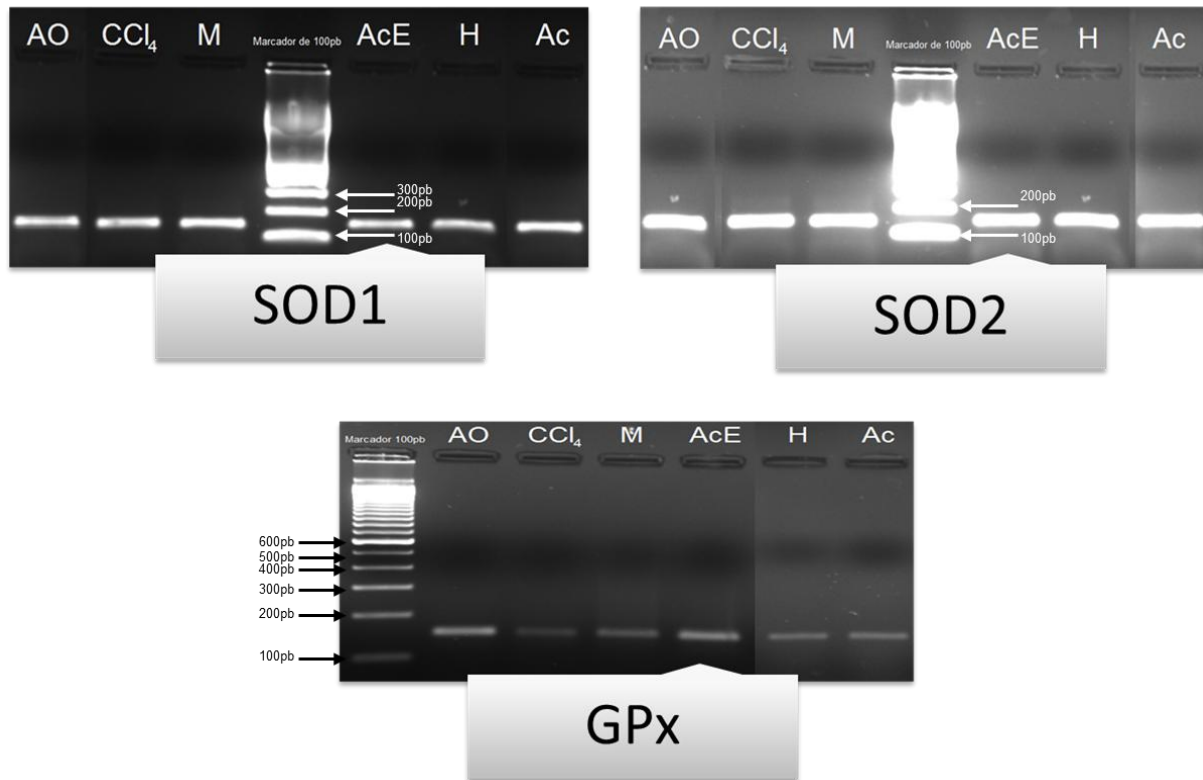


Figura 7. Productos de PCR de los genes propuestos de enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2 Y GPx). Gel de agarosa al 2.5%. Se observa el marcador de tamaño de 100pb (Invitrogen, EUA).

En la figura 8, se muestran los productos de PCR del gen endógeno más estable sin presencia de productos inespecíficos, las muestras fueron elegidas aleatoriamente de corteza y hemisferio. El tamaño de los amplicones corresponden a los esperados, con ayuda del marcador de 100pb.

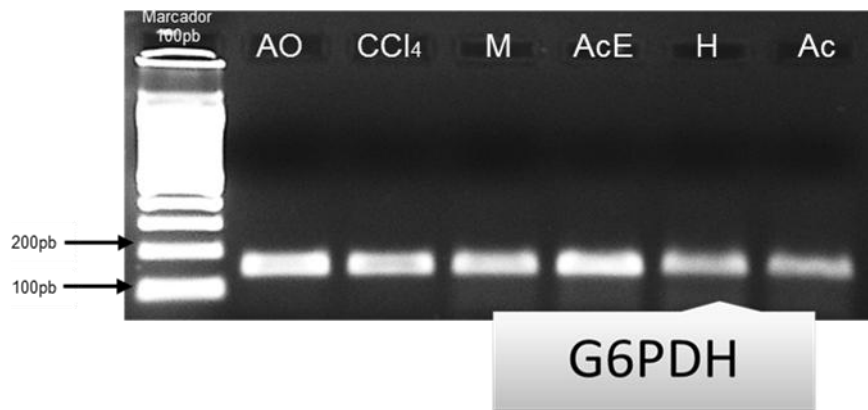


Figura 8. Gen endógeno se observa que el tamaño del amplicón corresponde al esperado. Gel de agarosa al 2.5%.

Otra forma de identificación de las enzimas antioxidantes fue por la curva MELT, en la cual observamos la amplificación de las enzimas específicamente y no de ruido que pueda causar algún tipo de solución o que se haya provocado por algún tipo de contaminación.

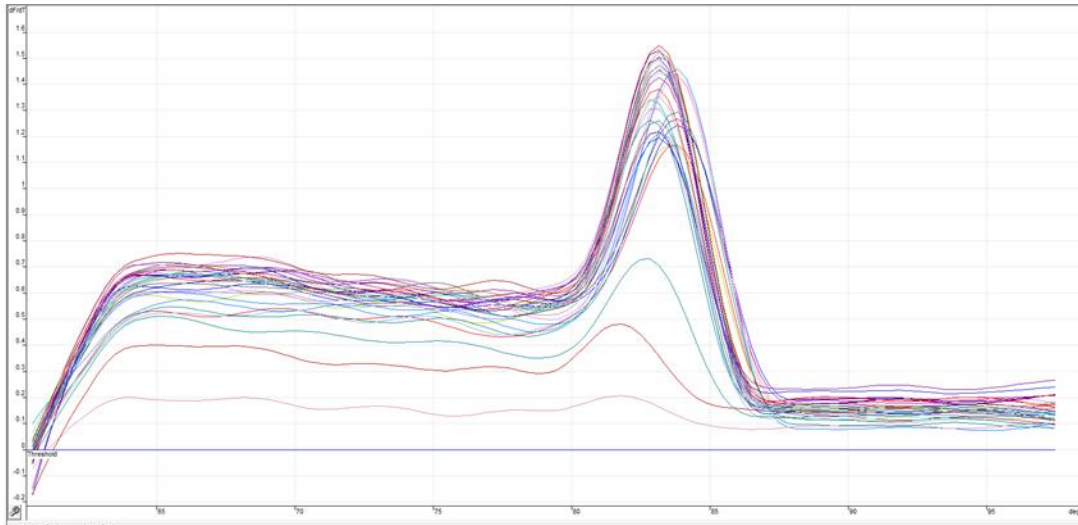


Figura 9. Curva Melt de SOD1 del tejido de Hemisferio (PCR-Tiempo Real).

Expresión génica.

El análisis de la expresión génica absoluta se realizó con el software Rotor Gene 6.0. Se consideró el punto de expresión ("Crossing Point", CP) de las curvas de calibración respectivas para cada gen incluyendo la curva del gen G6PDH, a partir de estas curvas se calculó el número de copias para cada muestra considerada por duplicado.

Para cada cálculo de la relación Gen problema/Gen endógeno se verificó que cada muestra amplificara con G6PDH, para verificar la presencia de RNA en la muestra, mediante la curva "melting" o curva de disociación.

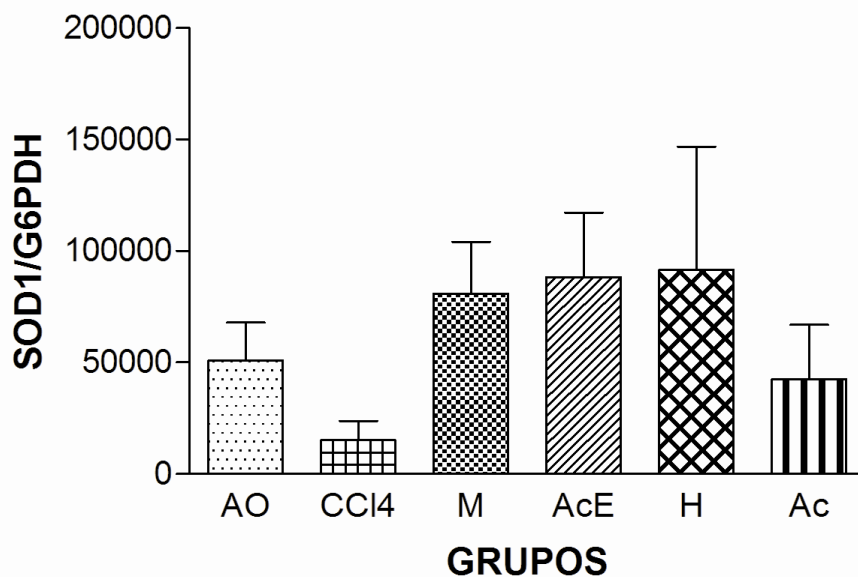
Una vez corroborado el RNA, se tomaron en cuenta los promedios del número de copias por muestra del gen correspondiente y de G6PDH, con los promedios en cada muestra se realizó la proporción Gen problema/G6PDH. Los resultados de la expresión génica absoluta en los seis grupos se muestran a continuación:

SOD1

En la gráfica 1, se muestra la expresión génica absoluta para SOD1 en corteza en los seis grupos estudiados, observando una diferencia significativa entre el nivel de expresión del grupo de CCl₄ vs todos los grupos. Por otro lado, no se observa diferencia significativa entre el grupo Acvs el grupo AO.

Entre el grupo AO vs el grupo CCl₄, se observó una diferencia significativa del nivel de expresión génica del gen SOD1.

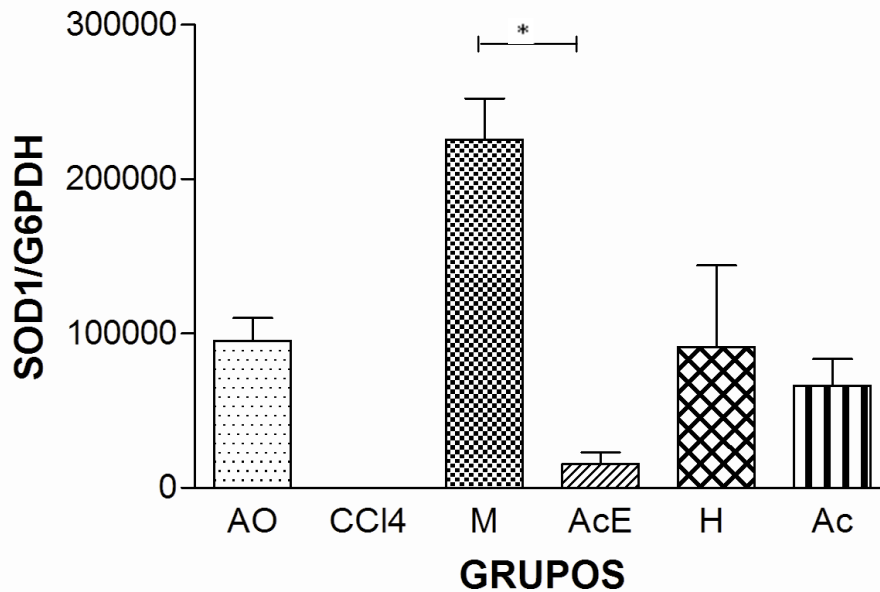
Expresión génica de SOD1 en corteza cerebral



Gráfica 1. Expresión génica absoluta de SOD1 en Corteza, para cada grupo estudiado (Aceite de oliva (AO), n= 3; Tetracloruro de carbono (CCl₄), n=4; Metanol (M), n=3; Acetato de Etilo (AcE), n=3; Hexano (H), n=3; Acuoso (Ac), n=3). Prueba estadística Kruskal Wallis p =0.2340, seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunn p <0.05, donde no se tiene diferencia estadísticamente significativa.

En la gráfica 2 se muestra la expresión génica absoluta para SOD1 en hemisferio en los seis grupos estudiados, observando una diferencia significativa entre el nivel de expresión del grupo de CCl₄ vs los cuatro extractos, incluido el AO. Por otro lado, se observa diferencia significativa entre el grupo M contra los demás grupos estudiados.

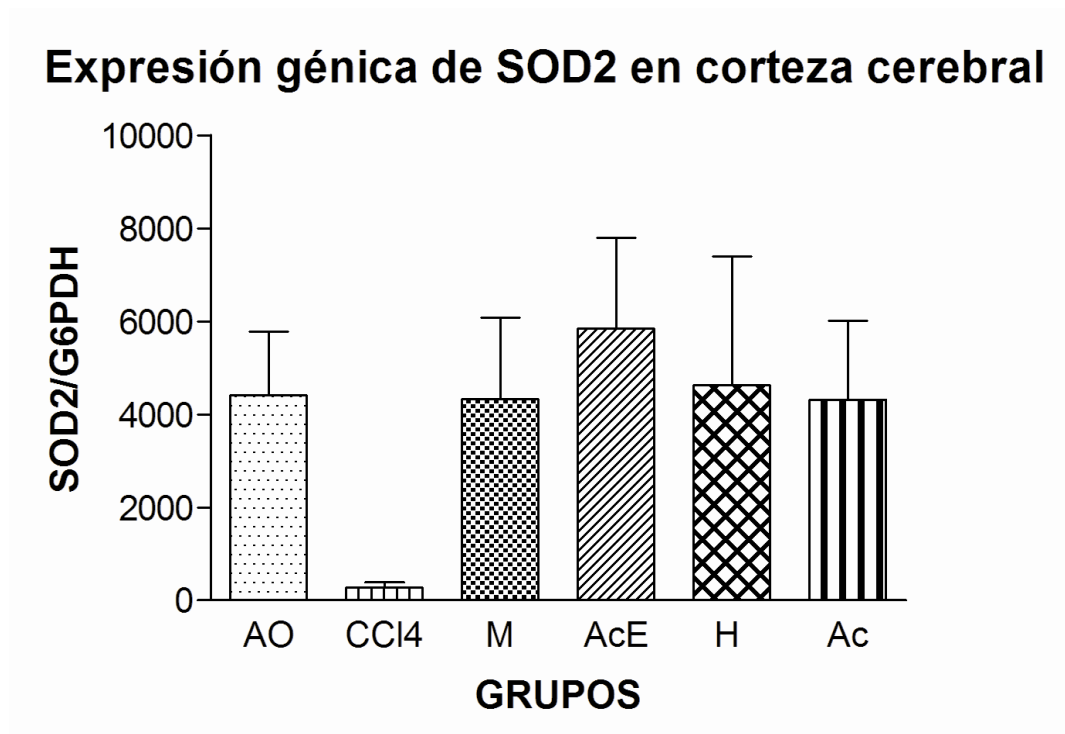
Expresión génica de SOD1 en hemisferio cerebral



Gráfica 2. Expresión génica absoluta de SOD1 en Hemisferio, para cada grupo estudiado (Aceite de oliva (AO), n= 3; Tetracloruro de carbono (CCl₄), n=4; Metanol (M), n=3; Acetato de Etilo (AcE), n=3; Hexano (H), n=3; Acuoso (Ac), n=3). Prueba estadística Kruskal Wallis $p = 0.0089$, seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunn: M vs AcE $p < 0.05$.

SOD2

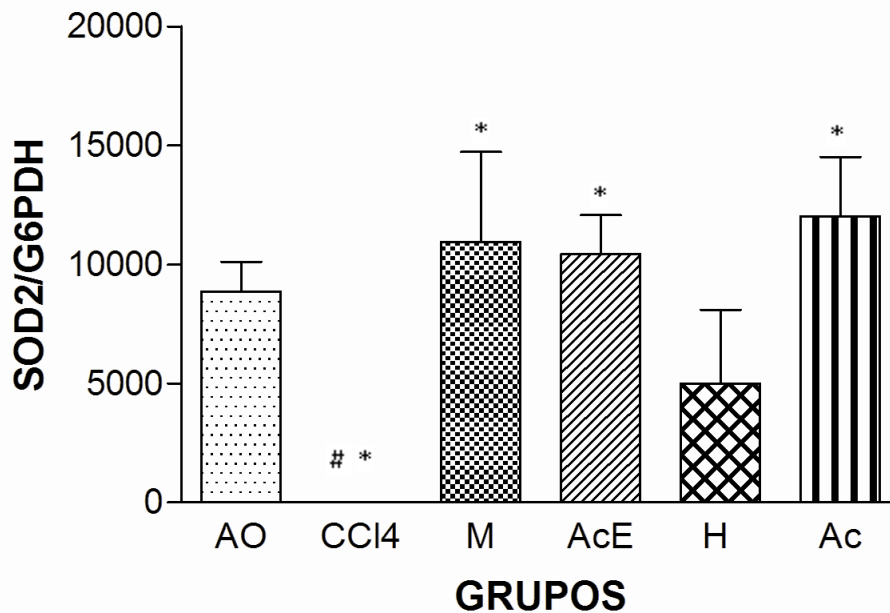
En la gráfica 3 se muestra la expresión génica absoluta para SOD2 en Corteza en los seis grupos estudiados, observando una diferencia significativa entre el nivel de expresión del grupo de CCl₄ contra los cuatro extractos y AO. Por otro lado, se observa diferencia significativa entre el grupo AcE contra los demás grupos estudiados.



Gráfica 3. Expresión génica absoluta de SOD2 en Corteza, para cada grupo estudiado (Aceite de oliva (AO), n= 3; Tetracloruro de carbono (CCl₄), n=4; Metanol (M), n=3; Acetato de Etilo (AcE), n=3; Hexano (H), n=3; Acuoso (Ac), n=3). Prueba estadística Kruskal Wallis p =0.1969, seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunn; p <0.05, donde no se tiene diferencia estadísticamente significativa.

En la gráfica 4 se muestra la expresión génica absoluta para SOD2 en Hemisferio en los seis grupos estudiados, observando una diferencia significativa entre el nivel de expresión del grupo de CCl₄ contra todos los grupos. Por otro lado, todos los extractos, excepto H presentaron diferencia significativa contra el grupo AO.

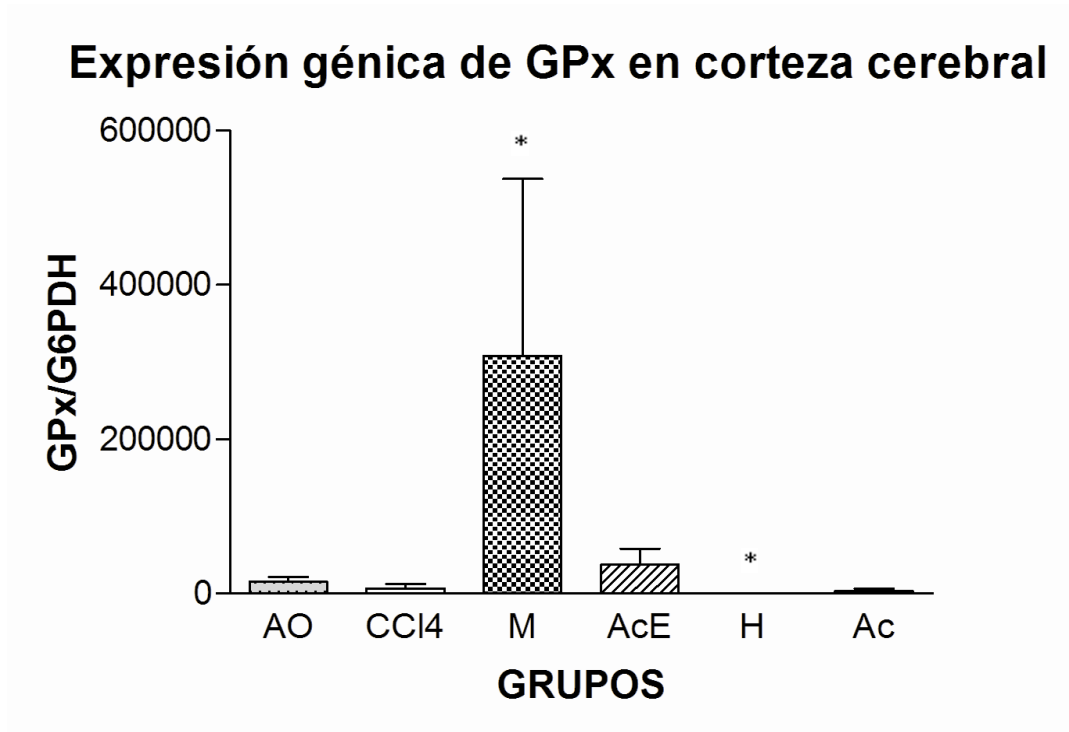
Expresión génica de SOD2 en hemisferio cerebral



Gráfica 4. Expresión génica absoluta de SOD2 en Hemisferio, para cada grupo estudiado (Aceite de oliva (AO), n= 3; Tetracloruro de carbono (CCl₄), n=4; Metanol (M), n=3; Acetato de Etilo (AcE), n=3; Hexano (H), n=3; Acuoso (Ac), n=3). Prueba estadística Kruskal Wallis p =0.0039, seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunn: CCl₄ vs AcE p <0.05, CCl₄ vs Ac p <0.05, CCl₄ vs M p <0.1.

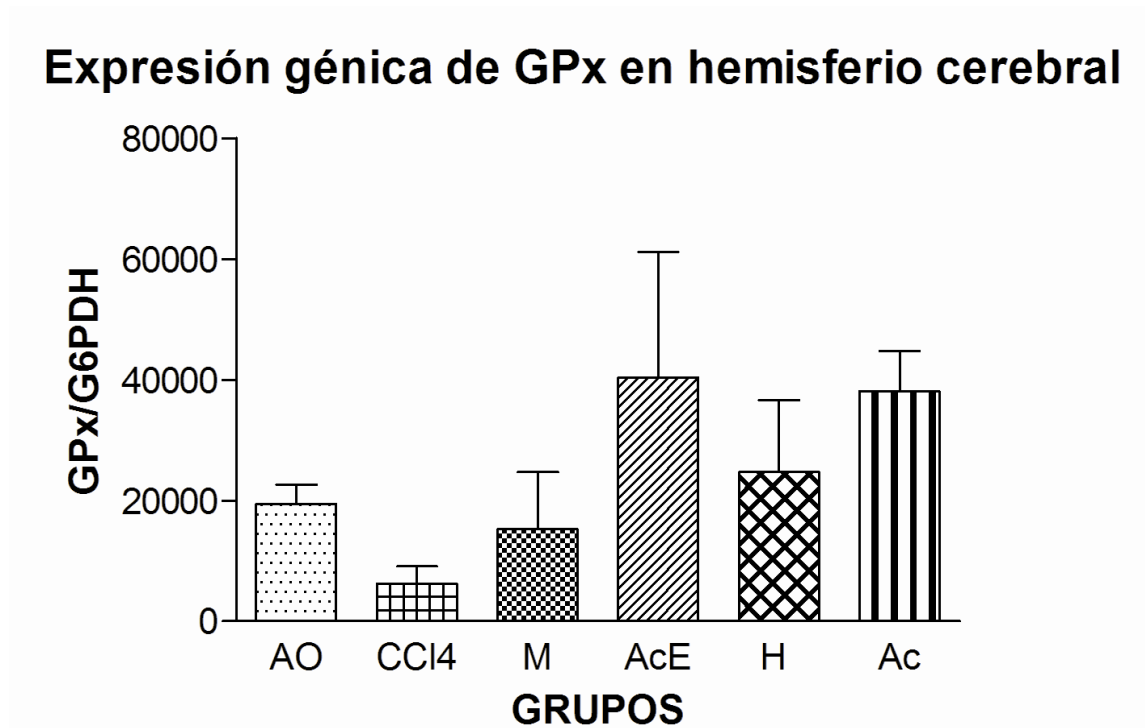
GPx

En la gráfica 5 se muestra la expresión génica absoluta para GPx en Corteza en los seis grupos estudiados, observando únicamente una diferencia significativa entre el nivel de expresión del grupo de CCl₄ AO contra M y AcE.



Gráfica 5. Expresión génica absoluta de GPx en Corteza, para cada grupo estudiado (Aceite de oliva (AO), n= 3; Tetracloruro de carbono (CCl₄), n=4; Metanol (M), n=3; Acetato de Etilo (AcE), n=3; Hexano (H), n=3; Acuoso (Ac), n=3). Prueba estadística Kruskal Wallis $p=0.0734$, seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunn: M vs H $p<0.1$.

En la gráfica 6 se muestra la expresión génica absoluta para GPx en Hemisferio en los seis grupos estudiados, observando una diferencia significativa entre el nivel de expresión del grupo de CCl₄ contra cuatro extractos. Por otro lado, no se observa diferencia significativa entre el grupo M contra el grupo AO.



Gráfica 6. Expresión génica absoluta de GPx en Hemisferio, para cada grupo estudiado (Aceite de oliva (AO), n= 3; Tetracloruro de carbono (CCl₄), n=4; Metanol (M), n=3; Acetato de Etilo (AcE), n=3; Hexano (H), n=3; Acuoso (Ac), n=3). Prueba estadística Kruskal Wallis p =0.3301, seguido de la prueba de Comparación Múltiple de Dunn; p <0.05, donde no se tiene diferencia estadísticamente significativa.

8. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo nos sugieren que el cambio en la expresión génica de las enzimas estudiadas, sugieren un efecto de protección por parte de los extractos de la *Tilia americana* en el daño inducido por CCl₄ en cerebro de rata.

En particular, se sabe que el cerebro se considera altamente sensible al daño oxidante, ya que es rico en ácidos grasos fácilmente peroxidables, y es relativamente deficiente en las defensas antioxidantes (Calderon, *et al.*, 2013). Aunque CAT y GPx comparten el mismo sustrato, GPx es más eficaz a bajos niveles de H₂O₂, mientras CAT es más eficaz en altos niveles y existe una reducción de la actividad de SOD relacionada con los altos niveles generados en esta condición (Morsy, *et al.*, 2013).

Varios estudios han demostrado que los sistemas de defensa antioxidantes naturales tienen una capacidad limitada en el cerebro en comparación con los tejidos periféricos (Szymonik-Lesiuk, *et al.*, 2003). Esto sugiere que GPx es más importante que la catalasa para la desintoxicación de H₂O₂ en el cerebro, porque el cerebro contiene pequeñas cantidades de CAT y GPx, pero también puede interactuar directamente con los peróxidos de lípidos. Estos hallazgos sugieren que el cerebro tiene diferentes mecanismos de adaptación para hacer frente al estrés oxidante que otros órganos (Szymonik-Lesiuk, *et al.*, 2003).

La posibilidad de que la actividad *in vivo* de las enzimas antioxidantes se vea obstaculizada por la estabilidad del plasma bajo o entrega inadecuada para el sitio de la lesión ha llevado a varios investigadores a utilizar, tratamientos alternos como fitofármacos para una mejora ante el estrés oxidante (Baker, *et al.*, 1997). Por lo que, hay evidencia de que el estrés oxidante es un factor relevante en la patogénesis de las principales enfermedades neurológicas incluyendo la enfermedad de Parkinson (Guimarães, *et al.*, 2009; Mejía-Toiber, *et al.*, 2009; Martínez-Lazcano, 2010), enfermedad de Alzheimer (Martínez-Lazcano, 2010; Angoa-Pérez, 2007; Dorado-Martinez, *et al.*, 2003), esclerosis lateral amiotrófica (Martínez-Lazcano, 2010; Angoa-Pérez, 2007; Rodríguez-Violante, *et al.*, 2010), así como en los casos de accidente cerebrovascular (Bernhardi, 2005; Ferrer-Viant, *et al.*, 1999), trauma (Muñoz-Céspedes,

et al., 2001; Gil, *et al.*, 2008) encefalopatías (Seyan, *et al.*, 2010; Görg, *et al.*, 2010; Samarghandian, *et al.*, 2014) y epilepsia (Fisher, *et al.*, 2005; Martinc, 2012; Azevedo de Lima, 2014).

El estrés oxidante se neutraliza eficazmente mediante acciones sincronizadas de diferentes antioxidantes celulares (como SOD, CAT, GPx, GR, GST, y GSH) en células de mamíferos (Coballase-Urrutia, *et al.*, 2013). En el caso del DNA constituye un blanco de ataque por parte de las especies reactivas de oxígeno, principalmente el ADN mitocondrial, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de especies reactivas de oxígeno provenientes de la cadena respiratoria; además, carece de histonas en su estructura lo que le resta estabilidad (Turrens, 2000). Por otra parte, se ha observado que sus mecanismos de reparación son menos eficientes. En general, dentro del espectro de alteraciones que puede sufrir el DNA se describe la oxidación de desoxirribosas, ruptura y entrecruzamientos de cadenas y la modificación de bases nitrogenadas, principalmente (Chihuailaf, *et al.*, 2001).

Nuestros resultados son la primera evidencia que sugiere un efecto modulador sobre las tres enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2 y GPx) a nivel génico inducido de forma diferencial por los extractos de *Tilia americana* (Metanol, Acetato de etilo, Hexano, Metanol). Estos hallazgos nos permiten sugerir, que los efectos de los extractos de *Tilia americana* evitan el daño en el cerebro, inducido por la administración sistémica de CCl₄, y que este efecto es diferencial dependiendo del extracto, de la estructura cerebral y de la enzima antioxidante estudiada. Cabe mencionar que estos efectos pueden ser parte del mecanismo de acción por el cual la *Tilia americana* ejerce sus efectos farmacológicos a nivel central.

Sin embargo, se desconoce el conocimiento de la posible contribución de las diferencias en el patrón de flavonoides entre inflorescencias y hojas de *Tilia* en sus propiedades terapéuticas. En estudios anteriores, la actividades como antinociceptivo y ansiolítico dependiente de la dosis, fueron demostradas después de la administración de hexano, metanol, y los extractos acuosos de inflorescencias *Tilia* (10-300 mg / kg), donde glicósidos de quercetina y kaempferol se caracterizaron como el principal compuestos activos de las inflorescencias (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2014).

Además se ha reportado que la disminución de las tres enzimas, inducida por CCl₄, se debe a la solubilidad lipídica que le permite atravesar las membranas celulares, y cuando se administra se distribuye y deposita en cerebro, lo que induce su efecto tóxico por la generación de radicales libres (Szymonik-Lesiuk, *et al.*, 2003). Esto se debe a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados y la actividad metabólica aeróbica del cerebro, el cual aumentan la susceptibilidad de este órgano a la peroxidación daño inducido por especies reactivas de oxígeno después de la ingestión CCl₄ (Szymonik-Lesiuk, *et al.*, 2003).

Además, se ha reportado que en el cerebro el contenido del citocromo P-450 y ácido araquidónico es menor que en el hígado, lo que demuestra que el sistema de defensa antioxidante tiene una capacidad limitada en este órgano (Szymonik-Lesiuk, *et al.*, 2003). Incluso el CCl₄ inhibe las enzimas, que al igual altera y/o perturba la expresión de ARN mensajero (mRNA) de los antioxidantes endógenos (Escamilla-Jiménez, *et al.*, 2009). Punitha y Rajasekaran demostraron que el tratamiento con CCl₄ reduce significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes (Yin, *et al.*, 2011). Por todo lo anterior, nuestros resultados nos permiten sugerir que el aumento en la expresión de las diferentes enzimas antioxidantes inducido por los extractos estudiados son contraparte de los efectos tóxicos inducidos por el CCl₄, al inducir estrés oxidante en cerebro.

En particular, los resultados observados en la expresión génica de la enzima SOD1, en los tejidos de corteza y hemisferio se mostró como una tendencia al incremento de la expresión génica, solo se encontró diferencia estadísticamente significativa en el tejido de hemisferio con los tratamientos de M vs AcE (sin ser los demás estadísticamente significativos), inducido por los cuatro extractos de Tilia contra el grupo de CCl₄, y de forma similar al grupo de aceite de oliva conocido por sus propiedades protectoras por su capacidad como antioxidante (El-Kholy, *et al.*, 2014).

Con respecto a la expresión génica de la enzima SOD2, en los tejidos de corteza y hemisferio también los extractos de Tilia mostraron un aumento en la expresión génica contra CCl₄ y de igual manera con el grupo de Aceite de oliva. Los únicos que

presentaron diferencia estadísticamente significativa fueron los grupos de M, AcE y Ac contra el grupo de CCl₄, en el tejido de hemisferio.

El grupo AcE en la enzima de SOD1 en hemisferio mostró una menor expresión génica contra el grupo de aceite de oliva, el cual puede estar justificado con el agotamiento de algunos elementos esenciales como el Zn y Cu que funcionan como cofactores para la enzima antioxidante y en consecuencia inhibir esta enzima (Morsy, *et al.*, 2013).

En la expresión génica de la enzima GPx, hubo variabilidad entre todos los grupos de los dos tejidos. En el tejido de Corteza solo presentaron diferencia significativa en la expresión génica los extractos de M y AcE contra los grupos de CCl₄ y Aceite de oliva. En el tejido de hemisferio todos los extractos de Tilia presentaron diferencia significativa en la expresión génica de esta enzima, contra el grupo de CCl₄. Por otro lado el único grupo que no presentó diferencia en la expresión génica contra el grupo de Aceite de oliva fue M. De esta enzima solo hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de M y H en el tejido de corteza.

En resumen estos hallazgos nos sugieren que el aumento de la expresión génica de las enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2 y GPx), en los tejidos estudiados puede ser un mecanismo que actúa como protector al daño a nivel central, que induce el CCl₄, esto se puede observar a su vez, por la misma tendencia del efecto inducido por el aceite de olivo en todas las preparaciones estudiada y el cuál es conocido con una sustancia neuroprotectora (González-Correa, *et al.*, 2007).

Todo esto podría sugerir que la Tilia está asociada con la modulación de la expresión de mRNA de las enzimas antioxidantes cerebrales, que en este caso SOD1, SOD2 tienen más éxito que GPx en ambos tejidos. Al igual estos resultados nos indican que cada disolvente contribuyo a la expresión, ya que cada uno tiene propiedades diferentes que en este caso es la polaridad.

Aunque el aumento de los niveles de mRNA de las enzimas antioxidantes no ha sido acompañado por marcadas modificaciones en las actividades enzimáticas, es importante destacar que la regulación positiva de la expresión de ARNm de todas las

enzimas evaluadas se correlacionó positivamente con la Nrf-2 de activación en la corteza y hemisferios (Roseni Mundstock Dias, *et al.*, 2014).

Nrf-2 es un factor de transcripción sensible a redox que, en la presencia de estrés oxidante puede disociarse de Keap-1 citosólica y se transloca al núcleo, donde se une al elemento de respuesta antioxidante en la región promotora de los genes que codifican las enzimas antioxidantes. Nrf-2 controla la expresión inducible de genes antioxidantes y la fase 2 de desintoxicación, que trabajan de forma sinérgica para mantener la homeostasis redox intracelular (Roseni Mundstock Dias, *et al.*, 2014). Por lo que, nosotros sugerimos que la activación Nrf-2 observada en la corteza y el hemisferio podría ser una respuesta compensatoria a eventos oxidantes inducidos por el daño derivado de la administración sistémica de CCl₄.

Por otro lado, el creciente interés en antioxidantes naturales más eficaces, menos tóxicos y de costos accesibles, han aumentado el estudio de las plantas medicinales (Lasagni-Vitar, *et al.*, 2014). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual los extractos de plantas mejoran el perfil antioxidante no está totalmente esclarecido. Algunos estudios indican que el aumento del estado antioxidante de los extractos acuosos de plantas es orquestada por la interacción con los elementos de respuesta antioxidante que regulan transcripcionalmente los genes relacionados con las enzimas antioxidantes. El creciente interés en antioxidantes naturales se ha desarrollado debido a la necesidad de efectivos antioxidantes más eficaces, menos tóxicos y de costos, y las plantas medicinales parecen tener estas ventajas deseadas (Srivastava, *et al.*, 2014; Lasagni-Vitar, *et al.*, 2014).

Tal evidencia experimental sugiere que la capacidad de los flavonoides de actuar como un antioxidante depende de su estructura molecular, del mismo modo estos efectos positivos se han atribuido a la activación de genes de supervivencia y vías de señalización, regulación de la función mitocondrial (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013).

Por otro lado, la eficacia del efecto protector de Tilia depende de las concentraciones de los flavonoides en los diferentes extractos, por la propiedad de polaridad o disolución de estos. En otros estudios se han demostrado que el metanol y el extracto acuoso son

eficaces en tratamientos contra convulsiones de tipo clónico, lo cual sugiere presencia de flavonoides tales como quercetina y isoquercetina, esto en *Tilia americana* var. *mexicana* (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013).

Con lo anterior, en los resultados obtenidos hubo una diferencia entre los extractos debido a su polaridad para extraer los metabolitos, flavonoides. Como se observó en las diferentes gráficas el metanol es uno de los que tiene un efecto mayor de los demás en las diferentes enzimas y tejidos, como se ha encontrado en diferentes estudios; después de este le sigue acetato de etilo, que al igual mantiene un efecto protector aunque en algunas ocasiones supera a metanol; los extractos hexano y acuoso cambian mucho su expresión, ya sea aumentaba o disminuía pero no mantenían su efecto en las diferentes enzimas y tejidos.

Existen numerosas evidencias que apuntan hacia la protección del DNA ejercida por los flavonoides al inhibir los efectos oxidativos que provocan las especies reactivas sobre esta biomolécula (Pérez-Trueba, 2003).

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos, otro mecanismo podrían incluir la inhibición de enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidantes, este es el caso de la fosfolipasa A2. Al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la CATy la SOD. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y DNA (Escamilla Jiménez, *et al.*, 2009; Martínez-Flórez, *et al.*, 2002; Perez-Trueba, *et al.*, 2001).

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza (Pérez-Trueba, 2003; Martínez-Flórez, *et al.*, 2002). Como lo son quercetina y kaempferol presentes en los extractos de *T. americana* (Pérez-Ortega, *et al.*, 2008; Aguirre-Hernández, *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha reportado que las plantas *Terminalia catappa L.* y *Solanum melongense* están compuestas de flavonoides con actividad antioxidante en presencia de los efectos de daño inducidos por CCl_4 en cerebro de rata, y además estos son capaces de aumentar las concentraciones (sangre, hígado, riñón y músculo) de enzimas antioxidantes (GSH y CAT) en ratas normales y alimentadas con colesterol (Calderón, *et al.*, 2013; Perez-Trueba, *et al.*, 2001).

Sin embargo, debido a los limitados estudios hasta la fecha, la eficacia y los efectos secundarios de los antioxidantes naturales para el tratamiento de enfermedades del SNC aún no se han determinado. Hasta la fecha, se ha avanzado poco en el estudio de la terapia génica para prevenir el daño oxidativo, y los ensayos clínicos, por lo tanto son necesarios para la exploración adicional de esta cuestión (Cárdenas-Rodríguez, *et al.*, 2013).

En cada uno de los extractos como se describe en la metodología se administraron con aceite de oliva como vehículo, el cual pudo que haya ayudado a la expresión de cada uno de los extractos, ya que como se ha mencionado el aceite de oliva es uno de los protectores de excelencia contra estrés oxidante. Para lo cual se sugiere para posteriores investigaciones optar por tener un grupo de ratas sin tratamientos para así contrarrestar el efecto que pueda dar el vehículo que se utilice, que en nuestro caso fue aceite de oliva, y así tener resultados óptimos acerca de las extracciones y visualizar su efecto y proponer dosis para una mejoría contra estrés oxidante.

Para lo cual se sugiere para posteriores investigaciones optar por tener un grupo de ratas sin tratamientos para así contrarrestar el efecto que pueda dar el vehículo que se utilice, que en nuestro caso fue aceite de oliva, y así tener resultados óptimos acerca de las extracciones y visualizar su efecto y proponer dosis para una mejoría contra estrés oxidante

9. Conclusiones

Se evaluó el efecto protector de los diferentes extractos, los cuales fueron: Metanol, Acetato de Etilo, Hexano y Acuoso de la *T. americana* mediante la expresión génica de las enzimas SOD1, SOD2 y GPx. Esto en las secciones cerebrales de corteza y hemisferio, en el cual se indujo un daño mediante CCl₄, causando así un estrés oxidante.

El aumento de la expresión génica de SOD1, SOD2 y GPx, sugiere que los extractos de la *T. americana* tiene un efecto protector por el daño de estrés oxidante en las regiones de corteza y hemisferio cerebral. Esto puede deberse a sus metabolitos, en este caso los flavonoides (quercetina y kaempferol), los cuales actúan como antioxidantes naturales, ya sea como atrapadores de radicales libres o promotores de estas enzimas antioxidantes. La expresión génica de los extractos de Tilia es similar a los observados del aceite de oliva, el cual es considerado un neuroprotector por excelencia.

Algo que no tomamos totalmente en cuenta fue la influencia del aceite de oliva sobre los extractos, el cual haya aportado mayor protección y así potencializando el efecto de los extractos que se utilizaron. Con esto que haya modificado los resultados verdaderos que se buscaban con relación a los extractos. Para comprobar esto se podría modificar la experimentación metiendo una rata blanco para delimitar lo anterior dicho.

Con referente a los extractos hubo diferencias entre ellos, por las diferentes propiedades que tienen, en este caso la polaridad, para obtener los metabolitos requeridos para el efecto antioxidante que se buscaba. Como se observó se modificaron las expresiones en cada uno de ellas.

Esto nos permite sugerir que la *T. americana* puede ser utilizada como un fitofármaco complementario de la terapia de fármacos, en enfermedades relacionadas con estrés oxidante en cerebro.

10. Anexo

Materiales

Se utilizaron los siguientes materiales durante la parte experimental:

Cuadro 7. Materiales

Homogenizador	Tubos para PCR de 100 μ L (con respectivas tapas)
Vidrio de reloj	Tubos de 0.6 μ L
Bisturíes	Tubos Eppendorff de 1.5 mL
Tubos Falcon de 50 mL	Placa metálica para tubos de PCR de 100 μ L
Hielera	Gasa estéril
Tubos Eppendorff de 1.5 mL	Marcadores indelebles
Micropipetas (10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L)	Puntas para micropipetas (10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L)
Placa de ELISA negra	Gradillas para tubos de 0.2 μ L, 0.6 μ L, 1.5 μ L y 2 μ L

Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos durante la parte experimental:

Cuadro 8. Reactivos

Agua destilada estéril	Agarosa
Agua molecular estéril	Bromuro de etidio
Trizol	Alcohol al 75%
Cloroformo grado molecular	TBE al 0.5%
Isopropanol grado molecular	Buffer de corrimiento
Alcohol grado molecular 75%	Buffer de carga
Agua free, libre de DNAsas, RNAsas y nucleasas	Marcador de peso molecular
Picogreen	KapaBiosystems

Equipos

Se utilizaron los siguientes equipos durante la parte experimental:

Cuadro 9. Equipos

Centrífuga refrigerada Eppendorf	Refrigerador de 4°C
Balanza granataria	Congelador de -20°C
Horno de microondas	REVCO de -80°C
Cámara de electroforesis con peines	Fotodocumentador
Fuente de poder	Rotor-Gene

11. REFERENCIAS

1. **Acuña-Castroviejo D**, Escames G, López LC, Ortiz F, López A, García JA. (2009). Evidencias de la utilidad de la melatonina frente al envejecimiento y los procesos neurodegenerativos. *Psicogeriatría*. 1:3-21.
2. **Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR)**. (2005). Resumen de salud pública tetracloruro de carbono. Departamento de salud pública y servicios humanos de los EE.UU. Cas#56-23-5.
3. **Aguirre HE**, Martínez AL, González-Trujano ME, Moreno J, Vibrans H, Soto-Hernández M. (2007). Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. *americana* var. *mexicana* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 109(1):140-5.
4. **Aguirre-Hernández E**, González-Trujano ME, Martínez AL, Moreno J, Kite G, Terrazas T, Soto-Hernández M. (2010). HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*. 127(1):91–97.
5. **Angoa-Pérez MA**, Rivas-Arancibia. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia?. *Arch Neurocién*. 12(1):45-54.
6. **Avilés MD**. (2008). Efecto antidepresivo y caracterización química de extractos de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana* (Tesis de Maestría) México. Instituto Politécnico Nacional.
7. **Azevedo de Lima P**, Pereira de Brito-Sampaio L, Teixeira-Damasceno NR. (2014). Neurobiochemical mechanisms of a ketogenic diet in refractory epilepsy. *CLINICS*. 69(10): 699-705.
8. **Barbosa KBF**, Bressan J, Zulet MA, Martínez JA. (2008). Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *An. Sist. Sanit. Navar*. 31(3): 259-280.

9. **Benítez-Zequeira DE.** (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 25(2).
10. **Bernhardi MR.** (2004). Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis? *Revista chilena de neuro-psiquiatría.* 42(4):281-292.
11. **Bernhardi MR.** (2005). Envejecimiento: Cambios bioquímicos y funcionales del sistema nervioso central. *Revista chilena de neuro-psiquiatría.* 43(4):297-304.
12. **Calderón A,** Torres P, Pretel O. (2013). Efecto del extracto hidroalcoholico de *Terminalia catappel* (Combretaceae) sobre radicales libres inducidos en cerebro de rata. *The Biologist (Lima).* 11(2):267-275.
13. **Calderón-Guzmán D,** Bratoeff E, Ramírez-López EG, Cabeza-Salinas C, Norma Osnaya B, García-Álvarez R, Hernández-García E. (2007). Efecto antioxidante de nuevo esteroide sintético (4-cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona) en cerebro de ratas adultas. *Arch Neurocién (Mex).* 12(2):95-99.
14. **Cañas-Fernández N.** (2008). Efecto neuroprotector del condroitin sulfato en modelos de isquemia y neuroinflamación. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.
15. **Cárdenas-Rodríguez N,** Huerta-Gertrudis B, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, Bandala C, Carmona-Aparicio L, Coballase-Urrutia E. (2013). Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. *International journal of molecular sciences.* 14(1):1455-1476.
16. **Cárdenas-Rodríguez N,** González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E, Ruíz-García M, Sampieri III A, Coballase-Urrutia E, Carmona-Aparicio L. (2014). Anticonvulsant and Antioxidant Effects of *Tilia americana* Var. mexicana and Flavonoids Constituents in the Pentylene-tetrazole-Induced Seizures. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Vol.2014:1-10.

17. **Carmona-Aparicio L**, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Rodríguez-Chavez JL, Coballase-Urrutia E. (2013). *Hetherotheca inuloides* (arnica) a potent antioxidant, effects as neuro and hepato-protective. En: "Medicinal Plants: Antioxidant Properties, Traditional Uses and Conservation Strategies / Chapter 8", Nova Science Publishers. 1-15.
18. **Carmona-Aparicio L**, Ortega-Cuellar D, González-Trujano ME, Rodríguez-Chávez JL, Sampieri All, Floriano-Sánchez E, Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E. (2014). Antioxidant and cytotoxicity effects of ethyl acetate extract of *Tilia americana* L. var. *mexicana*. Journal of Food Agricultural and Enviroment. 12(2): 78-81.
19. **Casanova-Sotolongo P**, Casanova-Carrillo P, Casanova-Carrillo C. (2002). Toxoplasmosis cerebral durante la infección por el virus de inmunodeficiencia humana. Revista Cubana de Medicina. 41(5):297-302.
20. **Chávez-Morales RM**, Rodríguez-Vázquez ML, Martínez-Saldaña, Posada del Rio FA, Reyes-Romero MA, Jaramillo-Juárez F. (2006). Análisis del efecto preventivo del Ginkgo biloba sobre el daño hepático funcional y estructural producido por el tetracloruro de carbono. Segundo congreso estatal "La investigación en el posgrado". Aguascalientes. pp. 1.
21. **Cheng Y**, Morshed R, Auffinger B, Tobias AL, Lesniak MS. (2014). Multifunctional nanoparticles for brain tumor diagnosis and therapy. Adv Drug Deliv Rev. 66:42–57.
22. **Chihuailaf RH**, Contreras PA, Wittwer FG. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. Vet. Méx. 33(3):265-283.
23. **Coballase-Urrutia E**, González-Trujano ME, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Montesinos-Correa H, Carmona-Aparicio L. (2013). *Tilia americana* var. *mexicana*: a species with high antioxidant potential. Journal of Neurochemistry. 125: 177.

24. **Díaz-Rubio E**, García-Conde J. (2000). Oncología clínica básica. 1ªed. Ed Arán. España. pp. 754.
25. **Donnersberger AB**, Lesak AE. (2002). Libro de laboratorio de anatomía y fisiología. 1ªed. Ed. Paidotribo. Barcelona (España). pp. 514
26. **Dorado-Martínez C**, Rugerio-Vargas C, Rivas-Arancibia S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. 46(6):229-235.
27. **El-Kholy TA**, Abu Hilal M, Al-Abbadi HA, Serafi AS, Al-Ghamdi AK, Sobhy HM, Richardson JR. (2014). The effect of extra virgin olive oil and soybean on DNA, cytogenicity and some antioxidant enzymes in rats. *Nutrients*. 6(6): 2376-86.
28. **Elejalde-Guerra J**. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. An. Med. Interna Madrid. 18(6):326-335.
29. **Erazo-Torricelli R**. (2009). Síndrome de Guillain Barré en pediatría. Medicina (Buenos Aires). 69(1):84-91.
30. **Escamilla-Jiménez CI**, Cuevas-Martínez EY, Guevara-Fonseca J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM. 52(2):73-75.
31. **Escobar-Izquierdo A**. (2001). Envejecimiento cerebral normal. Revista Mexicana de Neurociencia. 2(4):197-202.
32. **Fernández-Viladrich P**, Cabellos-Minguez C. (2005). Infecciones del sistema nervioso central. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Buenos Aires, Madrid. Editorial Médica Panamericana. pp.343-361.
33. **Ferrer-Viant D**, Fonseca CJ, Cutiño-Clavel Ileana, García-Rodríguez RE, Arce-Gómez DL. (1999). Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal. Medisan. 3(3):5-11.
34. **Fisher RS**, van Emde BW, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel Jr. (2005). Epilepsia. 46(4):470-472.

35. **Furukawa S**, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Mokishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*. 114(12):1752.
36. **García-Salmán JD**, García-Jiménez TE, Menéndez-Castillo R, Buznego-Rodríguez MT. (1996). *Rev Cubana Plant Med*. 1(2):27-30.
37. **Gil N**, Gómez JC, Gómez A. (2008). Radicales libres y lesión cerebral. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*. 49(2):231-242.
38. **Goldkorn T**, Filosto S, Chung S. (2014). Lung injury and lung cancer caused by cigarette smoke-induced oxidative stress: molecular mechanisms and therapeutic opportunities involving the ceramide-generating machinery and epidermal growth factor receptor. *Antioxidants & Redox Signaling*. 21(15):2149-2174.
39. **González-Fraguela ME**, Fernández I, Bauza JY. (2007). Indicadores de estrés oxidativo en cerebros de ratas viejas con déficit cognitivo. *Biotechnol Apl*. 24:145-50.
40. **González-Correa JA**, Muñoz-Marín J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, López-Villodres JA, De La Cruz JP. (2007). Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids*. 42(10): 921-9.
41. **Görg B**, Qvartrkhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D. (2010). Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 52(1): 256-265.
42. **Guimarães JS**, Freire MAM., Lima RR, Souza-Rodrigues RD, Cost AMR, dos Santos CD, Picanço-Diniz CW, Gomes-Lea WI. (2009). Mecanismos de degeneración secundaria en el sistema nervioso central durante los trastornos neuronales agudos y el daño en la sustancia blanca. *Rev. Neurología*. 48(6): 304-310.

43. **Gutiérrez C.** (2004). Principios de Anatomía, fisiología e higiene: Educación para la salud. Ed. Limusa. México. pp. 312.
44. **Halliwell B.** (2014). Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J.* 37(3): 99-105.
45. **Jiménez-Castellanos JB,** Catalina-Herrera CJ, Carmona AB. (2002). Neuroanatomía. Anatomía Humana General. Universidad de Sevilla. pp.221.
46. **Jordán J.** (2003). Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *Offarm.* 22(3).
47. **Kaila K,** Ruusuvuori E, Seja P, Voipio J, Puskarjov M. (2014). GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Current opinion in neurobiology.* 26:34-41.
48. **Laguna del Estal P.** (2000). Complicaciones del herpes zoster. *Emergencias.* 12:S19-S28.
49. **Lasagni-Vitar RM,** Reides CG, Ferreira SM, Llesuy SF. (2014). The protective effect of *Aloysia triphylla* aqueous extracts against brain lipid-peroxidation. *Food Funct.* 5(3):557-63.
50. **Martinc B,** Grabnar I, Vovk T. (2002). The role of reactive species in epileptogenesis and influence of antiepileptic drug therapy on oxidative stress. *Current Neuropharmacology.* 10(4):328-243.
51. **Martínez AL,** González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E, Moreno J, Soto-Hernández M, López-Muñoz FJ. (2009). Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology.* 56(2): 564-571.
52. **Martínez-García L,** Tacoronte-Morales JE, Nuñez-Figueroa Y, Montalbán M, Cabrera-Suárez RH. (2007). Potencial terapéutico de los cannabinoides como neuroprotectores. *Revista Cubana de Farmacia.* 41(3):1-11.

53. **Martínez-Flórez S**, González-Gallego J, Culebras JM. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17(6):271-278.
54. **Martínez-Lazcano JC**, Boll-Woehrlen MC, Hernández-Melesio MA, Rubio-Osornio M, Sánchez-Mendoza MA, Ríos C. (2010). Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. *Mensaje Bioquím*. 34:43-59.
55. **Medina MI**, López N, Pérez GE. (2003). Infecciones comunes del sistema nervioso central en adultos. *Guía Neurológica*. Bogotá: Ediciones ANC. 5:151-165.
56. **Medline plus**. 25-Ene-2015. Available at: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19080.htm
57. **Mejía-Toiber J**, Castillo CG, Giordano M. (2009). Terapia celular y terapia génica ex vivo: avances en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. *Rev Neurol*. 49(9):483-489.
58. **Mesejo A**, Juan M, Serrano A. (2008). Cirrosis y encefalopatía hepáticas: consecuencias clínico-metabólicas y soporte nutricional. *Nutr Hosp*. 23(2):8-18.
59. **Moore KL**, Dalley AF, Agur AM. (2007). Anatomía con orientación clínica. 5ªed. Ed. Médica Panamericana. México. pp. 1208
60. **Morsy GM**, Abou El-Ala KS, Ali AA. (2013). Studies on fate and toxicity of nanoalumina in male albino rats: oxidative stress in the brain, liver and kidney. *Toxicol Ind Health*. Vol.2013: 1-15.
61. **Muñoz-Céspedes JM**, Paúl-Lapedriza N, Pelegrín-Valero C, Tirapu-Ustarroz J. (2001). Factores de pronóstico en los traumatismos craneoencefalicos. *Rev Neurología*. 32(4):351-364.
62. **Núñez-Sellés AJ**. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*. 37:644-660.

63. **Puelles-López L**, Martínez-Peréz, S, Martínez de la Torre M. (2008). Neuroanatomía. Ed. Médica Panamericana. Madrid (España). pp.418.
64. **Peinado MA**, Del Moral ML, Esteban FJ, Martínez-Lara E, Siles E, Jiménez A, Hernández-Cobo R, Blanco S, Rodrigo J, Pedrosa JA. (2000). Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol.* 31(11):1054-1065.
65. **Pérez-Calix E**. (2009). Flora del bajío y de regiones adyacentes. *Hardin, Syst. Bot.* 15:45.
66. **Pérez-Gastell PL**, Pérez de Alejo JL. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar.* 29(3):192-198.
67. **Pérez-Ortega G**, Guevara-Fefer P, Chávez M, Herrera J, Martínez A, Martínez AL, González-Trujano ME. (2008). Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico. *J Ethnopharmacol.* 116(3): 461-8.
68. **Pérez-Trueba G**, Martínez-Sánchez G. (2001). Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerense.* 20(4):297-306.
69. **Pérez-Trueba G**. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 22(1):48-57.
70. **Prestegui-Martel B**. (2013). Expresión génica y actividad enzimática de enzimas antioxidantes en tejido de cáncer de mama de pacientes de la clínica de especialidades de la mujer. (Tesis de Maestría) México. Instituto Politécnico Nacional.
71. **Pita-Rodríguez G**. (1997). Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 11(1):46-57.
72. **Ramos-Ibarra ML**, Batista-González CM, Gómez-Meda BC. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud.* 8(1):7-15.

73. **Rawal AK**, Muddeshwar MG, Biswas SK (2004). *Rubia cordifolia*, *Fagonia cretica* linn and *Tinospora cordifolia* exert neuroprotection by modulating the antioxidant system in rat hippocampal slices subjected to oxygen glucose deprivation. *BMC complementary and alternative medicine*. 4(1):11.
74. **Rodríguez-Rodríguez E**, Perea JM, López-Sobaler AM, Ortega RM. (2009). Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutr Hosp*. 24(4):415-421.
75. **Rodríguez-ViolanteM**, Cervantes-Arriaga A, Vargas-Cañas S, Corona T. (2010). Papel de la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas. *Arch Neurocién (Mex)*. 15(1):39-46.
76. **Romero A**, Cabaleiro T, Caride A, Lafuente A. (2008). Posible papel protector de la melatonina frente a la toxicidad neuroendocrina inducida por cadmio. *Rev. Toxicol*. 25:3-11.
77. **Roseni Mundstock Dias G**, Medeiros Golombieski R, de Lima Portella R, Pires do Amaral G, Antunes Soares F, Teixeira da Rocha JB, Wayne Nogueira C, Vargas Barbosa N. (2014). Diphenyl Diselenide Modulates Gene Expression of Antioxidant Enzymes in the Cerebral Cortex, Hippocampus and Striatum of Female Hypothyroid Rats. *Neuroendocrinology*. 100(1):45-59.
78. **Rowley S**, Patel M. (2013). Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radic Biol Med*. 62:121–131.
79. **Salamano R**, Gervaz E, Mañana G, Peña S, Panuncio A, Puppo C, Mesa P, Legnani C, Sabaris A, Azambuja C. (2001). Encefalitis a citomegalovirus en un Paciente inmunocompetente: Análisis clínico, neuropatológico y ultraestructural. *Arq Neuropsiquiatr*. 59(4):954-958.
80. **Samarghandian S**, Azimi-Nezhad M, Samini F. (2014). Ameliorative effect of saffron aqueous extract on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress on diabetic encephalopathy in streptozotocin induced experimental diabetes mellitus. *BioMed Research International*. Volume 2014:12.

81. **Sanchez-Valle V**, Mendez-Sanchez N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidante y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex.* 20(3): 161-168.
82. **Segovia de Arana JM**, Mora-Teruel F. (2002). Enfermedades neurodegenerativas. Serie científica (Farmaindustria). Madrid. pp.8.
83. **Segura T**, Galindo MF, Rallo-Gutiérrez B, Ceña V, Jordán J. (2003). Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol.* 36(11):1047-1057.
84. **Selema de la Morena G**, Martínez-Pérez J. (1999). Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide Astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. *Rev Cubana Plant Med.* 1(4): 36-9.
85. **SeyanAS**, Hughes RD, Shawcross DL. (2010). Changing face of hepatic encephalopathy: Role of inflammation and oxidative stress. *World J Gastroenterol.* 16(27): 3347-3357.
86. **Shors T.** (2009). *Virus: estudio molecular con orientación clínica.* 1ªed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. pp.668.
87. **Snell RS.** (2007). *Neuroanatomía clínica.* 6ª ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires (Argentina). pp.612.
88. **Srivastava A**, Shivanandappa T. (2014). Prevention of hexachlorocyclohexane-induced neuronal oxidative stress by natural antioxidants. *Nutr Neurosci.* 17(4): 164-71.
89. **Szymonik-Lesiuk S**, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Madro A, Celinski K, Wielosz M. (2003). Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 10:309–315.
90. **Thannickal VJ**, Fanburg BL. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 279(6):L1005-L1028.

91. **Tortora GJ**, Derrickson B. (2006). Principios de anatomía y fisiología. 11^a ed. Ed. Médica Panamericana. Madrid (España). pp.1300.
92. **Turrens JF**. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. The Journal of physiology. 552(2): 335-344.
93. **Vargas-Caraveo A**. (2009). Respuesta antioxidante inducida por quercetina en los linfocitos humanos circulares. (Tesis de Maestría) México. Instituto Politécnico Nacional.
94. **Venereo-Gutiérrez JR**. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de medicina militar. 31(2):126-133.
95. **Voley-Gómez M**. (2004). Epilepsia del lóbulo temporal mesial: fisiopatología, características clínicas, tratamiento y pronóstico. Rev Neurol. 38(7):663-667.
96. **Waldbaum S**, Patel M. (2010). Mitochondrial oxidative stress in temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 88(1): 23-45.
97. **Wang GS**, Eriksson LC, Xia L, Olsson J, Stål P. (1999). Dietary iron overload inhibits carbon tetrachloride-induced promotion in chemical hepatocarcinogenesis: effects on cell proliferation, apoptosis, and antioxidation. J Hepatol. 30(4): 689-98.
98. **Yin G**, Cao L, Xu P, Jeney G, Nakao M, Lu Ch. (2011). Hepatoprotective and antioxidant effects of Glycyrrhiza glabra extract against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatocyte damage in common carp (Cyprinus carpio). Fish Physiol Biochem. 37:209-216.
99. **Zarranz JJ**, Losada JM. (2007). Enfermedades por priones. Jano: Medicina y humanidades. (1.666):29-32.
100. **Zulet MA**, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez JA. (2007). Biomarcadores del estado inflamatorio: nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. Nutr Hosp. 22(5):511-27.