



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO DEL EXTRACTO
ACETÓNICO DE *Heterotheca inuloides*, POR LA
ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO KAÍNICO EN UN MODELO
ANIMAL

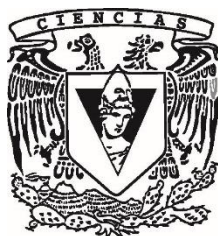
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OMAR NARVAEZ DELGADO



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELVIA COBALLASE URRUTIA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

<p>1. Datos del alumno Narvaez Delgado Omar 044 55 35785516 Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias Biología. 310296085</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Coballase Urrutia Elvia Instituto Nacional de Pediatría Laboratorio de Neuroquímica</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Aguirre Hernández Eva Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias Departamento de Ecología y Recursos Naturales</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 M. en C. Rufino González Yadira Instituto Nacional de Pediatría Laboratorio de Parasitología Experimental</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Biól. Estrada Rojo Francisco Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Departamento de Fisiología</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dra. González Trujano María Eva Instituto Nacional de Psiquiatría Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Determinación del efecto biológico del extracto acetónico de <i>Heterotheca inuloides</i>, por la administración de ácido kainico en un modelo animal 2017 48 pp.</p>

Agradecimientos

Por el apoyo al proyecto 016/2014/INP, y a los fondos federales 2015, para apoyo de la realización del mismo.

Al Dr. Guillermo Delgado L. del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por la donación del extracto.

A mis padres, hermanos y a toda mi familia por el cariño y apoyo que me han brindado, ya que siempre se han interesado en mi desarrollo personal y formación académica.

A Rocío por el apoyo y motivación para ser un mejor estudiante y persona, quien siempre me acompaña en desvelos, dando consejos e impulsando a cumplir todas las metas.

A la Dra. Elvia Coballase por el tiempo, trabajo y paciencia, ya que ha sido fundamental en este trabajo y mi formación como investigador.

Además, agradezco a mis compañeras Natalia, Monse, Paulina y Tere, quienes me apoyaron con sus opiniones, sugerencias y esfuerzo durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Eva Aguirre, Dra. Eva González, M. en C. Yadira Rufino y al Biól. Francisco Estrada por sus observaciones y sugerencias en este trabajo.

A las profesoras y profesores de la universidad, especialmente a Eva Aguirre, Itzel Ramírez, Juan Pérez, Violeta Méndez, Susana Valencia, Irene Sánchez, Noé Pacheco, Liliana Carmona, Norma López de quienes he aprendido tanto y me siento honrado de haber sido alumno, ya que siempre han mostrado dedicación y compromiso por la docencia y así transmitir de la mejor manera el conocimiento y gusto por éste.

A mis amigos y amigas por sus consejos y pláticas que de una u otra manera me han impulsado a ser una mejor persona.

CONTENIDO

i. ABREVIATURAS

ii. RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DE *Heterotheca inuloides* Cass.

2.1.1. Características generales

2.1.2. Fitoquímica

2.1.3. Efectos biológicos

2.2. ESPECIES REACTIVAS Y ESTRÉS OXIDANTE

2.2.1. Sistemas antioxidantes

2.2.2. Marcadores bioquímicos de estrés oxidante

2.2.3. Lipoperoxidación

2.2.4. Excitotoxicidad

2.2.5. Participación de los radicales libres en la fisiopatología de las enfermedades del SNC

2.3. ÁCIDO KAÍNICO

2.3.1. Generalidades

2.3.2. Efectos biológicos y participación del estrés oxidante inducido por AK

3. PLANTEAMIENTO

4. JUSTIFICACIÓN

5. HIPÓTESIS

6. OBJETIVO GENERAL

7. OBJETIVOS PARTICULARES

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Identificación y colecta de *Heterotheca inuloides*

8.2 Obtención del extracto acetónico

8.3 Reactivos

8.4 Sujetos experimentales

8.5 Tratamiento

8.6 Homogenados

8.7 Determinación de proteínas

8.8 Determinación de lipoperoxidación

8.9 Estadística

9. RESULTADOS

9.1 Hígado

9.2 Riñón

9.3 Cerebro

9.3.1 Hemisferios

9.3.2 Corteza

9.3.3 Cerebelo

9.3.4 Médula

10. DISCUSIÓN

11. CONCLUSIÓN

12. PERSPECTIVAS

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

i. ABREVIATURAS

AD – Ácido domoico

ADP - Adenosín difosfato

AK – Ácido kaínico

DNA por sus siglas en inglés – Ácido desoxirribonucleico

ER – Especies reactivas

ERO – Especies reactivas de oxígeno

ERN – Especies reactivas de nitrógeno

MDA – Malondialdehído

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido

RM – Resonancia magnética

RSE - Resonancia del spin electrónico

SNC – Sistema nervioso central

LDL por sus siglas en inglés - Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

PUFA's por sus siglas en inglés - Ácidos grasos poliinsaturados

4-HNE - 4-hidroxinonenal

ii. RESUMEN

El uso de plantas medicinales es una práctica utilizada desde las primeras civilizaciones. En México debido a su riqueza biológica y diversidad cultural, el uso de plantas con propósito medicinal es una actividad que está muy arraigada, a la cual se asocian efectos antiinflamatorios, digestivos, antinecróticos, neuroprotectores, entre otros, por sus propiedades químicas. Una de estas especies medicinales es *Heterotheca inuloides* en la cual se ha observado que el extracto acetónico produce efectos protectores al daño inducido por estrés oxidante.

En este trabajo se determinó el efecto del extracto acetónico obtenido a partir de las inflorescencias de *Heterotheca inuloides* Cass, sobre la lipoperoxidación en diferentes tejidos de rata en un modelo prooxidante inducido por la administración intraperitoneal de ácido kaínico. Para ello se utilizaron ratas macho (Wistar, 180-220 g) se formaron 6 grupos experimentales, se evaluó la lipoperoxidación mediante la generación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en cerebro (corteza, hemisferio, cerebelo y médula), hígado y riñón, en presencia y ausencia del extracto acetónico [E.Ac; 100 mg/Kg; v.o.], y con la administración de ácido kaínico (AK) [10 mg/Kg; i.p.]. Los resultados fueron analizados mediante una ANOVA seguida por una prueba de Dunnett ($p < 0.05$). La administración del extracto acetónico previo al AK mostró un decremento significativo en los niveles de malondialdehído (MDA) en hígado (43.86%), riñón (50.44%), hemisferio (62.72%), corteza (78.33%), cerebelo (80.74%) y médula (61.64%). A partir de estos resultados se propone que el extracto acetónico puede ejercer efectos como antioxidante y neuroprotector. Lo anterior podría ser debido a diferentes mecanismos tales como, la relación estructura-función de los metabolitos al ser capaces de donar electrones, quelar metales y atrapar especies reactivas e inhibir la producción de óxido nítrico, modular la entrada del ion cloruro al actuar sus diferentes flavonoides sobre el receptor GABA_A. Por lo que se propone que el extracto acetónico de *H. inuloides* puede ser una alternativa para el tratamiento de distintas enfermedades asociadas al estrés oxidante.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas con propósitos medicinales es una práctica ampliamente distribuida a nivel mundial, debido a sus diversos efectos como anti-inflamatorio, antioxidante, digestivas, antinecrótico, neuroprotector, hepatoprotector, entre otros. Esta actividad biológica al tratamiento de distintas enfermedades es debido a los fitoquímicos presentes en las plantas, los cuáles son investigados y obtenidos en una primera aproximación por medio de extractos realizados en medios acuosos o de compuestos orgánicos como metanol, acetato, hexano, entre otros.

Heterotheca inuloides es una planta con uso en la medicina tradicional y en la cual se ha observado que el extracto acetónico puede ejercer efectos como hepatoprotector, antioxidante, antiinflamatorio e inhibidor de la producción de óxido nítrico.

Por otro lado, el estrés oxidante es un proceso en el cual ocurre un desbalance entre las especies reactivas y el sistema antioxidante. Este desbalance se ha asociado a diversas enfermedades del sistema nervioso central (SNC) y sistémicas como en problemas cardiovasculares, insuficiencia renal, cáncer, entre otros. Particularmente, el estrés oxidante puede ocasionar daños a biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. El presente trabajo se enfoca en estudiar el efecto antioxidante del extracto acetónico de *H. inuloides* sobre el daño a lípidos en hígado, riñón y cerebro de rata ocasionado por un estado de estrés oxidante inducido por medio del ácido kainico, el cual es una neurotoxina pro-oxidante, ya que actúa como agonista glutamatérgico y presenta afinidad por los receptores AMPA-Kainato.

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DE *Heterotheca inuloides* Cass

2.1.1. Características generales

La flora de México es una de las más diversas del planeta. Para ello se han realizado estimaciones de la riqueza florística del país desde Francisco Hernández de 1571 a 1576, hasta los trabajos de Rzedowski en 1998 y la evaluación más reciente de Villaseñor en 2004 en la cual estiman más de 22,000 especies de 2663 géneros y de estos 218 son considerados endémicos (Villaseñor, 2004; IBUNAM, 2010).

La alta riqueza de especies vegetales en diversos ambientes, así como una alta diversidad cultural ha permitido que el uso de plantas medicinales sea una práctica ampliamente distribuida en el territorio con cerca de 3000 usos en medicina tradicional documentadas por el Instituto Nacional Indigenista (Almaguer, 2001).

La eficacia para aliviar algunos malestares es debido a que las plantas contienen diversos fitoquímicos de los que se conocen más de 30,000 y son obtenidos de frutos, hojas, semillas, flores, entre otros. Por lo que es necesario caracterizar el efecto de algunos de estos fitoquímicos para poder conocer su potencial aplicación en beneficio de la salud (Liu, 2003; Lanham-New *et al.*, 2011; Micael, 2014).

Existen más de 20 especies dentro del género *Heterotheca*, entre ellas *H.inuloides* es una planta herbácea perenne, su tamaño es variado, de 50 cm a 1.5 m de alto. Su tallo es erecto, generalmente no ramificado por debajo de la inflorescencia, con pubescencia piloso-hispida y con tricomas glandulares (Fig.1); sus hojas inferiores se encuentran sobre peciolo de 2 a 8 cm de largo, ensanchadas en la base, las hojas de la parte media y superior son sésiles reduciéndose paulatinamente de tamaño, oblongas u oblanceoladas; la inflorescencia se encuentra bien desarrollada en conjuntos corimbiformes; la cabezuela se encuentra sobre pedúnculos de hasta 8 cm de largo y de 2,5 a 4 cm en diámetro, el involucre es campanulado a hemisférico con brácteas, las flores liguladas son laminas oblongas de 8 a 15mm y las flores del disco tienen corolas de 4 a 7 mm (Villaseñor y Espinosa, 1998; CONABIO, 2009; De Rzedowski y Rzedowski, 2001).



Fig. 1 *Heterotheca inuloides* Cass.

Se encuentra distribuida en bosque de pino-encino, pastizales, bosque tropical caducifolio. Y se ha registrado principalmente en Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Los nombres comunes para *H. inuloides* varían de acuerdo a la región del país, el más frecuente es “árnica”, también se le conoce como: árnica mexicana, acahua, acahuallia, arnika, cuateteco y tlályetl (Martínez, 1979).

El uso de *H. inuloides* está ampliamente difundido en la medicina tradicional por sus propiedades medicinales, disponibilidad y a su accesibilidad económica. La planta completa es usada y consumida en decocciones para aliviar el dolor muscular, reumatismo, malestar estomacal, riñones y úlceras. Además, es utilizada como ungüento mezclado con mantequilla o cataplasma para curar heridas, moretones, espinillas, erupciones, inflamaciones y llagas (Argueta *et al.*, 1994; Cruz, 2007; González-Stuart, 2010). Las partes aéreas de la planta (flores, pétalos o estambres) son usadas en decocción para lavar heridas, así como aplicada en los moretones (Almaguer, 2001).

2.1.2. Fitoquímica

H. inuloides está constituida de poliacetilenos, cadinanos, triterpenos, esteroides, sesquiterpenos y flavonoides con diferentes propiedades (Coballase-Urrutia *et al.*, 2011; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015a). Se han identificado los siguientes compuestos secundarios: 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, 7-hidroxicadaleno, 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadaleno-4-uno, 1R,4R-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrocadaleno-15-ácido-oico, quercetina, quercetin-3,7,3'-trimetil éter, quercetin-3,7,3',4'-tetrametil éter y eriodictyol-7,4'-dimetil éter, cadaleno-15-ácido-oico, estigmasterol, β -sitosterol, caryolan-1,9 β -diol, kaempferol, d-chiro-inositol, espinasterol, entre otros (Coballase-Urrutia *et al.*, 2011; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015b).

2.1.3. Efectos biológicos

Con el fin de conocer más acerca de la actividad biológica de *H. inuloides*, se han realizado diversas investigaciones y de las cuales se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Actividad biológica de *H. inuloides*

Parte de la planta	Actividad biológica	Referencia
	Actividad citotóxica en contra de diferentes líneas celulares de tumores sólidos	Kubo <i>et al.</i> 1996
	Inhibición de lipoperoxidación microsomal y mitocondrial inducida por Fe (III)- Adenosín difosfato (ADP)/ Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y protección en contra de hemodiálisis oxidante	Haraguchi <i>et al.</i> , 1996
Inflorescencia	Anti inflamatorio y analgésico en edema inducido por carragenina	Gené <i>et al.</i> , 1998
	Anti inflamatorio en edema inducido por aceite de croton	Segura <i>et al.</i> , 2000
	Se observó un efecto anti inflamatorio de los extractos obtenidos evaluados por medio de la determinación de la inhibición de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)	Delgado <i>et al.</i> , 2001
Inflorescencia (Extracto acetónico y metanólico)	Capacidad antioxidante	Coballase-Urrutia <i>et al.</i> , 2010
Inflorescencia (Extracto acetónico y metanólico)	Hepatoprotección en contra de daño oxidante inducido por tetracloruro de carbono (CCl ₄)	Coballase-Urrutia <i>et al.</i> , 2011
Inflorescencia (Extracto acetónico)	Antiinflamatorio, atrapador de ERO e incremento del tiempo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	Rodríguez-Chávez <i>et al.</i> , 2015c
Inflorescencia (Extracto acetónico)	Protección contra estrés oxidante inducido por cobre y juglona en <i>Caenorhabditis elegans</i> e inhibición de la producción de óxido nítrico	Rodríguez-Chávez <i>et al.</i> , 2016d

2.2. ESPECIES REACTIVAS Y ESTRÉS OXIDANTE

La materia está constituida por combinaciones de elementos, en los cuales, sus partículas conformacionales son los átomos, donde existe una íntima relación entre los electrones y la energía (Curtis *et al.*, 2008). En este contexto, las moléculas constituyentes de sustancias que se encuentran en cada ser vivo son un conjunto de átomos unidos entre sí por enlaces químicos. Estos enlaces, en su mayoría, están formados por pares de electrones (e^-) (Halliwell y Gutteridge, 2007; Konigsberg, 2008).

Durante el metabolismo ocurren transformaciones químicas que rompen alguno de los enlaces de una molécula y cada uno de los componentes enlazados toma uno de los dos electrones que al principio constituía el enlace, esto, da lugar a la formación momentánea de especies que se transforman rápidamente y producen moléculas diferentes a las de inicio (Konigsberg, 2008). Por lo que un radical libre se define como un átomo o grupo de átomos que contienen un electrón desapareado dentro de su estructura. Estas especies siendo altamente reactivas, tienen en su mayoría un tiempo de vida media menor de 1 μ seg y se combinan con otras moléculas para generar otras más estables (Konigsberg, 2008).

Para que exista la formación de radicales libres es necesario suministrar la suficiente energía para dissociar el enlace. Dicha energía puede ser fotoquímica, radioquímica, térmica y por una reacción de óxido-reducción (Konigsberg, 2008).

Por otro lado, el O_2 se ha considerado esencial para la vida dado que es necesario en la respiración de los organismos aerobios, pero esto no es siempre así, ya que puede llegar a ser tóxico a cualquier concentración dependiendo de los requerimientos y capacidades antioxidantes de cada especie. La toxicidad del O_2 radica en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), dado que estas son más reactivas que su estado basal de energía (Konigsberg 2008).

En los seres vivos existen una gran cantidad de especies reactivas (radicales y no-radicales) distintas a las de oxígeno, como los óxidos de nitrógeno ($NO^{\cdot-}$, NO_2^{\cdot}), conocidos como especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Cuadro 2) (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Cuadro 2: Principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno consideradas radicales y no-radicales.

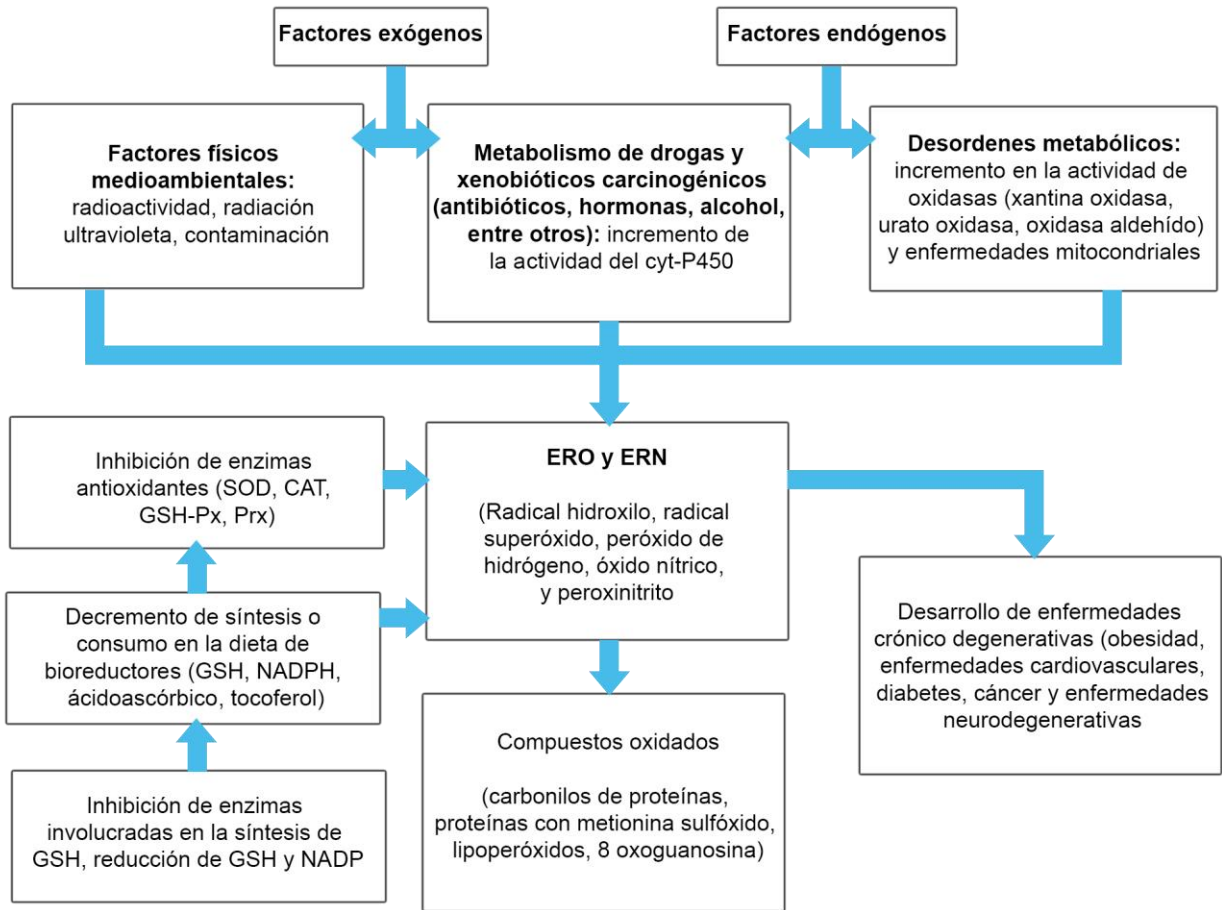
Radicales libres	No- radicales
Especies reactivas de oxígeno	Especies reactivas de oxígeno
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\cdot}	Ácido hipobromoso, $HOBr$
Hidroperoxilo, HO_2^{\cdot}	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Ozono, O_3
Peroxilo, RO_2^{\cdot}	Oxígeno singulete $O_2^1 \Delta G$
Alcoxilo, RO^{\cdot}	Peróxidos orgánicos, $ROOH$
Dióxido de carbono, $CO_2^{\cdot-}$	
Singulete, $O_2^1 \Sigma g^+$	
Especies reactivas de nitrógeno	Especies reactivas de nitrógeno
Óxido nítrico, $NO^{\cdot-}$	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido nítrico, NO_2^{\cdot}	Catión nitrosilo, NO^+
Nitrato, NO_3^{\cdot}	Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot-}$

Cuadro modificado de [Halliwell y Gutteridge, 2007](#).

En los sistemas biológicos, especialmente aerobios con una regulación metabólica normal, se generan especies reactivas (ER), esta acción fisiología es ocasionada por diversos factores endógenos, como NADPH oxidasas (NOX) de neutrófilos y macrófagos como respuesta a procesos inflamatorios en una amplia cantidad de vías de señalización, en la inducción de respuesta mitogénica, en la cadena respiratoria mitocondrial, el citocromo P_{450} , o por factores exógenos como la administración de fármacos, exposición prolongada a radiación ultravioleta (UV), contaminantes ambientales, entre otros ([Halliwell y Gutteridge, 2007](#)). Sin embargo, la generación de especies puede ser resultado de un metabolismo alterado, generando un

aumento excesivo de ERO y ERN, ocasionando daño celular a nivel de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos e incluso ser mediadores de apoptosis y muerte celular (Cuadro 3) (Morales, 2013). Es por esto que las ER tienen un carácter dual en los sistemas biológicos, pueden ser benéficos y/o perjudiciales (Halliwell y Gutteridge, 2007; Valko *et al.*, 2007).

Cuadro 3: Alteraciones fisiológicas generadas por la presencia de ERO y ERN.



Cuadro modificado de Morales, 2013.

Las especies reactivas se encuentran en un balance dinámico con sistemas de defensa antioxidante en los seres vivos, cuando este balance se ve inclinado continuamente hacia las ER por el exceso de especies en relación a los antioxidantes disponibles en el medio se conoce como estrés oxidante (Halliwell y Gutteridge, 2007; Valko *et al.*, 2007).

2.2.1. Sistemas antioxidantes

Debido a los diversos factores que pueden generar especies reactivas, tanto endógenos como exógenos, los organismos han evolucionado desarrollando un sistema antioxidante que les permita reducir o contrarrestar la actividad de estos pro-oxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2007).

El uso de la palabra antioxidante es utilizado en distintas áreas de la ciencia con diversos significados, pero particularmente en biología es empleado para referirse a cualquier sustancia sintética o natural que retrasa, previene o remueve el daño oxidante de una molécula blanco (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los niveles, composición y respuesta de la defensa antioxidante difieren de tejido a tejido y de un tipo celular a otro. Algunos de estos sistemas pueden comprender:

- a) Agentes que remueven las ER
- b) Agentes que disminuyen la formación de ER
- c) Proteínas que protegen biomoléculas en contra del daño oxidante
- d) El remplazo de moléculas sensibles al daño oxidante por moléculas resistentes al mismo
- e) “Agentes sacrificios” que son preferencialmente oxidados por ER para preservar biomoléculas más importantes (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Dentro de los agentes que remueven las ER se encuentran los antioxidantes endógenos como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT), entre otras. Además, existen antioxidantes exógenos, los cuales se pueden obtener a través de la dieta o por medio de suplementos con capacidad antioxidante. Algunos de los mejores conocidos son: la vitamina C, abundante en cítricos y verduras; la vitamina E, la cual es liposoluble y puede ser encontrada en frutos secos, aceites vegetales no refinados como maíz, semilla de algodón, entre otros (Valko *et al.*, 2007).

En los últimos años, el estudio de antioxidantes naturales derivados de plantas se ha incrementado, teniendo una amplia variedad de hierbas y otros alimentos como el té verde,

ginkgo biloba, vino rojo, ajo, cebolla, aloe vera; dado que estas presentan actividad que es comparable con algunos de los antioxidantes sintéticos más usados (Valko *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2009).

2.2.2. Marcadores bioquímicos de estrés oxidante

En años recientes, el estudio de biomarcadores para evaluar la acción del estrés oxidante *in vivo* ha incrementado tanto en el estudio y comprensión de condiciones patológicas como en la evaluación de la eficacia de un fármaco (Yoshikawa y Naito, 2002; Czerska *et al.*, 2015). Los ensayos para su evaluación implican el uso de sangre, orina y otros fluidos biológicos y, recientemente existe un método similar a la imagen de resonancia magnética (RM) y tomografía computarizada (CT), la resonancia del *spin* electrónico (RSE) con la cual se puede obtener información estructural, cinética, formación y decaimiento de radicales (Yoshikawa y Naito, 2002; Kopáni *et al.*, 2006).

Como ya se mencionó, a pesar de la existencia de un sistema antioxidante endógeno y agentes exógenos para regular los niveles de ER en el cuerpo, en ocasiones este no es suficiente, generando un daño oxidante, para el cual los productos generados de estas reacciones son usados como marcadores (Yoshikawa y Naito, 2002). El empleo del adecuado marcador depende de la información que se quiera obtener en el objetivo de un estudio, ya sea clínico o de investigación. En el caso de daño a proteínas existen ensayos de cuantificación de productos de la oxidación de proteínas y aminoácidos como la proteína carbonil, hidroxileucina, hidrovalina y nitrotirosina. Para daño a DNA se pueden emplear marcadores como 8-hidroxiguanosina y timinaglicol. En el estudio de daño producido hacia lípidos se incluye la cuantificación de peróxidos lipídicos, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Yoshikawa y Naito, 2002). En el Cuadro 4 (Czerska *et al.*, 2015) se pueden observar algunos de los marcadores de estrés oxidante utilizados en la investigación.

Cuadro 4: Marcadores de estrés oxidante.

Proceso	Marcadores de estrés oxidante
Lipoperoxidación	<ul style="list-style-type: none"> • Malondialdehido • F2-isoprostanos • Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL por sus siglas en inglés) • Anticuerpos LDL oxidados • Productos avanzados de lipoperoxidación • Acroleína • 4-hidroxinonenal • Sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés)
Oxidación de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Productos avanzados de la oxidación de proteínas • Productos finales de la glicación avanzada • 3-nitrotirosina
Oxidación de carbohidratos	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de grupos carbonilos
Oxidación de ácidos nucleicos	<ul style="list-style-type: none"> • Aldehídos reactivos • Azúcares reducidos (ascorbato, ribosa, etc.) • 8-oxi-2-deoxiguanosina

Cuadro modificado de [Czerska et al., 2015](#)

2.2.3. Lipoperoxidación

Los lípidos son un grupo muy diverso de compuestos químicos y por lo tanto juegan un papel importante en funciones biológicas, encontrando grasas y aceites como fuente principal de almacenamiento de energía en varios organismos; fosfolípidos y esteroides como estructuradores de membranas biológicas; y otros lípidos funcionando como cofactores enzimáticos, transportadores de electrones, fotopigmentos, precursores hormonales, mensajeros intracelulares, entre otros (Boyle, 2005).

Particularmente una gran variedad de estos lípidos son parte importante del sistema nervioso central (SNC), principalmente ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's por sus siglas en inglés), debido a que este órgano tiene altas concentraciones (Adibhatla y Hatcher, 2007).

Por esta misma razón, éstos son vulnerables a la oxidación. El proceso que involucra la interacción de radicales libres o especies no radicales con estos ácidos grasos dando como resultado una alta cantidad de aldehídos electrofílicos reactivos se conoce como lipoperoxidación (Reed, 2011). El mecanismo de la lipoperoxidación es una cadena de reacciones, consistiendo de tres etapas, la iniciación, propagación y terminación (Yin *et al.*, 2011).

En la iniciación ocurre la formación de un radical lipídico L^{\bullet} . Durante la propagación, el oxígeno molecular (O_2) es incorporado al carbono central del radical L^{\bullet} para generar un radical peroxil (LOO^{\bullet}), el cual es el transportador principal de especies en la cadena de reacciones ya que extrae el hidrógeno de otro lípido formando hidroperóxido lipídico y generando un nuevo radical lipídico. La terminación ocurre cuando dos radicales reaccionan y generan un no-radical y oxígeno o cuando antioxidantes como la vitamina E dona un hidrógeno a las especies LOO^{\bullet} , cuando esto ocurre da lugar a un radical de la vitamina E que reacciona con otro LOO^{\bullet} formando productos no-radicales (Fig. 2) (Ayala *et al.*, 2014; Reed, 2011; Yin *et al.*, 2011).

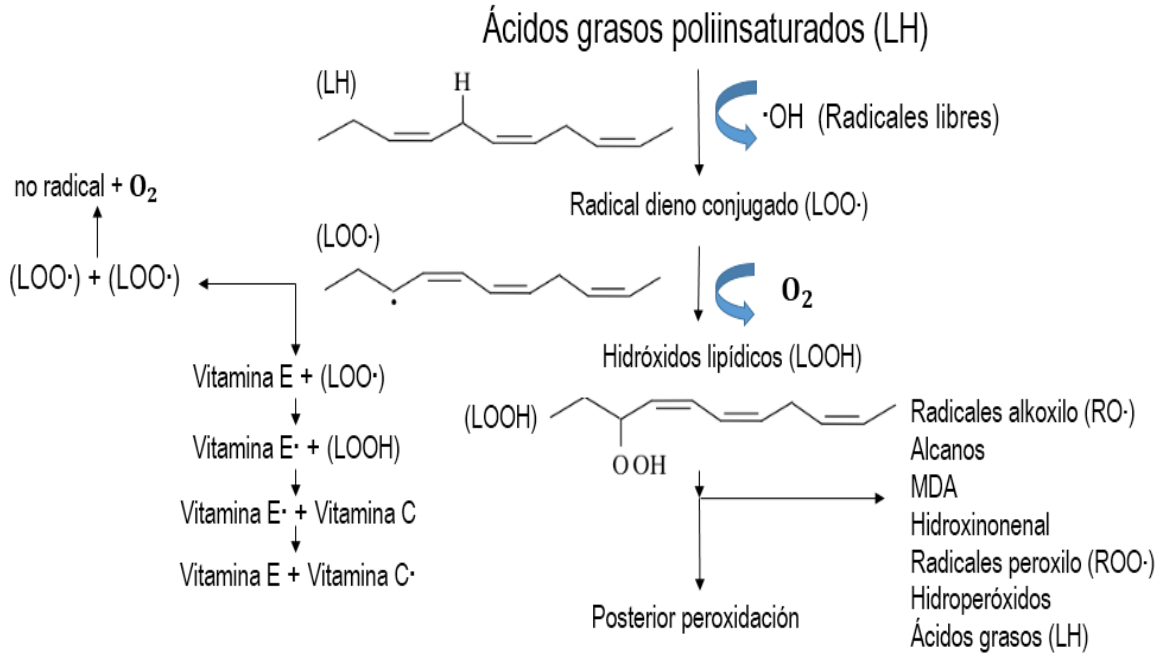


Fig 2. Mecanismos de una cadena de reacción mediada por radicales libres.

El hidroperóxido lipídico (LOOH) es importante en la lipoperoxidación debido a que su descomposición lleva a la formación de productos como la acroleína y su derivado, malondialdehído, propanal, hexanal y 4-hidroxinonenal (Ayala *et al.*, 2014; Reed, 2011).

2.2.4. Excitotoxicidad

En una neurotransmisión basal existen sustancias químicas llamadas neurotransmisores, que son liberadas por una neurona presináptica para ejercer una acción inhibitoria o excitadora en la célula postsináptica. Uno de los neurotransmisores más estudiados debido a que se encuentra ampliamente distribuido por el SNC con una capacidad inhibitoria es el ácido gamma aminobutírico (GABA) mediado por receptores ionotrópicos (GABA_A) y metabotrópicos (GABA_B). Por otro lado, el neurotransmisor más abundante en diversas partes del SNC de los mamíferos con una actividad excitadora es el glutamato (GLU). Es uno de los más estudiados y para el cual se han identificado receptores específicos ionotrópicos como el N-metil-D-aspartato (NMDA), el alfa-amino-2,3-dihidro-5-metil-3-oxo-4-isoxazol propiónico (AMPA) y Kainato, así como los receptores metabotrópicos (mGluR) (Cortés-Romero *et al.*, 2011; Fouilloux *et al.*, 2004; Tortora y Derrickson, 2009).

En condiciones de homeostasis el sistema neurona-glia, regula las concentraciones extracelulares de GLU, sin embargo, estas se elevan en condiciones patológicas y llevan a la neurotoxicidad. Durante este proceso ocurre la activación descontrolada de los receptores AMPA, NMDA y kainato permitiendo una hiperexcitabilidad neuronal ocasionada por el intercambio iónico a través de los canales que controlan. (Haeberlein, 2009).

Además, de los mecanismos antes mencionados existe evidencia experimental que sustenta la participación del estrés oxidante en la neurotoxicidad (McCord, 2000; Martínez, 2003; Mehta *et al.*, 2013). Cuando ocurre el aumento intracelular de Ca^{2+} estimula la conversión de xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XO) junto con la activación de NOS dependiente de calmodulina. Ésta entrada masiva de Ca^{2+} a la mitocondria hace que se forme un poro de transición en la membrana mitocondrial interna, lo que lleva a un colapso en el potencial electroquímico y un significativo decremento de los niveles de adenosín trifosfato (ATP) y especies reactivas. La reducción del ATP resulta en la despolarización de la membrana y la entrada de más Ca^{2+} por medio de canales iónicos creando un círculo continuo que culmina en la pérdida de la función neuronal y muerte de la célula (Olanow, 1993; Martínez, 2003; Mehta *et al.*, 2013).

2.2.5. Participación de los radicales libres en la fisiopatología de enfermedades del SNC

El SNC tiene como principales funciones las de detectar, integrar y transmitir información. Durante todo este proceso se generan señales de respuesta para vías motoras y autónomas regulando el movimiento, funciones viscerales y endócrinas. Todo esto sucede por la comunicación entre células neuronales y adyacentes bajo una condición normal pero desafortunadamente existen anomalías que desencadenan mecanismos perjudiciales dando como resultado desde patologías tratables hasta las severas que involucran una baja calidad de vida y que puede culminar con la muerte. El SNC al ser un sistema complejo y dinámico conlleva a que su estudio demande la integración de fundamentos biológicos, químicos y físicos para la comprensión de las causas y posibles tratamientos para enfermedades neurodegenerativas (EN) (McPhee y Hammer, 2015).

El cerebro al contener altas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados y un escaso sistema antioxidante, lo convierte en un órgano susceptible de estrés oxidante (Yin *et al.*, 2011). La primera evidencia de la participación del estrés oxidante en las enfermedades del SNC fue descrita en 1975 por Kosiakov *et al.* Diferencias en los niveles de hemoglobina y el índice de catalasa se han reportado en tumores cerebrales de humano y en individuos sanos (Kosiakov, 1975). Por lo que diversas investigaciones para comprender la fisiopatología de enfermedades del SNC asociadas al estrés oxidativo han sido reportadas (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2015; Figueroa-Méndez y Rivas-Arancibia, 2015).

En pacientes con Parkinson, las especies reactivas se han visto relacionadas con genes como SNCA, parquin, DJ-1, PINK1 y LRRK2, con defectos en el complejo 1 de la cadena mitocondrial transportadora de electrones y estrés oxidante en la sustancia nigra (Floyd y Carney, 1992; Dexter *et al.*, 1994). En los modelos experimentales, la formación excesiva de ERO conlleva al incremento de lipoperoxidación, daño oxidante de DNA, reducción de GSH e incremento en la actividad de SOD (Floyd y Carney, 1992; Dexter *et al.*, 1994; Sanyal *et al.*, 2009; Bolner *et al.*, 2011; Gencer *et al.*, 2012; Maetzler *et al.*, 2011)

En pacientes con Alzheimer se ha visto que un incremento de la producción de A β y de productos de la lipoperoxidación inducen a la vía c-Jun-N-terminal-cinasa (JNK), lo cual conlleva a apoptosis neuronal, así como la producción de 4-HNE, MDA, y acroleína. Estas últimas son difusibles y altamente reactivas con otras biomoléculas lo que facilita que haya neurotoxicidad (Tang *et al.*, 2008; Esterbauer *et al.*, 1991; Markesbery *et al.*, 1998; Montine *et al.*, 1997).

Otra enfermedad en SNC que ha sido estudiada es la esclerosis lateral amiotrófica, en la cual, varios mecanismos se ven involucrados, incluyendo la excitotoxicidad por GLU, agregados aberrantes de proteínas conteniendo Cu-Zn-SOD mutado, agregación de neurofilamentos, daño oxidante generado por disfunción mitocondrial (Maragakis y Rothstein, 2001; Rothstein, 1995; Wood *et al.*, 2003; Lariviere y Julien, 2004).

2.3. ÁCIDO KAÍNICO

2.3.1. Generalidades

Existen compuestos que son análogos al GLU lo cual los hace agonistas a sus receptores, uno de ellos es el ácido domoico (AD), una neurotoxina que es producida por diatomeas pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia* (Funk *et al.*, 2014).

Otra sustancia ampliamente utilizada para la investigación es el ácido kaínico (AK), el cual es un compuesto que fue aislado del alga roja *Digenea simplex*, comúnmente conocida como “Makuri” o “Kaijinso”. La fórmula molecular del AK es $C_{10}H_{15}NO_4$ y su masa molecular es 213.23 g/mol (Fig. 3) (Zheng *et al.*, 2011).

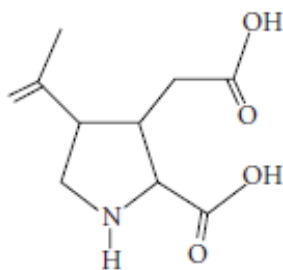


Figura 3: Ácido kaínico

Este compuesto fue inicialmente empleado como antihelmintico del género *Ascaris* del intestino, pero estudios posteriores demostraron que es una potencial neurotoxina debido a su acción biológica como un agonista glutamatérgico que presenta afinidad por los receptores AMPA-Kainato (Zheng *et al.*, 2011).

2.3.2. Efectos biológicos y la participación del estrés oxidante inducido por AK

Al ser un agonista glutamatérgico la relevancia que tiene esta sustancia en los seres vivos es importante debido a que éste sistema es el principal en la neurotransmisión excitadora y media diversas funciones fisiológicas esenciales (Fouilloux *et al.*, 2004). El AK, al ser administrado de manera sistémica o intracerebral induce crisis límbicas con daño neuronal localizado principalmente en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, así como gliosis (Lothman y Collins, 1981; Nadler, 1981), similar a los efectos neuropatológicos observados en el sistema límbico

de pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (Ben-Ari *et al.*, 1980; Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013). El AK induce la liberación de GLU y aspartato (Ferkany *et al.*, 1982). En hipocampo activa a los receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA y AK) y metabotrópicos (Young y Fagg; 1990). La administración intravenosa de AK causa actividad electrográfica (EG) ictal e interictal asociada a cambios conductuales. Esta actividad EG se inicia en el hipocampo y en el septum lateral, posteriormente se propaga a otras áreas límbicas extra hipocampales como son: la corteza entorrinal, complejo subicular, amígdala y septum medial (Lothman y Collins, 1981). Estudios electrográficos indican que varios días después de la administración de AK se presentan espigas recurrentes en la amígdala que posteriormente producen crisis espontáneas. Estos cambios se relacionan con un reacomodo neuronal a nivel del giro dentado y forman parte de la respuesta ante el daño neuronal que induce el AK (Babb *et al.*, 1992; Slovieter, 1992).

Existe evidencia que relacionan el estrés oxidante con neurotoxicidad inducida por AK debido a la producción de radicales libres (Zheng *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2005). La administración de esta sustancia genera una pérdida de la integridad de la membrana celular, un decremento en las funciones mitocondriales, condensación y fragmentación del núcleo (Zheng *et al.*, 2011). Particularmente el AK tiene una modulación directa en la acción presináptica y posináptica, cuando se despolariza la membrana ocurre una alteración en la homeostasis de calcio dando como resultado una cascada de eventos donde uno de estos es el incremento importante de ERO y ERN generando estrés oxidante. Durante la oxidación de biomoléculas, principalmente lípidos, incrementan significativamente sus productos tales como MDA y 4-hidroxi-alquenos y así culmina en apoptosis o necrosis (Fig. 4) (Wang *et al.*, 2005; Brown y Borutaite, 2001; Zheng *et al.*, 2011).

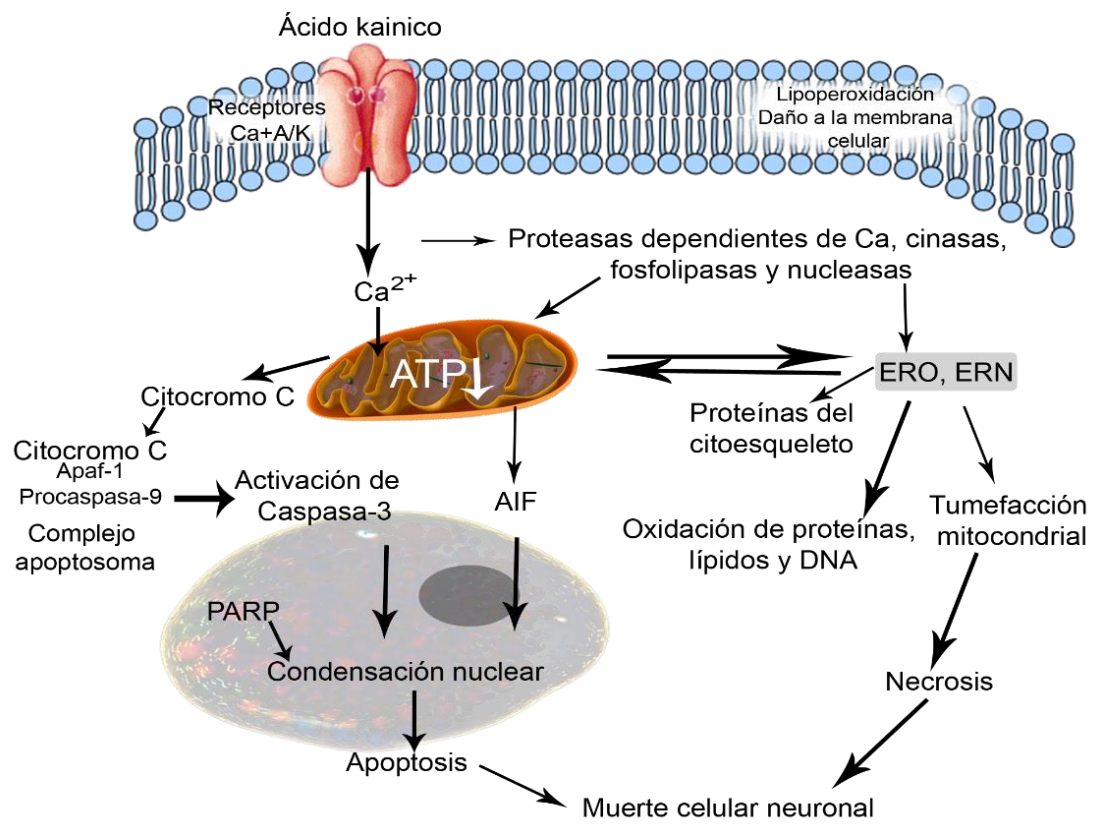


Figura 4: Cascada de eventos ocasionada por ácido kaínico.

3. PLANTEAMIENTO

¿Cuál es efecto biológico de la administración del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* previo al ácido kaínico sobre la lipoperoxidación en hígado, riñón y cerebro de rata?

4. JUSTIFICACIÓN

El uso de plantas medicinales es una práctica que ha utilizada desde las primeras civilizaciones. En México, debido a su amplia diversidad biológica y cultural el empleo de plantas con propósitos medicinales es una actividad que se encuentra ampliamente arraigada y sus efectos se deben a sus propiedades químicas anti-inflamatorias, antioxidantes, digestivas, antinecróticas, neuroprotectoras, hepatoprotectoras, etc. Una de estas es *Heterotheca inuloides*. En la cual se ha observado que el extracto acetónico puede ejercer efectos protectores al daño inducido por estrés oxidante debido a ciertos constituyentes.

En diversas enfermedades sistémicas como en problemas cardiovasculares, insuficiencia renal, cáncer, entre otros, y del SNC el estrés oxidante se ha asociado a estos padecimientos, por lo que sustancias de origen natural con propiedades antioxidantes como *H. inuloides* pueden ser potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades.

5. HIPÓTESIS

La administración del extracto acetónico previo al ácido kaínico producirá menor daño ocasionado por estrés oxidante mediado por la lipoperoxidación en los tejidos (cerebro, hígado y riñón) de los sujetos experimentales.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante del extracto acetónico de *Heterotheca inuloides* en la lipoperoxidación inducida por ácido kaínico en cerebro (hemisferio, corteza, cerebelo y médula), hígado y riñón de rata.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el contenido proteico de los tejidos cerebro, hígado y riñón en presencia y ausencia de ácido kaínico (10 mg/kg; i.p.).
2. Evaluar la lipoperoxidación en los tejidos cerebro, hígado y riñón en presencia y ausencia de ácido kaínico (10 mg/kg; i.p.).
3. Determinar el efecto antioxidante del extracto acetónico de *H. inuloides* (100 mg/kg; v.o.) sobre la lipoperoxidación inducida por ácido kaínico.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental para el manejo y uso de los animales de laboratorio siguió la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y (NOM-087-ECOL-1995) respectivamente en el proyecto con número 016/2014 aceptado por el comité de investigación y CICUAL del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

8.1 Identificación y colecta de *Heterotheca inuloides*

El material vegetal fue colectado en Zacapoaxtla, Puebla, México, y fue clasificada por la Bióloga Myrna Mendoza Cruz del departamento de Plantas Medicinales del Jardín Botánico, (UNAM), además, un ejemplar de la misma fue colocado en la colección del Herbario Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social de la ciudad de México clasificado como: (Myrna Mendoza C 15,375).

8.2 Obtención del extracto acetónico

Las inflorescencias (2 kg) se cortaron y secaron en una cámara de secado a 37°C, se depositaron en recipientes de vidrio con capacidad de 2 L y se le agregó 1.5 L de acetona, después de 24 hrs, se filtró y se colectó el sobrenadante obtenido, posteriormente se agregó nuevamente acetona al triturado y este procedimiento se repitió tres veces más.

El sobrenadante total se colocó en un rotovapor para evaporar los solventes y obtener el extracto puro, del cual se obtuvieron 12 g (Delgado *et al.*, 2001). Dicho extracto fue donado por el Dr. Guillermo Delgado L.

8.3 Reactivos

Aceite de oliva, Folin y reactivo fenol Ciocalteu, Triton X-100, sulfato de cobre (II), albumina bovina, 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano, carbonato de sodio, tartatro sódico-potásico, deferoxamina mesilada (DMSO) se obtuvieron de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Hidróxido de sodio (NaOH) de Merck (Naucalpan, Edo. de Méx, México). El ácido kaínico ($C_{10}H_{15}NO_4$) de Tocris Bioscience.

8.4 Sujetos experimentales

Ratas Wistar macho con un peso de 180-220 g fueron utilizadas. Se mantuvieron en el bioterio del INP en cajas de acrílico bajo condiciones constantes de temperatura ($21^{\circ} \pm 1^{\circ}C$), humedad relativa (50 – 60%), iluminación de 12/12 hrs luz/oscuridad y aire filtrado (5mm de partículas) con intercambio de 18 veces/h, con alimento (Harlan 2018S Teklad dieta global esterilizado, Harland Teklad, Madison, WI, EUA) y agua filtrada *ad libitum*.

8.5 Tratamiento

Las ratas fueron divididas en 6 grupos. Los cuales tuvieron una alimentación y toma de agua *ad libitum*, durante 6 días, cada día se administraba 100 mg/kg de extracto acetónico disuelto en aceite de oliva (E.Ac) (1.5 mL) y/o aceite de oliva (A.O), y al 6 día se le administró AK 10 ml/kg y se observó el efecto del AK al evaluar su conducta por 4 hrs y posteriormente se sacrificaron (Cuadro 5). El aceite de oliva y el extracto acetónico fueron administrados vía oral con ayuda de una sonda pediátrica (Tecmed, Nezahualcoyotl, Edo. de Méx, Méx.) para asegurar la ingesta total durante los seis días y el AK fue administrado vía intraperitoneal.

Cuadro 5. Grupos experimentales sometidos a distintos tratamientos

		<i>Tratamiento</i>					
		Control	Aceite de oliva **	Aceite de oliva** + Ácido kaínico***	Ácido kaínico***	Extracto acetónico**	Extracto acetónico** + ácido kaínico***
		(C)	(A.O.)	(A.O + A.K.)	(A.K.)	(E.Ac.)	(E.Ac. + A.K.)
			mL	mL		mg/kg	mg/kg
<i>Días</i>	1	S/t*	1.5	1.5	-	100	100
	2	S/t	1.5	1.5	-	100	100
	3	S/t	1.5	1.5	-	100	100
	4	S/t	1.5	1.5	-	100	100
	5	S/t	1.5	1.5	-	100	100
	6	S/t y sacrificio	1.5 mL y sacrificio	1.5 mL/10 mL/kg y sacrificio	10 mL/kg y sacrificio	100 mg/kg y sacrificio	100 mg/kg/10 mL/kg y sacrificio

*Sin tratamiento. ** Administrado vía oral. *** Administrado intraperitoneal.

Posterior a la administración de ácido kaínico, los animales se observaron durante 4 hrs y se registró el comportamiento cada diez minutos hasta su sacrificio para asegurar el efecto del AK. El sacrificio se llevó a cabo por decapitación e inmediatamente se extrajo el hígado y riñón, y se obtuvo el cerebro que fue dividido en corteza, hemisferio, cerebelo y médula. Cada tejido fue almacenado en un ultracongelador a -72°C hasta su uso.

8.6 Homogenados

De cada tejido se pesó 1 g, se le agregó 1 mL de amortiguador de fosfatos y fue homogenizado con ayuda de un homogeneizador (Kinematica Polytron PT 10 35, Bohemia, NY, EUA).

Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 30,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante de cada tubo y fueron almacenados en un ultracongelador a -72°C hasta su uso para la determinación del contenido proteico y de lipoperoxidación.

8.7 Determinación de proteínas

La determinación proteica se llevó a cabo por el método de [Lowry *et al.*, 1951](#).

8.8 Determinación de lipoperoxidación

Un método colorimétrico se realizó para determinar las sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS), en el cual el ácido tiobarbitúrico reacciona con el malodialdehído generado durante la lipoperoxidación de los tejidos.

Una curva estándar se realizó, con las absorbancias registradas y los resultados obtenidos fueron expresados en mg/mL de proteína/molMDA de concentración ([Janero, 1990](#)).

Posteriormente se leyó en espectrofotómetro (Epoch, Biotek instruments, Inc. Winooski, VT, USA) a 530 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

8.9 Estadística

Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de n=6, por triplicado, se analizaron por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple Dunnett en un paquete estadístico (GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, USA). Una p con valor <0.05 fue considerada estadísticamente significativa.

9. RESULTADOS

9.1 Hígado

El resultado obtenido de la concentración de MDA en hígado para el grupo A.K fue de 312.29 mg/mL de proteína/molMDA, lo que representa el 100% de efectos ocasionados por AK. El grupo C, tuvo una cantidad de MDA de 76.09 mg/mL de proteína/molMDA que representa la cantidad basal sin efectos de lipoperoxidación. El grupo A.O tuvo una cantidad de 97.33 mg/mL de proteína/molMDA, así mismo, para el grupo E.Ac fue de 151.20 mg/mL de proteína/molMDA, ambos representando valores basales. Para el caso del grupo A.O+A.K que tuvo la administración del aceite de oliva previo al ácido kaínico, mostró un decremento del 48.44% con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo A.K, y, por último, con un valor similar, el grupo que tuvo la administración del extracto acetónico previo al ácido kaínico E.Ac+A.K mostró un decremento estadísticamente significativo del 43.86% con respecto al grupo con únicamente la administración del ácido kaínico.

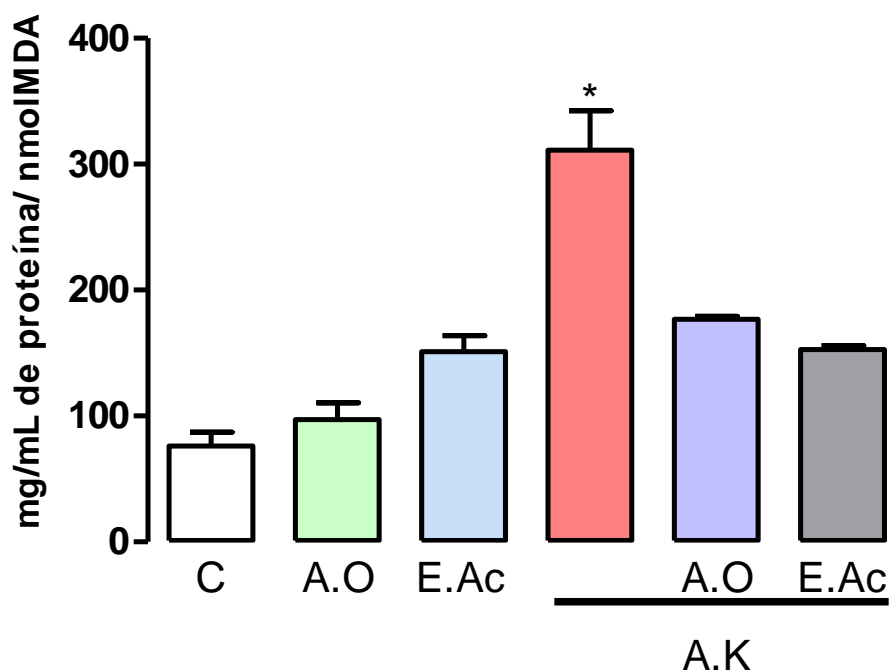


Fig. 5. Concentración de malodialdehído (MDA) en los grupos de estudio para hígado de rata: C, control; A.O, aceite de oliva (1.5 mL); E. Ac, extracto acetónico (100 mg/mL); A.K, ácido kaínico (10 mL/kg); A.O + A.K, aceite de oliva más ácido kaínico (1.5 mL/10 mL/kg); E. Ac + A.K, extracto acetónico mas ácido kaínico (100 mg/kg/10 mL/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n=6, por triplicado, *p<0.0001 A.K vs todos los grupos.

9.2 Riñón

El resultado obtenido de la cantidad de MDA en riñón para el grupo A.K el cual tuvo únicamente la administración de A.K i.p fue de 281.50 mg/mL de proteína/molMDA, lo que representa el 100% de efectos ocasionados por la lipoperoxidación. El grupo C, tuvo una cantidad de MDA de 74.43 mg/mL de proteína/molMDA que representa la cantidad basal sin efectos de lipoperoxidación. El grupo A.O tuvo una cantidad de 52.54 mg/mL de proteína/molMDA, así mismo, para el grupo E.Ac fue de 114.40 mg/mL de proteína/molMDA, ambos representando valores basales. Para el caso del grupo A.O+A.K que tuvo la administración del aceite de oliva previo al ácido kaínico, mostró un decremento del 54.81% con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo A.K. Por último, con un valor similar, el grupo que tuvo la administración del extracto acetónico previo al ácido kaínico E.Ac+A.K mostró un decremento estadísticamente significativo del 50.44% con respecto al grupo con únicamente la administración del ácido kaínico.

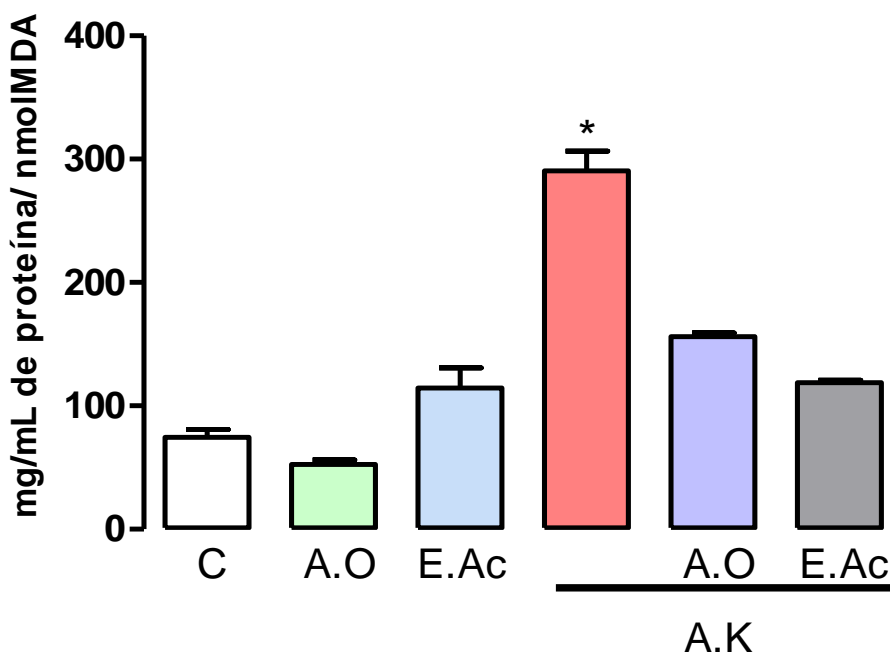


Fig. 6. Concentración de malodialdehído (MDA) en los grupos de estudio para riñón de rata: C, control; A.O, aceite de oliva (1.5 mL); E. Ac, extracto acetónico (100 mg/mL); A.K, ácido kaínico (10 mL/kg); A.O + A.K, aceite de oliva más ácido kaínico (1.5 mL/10 mL/kg); E. Ac + A.K, extracto acetónico mas ácido kaínico (100 mg/kg/10 mL/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n=6, por triplicado, *p<0.0001 A.K vs todos los grupos.

9.3 Cerebro

9.3.1 Hemisferios

El resultado obtenido de la cantidad de MDA en hemisferios para el grupo A.K fue de 134.10 mg/mL de proteína/molMDA, lo que representa el 100% de daño ocasionado por el AK. Los grupos C, A.O y E.Ac representan los grupos control, los cuales tienen valores basales de lipoperoxidación de 19.59 mg/mL de proteína/molMDA, 18.30 mg/mL de proteína/molMDA y de 48.49 mg/mL de proteína/molMDA respectivamente. Para el caso del grupo A.O+A.K mostró un decremento del 31.20% con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo A.K. Por último, con un valor similar, el grupo E.Ac+A.K mostró un decremento estadísticamente significativo del 62.72% con respecto al grupo con únicamente la administración del ácido kaínico.

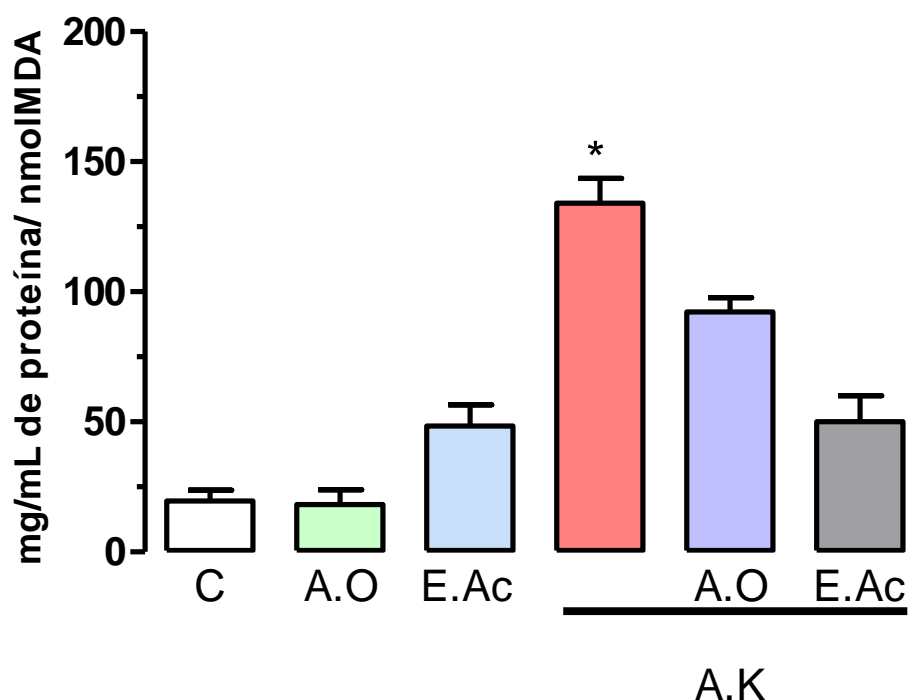


Fig. 7. Concentración de malodialdehído (MDA) en los grupos de estudio para hemisferios de rata: C, control; A.O, aceite de oliva (1.5 mL); E. Ac, extracto acetónico (100 mg/mL); A.K, ácido kaínico (10 mL/kg); A.O + A.K, aceite de oliva más ácido kaínico (1.5 mL/10 mL/kg); E. Ac + A.K, extracto acetónico mas ácido kaínico (100 mg/kg/10 mL/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n=6, por triplicado, *p<0.0001 A.K vs todos los grupos.

9.3.2 Corteza

El resultado obtenido de la cantidad de MDA en corteza para el grupo A.K fue de 201.20 mg/mL de proteína/molMDA, lo que representa el 100% de efectos ocasionados por la lipoperoxidación. El grupo C, tuvo una cantidad de MDA de 20.02 mg/mL de proteína/molMDA que representa la cantidad basal sin efectos de lipoperoxidación. El grupo A.O tuvo una cantidad de 14.78 mg/mL de proteína/molMDA, así mismo, para el grupo E.Ac fue de 46.56 mg/mL de proteína/molMDA, ambos representando valores basales. Para el caso del grupo A.O+A.K mostró un decremento del 40.59% con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo A.K. Por último, con un valor similar, el grupo E.Ac+A.K mostró un decremento estadísticamente significativo del 78.33% con respecto al grupo con únicamente la administración del ácido kaínico.

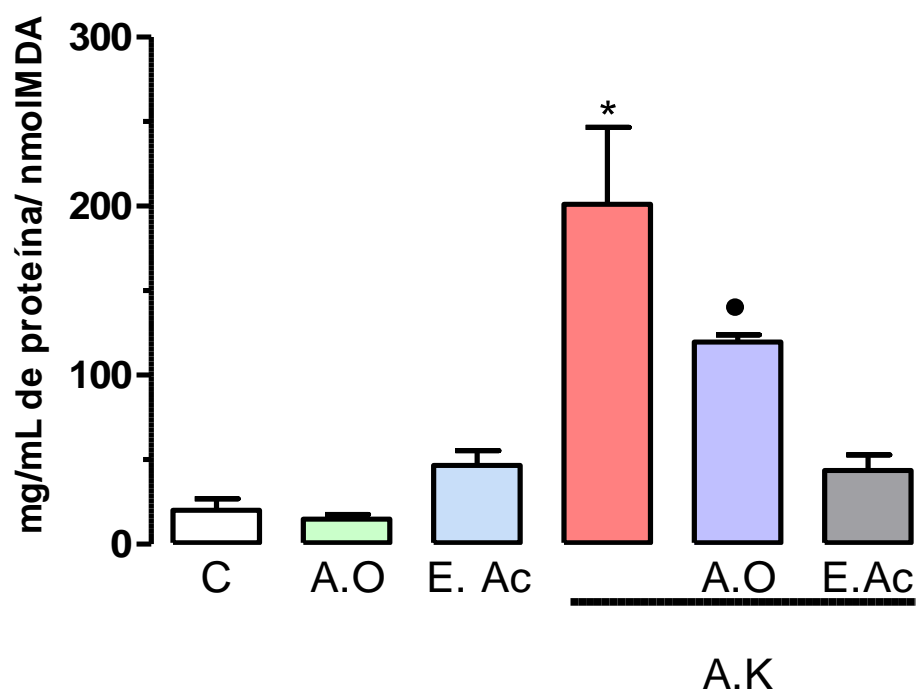


Fig. 8. Concentración de malodialdehído (MDA) en los grupos de estudio para corteza de rata: C, control; A.O, aceite de oliva (1.5 mL); E. Ac, extracto acetónico (100 mg/mL); A.K, ácido kaínico (10 mL/kg); A.O + A.K, aceite de oliva más ácido kaínico (1.5 mL/10 mL/kg); E. Ac + A.K, extracto acetónico mas ácido kaínico (100 mg/kg/10 mL/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n=6, por triplicado, *p<0.0001 A.K vs C, A.O, E.Ac y E.Ac +A.K; • p<0.001 A.K vs A.O + A.K.

9.3.3 Cerebelo

El resultado obtenido de la cantidad de MDA en cerebelo para el grupo A.K fue de 228.00 mg/mL de proteína/molMDA, lo que representa el 100% de efectos ocasionados por la lipoperoxidación. El grupo C, tuvo una cantidad de MDA de 19.67 mg/mL de proteína/molMDA que representa la cantidad basal sin efectos de lipoperoxidación. El grupo A.O tuvo una cantidad de 21.53 mg/mL de proteína/molMDA. El grupo E.Ac fue de 40.79 mg/mL de proteína/molMDA, ambos representando valores basales. Para el caso del grupo A.O+A.K mostró un decremento del 57.03% con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo A.K. Por último, con un valor similar, el grupo E.Ac+A.K mostró un decremento estadísticamente significativo del 80.74% con respecto al grupo con únicamente la administración del ácido kaínico.

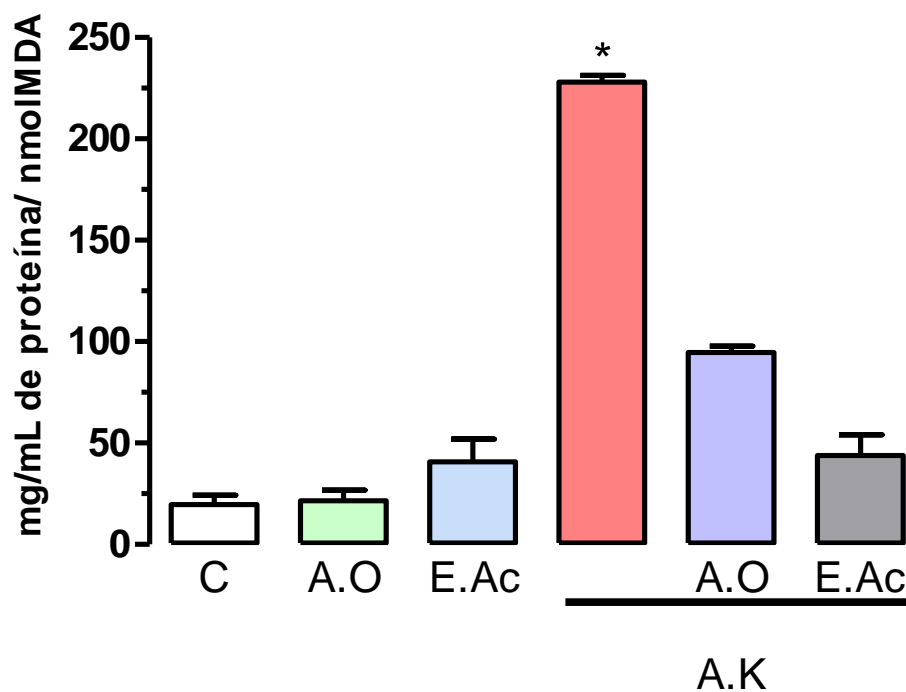


Fig. 9. Concentración de malodialdehído (MDA) en los grupos de estudio para cerebelo de rata: C, control; A.O, aceite de oliva (1.5 mL); E. Ac, extracto acetónico (100 mg/mL); A.K, ácido kaínico (10 mL/kg); A.O + A.K, aceite de oliva más ácido kaínico (1.5 mL/10 mL/kg); E. Ac + A.K, extracto acetónico mas ácido kaínico (100 mg/kg/10 mL/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n=6, por triplicado, * $p < 0.0001$ A.K vs todos los grupos.

9.3.4 Médula

El resultado obtenido de la cantidad de MDA en médula para el grupo A.K el cual tuvo únicamente la administración de ácido kaínico i.p fue de 128.80 mg/mL de proteína/molMDA, lo que representa el 100% de efectos ocasionados por la lipoperoxidación. El grupo C tuvo una cantidad de MDA de 11.31 mg/mL de proteína/molMDA que representa la cantidad basal sin efectos de lipoperoxidación. El grupo A.O al cual se le administró únicamente el aceite de oliva tuvo una cantidad de 15.94 mg/mL de proteína/molMDA, así mismo, para el grupo al cual solo se le administró el extracto acetónico E.Ac fue de 37.23 mg/mL de proteína/molMDA, ambos representando valores basales. Para el caso del grupo A.O+A.K que tuvo la administración del aceite de oliva previo al ácido kaínico, mostró un decremento del 43.30% con diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo A.K. Por último, con un valor similar, el grupo que tuvo la administración del extracto acetónico previo al ácido kaínico E.Ac+A.K mostró un decremento estadísticamente significativo del 61.64 % con respecto al grupo con únicamente la administración del ácido kaínico.

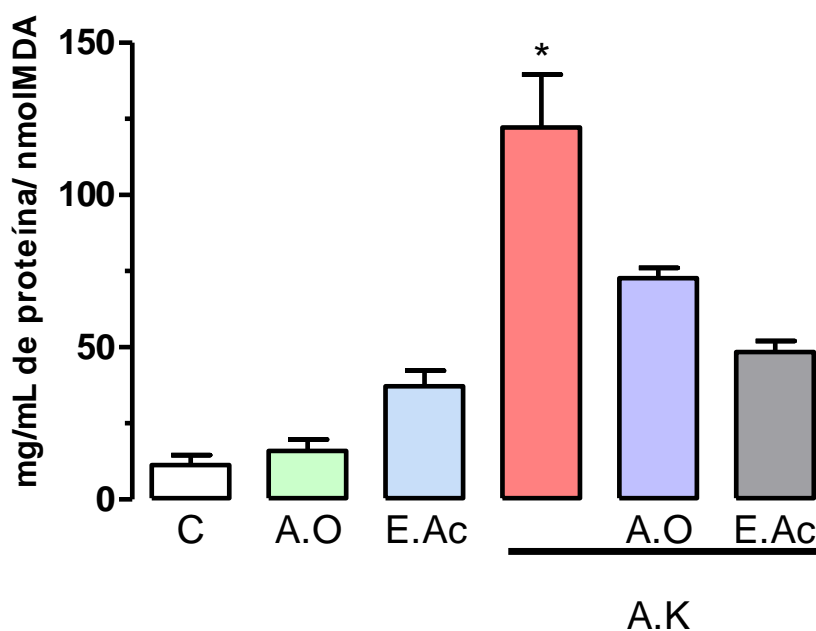


Fig. 10. Concentración de malodialdehído (MDA) en los grupos de estudio para médula de rata: C, control; A.O, aceite de oliva (1.5 mL); E. Ac, extracto acetónico (100 mg/mL); A.K, ácido kaínico (10 mL/kg); A.O + A.K, aceite de oliva más ácido kaínico (1.5 mL/10 mL/kg); E. Ac + A.K, extracto acetónico mas ácido kaínico (100 mg/kg/10 mL/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n=6, por triplicado, *p<0.0001 A.K vs todos los grupos.

10. DISCUSIÓN

Un estado de estrés oxidante puede causar daño a biomoléculas que eventualmente conlleva a muchas enfermedades crónicas, tales como arterioesclerosis, cáncer, diabetes, artritis reumatoide, infartos de miocardio, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, entre otros (Uttara *et al.*, 2009). Por lo que el estudio del estrés oxidante ha cobrado considerable importancia debido a las consecuencias que puede tener en la salud (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza, 2006).

Los marcadores que pueden ser utilizados para evaluar el estrés oxidante *in vivo* han atraído el interés en años recientes, debido a que las mediciones precisas del mismo son necesarias para investigar su papel en el estilo de vida de las personas que padecen enfermedades relacionadas a éste o también evaluar el éxito de ciertos tratamientos (Czerska, 2015). Desafortunadamente los radicales libres tienen una vida media muy corta (del orden de algunos segundos) y su medición *in vivo* es enfrentada con muchos retos. Sin embargo, los derivados del radical oxo (peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos lipídicos) son estables y tienen una larga vida media (horas a semanas) y además pueden ser medidos y monitoreados repetidamente (Czerska, 2015).

Muchos marcadores de estrés oxidante encontrados en el cuerpo han sido propuestos, para la investigación, incluyendo los hidroperóxidos, 4-hidroxinonanal, isoprostanos, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, malondialdehído, entre otros (Czerska, 2015). El malondialdehído es el producto principal y más estudiado de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Desde 1960, varios métodos se han desarrollado para identificar esta molécula con el propósito de cuantificar los niveles de estrés oxidativo *in vivo* e *in vitro* (Del Rio, 2005).

El AK conlleva a una sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, lo que produce una depolarización de la membrana neuronal. Esto ocasiona la entrada masiva de iones de (Ca^{2+}) y subsecuentemente dispara la cascada de eventos de la muerte neuronal por excitotoxicidad (Mohd *et al.*, 2015). La administración de esta sustancia genera una pérdida de la integridad de la membrana celular, un decremento en las funciones mitocondriales, condensación y fragmentación del núcleo (Zheng, 2011). Particularmente el AK tiene una modulación directa en la acción presináptica y posináptica, cuando se despolariza la membrana ocurre una alteración en la

homeostasis de calcio dando como resultado una cascada de eventos donde uno de estos es el incremento importante de ERO y ERN generando estrés oxidante.

Los resultados obtenidos en éste estudio demostraron que el tratamiento con AK, en hígado y riñón, así como en las diferentes partes del cerebro estudiadas, tuvieron un incremento en sus valores de MDA. Está bien establecido que la lipoperoxidación es una de las principales reacciones resultantes de la interacción de los radicales libres y las membranas biológicas (Niki *et al.*, 2005). Así mismo, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's por sus siglas en inglés) abundan en el sistema nervioso central (SNC) (Adibhatla y Hatcher, 2007). Lo cual, en condiciones patológicas, por una excesiva formación de especies reactivas, convierte al cerebro en un órgano susceptible a la lipoperoxidación (Reed, 2011; Basaga, 1990). Al mismo tiempo, la administración del AK puede inducir la producción de ER por una disfunción mitocondrial, la síntesis de óxido nítrico, precursores de inflamación, entre otros, que culminan en un estado excitotóxico con subsecuente inducción de apoptosis, autofagia o necrosis (Mohd *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2005; Chuang *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2011).

Éste incremento de MDA por AK se ha observado en otros estudios como el de Shin *et al.* (2009) en donde el uso de ginsenósidos revirtió al daño por AK. Los autores evaluaron el daño a lípidos por medio del método de TBARS en fracciones mitocondriales y homogenados de tejido hipocampal, de donde obtuvo un incremento significativo de TBARS en el grupo con AK con respecto al grupo control y el grupo con la administración de ginsenósidos.

En el presente estudio se observaron diferencias en los niveles de MDA dependiendo del órgano y en el caso del cerebro, diferencias entre regiones. Ello puede deberse a la diferencia de la distribución de la expresión de los receptores a GLU, importantes en los procesos de neuroexcitotoxicidad, como ocurre para el receptor KA-1 que se encuentra primariamente en la región CA3 y el giro dentado y en menor cantidad en las capas corticales, células de Purkinje en cerebelo y en la materia blanca. Además, la expresión del gen que codifica para el receptor KA-2 se encuentra principalmente en capas de la neocorteza, células piramidales de las regiones hipocampales CA1-CA3, en los núcleos preóptico medial, supraquiasmático e hipotalámico medial ventral. En tejido perteneciente a la médula se pueden encontrar mayor abundancia de expresión de receptores a GLU en comparación con el cerebelo, en general la neocorteza e hipocampo

presentan mayor expresión que el resto de los tejidos (Wisden y Seeburg, 1993; Contractor *et al.*, 2000). Lo cual permite que el AK tenga diferentes efectos dependiendo de la región y la cantidad de estos receptores.

Por otro lado, se ha reportado que la administración de AK conlleva a la sobreactivación de la glía, la cual es medida por el incremento de los astrocitos y microglía (Mehta *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2005; Ravizza *et al.*, 2005). Cuando ocurre tal activación, se produce una gran cantidad de mediadores inflamatorios, tales como el óxido nítrico (ON) (Lu *et al.*, 2008). El ON se ha visto incrementado cuando se administra el AK en la región de la corteza temporal/amígdala (Mülsch *et al.*, 1994), participa en la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, se ha demostrado que ON es capaz de activar elementos moleculares como las ciclooxygenasa (COX), la cual es usualmente regulada por células cerebrales bajo condiciones de inflamación, además, puede combinarse con superóxido para generar peroxinitrito, un compuesto reactivo que induce la lipoperoxidación causa daño a DNA, en respuesta la administración de AK, lo que ha permitido asociarlo a diferentes enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras (Parathath *et al.*, 2006 y 2007; Yuste *et al.*, 2015; Mikami *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha observado que metabolitos tipo flavonoide de una fracción acetónica de *H. inuloides* tienen la capacidad de inhibir la producción de óxido nítrico y por lo tanto la subsecuente generación de peroxinitrito NOO- (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2016), lo cual contribuye a que en este experimento se haya observado la disminución de los niveles de lipoperoxidación.

En éste estudio, la administración del extracto acetónico antes de la aplicación de AK mostró una disminución estadísticamente significativa, del daño para el caso las cuatro regiones del cerebro (hemisferios, corteza, cerebelo y médula), éste resultado sugiere que el extracto acetónico interacciona con sus diferentes metabolitos (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2016) de los cuales se pueden mencionar algunos con relevancia en su capacidad atrapadora de especies reactivas. Esta disminución también ha sido reportada cuando es utilizando un extracto o metabolito de alguna planta en contra de los efectos del AK como la cúrcuma (*Curcuma longa*), naringina, extracto metanólico (*Aster scaber*), apigenina (*Cirsium japonicum* y

Carduus crispus), extracto metanólico (*Petasite japonicus*) (Gupta *et al.*, 2008; Golechha *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2012; Sok *et al.*, 2006).

Previos reportes de *H. inuloides* mencionan que está constituida de poliacetilenos, cadinanos, triterpenos, esteroides, sesquiterpenos y flavonoides (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015; Coballase-Urrutia *et al.*, 2011). Particularmente, el extracto acetónico contiene metabolitos de tipo flavonoide y sesquiterpenos (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2016; Haraguchi *et al.*, 1997). Los flavonoides estarían incluidos entre los antioxidantes preventivos, mientras que los sesquiterpenoides serían clasificados como los antioxidantes rompedores de cadenas (Haraguchi *et al.*, 1997). Los primeros se caracterizan por su capacidad de atrapar grupos hidroxilos y de quelar iones de metales de transición (Rice-Evans *et al.*, 1997). Particularmente, los flavonoides presentan una estructura importante, como lo es; un grupo catecol en la posición 3'4' del anillo B; los grupos hidroxilos que donan electrones a los radicales hidroxilos, peroxilo y peroxinitrito; el efecto de la resonancia por la conjugación del anillo A y B les otorga estabilidad; el doble enlace de la posición 2-3 en conjugación con la función oxo (Soobrattee *et al.*, 2005). Diferentes metabolitos como la quercetina, isoquercetina, kaempferol, entre otros, presentan algunas o todas éstas características, y en particular un metabolito que ha sido bien estudiado es la quercetina, la cual se encuentra presente en el extracto acetónico y se ha demostrado que tiene capacidad antioxidante, antiinflamatoria, protector de enfermedades cardiovasculares, anticáncer, entre otros, características que se buscan en un buen agente terapéutico alternativo en el tratamiento de padecimientos neurodegenerativos (Baghel *et al.*, 2016; Alrawaiq y Abdullah, 2014; Gormaz *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011; Mohd *et al.*, 2015)

Por otra parte, el sistema de receptores al ácido gamma-aminobutírico (GABA) es uno de los mecanismos que se encarga de la inhibición química en el cerebro, la contraparte del glutamato. Muchas neuronas expresan el receptor de tipo A de GABA (GABA_A) el cual es considerado como el más importante modulador inhibitorio a nivel farmacológico de la función cerebral (Wasowski y Marder, 2012).

Estos receptores tipo A pueden ser modulados alostericamente por benzodiazepinas, barbituratos, esteroides, anestésicos, anticonvulsivantes y muchos otros fármacos. (Sieghart, 1995; Korpi *et al.*, 2002; Wasowski y Marder, 2012). Particularmente, recientes estudios han propuesto que algunos

flavonoides, entre ellos la quercetina, pueden actuar como benzodiazepinas al unirse al receptor GABA_A (Goutman *et al.*, 2003; Wasowski y Marder, 2012), por lo que en este estudio puede ser otro posible mecanismo por el cual el extracto acetónico ejerce su efecto.

El hígado y riñón han sido menos estudiados en relación a los efectos que el AK puede tener directamente sobre estos, sin embargo existe un estudio realizado por Szaroma *et al.*, en 2012, en el que se observó una disminución de las enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa), GSHPx (glutación peroxidasa), así como un decremento en la cantidad de GSH y ASC (ácido ascórbico), mostrando así que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis del AK en ratón, además se sugiere que el AK no solo es tóxico para el cerebro, sino también para el hígado y riñón de ratón.

Los resultados presentes en este trabajo muestran el incremento de los niveles de MDA cuando solo se administra el AK, lo cual es apoyado por Szaroma *et al.* (2012), y como se mencionó anteriormente este incremento de los niveles de MDA es consecuencia al aumento de especies reactivas posterior a la administración del AK. Una de las probables razones por las cuales se puede observar este incremento es debido a que tanto el hígado como los riñones juegan un papel importante en el metabolismo y detoxificación de sustancias por lo que son susceptibles, además se debe contemplar que el AK al haber sido administrado vía intraperitoneal, es distribuida por el torrente sanguíneo y cuando éste ha generado un daño en SNC las moléculas generadas como ERO, MDA, ON, entre otras, pueden difundirse por el mismo torrente lo que supone un desbalance en diferentes zonas a nivel sistémico.

Los niveles de MDA tanto en hígado como en riñón se vieron disminuidos cuando se administró el extracto acetónico previamente al AK, sugiriendo así que se debe a los mecanismos antes mencionados del atrapamiento de especies reactivas por los componentes del extracto. El estudio de Coballase-Urrutia *et al.* (2011) demostró que *H. inuloides* es un hepatoprotector en contra de las ERO formadas por CCl₄, una sustancia altamente hepatotóxica, ésta información puede apoyar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan analizar las vías específicas que pueden influir los incrementos de MDA observados.

11. CONCLUSIÓN

La administración del extracto acetónico previo al AK disminuyeron los niveles de lipoperoxidación tanto en hígado y riñón, como en cerebro de rata. Esta evidencia sugiere que el extracto acetónico de *H. inuloides* puede ejercer efectos como antioxidante y neuroprotector, por lo que se propone que puede ser una alternativa para el tratamiento de distintas enfermedades asociadas al estrés oxidante. Sin embargo, son necesarios más estudios para identificar los metabolitos implicados en estas propiedades, además de las vías o mecanismos de acción de estos compuestos.

12. PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto del extracto acetónico en un modelo de AK sobre enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, entre otras; cambios morfológicos de células del SNC, hígado y riñón; realizar un perfil de la neuroquímica y la interacción de los metabolitos del extracto con los receptores a GABA.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Villaseñor J. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 2004;75: 105-135.
- IBUNAM: Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. México: Flores Olvera MH; c2010. Citado el 7 de mayo 2017. Historia de las plantas de la nueva España de Francisco Hernández, edición 1942-1946. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/normas-vancouver-buma-2013-guia-breve.pdf>
- Almaguer A. Programa de trabajo 2001-2006 de la dirección de medicina tradicional. Coordinación de Salud para los Pueblos Indígenas. Secretaría de Salud. México, D.F. Manuscrito. 2001: 12 pp.
- Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. The American Journal of Clinical Nutrition. 2003;78. 517S-520S.
- Lanham-New SA, Macdonal IA y Roche HM. Nutrition and metabolism. The Nutrition Society. 2ª edición. 2011: 431 pp.
- Micael D. Medicinal plants: antioxidant properties, traditional uses and conservation strategies. 2014: 227-242.
- Villaseñor R y Espinosa F. Catálogo de malezas de México. Fondo de Cultura Económica, Universidad Nacional Autónoma de México, CNCF. 1998: 448 pp.
- CONABIO: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México: Heike Vibrans; c2009. Citado el 7 de nov 2015. Malezas de México. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/heterothecainuloides/fichas/ficha.htm>
- De Rzedowski GC y Rzedowski J. *Heterotheca inuloides*. En: De Rzedowski GC, Rzedowski J. Flora fanerógama del Valle de México. Michoacán, México: Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad: Pátzcuaro; 2001: 1406 pp.
- Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. 1ª ed. 1979: 1220 pp.
- Argueta V, Cano A y Rodarte M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México D.F. 1994: 1786 pp.
- Cruz A. Plantas medicinales de nueve comunidades en la frontera entre Chignahuapan, Ixtacamaxtitlán y Aquixtla, Puebla. Universidad Autónoma de Chapingo. Tesis de licenciatura. Ingeniería en planeación y manejo de los recursos naturales renovables. 2007: 351 pp.
- González-Stuart AE. Use of medicinal plants in Monterrey, Mexico. Notulae Scientia Biologicae. 2010;2(4): 7-11.

- Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Edna García-Cruz M, Ramírez-Morales A, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Camacho-Carranza R y Espinosa-Aguirre JJ. Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2011;63(4): 363-370.
- Rodríguez-Chávez JL, Coballase-Urrutia E, Sicilia-Argumedo G, Ramírez-Apan T y Delgado G. Toxicological evaluation of the natural products and some semisynthetic derivatives of *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;4;S0378-8741(15): 30121-30125. (a)
- Rodríguez-Chávez JL, Rufino-González Y, Ponce-Macotela M y Delgado G. In vitro activity of 'Mexican arnica' *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*. *Parasitology*. 2015;142(4): 576-584. (b)
- Kubo I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T, Saito T, Ishikawa H y Haraguchi H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica*. 1996;62(5): 427-430.
- Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, Sanchez Y, Ogura T y Kubo I. Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1996;48(4): 441-443.
- Gené RM, Segura L, Adzer T, Marin E e Iglesias J. *Heterotheca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effect. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;60: 157–162.
- Segura L, Freixa B, Ringbom T, Vila R, Perera P, Adzet T, Bohlin L y Cañigueral S. Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Heterotheca inuloides* *in vivo* and *in vitro*. *Planta Medica*. 2000;66: 553–555.
- Delgado G, del Socorro M, Chávez MI, Ramírez-Apan T, Linares E, Bye R y Espinosa-García FJ. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *Journal of Natural Products*. 2001;64(7): 861-864.
- Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Medina-Campos O, Mendoza-Cruz M, Delgado-Lamas G y Espinosa-Aguirre JJ. Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*. 2010;276(1): 41-48.
- Rodríguez-Chávez JL, Coballase-Urrutia E, Nieto-Camacho A y Delgado-Lamas G. Antioxidant capacity of "Mexican arnica" *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives: their anti-inflammatory evaluation and effect on *C. elegans* life span. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 11 pp. (c)
- Rodríguez-Chávez JL, Gómez-Vidales V, Coballase-Urrutia E, Ortega Cuellar D y Delgado-Lamas G. *Heterotheca inuloides* (Mexican arnica) metabolites protect *Caenorhabditis elegans* from oxidative damage and inhibit nitric oxide production. *The Royal Society of Chemistry*. 2016;6(15): 12032-12041. (d)
- Curtis H, Barnes N y Schnek A. Massarini M. *Biología*. Editorial Médica Panamericana, 7ª ed. 2008: 1009 pp.
- Halliwell B y Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. 4ª ed. Oxford University Press. 2007: 888 pp.
- Konigsberg FM. *Radicales libres y estrés oxidativo aplicaciones médicas*. México. Manual Moderno 2008: 623 pp.

- Morales JA. Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants. InTech. 2013: 512 pp.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M y Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1): 44-84.
- Herrera E, Jiménez R, Aruoma O, Hercberg S, Sánchez-García I y Fraga C. Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutrition Reviews*. 2009;67: S140-S144.
- Yoshikawa T. y Naito Y. What is oxidative stress?. *Journal of the Japan Medical Association*. 2002;45(7): 271-276.
- Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J y Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy*. 2015;66(3): 393-405.
- Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P y Biró C. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta*. 2006;364(1-2): 61-66.
- Boyle J, Nelson D y Cox M. *Lehninger principles of biochemistry*. Biochemistry and Molecular Biology Education. 4a ed. 2005;33(1): 74-75.
- Adibhatla R y Hatcher J. Role of lipids in brain injury and diseases. *Future Lipidology*. 2007;2(4): 403-422.
- Reed T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(7): 1302-1319.
- Yin H, Xu L y Porter N. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*. 2011;111(10): 5944-5972.
- Ayala A, Muñoz M y Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 1-31.
- Cortés-Romero C, Galindo F, Galicia-Isasmendi S y Flores A. GABA: ¿dualidad funcional? transición durante el neurodesarrollo. *Revista de Neurología*. 2011; 52: 665-675.
- Fouilloux C, Contreras F, Rivera M, Terán A y Velasco M. Receptores de glutamato: implicaciones terapéuticas. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2004; 23(2): 99-108.
- Tortora GJ y Derrickson BD. *Principles of anatomy and physiology*. John Wiley & Sons, USA. 10ª ed. 2009: 1248 pp.
- Haeberlein SL. Excitotoxicity in neurodegenerative disease. *Encyclopedia of Neuroscience*, 2009, 4; 77-86.
- McCord JM. Evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*. 2000; 108 (8): 652-659.

- Martínez CD, Vargas CR y Arancibia SR. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 2003;46(6): 229-235.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R y Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*. 2013;698(1-3): 6-18.
- Olanow CA. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends in Neurosciences* 1993; 16: 439-444.
- McPhee S y Hammer G. *Fisiopatología de la enfermedad: una introducción a la medicina clínica*. México: McGraw-Hill. 7ª ed. 2015: 757 pp.
- Kosiakov KS. Blood catalase activity in brain tumors during the postoperative period. *Voprosy Neirokhirurgii*. 1975;(6): 41-44.
- Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, Bandala C, Carmona-Aparicio L, y Coballase-Urrutia E. Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(1):1455-1476.
- Ferreira CF, Bernardi JR, da Silva DC, de Sá Couto-Pereira N, de Souza Mota C, Krolow R, Weis SN, Petteuzzo L, Kapczinski F, Silveira PP y Dalmaz C. Mitochondrial and oxidative stress aspects in hippocampus of rats submitted to dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency after exposure to early stress. *Neurochemical Research*. 2015;40(9):1870-1881.
- Figueroa-Méndez R, y Rivas-Arancibia S. Vitamin C in health and disease: it's role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Frontiers in Physiology*. 2015;6;397: 1-11.
- Floyd R y Carney J. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Annals of Neurology*. 1992;32: S22–S27.
- Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P y Marsden CD. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: An HPLC and ESR study. *Movement Disorders*. 1994;9: 92–97
- Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC y Rao VR. Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2009;13: 129–132.
- Bolner A, Pilleri M, de Riva V y Nordera GP, Plasma and urinary HPLC-ED determination of the ratio of 8-OHdG/2-dG in Parkinson's disease. *Clinical Laboratory*. 2011;57: 859–866.
- Gencer M, Dasdemir S, Cakmakoglu B, Cetinkaya Y, Varlibas F, Tireli H, Kucukali CI, Ozkok E y Aydin M. DNA repair genes in Parkinson's disease. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2012;16: 504–507.
- Maetzler W, Schmid SP, Wurster I, Liepelt I, Gaenslen A, Gasser T y Berg D. Reduced but not oxidized cerebrospinal fluid glutathione levels are lowered in Lewy body diseases. *Movement Disorders*. 2011;26: 176–181.

- Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, Siler DA, Markesbery WR, Arumugam TV y Mattson MP. Toll-Like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloidbeta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Experimental Neurology*. 2008;213: 114–121.
- Esterbauer H, Schaur RJ y Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*. 1991;11: 81–128.
- Markesbery WR y Lovell MA. 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 1998;19: 33–36.
- Montine KS, Olson SJ, Amarnath V, Whetsell WO, Graham DG y Montine TJ. Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of APOE4. *The American Journal of Pathology*. 1997;150: 437–443.
- Maragakis NJ y Rothstein JD. Glutamate transporters in neurologic disease. *Archives of neurology*. 2001;58: 365–370.
- Rothstein JD. Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Advances in Neurology*. 1995;68: 7–20.
- Wood JD, Beaujeux TP y Shaw PJ. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2003;29: 529–545.
- Lariviere RC y Julien JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *Journal of Neurobiology*. 2004;58: 131–148.
- Funk J, Janech M, Dillon J, Bissler J, Siroky B y Bell P. Characterization of renal toxicity in mice administered the marine biotoxin domoic acid. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;25(6): 1187-1197.
- Zheng X, Zhang H, Luo Q y Zhu J. Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011: 10 pp.
- Lothman E y Collins R. Kainic acid limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Research*. 1981;218: 299-318.
- Nadler JV. Kainic acid tool for study of temporal epilepsy. *Life Science*. 1981;29: 2031-2042.
- Ben-Ari Y, Tremblay E y Ottersen OP. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience*. 1980: 515-528.
- Ferkany JW, Zaczek R y Coyle JT. Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature*. 1982;298(5876): 757-759.
- Young AB y Fagg GE. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1990;11(3): 126–133

- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Mathern GW, Crandall PH y Levesque MF. Aberrant synaptic reorganization in human epileptic hippocampus: evidence for feedforward excitation. *Dendron*. 1992;1: 7–25.
- Sloviter RS. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainite-treated rats. *Neuroscience Letters*. 1992;137: 91–96.
- Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun G y Sun A. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*. 2005;31(1-3): 3-16.
- Brown GC y Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 2001: 189–195.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A y Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1): 265-275.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 1990;9(6): 515-540.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P y Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*. 2009;7(1): 65-74.
- Cárdenas-Rodríguez N y Pedraza J. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*. 2006;17(2): 164-173.
- Del Rio D, Stewart AJ y Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2005;15(4): 316-328.
- Mohd NS, Sirajudeen KN, Asari MA, Muzaimi M, Mummedy S y Sulaiman SA. Kainic acid-induced excitotoxicity experimental model: protective merits of natural products and plant extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015: 15 pp.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y y Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;9;338(1): 668-676.
- Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry and Cell Biology*. 1990;68(7-8): 989-998.
- Chuang YC, Chang AYW, Lin J-W, Hsu S-P y Chan SHH. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia*. 2004;45(10): 1202–1209.
- Shin EJ, Jeong JH, Kim AY, Koh YH, Nah SY, Kim WK, Ko KH, Kim HJ, Wie MB, Kwon YS, Yoneda Y y Kim HC. Protection against kainate neurotoxicity by ginsenosides: attenuation of convulsive behavior, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*. 2009;87(3): 710-722.
- Wisden W y Seeburg PH. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *Journal of Neuroscience*. 1993;13(8): 3582-3598.

- Contractor A, Swanson GT, Sailer A, O'Gorman S y Heinemann SF. Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2000;20(22): 8269-8278.
- Chen Z, Duan RS, Quezada HC, Mix E, Nennesmo I, Adem A, Winblad B y Zhu J. Increased microglial activation and astrogliosis after intranasal administration of kainic acid in C57BL/6 mice. *Journal of Neurobiology*. 2005;62(2): 207-218.
- Ravizza T, Rizzi M, Perego C, Richichi C, Velísková J, Moshé SL, De Simoni MG y Vezzani A. Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia*. 2005;46: 113s-117s.
- Lu MO, Zhang XM, Mix E, Quezada HC, Jin T, Zhu J y Adem A. TNF-alpha receptor 1 deficiency enhances kainic acid-induced hippocampal injury in mice. *Journal of Neuroscience Research*. 2008;15;86(7): 1608-1614.
- Mülsch A, Busse R, Mordvintcev PI, Vanin AF, Nielsen EO, Scheel-Krüger J y Olesen SP. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *NeuroReport*. 1994;5(17): 2325-2328.
- Parathath S, Parathath S y Tsirka S. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *Journal of Cell Science*. 2006;119: 339 –349.
- Parathath SR, Gravanis I y Tsirka SE. Nitric oxide synthase isoforms undertake unique roles during excitotoxicity. *Stroke*. 2007;38(6): 1938-1945.
- Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9: 322 pp.
- Mikami Y, Kanemaru K, Okubo Y, Nakaune T, Suzuki J, Shibata K, Sugiyama H, Koyama R, Murayama T, Ito A, Yamazawa T, Ikegaya Y, Sakurai T, Saito N y Kakizawa S. Nitric oxide-induced activation of the type 1 ryanodine receptor is critical for epileptic seizure-induced neuronal cell death. *EBioMedicine*. 2016;11:253-261.
- Gupta YK, Briyal S y Sharma M. Protective effect of curcumin against kainic acid induced seizures and oxidative stress in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;53(1):39-46.
- Golechha M, Chaudhry U, Bhatia J, Saluja D y Arya DS. Naringin protects against kainic acid-induced status epilepticus in rats: evidence for an antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective intervention. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2011;34(3):360-365.
- Oh SH, Sok DE y Kim MR. Neuroprotective effects of butterbur and rough aster against kainic Acid-induced oxidative stress in mice. *Journal of Medicinal Food*. 2005;8(2): 169-176.
- Han YS, Ahn Y, Kim S, Yoo SK, Kim SK, Kim HC, Hong JT y Oh KW. Protection of apigenin against kainate-induced excitotoxicity by anti-oxidative effects. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2012; 35(9): 1440–1446.
- Sok DE, Oh SH, Kim YB, Kang HG y Kim MR. Neuroprotection by extract of *Petasites japonicus* leaves, a traditional vegetable, against oxidative stress in brain of mice challenged with kainic acid. *European Journal of Nutrition*. 2006;45(2): 61-69.

- Haraguchi H, Ishikawa H, Sanchez Y, Ogura T, Kubo Y y Kubo I. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1997;5(5): 865-871.
- Rice-Evans CA, Miller NJ y Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. 1996;20(7): 933-56.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI y Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*. 2005;579(1-2): 200-213.
- Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS, Agrawal P y Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016;1(1): 146–160.
- Alrawaiq NS y Abdullah A. A review of flavonoid quercetin: metabolism: bioactivity and antioxidant properties. *International Journal of PharmTech Research*. 2014;6: 933– 941.
- Gormaz JS, Quintremil S y Rodrigo R. Cardiovascular disease a target for the pharmacological effects of quercetin. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015;15: 1735–1742.
- Zhang M, Swarts SG, Yin L, Liu C, Tian Y, Cao Y, Swarts M, Yang S, Zhang SB, Zhang K, Ju S, Olek Jr DJ, Schwartz L, Keng PC, Howell R, Zhang L y Okunieff P. Antioxidant properties of quercetin. *Oxygen Transport to Tissue XXXII*. 2011: 283–289.
- Wasowski C y Marder M. Flavonoids as GABA_A receptor ligands: the whole story?. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2012;4: 9–24.
- Sieghart W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacological Reviews*. 1995;47: 181–234.
- Korpi ER, Gründer G y Lüddens H. Drug interactions at GABA_(A) receptors. *Progress in Neurobiology*. 2002;67: 113–159.
- Goutman JD, Waxenberg MD, Donate-Oliver F, Pomata PE y Calvo DJ. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. *European Journal of Pharmacology*. 2003;461: 79–87.
- Szaroma W, Dziubek K, Greń A, Kreczmer B y Kapusta E. Influence of the kainic acid on antioxidant status in the brain, liver and kidneys of the mouse. *Acta Physiologica Hungarica*. 2012;99(4): 447-459.