



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA QUERCETINA EN UN
MARCADOR BIOQUÍMICO DE ESTRÉS OXIDANTE
EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATA, EN ESTADO
EPILÉPTICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

ANA PAULINA GUTIÉRREZ ALEJANDRE



**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. ELVIA COBALLASE URRUTIA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., septiembre, 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 Ana Paulina Gutiérrez Alejandre Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 310011491</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Elvia Coballase Urrutia Instituto Nacional de Pediatría Laboratorio de Neurociencias</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. María de la Luz Navarro Angulo Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. María Eva González Trujano Instituto Nacional de Psiquiatría Laboratorio de Neurofarmacología de Productos Naturales</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra. Eva Aguirre Hernández Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Yadira Rufino González Instituto Nacional de Pediatría Laboratorio de Parasitología Experimental</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Estudio del efecto de la quercetina en un marcador bioquímico de estrés oxidante en diferentes tejidos de rata, en estado epiléptico. 2017 62 pp.</p>

Esta tesis se realizó en el **Instituto Nacional de Pediatría**, en el Laboratorio de **Neurociencias** (Torre de investigación, piso 3), bajo la dirección de la

Dra. Elvia Coballase Urrutia.

La información derivada de este estudio corresponde al proyecto con No. INP 016/2014, aprobado por el Comité de Investigación y CICUAL de este Instituto.

Obtención Fondos federales 2015.

"Que tu espíritu me guíe sin fronteras, más allá de las barreras, a donde tú me llames. Tú me llevas más allá de lo soñado, donde puedo estar confiado al estar en tu presencia".

Hillsong. "Océanos"

2014

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a Dios mediante el señor Jesucristo, ya que ha estado conmigo no sólo en esta aventura llamada "licenciatura", sino también desde que empezó mi vida en general. Lo que muchos consideran coincidencias, yo lo veo como su presencia recordándome que desde que me voy a dormir hasta que despierto, que él está ahí, a mi lado. En el encuentro gran inspiración a cada paso que voy a tomar, gracias por día con día mostrarme el camino.

A mi mamá y mi papá, por toda su paciencia, amor y cuidados. Me considero demasiado afortunada y agradecida que sean mis padres, sin sus consejos y orientación quizás mi vida sería otra. Se que en ustedes encuentro refugio y tranquilidad, independientemente que el mundo de allá afuera sea un lugar muy difícil. Trabajaré con todas mis fuerzas para que en el futuro vean que todo el fruto de esto y retribuirles, aunque sea un poco de lo mucho que me han dado. Cuando tomo una decisión de vida, sin duda pienso en ustedes. ¡GRACIAS POR AYUDARME A REALIZAR MIS SUEÑOS!

A mi hermano, porque sé que él siempre ha estado ahí en cada paso que doy. La gente dice que uno nace sólo y muere sólo, yo sólo tengo la certeza de decir que mi nacimiento incluyó un compañero de aventuras de la vida.

A la Dra. Elvía, por haber compartido no sólo sus conocimientos y paciencia para elaborar y mejorar este proyecto, sino también por haberme apoyado en momentos que fueron un tanto extraños, por confiar en mí, por haber creado un ambiente muy familiar entre nosotros, sus alumnos, por el viaje a Cancún, por instruirme en este

interesante camino de la ciencia y por muchas otras cosas más que no me alcanza la hoja para escribir. ¡MUCHAS GRACIAS POR SER LA MEJOR TUTORA!

A Lala, porque no solamente es mi prima, sino es mi hermana, mi mejor amiga, confidente, la persona que yo sé que puedo confiar hasta el fin del mundo y que siempre estará en los momentos felices y difíciles. Eres la prima que vale más que un millón de amigos. ¡TE QUIERO MUCHO LALA!

A mis abuelitas, tíos y familiares que me han dado aliento para seguir en este camino, agradezco mucho por sus vidas.

A mis amigos, Diana, Jacobo, ustedes son mis amigos de toda la vida, sé que son verdaderos y su amistad en mi vida me hace muy feliz, los momentos que paso con ustedes son AMOR. Agradezco tanto haberlos conocido en la prepa.

A mis amigas, Priscila, Dennise, Joss e Isa sin duda su apoyo, consejos y amistad hizo que la carrera fuera muy divertida, las experiencias que he vivido con ustedes no las cambio por nada, son historias para contar a mis nietos.

A mis amigos compañeros del laboratorio de Neurociencias, Teresita, Naty, Monse, Omar, gracias a ustedes el proceso de elaborar este trabajo fue muy divertido, momentos llenos de risas y un ambiente de mucha amistad y apoyo.

Finalmente, pero no menos importante, a dos pequeños seres que han alegrado tanto mi vida desde que llegaron a ella y que me acompañaron en cada desvelo durante la carrera, son el mejor regalo que pude haber recibido, que, aunque sé que jamás leerán esto, me es importante mencionarlos porque, Lucky y Molly ocupan un pedazo muy grande de mi corazón.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de cursar la carrera de Biología en la Facultad de Ciencias de Ciudad Universitaria, además hacer uno de mis más grandes sueños realidad y haberme dado experiencias y aprendizajes que van más allá del aula o de los libros.

A mis sinodales, Dra. Luz Navarro, Dra. Eva González, M. en C. Yadira Rufino, Dra. Eva Aguirre y al Dr. Francisco Estrada, por haberme guiado de gran manera y ayudado a mejorar esta tesis, agradezco mucho por sus observaciones, tiempo, apoyo y paciencia que me brindaron y que dedicaron a el presente trabajo.

Al Taller de Fisiopatología Cerebral y Neuroprotección de la carrera de Biología, por haberme aceptado en aquella entrevista para entrar al taller nivel 1, desde ese momento empezó la cuenta regresiva para emprender este trabajo.

Al Instituto Nacional de Pediatría y en especial al Laboratorio de Neurociencias por haberme brindado todos los materiales y área de trabajo necesarios para poder llevar a cabo esta tesis y haberme dado la oportunidad de vivir experiencias que enriquecieron mis conocimientos.

Al Dr. Guillermo Delgado L. del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haber donado el metabolito quercetina extraído de la planta *Heterotheca inuloides*, el cual fue fundamental para realizar esta tesis.

A todos los profesores que me dieron clases y se han cruzado a lo largo de esta gran aventura, sin duda la gran mayoría de ellos me inspiraron a forjar un camino en las ciencias biológicas.

Por último, pero no menos importante, agradezco a la Dra. Elvia nuevamente ya que ha sido una gran tutora y madre académica. Gracias por su apoyo, paciencia y conocimientos brindados a lo largo de esta aventura, sin duda es una persona que jamás olvidaré.

CONTENIDO

i.	ABREVIATURAS.....	9
ii.	ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	10
iii.	RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN		
1.1.	QUERCETINA GENERALIDADES.....	12
1.1.1.	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y EFECTO ANTIOXIDANTE.....	13
1.1.2.	PROPIEDADES TERAPÉUTICAS.....	15
1.2.	ESTRES OXIDANTE GENERALIDADES.....	16
1.2.1.	ESPECIES REACTIVAS.....	17
1.2.2.	FUENTES DE ESPECIES REACTIVAS.....	21
1.2.3.	SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	24
1.3.	ÁCIDO KAINICO.....	25
1.3.1.	ÁCIDO KAÍNICO COMO GENERADOR EXCITOTOXICIDAD NEURONAL.....	26
1.3.2.	MECANISMO DE GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS INDUCIDO POR ÁCIDO KAÍNICO COMO PRO-OXIDANTE	27
1.4.	LIPOPEROXIDACIÓN (OXIDACIÓN LIPÍDICA), GENERALIDADES Y MECANISMO.....	30
2.	JUSTIFICACIÓN.....	32
3.	HIPÓTESIS.....	32
4.	OBJETIVO GENERAL.....	32

5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1.1. MATERIALES.....	33
1.2. SUJETOS EXPERIMENTALES.....	34
1.3. TRATAMIENTOS	34
1.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	35
1.6. DETERMINACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN.....	35
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
8. RESULTADOS.....	36
8.1. CEREBRO:	37
8.1.1. CORTEZA.....	37
8.1.2. CEREBELO.....	38
8.1.3. HEMISFERIOS.....	39
8.1.4. MÉDULA.....	40
8.2 HÍGADO.....	41
8.3 RIÑÓN.....	42
9. DISCUSIÓN.....	43
10. CONCLUSIÓN.....	49
11. PERSPECTIVAS.....	49
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

i. ABREVIATURAS

Q (Quercetina)

MDA (Malondialdehído)

BHE (Barrera hematoencefálica)

TBARS (Determinación colorimétrica de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico)

XOD (Xantinaoxidasa)

LOx (Lipoxigenasa)

NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)

RNOS (Especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, siglas en inglés)

O₂⁻ (Superóxido)

O₂ (Oxígeno)

H₂O₂ (Peróxido de hidrógeno)

GABA (Ácido γ-aminobutírico)

NMDA (Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico)

ATP (Adenosín trifosfato)

ADP (Adenosín difosfato)

SNC (Sistema nervioso central)

ADN (Ácido desoxirribonucleico)

ADNmt (Ácido desoxirribonucleico mitocondrial)

A.F. (Amortiguador de fosfatos)

NO (Oxido nítrico)

NOS (Oxido nítrico sintasa, siglas em inglés)

GTP (Guanosín trifosfato)

GMPc (Guanosín monofosfato cíclico)

CAT (Enzima catalasa)

GSH (Glutación)

GSR (Glutación reductasa)

GSP (Glutación peroxidasa)

ii. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURAS.

Figura 1. Estructura química de la quercetina (Q).....	13
Figura 2. Reducción del oxígeno (Dismutación del O ₂).....	17
Figura 3. Estructura química del ácido kaínico (AK).	25
Figura 4. Concentración de malondialdehído (MDA): tejido de corteza.....	37
Figura 5. Concentración de malondialdehído (MDA): tejido de cerebelo.....	38
Figura 6. Concentración de malondialdehído (MDA): tejido de hemisferios....	39
Figura 7. Concentración de malondialdehído (MDA): tejido de médula.....	40
Figura 8. Concentración de malondialdehído (MDA): tejido de hígado.....	41
Figura 9. Concentración de malondialdehído (MDA): tejido de riñón.....	42

CUADROS.

Cuadro 1. Propiedades terapéuticas de la quercetina.....	15
Cuadro 2. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNOS).....	18
Cuadro 3. Reacciones bioquímicas de los radicales libres (RNOS).....	20
Cuadro 4. Enzimas antioxidantes principales y sus funciones.....	24
Cuadro 5. Tratamientos experimentales.....	34

iii. RESUMEN

La quercetina es un metabolito secundario sintetizado principalmente por las plantas, el cual pertenece a la familia de los flavonoides tipo flavonol y presenta diversas funciones biológicas tales como: efecto antioxidante, antiinflamatorio, etc. Se determinó el efecto de la quercetina (Q), obtenida a partir de las inflorescencias de *Heterotheca inuloides* Cass, sobre el marcador bioquímico de daño a lípidos (lipoperoxidación), en diferentes tejidos cerebrales, así como en los tejidos de órganos como hígado y riñón, de ratas macho en estado epiléptico, inducido por la administración del prooxidante ácido kaínico (AK) [10mg/Kg, vía intraperitoneal], en presencia y ausencia del pretratamiento de Q [100mg/Kg, vía oral] (durante 6 días previos a la administración del AK) .

Los resultados fueron analizados mediante una ANOVA seguida por la prueba de Dunnett ($p < 0.05$). y demostraron que la administración previa de Q favoreció significativamente la disminución de lipoperoxidación inducida por AK, esto se observó en las concentraciones de MDA (malondialdehído), en donde se obtuvo en % de disminución: cerebelo (86.42%), corteza (86.12%), médula (79.53%), hemisferios (75.94%), hígado (51.17%) y finalmente riñón (60.16%). Esta evidencia permite sugerir que la quercetina puede ejercer su efecto antioxidante en los órganos de cerebro, hígado y riñón sobre el daño inducido (lipoperoxidación) posterior a la administración de AK.

Esto podría ser por: 1) Su función de flavonoide que le confiere propiedades atrapadoras de radicales libres, queladora de iones metálicos de transición y donadora de electrones. 2) La capacidad de regular la formación de los ROS y RNS (causantes de la lipoperoxidación), formados durante la excitotoxicidad debido a la entrada de flujo masivo de Ca^{2+} causada por la sobre activación de los receptores de AMPA kainato inducido por la administración de AK.

Se concluye que la quercetina es un potente antioxidante que puede ser una alternativa contra una variedad de insultos oxidativos, así como a diversas enfermedades (entre las cuales se encuentran las neurodegenerativas) relacionadas con el estrés oxidante.

INTRODUCCIÓN

1.1 QUERCETINA GENERALIDADES

La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona) es un metabolito secundario sintetizado principalmente por las plantas, además de que pertenece a la familia de los flavonoides, se encuentra ampliamente distribuido y en mayor concentración en diversos alimentos y plantas como: frutas cítricas, manzanas, vegetales, semillas, cebollas, vino tinto, té verde, etc. (Murakami *et al.*, 2008).

Los flavonoides son un grupo compuesto de polifenoles que se encuentran en las células fotosintéticas, en formas de glicósidos y agliconas, poseen diversos efectos biológicos que son de interés para la salud humana como, por ejemplo: antioxidantes, anticarcinogénos, antimicrobianos, antiinflamatorios. Una dieta rica en flavonoides reduce el riesgo de padecer enfermedades crónicas, relacionadas con el estrés oxidante como lo son la diabetes, el cáncer, enfermedades neurodegenerativas (epilepsia, Alzheimer, etc), coronarias del corazón, entre otras (Boots *et al.*, 2008).

La quercetina es un potente antioxidante por su capacidad para atrapar radicales libres como lo son el ONOO^- y el OH^\bullet , es por esto que se le considera que está involucrada en múltiples efectos benéficos para la salud y por sus diversas propiedades, le dan un potencial para ser usado en la industria farmacéutica, además de que tiene la habilidad de penetrar la barrera hematoencefálica (BHE), incluso con un 65.44% de permeabilidad, por lo que produce resultados favorecedores en el sistema nervioso central (Ren *et al.*, 2010).

1.1.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y EFECTO ANTIOXIDANTE

Existen más de 400 tipos de flavonoides los cuales son categorizados en subclases: flavonoles, antocianinas, flavononas y flavonas (Murakami *et al.*, 2008). La quercetina (flavonoide tipo flavonol), es un polifenol compuesto por 15 átomos de carbono. Posee una estructura base de difenilpropano (C6–C3–C6), que comprende: 2 anillos de benceno llamados A y B (este último tiene dos grupos OH⁻ (hidroxilo), en las posiciones 3' y 4' unidos por un anillo de pirano heterocíclico (C) que contiene también grupos OH⁻ en la posición 3. (Erlund , 2004). (Figura 1)

Los flavonoles se encuentran comúnmente como o-glicósidos, en ellos al menos un grupo OH⁻ es substituido por varios tipos de azúcares, particularmente en la quercetina este grupo azúcar (o-glicósidos) está unido en la posición 3. Además, posee un grupo catecol en las posiciones 3' y 4' del anillo B, en el anillo C tiene grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C y grupo hidroxilo en la posición 3', además de un doble enlace entre los carbonos C2 y C3. Es una molécula hidrofóbica, sin embargo, su solubilidad en agua incrementa conforme incrementan los grupos azúcares y, posee estructura coplanar, (Murakami *et al.*, 2008). Debido a sus grupos hidroxilo tiene la capacidad de quelar Fe y otros iones metálicos, lo que le confiere su poder de reducción o bien, su propiedad donadora de electrones (e⁻), la cual es esencial para su actividad atrapadora de radicales libres (Martínez-Flores *et al.*, 2002).

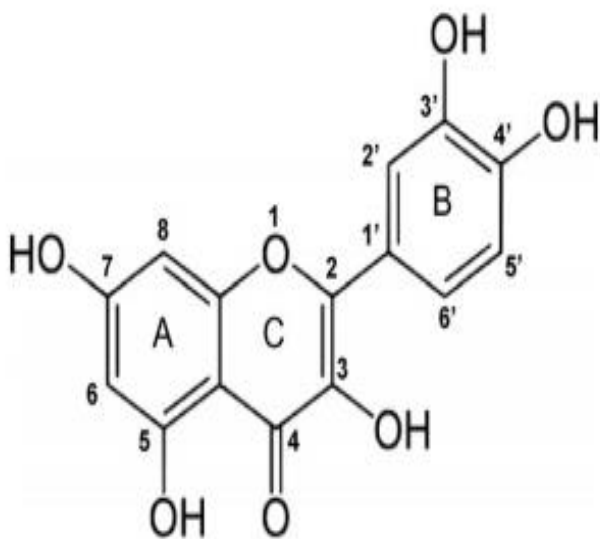


Figura 1. Estructura de la quercetina.

Se sabe que en la capacidad antioxidante de la quercetina están involucradas diversas estructuras como: el *orto*-dihidroxibenceno en las posiciones 3' y 4' en el anillo B, esto forma un grupo catecol; así como el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, unidos al grupo carbonilo de la posición 4, y el grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, también está involucrada en potenciar el efecto antioxidante, (Boots *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2008).

Además, se ha sugerido atribuir la acción antioxidante de la quercetina al efecto inhibidor que le provoca a enzimas oxidantes como: la xantina oxidasa (XOD), lipoxigenasa (LOx) y del NADPH oxidasa. Las cuales tienen un papel importante en los procesos iniciales de daño celular inducido por radicales libres por lo que al inhibir estas enzimas se atenúa el estrés oxidante (Murakami *et al.*, 2008).

Existe una paradoja para la quercetina, donde se plantea que los antioxidantes, los cuales son capaces de donar electrones, se convierten químicamente en productos (metabolitos) de la oxidación en su esfuerzo por proteger contra los radicales libres a las células, volviéndose pro-oxidante. Esto sucede porque la quercetina al ser convertida en una o-quinona por una reacción autocatalítica y el radical o-semiquinona es inevitablemente producido como una especie reactiva intermediaria (Boots *et al.*, 2007).

Las moléculas de oxígeno pueden reaccionar con este radical resultando en la producción de las especies reactivas O_2^- y H_2O_2 , las cuales afectan las vías de señalización redox en las células y son capaces de inducir daño por estrés oxidante (Murakami *et al.*, 2008).

1.1.3 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

A continuación, se describirán algunas de las propiedades terapéuticas de la quercetina. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Propiedades terapéuticas de quercetina.

Propiedades terapéuticas	Mecanismo de acción	Referencias
Antiinflamatorio	La inflamación es mediada parcialmente por la liberación de histamina. La quercetina estabiliza las membranas de las células que liberan la histamina, reduciendo así su liberación. Inhibe <i>in vitro</i> la producción de enzimas como LOX (lipoxigenasa).	Pérez-Trueba & Martínez-Sánchez, 2001; D' Andrea, 2015.
Anticancerígeno	Inhibe el crecimiento <i>in vitro</i> de ciertas células malignas. Acción benéfica en el tratamiento de tumores en próstata.	Murami <i>et al.</i> , 2008; D' Andrea, 2015
Anti-envejecimiento	Posible influencia sobre la sobrevivencia, viabilidad y duración <i>in vitro</i> en fibroblastos primarios de humanos (HFL-1).	D' Andrea, 2015
Antialérgicas	Bloquea las sustancias involucradas en las alergias, por ejemplo: la histamina.	Pérez- Trueba & Martínez-Sánchez, 2001; D' Andrea, 2015.
Antiobesidad	Suprime el incremento de estrés oxidante en los adipocitos suprime el incremento de estrés oxidante	Ahn <i>et al.</i> , 2008; D'Andrea, 2015 ; Nabavi <i>et al.</i> , 2015.
Diabetes	Inhibe la enzima que convierte la glucosa en sorbitol, un compuesto involucrado con las complicaciones diabéticas, (incluyendo las cataratas). Mejora la secreción de insulina y protege las células pancreáticas del daño por radicales libres.	D' Andrea, 2015
Gastrorrotcción	Estudios <i>in vivo</i> reportan efecto protector contra la ulceración gástrica inducida por etanol, así también como en contra del reflujo por esofagitis.	D' Andrea, 2015
Inmunología	Actividad antiviral <i>in vitro</i> contra VIH y otros retrovirus. Actividad antibacteriana contra <i>Helicobacter pylori</i> tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .	D' Andrea, 2015
Neuroprotección	Capacidad de protección a las neuronas ante el probable daño por estrés oxidante inducido por radicales libres.	Pérez-Trueba & Martínez-Sánchez, 2001; Costa <i>et al.</i> , 2016.

1.2. ESTRES OXIDANTE GENERALIDADES

El O₂ es un elemento esencial para la vida. La mayor parte del O₂ inhalado es consumida por la oxidación de los carbohidratos, una pequeña porción (aproximadamente el 2%) es convertida en alguna especie reactiva de oxígeno y nitrógeno (RNOS) (Ramasarma, 1982).

El estrés oxidante se produce por un desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (RNOS) y agentes antioxidantes (enzimas antioxidantes) en las células. Esto es a favor de las RNOS, ya que ocurre un aumento de ellas y/o una disminución de los agentes antioxidantes. Cuando el estrés oxidante continúa o se intensifica, se produce oxidación de los lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos lo cual induce disfunción de los organelos (Milei *et al.*, 2006).

El desequilibrio entre la producción de RNOS y la defensa antioxidante crea un estrés oxidante que promueve o aumenta a diversas condiciones patofisiológicas como: cáncer, arterosclerosis, envejecimiento, diabetes mellitus, enfermedades de Alzheimer, Parkinson, así como la epilepsia, entre otras. Durante estas complicaciones, las RNOS participan en reacciones irreversibles e inducen daño a las biomacromoléculas. Las alteraciones dentro de las células y los tejidos pueden resultar cuando este estado persiste, siendo los principales efectos del estrés oxidante (Paradies *et al.*, 2002; Bailey *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2012).

1.2.1. ESPECIES REACTIVAS

Las especies reactivas (agentes prooxidantes) son moléculas que presentan un electrón no apareado impar en el orbital externo que les da una configuración espacial generadora de gran inestabilidad con fuerte propensión a reaccionar con otras moléculas biológicas e inducir daño, por ejemplo, en lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. (Lozada & García, 2009).

La formación de especies reactivas se da a partir de la reducción (dismutación) del O₂ (**Figura 2**), cabe señalar que el oxígeno es un birradical, lo que significa que contiene dos electrones individuales no apareados en distintos orbitales. Esta característica le da la capacidad de aceptar electrones individuales para crear radicales de oxígeno altamente reactivos. El oxígeno puede aceptar 4 electrones y así reducirse en agua (Lieberman, 2014).

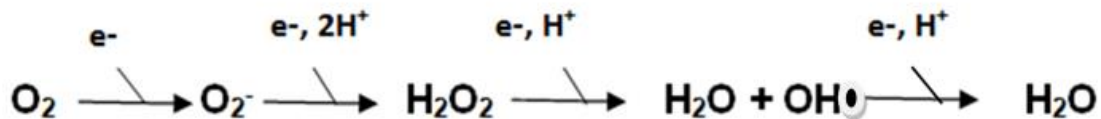


Figura 2. Reducción del oxígeno (dismutación del O₂): la adición de un electrón (e⁻) genera superóxido (O₂⁻), la adición de un 2do (e⁻) genera peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la adición de un 3er (e⁻) genera el radical hidroxilo (OH[•]) y la adición de un último (e⁻) genera una segunda molécula de agua (H₂O). (Lieberman M., 2014)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son una cadena de intermediarios redox activos formados por la reducción parcial química, fotoquímica o bioquímica del O₂. Los miembros de la familia ROS incluyen especies no radicales tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno singulete (O₂↑), y radicales tales como anión superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo (OH[•]), radical hidroperoxilo (HO₂[•]), radicales peroxilo (ROO[•]) y radicales alcoxilo (RO[•]) (Yu, 1994; Paradies *et al.*, 2002; Bergamini *et al.*, 2004). (**Cuadro 2**).

Los ROS pueden actuar como agonistas y antagonistas. Por lo que son tanto benéficos como nocivos en los sistemas biológicos, estas controversias han sido objeto de una investigación activa durante las últimas dos décadas. Ellos se forman como resultado del metabolismo celular en procesos fisiológicos

normales (por ejemplo, proliferación celular, apoptosis, inflamación y defensa contra patógenos etc.), así como en procesos patológicos. (Paradies *et al.*, 2002; Corrales & Muñoz-Ariza, 2012; Sharma *et al.*, 2012).

Por otro lado, las especies reactivas de nitrógeno derivan del radical NO, producido por el óxido nítrico sintasa (NOS) principalmente, que al combinarse con O_2^- produce la especie ONOO⁻ (peroxinitrito) (Lieberman, 2014).

Aunque los mecanismos antioxidantes de defensa celular protegen las biomacromoléculas de las reacciones con especies reactivas, la producción incontrolada de ROS las daña irreversiblemente.

Cuadro 2. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNOS).

Especie reactiva	Propiedades
O₂⁻ Anión superóxido	Producido por la coenzima Q en la cadena de transporte de electrones y en otros sitios. No puede difundirse lejos del sitio de origen. Genera otras ROS.
H₂O₂ Peróxido de hidrógeno	No es un radical libre, pero puede generarlos por reacción con un metal de transición (por ejemplo, Fe ²⁺). Puede difundirse al interior de las membranas celulares y a través de ellas.
OH[•] Radical hidroxilo	La especie más reactiva al atacar moléculas biológicas. Se produce a partir de H ₂ O ₂ en la reacción de Fenton en presencia de Fe ²⁺ o Cu ⁺ .
RO[•], R[•], R-S Radicales orgánicos	Radicales libres orgánicos → R denota el resto del compuesto. Se producen a partir de ROH, RH (por ejemplo, en el carbono de un doble enlace en un ácido graso).
RCOO[•] Radical peroxilo	Se forma en la degradación de lípidos. También se presenta como LOO [•] .
O₂ ↓↑ Oxígeno singulete	Oxígeno con spins antiparalelos. Se produce a altas presiones parciales de oxígeno por absorción de rayos UV. Se desintegra muy rápido.

NO Óxido nítrico	Radical libre producido por el óxido nítrico sintasa (NOS). Se une a iones metálicos. Se combina con O_2^- u otros radicales libres que contiene oxígeno para formar más RNOS.
ONOO⁻ Peroxinitrito	Formado por superóxido y óxido nítrico. Agente oxidante fuerte que no es un radical libre. Puede generar NO_2 (dióxido de nitrógeno) que si es un radical.

(Lieberman, 2014).

Algunas características generales que presentan las RNOS son:

- Remueven (e^-) electrones de otros compuestos para completar sus propios orbitales, con lo que inician reacciones en cadena de radicales libres o bien, son moléculas capaces de existir de forma independiente conteniendo en su última órbita uno o más electrones desapareados lo que las hace muy inestables y altamente reactivas (Naqui *et al.*, 1996; Beckman & Koppenol, 1996).
- Son capaces de combinarse con las diferentes moléculas que integran la estructura celular [poseen potencial para atacar cualquier tipo de biomolécula] (Naqui *et al.*, 1996; Beckman & Koppenol, 1996).
- Por su configuración electrónica estos radicales presentan una vida media corta.
- El mecanismo más común en que se pueden formar los radicales libres es la adición de un electrón a una molécula estable.

Cuando los radicales se han formados, buscan el modo de conseguir una configuración electrónica estable y es así como interactúan con otras moléculas a través de reacciones bioquímicas redox [óxido-reducción] (**Cuadro 3**).

Estas interacciones ocasionan que haya una transferencia de e⁻ que involucran la reducción y oxidación de las moléculas participantes, lo cual genera que la producción de radicales libres, resultando en una reacción en cadena (al reaccionar un radical libre con una molécula no radical esta última pasa a ser un radical libre). Cabe destacar que la reacción en cadena solamente se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí formando una molécula estable (Turrens, 1994; Esposito *et al.*, 2000; Corrales & Muñoz-Ariza, 2012).

Cuadro 3. Reacciones bioquímicas de los radicales libres.

Reacción	Función	Ejemplo
Iniciación	Formación de un radical libre a partir de no radicales.	AB + C → A• + D + E
Propagación	Formación de un radical libre cuando reacciona una molécula estable con un radical libre.	A• + CD → AC + D•
Terminación	Reacción química entre dos radicales libres, en donde sus electrones desapareados son cancelados y se genera un producto estable	A• + D• → AD

(Corrales & Muñoz-Ariza, 2012)

1.2.2. FUENTES DE ESPECIES REACTIVAS

La producción de especies reactivas radicales y no radicales se debe a diversas reacciones químicas y fotoquímicas tanto exógenas como endógenas.

A nivel endógeno, los radicales libres se generan de manera extracelular e intracelular, por ejemplo, se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. También existen células del sistema inmune relacionadas con la producción de radicales libres por ejemplo neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, etc. Y finalmente, las enzimas oxidantes también se encuentran involucradas en la producción de radicales, por ejemplo: xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipoxigenasa, monoamino oxidasa y NADPH oxidasa (Venereo-Gutiérrez, 2002).

Una de las principales fuentes de producción no enzimática de ROS (O_2^-) en las células es la reducción de oxígeno por los electrones de la cadena de transferencia de electrones situada en la mitocondria (Chen *et al.*, 2003; Murphy, 2009).

Las otras fuentes principales de ROS no enzimáticos son la radiación ionizante (Rugo *et al.*, 2002; Yamamori *et al.*, 2012), las reacciones de transferencia de energía de los cromóforos biológicos (Mackerness *et al.*, 2001; Baier *et al.*, 2006), las reacciones catalíticas de los iones metálicos (Fenton, 1894; Haber & Weiss, 1932), materiales en partículas y contaminantes orgánicos (Gurgueira *et al.*, 2002; den Hartigh *et al.*, 2010; Miljevic *et al.*, 2010).

En ciertos casos, los ROS menos reactivos producidos por diferentes rutas activan químicamente ROS altamente reactivos. Por ejemplo, O_2^- reacciona con el óxido nítrico y forma ONOO⁻, que fácilmente nitra y desactiva biomoléculas tales como enzimas y ADN. De forma similar, iones metálicos de transición tales como Cu^{2+} y Fe^{2+} catalizan la producción de ROS *in vivo* (Haber & Weiss, 1932).

En la reacción de Fenton, el ion ferroso convierte el H_2O_2 en $\text{OH}\cdot$ altamente reactivo (Fenton, 1894) y, en la reacción de Heber-Weiss, el ion Fe^{2+} cataliza la producción de $\text{OH}\cdot$ por H_2O_2 y O_2^- . La naturaleza altamente reactiva de $\text{OH}\cdot$ las biomoléculas proximales, lo que es una causa primaria de daño debido al estrés oxidativo (Haber & Weiss, 1932).

A nivel exógeno existen diversas fuentes como rayos UV y otras radiaciones ionizantes (por ejemplo, rayos X, Y, Gamma), contaminantes tales como moléculas orgánicas e inorgánicas (como monóxido de carbono, fibras de asbestos, ozono, dióxido de nitrógeno, iones metálicos como cadmio, cobre, hierro, mercurio, etc.) y materiales en partículas de automóviles, emisiones industriales y humo de cigarrillos, que catalizan la producción de ROS radicales y causan estrés oxidativo, lesión e inflamación pulmonar (Venereo-Gutiérrez, 2002; Corrales & Muñoz-Ariza, 2012).

Mientras que las radiaciones de alta energía como los rayos X y rayos Gamma directamente producen ROS radicales por la ionización del agua u oxígeno, diversas reacciones químicas y fotoquímicas generan O_2^- , que a su vez produce otros ROS (Venereo-Gutiérrez, 2002; Corrales & Muñoz-Ariza, 2012). Dichas exposiciones alteran la homeostasis entre las concentraciones fisiológicas de las RNOS, el sistema de defensa antioxidante (Tao *et al.*, 2003; Poljšak & Fink, 2014), e inducen daño a las biomacromoléculas por estrés oxidante, por ejemplo:

Lípidos

Es aquí donde se produce el daño mayor, en un proceso que se conoce como lipoperoxidación, el cual afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular (los ácidos grasos que presentan insaturaciones son componentes esenciales de las membranas celulares). La oxidación de lípidos puede ser desencadenada por el oxígeno, el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Cadenas, 1989; Reilly & Bulkley, 1990; Jerlick *et al.*, 2000).

Proteínas

Hay oxidación sobre grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas (Venereo-Gutiérrez, 2002).

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Ocurren mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (Fraga et al., 1990; Wiseman & Halliwell, 1996; Venereo-Gutiérrez, 2002).

1.2.3 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Un antioxidante se refiere a una sustancia sintética o natural capaz de retrasar, prevenir o eliminar la oxidación de un sustrato oxidable como lípidos, ADN, proteínas, etc. El sistema de defensa antioxidante enzimático (**Cuadro 4**), se encarga de evitar que las especies reactivas se acumulen, esto lo logra al catalizar la transferencia de e⁻ (electrones) del sustrato hacia la especie reactiva en cuestión, por ejemplo, O₂⁻ y H₂O₂. Su mecanismo es el de atrapar a las especies reactivas teniendo como objetivo mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos (Corrales & Muñoz-Ariza, 2012).

Cuadro 4. Enzimas antioxidantes principales (sistema de defensa antioxidante enzimático) y sus funciones.

Enzima	Función
Catalasa (CAT)	<p>Presenta 2 funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa, forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno.</p> <p>Alta concentración en hígado y riñón, nula en tejido nervioso.</p> <p>Se localiza en mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos).</p>
Glutación peroxidasa (GPx)	<p>Cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido, usa como agente reductor el glutati6n reducido.</p> <p>Se localiza en citosol (eritrocitos), lisosomas, neutr6filos, macr6fagos y otras c6lulas del sistema inmune.</p>
Super6xido dismutasa (SOD)	<p>Catalizar la dismutaci6n del O₂⁻ para formar per6xido de hidr6geno el cual es menos reactivo y puede llegar a ser degradado por otras enzimas como la catalasa o la glutati6n a peroxidasa.</p> <p>Ejerce protecci6n contra el an6n super6xido. Se localiza en citosol y en el espacio intermembranoso mitocondrial.</p>

(Venereo-Guti6rrez, 2002; Corrales & Mu6noz-Ariza, 2012).

1.3. ÁCIDO KAINICO

El ácido (2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil)-acético monohidrato, (KA), es una neurotóxina aislada originalmente del alga japonesa *Digenea simplex* o “Makuri”, en un principio se utilizó como un agente antihelmíntico, al poder remover gusanos del tracto digestivo (Lothman & Collins, 1981)

Su fórmula molecular es C₁₀H₁₅NO₄ y su masa molecular equivale a 213,23 g/mol (Zheng *et al.*, 2011). (Figura 3).

Estudios posteriores lo señalaron como un agonista para receptores ionotrópicos de glutamato, lo que permite simular el efecto del glutamato en modelos neurodegenerativos. Su administración sistémica puede ser de manera intravenosa, intraperitoneal, intranasal o local (Lothman & Collins, 1981).

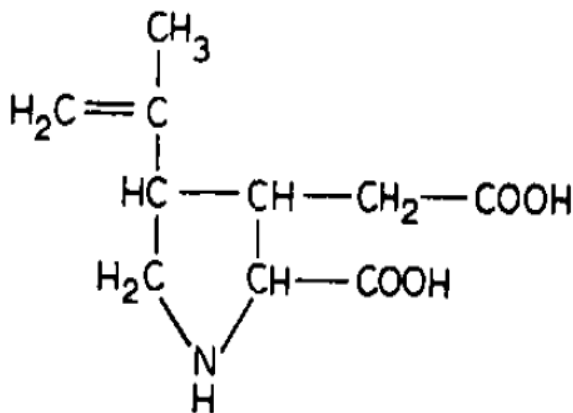


Figura 3. Estructura del ácido kainico.

También es un prooxidante y análogo del glutamato (principal neurotransmisor excitador), donde se ha descrito que el AK es 30 veces más neurotóxico que este. Induce grave daño en la región del hipocampo debido a que en esta región hay una mayor densidad de receptores AMPA kainato, los cuales son los receptores de AK (McGeer & McGeer, 1978; Darstein *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Zhang & Zhu, 2011).

La administración de AK es uno de los modelos de excitotoxicidad más utilizado en animales adultos, el cual es también un modelo de epilepsia del lóbulo temporal inducido por la inyección unilateral o sistémica. En dosis

convulsionantes daña por excitotoxicidad a las neuronas piramidales del hipocampo (Lorigados *et al.*, 2013).

El daño depende de la dosis, la especie y la cepa animal; pero el resultado es la muerte de las neuronas en las regiones vulnerables, la proliferación de astrocitos y el aumento de fibras gliales (Lorigados *et al.*, 2013).

1.3.1. ÁCIDO KAÍNICO COMO GENERADOR DE EXCITOTOXICIDAD NEURONAL

La excitotoxicidad neuronal es el mecanismo que promueve la muerte celular mediante la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos o cualquiera de sus análogos, y ha sido reconocido como causa de daño neural en diferentes condiciones patológicas. El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la lesión consiste en la sobre activación de receptores tipo NMDA / AMPA kainato que aumentan el calcio intracelular, conduciendo a la apoptosis (muerte celular programada) dentro del sistema nervioso, y parece estar relacionada con varios eventos fisiopatológicos que están mediados por la sobrecarga de Ca^{2+} en las neuronas y las células gliales (Doble, 1999; Heath & Shaw, 2002; Lorigados *et al.*, 2013), además también daña a las neuronas del hipocampo, particularmente a las de la región CA1 y CA3, así como en el *hilus* del giro dentado (García-Galloway, 2003; Lorigados *et al.*, 2013).

La administración de AK, se ha utilizado como modelo para los trastornos neurológicos agudos, y se ha informado que promueve la formación de radicales libres así como la oxidación lipídica (Dal-Pizzol *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000 ; Patel *et al.*, 2008).

En modelos animales se ha reportado cambios conductuales, neurodegeneración, necrosis o apoptosis neuronal y ha sido propuesto como inductor del estado epiléptico límbico [actividad epiléptica sostenida o bien, con una duración mayor a 5 minutos] (Olney *et al.*, 1974; Lowenstein *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005; Espitía *et al.*, 2010; Pereno, 2010).

Los mecanismos involucrados en esta patogénesis parecen estar relacionados con el estrés oxidativo. La disfunción mitocondrial inducida por peroxidación de lípidos y la reducción en los niveles de energía sugieren que las lesiones neuronales son causadas por la generación excesiva de especies reactivas (Sun *et al.*, 1992; Bruce & Baudry, 1995).

Por otra parte, el cerebro es altamente susceptible al estrés oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno, energía y glucosa, gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturado y la relativamente baja capacidad antioxidante (Floyd, 1999).

En resumen, la administración de AK ha demostrado que genera la entrada de flujo masivo de Ca^{2+} a la célula y activa enzimas dependientes de este ion incrementando la producción de RNOS y por lo tanto también incrementa el estrés oxidante, genera disfunción mitocondrial, condensación, fragmentación del núcleo y la apoptosis de las células, así como la activación de la microglía, mediadora de la respuesta inflamatoria en el SNC (Wang *et al.*, 2005)

1.3.2. MECANISMO DE GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS INDUCIDO POR AK COMO PRO-OXIDANTE

Después de administrar AK, se ha observado que los receptores (AMPA kainato) ejercen una acción presináptica moduladora y una acción postsináptica inhibitoria; También sobre activan los receptores de glutamato. La activación de estos receptores lleva a la despolarización de la membrana neuronal, el flujo de Na^+ y Ca^{2+} del medio extracelular al medio intracelular, incrementan la tendencia de la membrana de la neuronal hacia la despolarización. Cuando dicha membrana se despolariza hasta su umbral, los canales de Na^+ se modifican (abren) para permitir el paso de iones de Na^+ y se desencadene el potencial de acción, cuando hay sobreestimulación. De manera que cuando una terminal presináptica del axón se ve estimulada por este potencial de acción, causa la entrada masiva de las concentraciones de Ca^{2+} al medio intracelular. Esto provoca excitotoxicidad, lo cual estimula la formación de RNOS, y por lo tanto estrés oxidante, el cual es responsable de la entre otras cosas de la oxidación lipídica (lipoperoxidación) así como daño de proteínas, ADN, de igual manera causa reducción de energía (ATP) (Torres-Zambrano *et al.*, 2011).

El incremento de Ca^{2+} intracelular activa también a diferentes enzimas dependientes de Ca^{2+} como lo son las proteasas (responsables de romper la membrana y el citoesqueleto de las proteínas), endonucleasas (fragmentación de ADN), kinasas y fosfolipasas (daño a membrana), etc. La disfunción mitocondrial resulta en la activación de caspasas y proteasas, responsables de la muerte celular programada (apoptosis) y finalmente induce necrosis (Alfaro-Rodríguez, 2004; Baéz-Mendoza, 2004; Zheng *et al.*, 2011; Mohd *et al.*, 2015). Durante este proceso hay un consumo de oxígeno, glucosa y sustratos de energía como ATP (Malagón, 2013).

El estrés oxidativo inducido por las crisis recurrentes contribuye al daño y muerte celular. Los radicales libres derivados del estrés oxidante son componentes de la excitotoxicidad. En parte ello sustenta en que las crisis prolongadas inducen daño celular en las macromoléculas (Rodríguez-Violante *et al.*, 2010; Lorigados *et al.*, 2013; Luna-Ortíz *et al.*, 2014).

Es importante mencionar que la disfunción mitocondrial debido a las RNOS ha sido observada después de las crisis durante la epileptogénesis y se ha asociado con la neurodegeneración (Patel, 2002). Las mitocondrias también están involucradas en el proceso de muerte celular programada (apoptosis) y son moduladoras del flujo de Ca^{+2} que entra a la célula, además de ser los principales productores de ROS en el medio intracelular (Rego & Oliveira, 2003; Rodríguez-Violante *et al.*, 2010; Luna-Ortíz *et al.*, 2014).

La pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} se debe a la saturación de los mecanismos de regulación como la bomba de Ca^{2+} , el intercambiador ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), y las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} . Una vez saturados estos sistemas, la mitocondria captura el exceso de Ca^{2+} que se acumula en la matriz mitocondrial. Ello induce la despolarización de la membrana y afecta la síntesis de ATP y la activación del poro de transición mitocondrial, que contribuye una vía por donde el Ca^{2+} retorna al citosol. Este aumento en las concentraciones de Ca^{2+} potencializa la formación de radicales libres que inducen la oxidación de lípidos de la membrana, la síntesis de óxido nítrico (activación de NOS), cuyo producto reacciona con el superóxido y forma el peroxinitrito), así como la activación de enzimas involucradas en el catabolismo de proteínas (activación de proteasas e

inhibición de la síntesis de proteínas), fosfolípidos (activación de fosfolipasas) y ácidos nucleicos (Haglid *et al.*, 1994; Almeida *et al.*, 1998; Nicholls & Ward, 2000; Murchison & Griffith, 2000; Lorigados *et al.*, 2013; Luna-Ortíz *et al.*, 2014). El aumento sostenido de la concentración de iones Ca^{2+} al medio intracelular seguirá afectando a las mitocondrias, por lo que estas continuaran produciendo especies reactivas y generando una afectación a los diferentes órganos (Mohd *et al.*, 2015; Patel, 2002).

Además, la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y el agotamiento del mecanismo de defensa antioxidante podrían conducir a la epileptogénesis y también se ha propuesto que el daño inducido al ADN mitocondrial por RNOS y el decremento en la función de la cadena de transporte de electrones son los factores más importantes que conllevan a la muerte neuronal (Chuang *et al.*, 2004; Liang & Patel, 2006; Waldbaum & Patel, 2010; Rowley & Patel, 2013; Rowley *et al.*, 2015).

1.4. LIPOPEROXIDACIÓN (OXIDACIÓN LIPÍDICA), GENERALIDADES Y MECANISMO

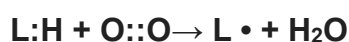
La lipoperoxidación es la reacción biológica de cadena de radicales libres más conocida, implica la oxidación de ácidos grasos insaturados u otros lípidos como los fosfolípidos, cuyos productos son peróxidos de estos compuestos. Puesto que los lípidos son responsables de mantener la integridad de las membranas celulares, la peroxidación extensa de los lípidos altera el ensamblaje, la composición, la estructura y la dinámica de las membranas lipídicas. Como compuestos altamente reactivos, los peróxidos lipídicos son también capaces de propagar una generación adicional de especies reactivas, o degradarse en compuestos reactivos capaces de inducir daño en ADN y proteínas (Niedernhofer *et al.*, 2003; Sakharov *et al.*, 2005; Klaunig *et al.*, 2009; Brewer, 2011).

Todo el organismo está expuesto de diversas formas al estrés oxidante, sin embargo el cerebro es un órgano muy susceptible, ya que se ha establecido que representa el 2% del peso corporal en humanos y utiliza el 20% del O₂ consumido por el organismo, además de que contiene grandes cantidades de lípidos y iones metálicos de transición como Fe²⁺ y Cu⁺, aparte tiene menos mecanismos antioxidantes que otros tejidos, lo cual lo hace más propenso al daño mediado por RNOS, por ejemplo: O²⁻, OH•, ONOO-, H₂O₂, etc. (Rego & Oliveira, 2003; Torres-Zambrano, *et al.*, 2011).

La oxidación lipídica se divide en 3 etapas:

1. **Iniciación:**

El radical de ácido graso se produce en esta etapa. Los iniciadores en células vivas son los radicales: hidroxilo (OH•), peroxilo (LOO•), alcoxilo (LO•) y alquilo (L•), así como ozono, dióxido de azufre y dióxido de nitrógeno. La separación de hidrógeno conduce a la formación de un radical alquilo.



2. Prolongación:

Los radicales de ácidos grasos volátiles reaccionan fácilmente con oxígeno molecular formando peróxidos. Estos peróxidos se caracterizan por un bajo nivel de estabilidad y, por lo tanto, son capaces de reaccionar con más moléculas de ácidos grasos creando más radicales. Esto es un proceso cíclico.



3. Terminación:

Cuando la concentración de radicales libres es suficientemente alta, la probabilidad de colisión entre dos radicales crece significativamente. La colisión de dos radicales termina el proceso.



Los dímeros de ácidos grasos, hidroxiácidos y oxoácidos son productos de la reacción de terminación. A menudo también existe una conexión entre los productos de peroxidación y las proteínas presentes en las membranas celulares, creando conexiones proteína-lípido. Los productos de la peroxidación lipídica pueden estar sujetos a cambios adicionales, tales como la reacción de β -eliminación, que produce, entre otras cosas, peróxidos como: malondialdehído (MDA), 8-hidro-2-deoxiguanosina, 4-hidroxinonenal. Debido a su pequeño tamaño, estos productos pueden difundirse fácilmente a través de membranas biológicas y por lo tanto pueden dañar al ADN. Los aldehídos resultantes son citotóxicos, mutagénicos y carcinógenos, y pueden causar ruptura en las cadenas de ADN. Los efectos primarios de la peroxidación lipídica también incluyen la pérdida de actividad de las membranas celulares, los cambios en su capacidad para inhibir la bomba de Ca^{2+} o el debilitamiento de la relación entre el transporte de electrones en la cadena respiratoria y la producción de ATP (Niedernhofer *et al.*, 2003; Sakharov *et al.*, 2005; Klaunig *et al.*, 2009; Brewer, 2011).

2. JUSTIFICACIÓN

Considerando la implicación del estrés oxidante en la lipoperoxidación y diversas enfermedades como: cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, epilepsia), así como el en el envejecimiento, etc. Los antioxidantes pueden ser posibles candidatos para el tratamiento preventivo y terapéutico de estos padecimientos.

La quercetina al presentar entre sus propiedades una alta capacidad antioxidante, pudiese ser una alternativa para limitar el grado de daño por especies reactivas sobre órganos como hígado, riñones o en el SNC, por lo cual la quercetina puede ser un potencial agente terapéutico que prevenga o reduzca el daño que ocasionan las enfermedades asociadas al estrés oxidante.

3. HIPÓTESIS

Debido a que la quercetina posee propiedades antioxidantes, disminuirá los niveles de daño por lipoperoxidación sobre los tejidos (cerebro, hígado y riñón) de los sujetos experimentales, al ser administrada previamente al prooxidante ácido kaínico.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la quercetina sobre la lipoperoxidación inducida por la generación de especies reactivas y excitotoxicidad después de la administración del ácido kaínico en los tejidos de cerebro (corteza, cerebelo, hemisferios y médula), así como en los de hígado y riñón de ratas.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Cuantificar la cantidad de proteínas presentes en: cerebro, hígado y riñón después de haber administrado AK (10 mg/kg; vía intraperitoneal) en presencia y ausencia de quercetina (100mg/kg; vía oral).
- 2- Determinar lipoperoxidación en tejidos de cerebro, hígado y riñón en presencia y ausencia del ácido kaínico (10 mg/kg; vía intraperitoneal).
- 3- Determinar el efecto antioxidante de quercetina (100mg/kg; vía oral) sobre la lipoperoxidación inducida por ácido kaínico (10 mg/kg; vía intraperitoneal).

6. 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.

6.1 MATERIALES

La quercetina se obtuvo de *Heterotheca inuloides*.

Reactivos:

Ácido Kaínico (C₁₀H₁₅NO₄) de Tocris Bioscience

Folin y fenol Ciocalteu, Tritón X-100, amortiguador de fosfatos (5mM pH 7.4), sulfato de cobre (II) [CuSO₄] al 1%, albumina sérico bovina (ASB), 1,1,3,3-tetrametoxipropano (C₇H₁₆O₄), carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 2%, tartatro sódico-pótasio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) al 2%, deferoxamina mesilada (DMSO) de Sigma Aldrich Co. Hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1 M de Merck.

6.2 SUJETOS EXPERIMENTALES.

Se utilizaron ratas Wistar macho con pesos de 180-220g. Se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Pediatría en cajas de acrílico en condiciones constantes de temperatura ($21^{\circ}\pm 1C$), humedad relativa (50-60%), iluminación (12:12-hrs luz/oscuridad) y aire filtrado (5mm de partículas) con intercambio de 18 veces/h.

La dieta proporcionada fue alimento *ad libitum* comercial estándar (Harlan 2018S Teklad dieta global esterilizado (Harland Teklad, Madison, WI, EUA) y agua filtrada *ad libitum*.

6.3 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Se dividieron en 6 grupos/tratamientos experimentales (**Cuadro 5**) a las ratas. Durante 6 días, diario se administró una vez vía oral con ayuda de una sonda pediátrica (Tecmed), 100mg/kg de quercetina (Q) disuelto en 0.1 mL de amortiguador de fosfatos (AF) y amortiguador de fosfatos solo. Posteriormente, al 6to día se administró vía intraperitoneal ácido kaínico (AK) en una concentración de 10 mg/kg y se observó su efecto sobre las ratas al evaluar su conducta por 4 horas. Finalmente, se procedió a sacrificar los animales.

Cuadro 5. Grupos, tratamientos experimentales y vías de administración.

Tratamientos	Sin tratamiento (C)	Amortiguador de fosfatos (AF)	Quercetina (Q)	Ácido kaínico (AK)	Amortiguador de fosfatos + Ácido Kaínico (AF+AK)	Quercetina + Ácido Kaínico (Q+AK)
Vía de administración	X	Vía oral	Vía oral	Vía intraperitoneal	Vía oral + vía intraperitoneal	Vía oral + vía intraperitoneal
Días	1 2 3 4 5 6					
		0.1 mL	100 mg/Kg	10 mg/Kg	0.1 mL + 10 mg/kg	100 mg/Kg + 10 mg/kg
	Sin dosis					
Sacrificio (6to día)						

Después de haber terminado las observaciones, se procedió a sacrificar y diseccionar a los animales. Se diseccionaron los órganos: cerebro (tejidos de corteza, cerebelo, médula, hemisferios), riñón y hígado. Se pesó 1 gr de cada tejido órgano, posteriormente se homogéneo cada tejido y se centrifugaron a 30000 rpm, durante 30 min/ -4°C y se tomó el sobrenadante de cada muestra. Finalmente, se mantuvieron en ultracongelación a -70° C, hasta su uso.

6.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de [Lowry et al., 1951](#).

6.5 DETERMINACIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN

Para la técnica de lipoperoxidación se utilizó el método de determinación colorimétrica de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Consiste en la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído generado durante el proceso de lipoperoxidación en los tejidos ([Janero, 1990](#)).

Para realizar esta prueba, primero se procedio a realizar curvas estándar, donde las absorbancias y resultados obtenidos se expresaron en mg/mL deproteína/molMDA ([Janero, 1990](#)).

Para finalizar las pruebas experimentales, se dio lectura con ayuda de un espectrofotómetro (Epoch, Biotek instruments, Inc.) a 530 nm.

Cabe destacar que cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de n=6, por triplicado, tuvieron un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación multiple Dunnett con ayuda del programa estadístico GraphPad Prism 5.0 (San Diego, Ca, EUA). Se considero una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

8. RESULTADOS

Determinación de proteínas:

La cuantificación de proteínas por el método de Lowry permitió observar que la cantidad de proteínas variaron según el órgano o el tejido, siendo mayor la concentración en el hígado y riñón y menor concentración en corteza, cerebelo, médula, hemisferios.

Determinación de lipoperoxidación:

A continuación, se presentan las gráficas que ilustran la concentración de MDA en los diferentes tratamientos por cada tejido de cerebro (corteza, cerebelo, Hemisferios y médula) y para los órganos de hígado y riñón.

8.1. CEREBRO

8.1.1. CORTEZA

En la **Figura 4**, se observan las concentraciones de malondialdehído (MDA) en el tejido de corteza. Los grupos de (C, AF y Q), obtuvieron concentraciones equivalentes a: C (20.02 mg/mlprot/nmol MDA), AF (27.23 mg/mlprot/nmol MDA) y Q (22.70 mg/mlprot/nmol MDA), los cuales representan valores promedio basales respectivamente. Por otro lado, el grupo al que sólo se le administro AK de manera intraperitoneal, fue el que más incrementó reporto, equivalente al 100% de daño ocasionado. Los grupos de (C, AF y Q), obtuvieron concentraciones equivalentes a: C (20.02 mg/mlprot/nmol MDA), AF (27.23 mg/mlprot/nmol MDA) y Q (22.70 mg/mlprot/nmol MDA), lo cual representa valores basales respectivamente. En el grupo que contiene AF+AK el incremento de MDA fue de 147.66 mg/mlprot/nmol MDA, que corresponde a un promedio de daño del 73.39%. Finalmente, en cuanto al grupo de Q+AK el incremento de MDA fue de 27.91mg/mlprot/nmolMDA, lo que corresponde a un promedio de daño de 13.87%, resultando así en un decremento estadísticamente significativo de 86.42% con respecto al grupo de AK.

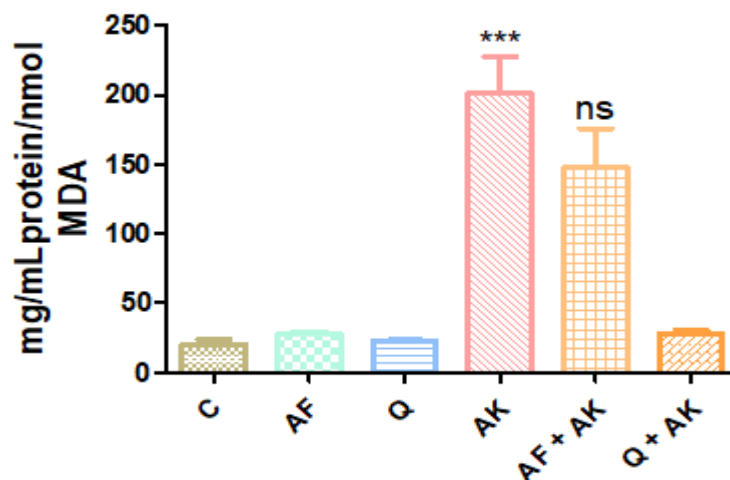


Fig. 4 Concentración de MDA sobre el **tejido de corteza de cerebro de rata**: **C** (sin tratamiento/control); **AF** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL); **Q** (quercetina, 100mg/kg); **AK** (ácido kaínico, 10 mg/kg); **AF+AK** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL + ácido kaínico, 10 mg/kg); **Q +AK** (quercetina, 100mg/kg + ácido kaínico, 10 mg/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n=6 por triplicado, *** p<0.0001 AK vs. todos los grupos; AF + AK ns.

8.1.2. CEREBELO

El resultado obtenido de las concentraciones de MDA en el tejido de cerebelo se representan en la **Figura 5**. Para los grupos (C, AF y Q), se pueden observar valores promedio basal, en donde se obtuvo: C (19.67 mg/mlprot/nmolMDA), AF (38.98mg/mlprot/nmolMDA) y Q (28.45 mg/mlprot/nmolMDA). Sin embargo, para el grupo al que únicamente se le administro AK tuvo el valor máximo de producido MDA a comparación de los demás grupos, equivalente a 228 mg/mlprot/nmolMDA, lo que representa el 100% de daño ocasionado por lipoperoxidación. El grupo de AF+AK presentó un incremento de MDA de 191.00 mg/mlprot/nmol MDA, dicho valor corresponde a un de daño del 83.77%, por lo que no presenta diferencias estadísticamente significativas a comparación del grupo al que sólo se le administro AK. Con respecto al grupo Q+AK, el incremento de MDA fue de 30.96mg/mlprot/nmol MDA, que corresponde a un promedio de daño de 13.57%, dando así una disminución de 86.42% con respecto al grupo que sólo contiene AK y presentando diferencias estadísticamente significativas contra este mismo

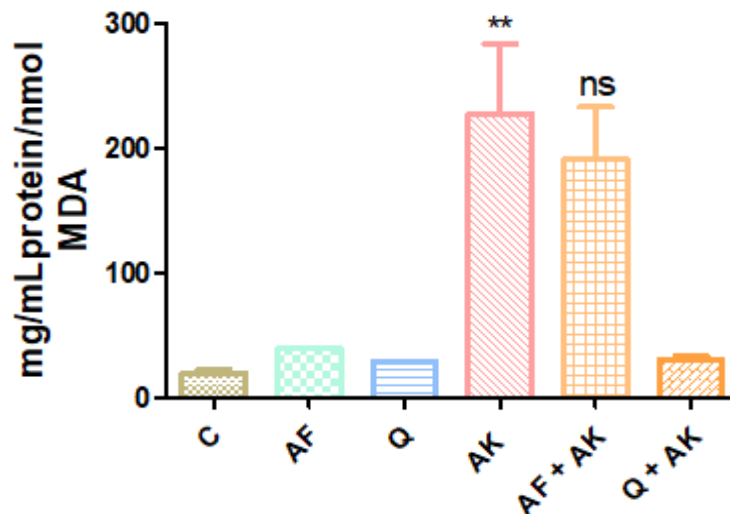


Fig. 5 Concentración de MDA sobre el **tejido de cerebelo de cerebro de rata**: **C** (sin tratamiento/control); **AF** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL); **Q** (quercetina, 100mg/kg); **AK** (ácido kaínico, 10 mg/kg); **AF+AK** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL + ácido kaínico, 10 mg/kg); **Q +AK** (quercetina, 100mg/kg + ácido kaínico, 10 mg/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n =6 por triplicado, ** p<0.0004 AK vs. todos los grupos; AF + AK ns.

8.1.3. HEMISFERIOS

En la Figura 6, se ilustran las concentraciones de (MDA) obtenidas para el tejido de hemisferios. En ellas se observó que los valores promedio basal fueron los obtenidos por los grupos: C (19.59 mg/mlprot/nmol MDA), AF (36.11mg/mlprot/nmol MDA) y Q (33.28 mg/mlprot/nmol MDA), los cuales representan un 0% de daño por lipoperoxidación. En cuanto al grupo al que sólo se le administro AK, ocurrió lo contrario, se observó un incremento máximo de MDA en comparativa a los demás grupos, este incremento es equivalente al 100% de daño por lipoperoxidación. En el grupo que contiene AF+AK, el incremento de MDA que se obtuvo fue de 112.00 mg/mlprot/nmol MDA, no obtuvo diferencias significativas con el grupo de AK. Por último, el grupo de Q+AK reporto un incremento de MDA de 32.23 mg/mlprot/nmolMDA, lo cual corresponde a un promedio de daño de 24.05% y, por lo tanto un decremento del 75.94%, siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo de AK.

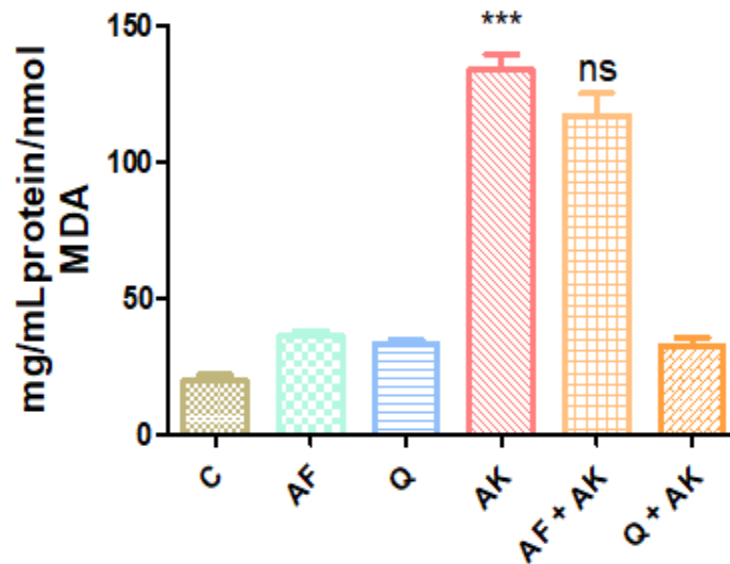


Fig. 6 Concentración de MDA sobre el **tejido de hemisferios de cerebro de rata**: **C** (sin tratamiento/control); **AF** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL); **Q** (quercetina, 100mg/kg); **AK** (ácido kainico, 10 mg/kg); **AF+AK** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL + ácido kainico, 10 mg/kg); **Q +AK** (quercetina, 100mg/kg + ácido kainico, 10 mg/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n =6 por triplicado, *** $p < 0.0001$ AK vs. todos los grupos; AF + AK ns.

8.1.4. MÉDULA

La concentración de MDA que se obtuvo para cada uno de los diferentes grupos del tejido de médula se observa en la **Figura 7**. El resultado obtenido para los grupos (C, AF y Q), a los que no se les administró AK fue de: C (11.31 mg/mlprot/nmol MDA), AF (20.84 mg/mlprot/nmol MDA) y Q (28.24mg/mlprot/nmol MDA), lo cuales representan valores promedio basal. Para l grupo al que se le administro AK únicamente, se observó un incremento considerable al comparar con las concentraciones de MDA de los demás grupos, este incremento fue equivalente al 100% de daño por lipooxidación. El AF+AK obtuvo un incremento de MDA de 101.66 mg/mlprot/nmol MDA, que corresponde a un promedio de 78.93% de daño por lipoperoxidación, con esto reporta tiene diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de AK. Finalmente, en el grupo Q+AK se observó un incremento de MDA de 26.36 mg/mlprot/nmol MDA, que corresponde a un promedio de daño del 20.46%, por lo que la disminución del daño por MDA equivale al 79.53% y es estadísticamente significativa.

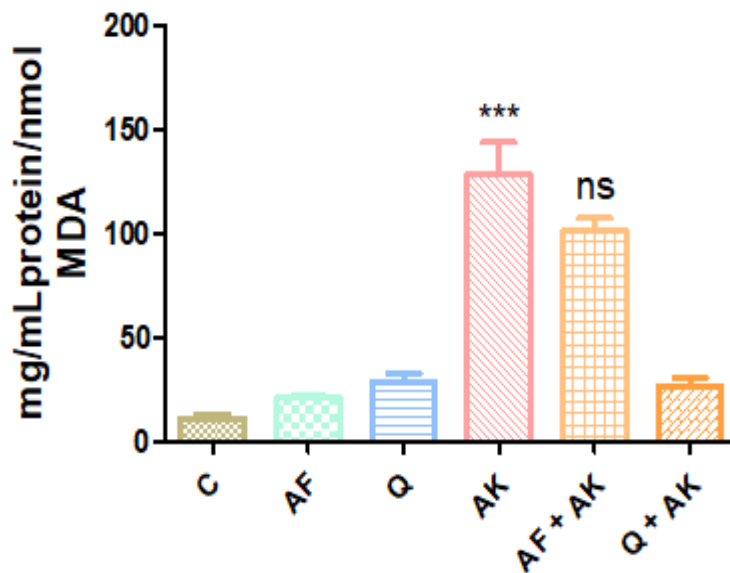


Fig. 7 Concentración de MDA sobre el **tejido de médula de cerebro de rata**: **C** (sin tratamiento/control); **AF** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL); **Q** (quercetina, 100mg/kg); **AK** (ácido kaínico, 10 mg/kg); **AF+AK** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL + ácido kaínico, 10 mg/kg); **Q +AK** (quercetina, 100mg/kg + ácido kaínico, 10 mg/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n =6 por triplicado, *** $p < 0.0001$ AK vs. todos los grupos; AF + AK *ns*.

8.2. HÍGADO

En la **Figura 8**, se reportan las concentraciones de MDA para el tejido de hígado de rata. Primero se observan los grupos a los que no se les administró AK, los cuales obtuvieron valores promedio basal de: control (C, AF y Q), poseen un valor promedio basal de: C (76.09 mg/mlprot/nmol MDA), AF (102.4 mg/mlprot/nmol MDA) y Q (142.7 mg/mlprot/nmol MDA), representando un 0% de daño inducido por lipoperoxidación. Por otra parte, el grupo de AK obtuvo un incremento significativo en la concentración de MDA, el cual representa el 100% de daño por lipoperoxidación. En cuanto al grupo de AF+AK, el incremento de MDA que se observó fue de 276.66 mg/mlprot/nmolMDA, por lo que corresponde a un promedio de 88.89% de daño por lipoperoxidación. Por último, con respecto al grupo de Q+AK el incremento de MDA que se obtuvo fue de 152.37 mg/mlprot/nmol MDA, el cual corresponde a un promedio de daño por lipoperoxidación de 48.83%, dando así una disminución del MDA de 51.17% con respecto al grupo que sólo contiene AK, de igual manera que en los demás tejidos, entre estos dos grupos hay diferencias estadísticamente significativas.

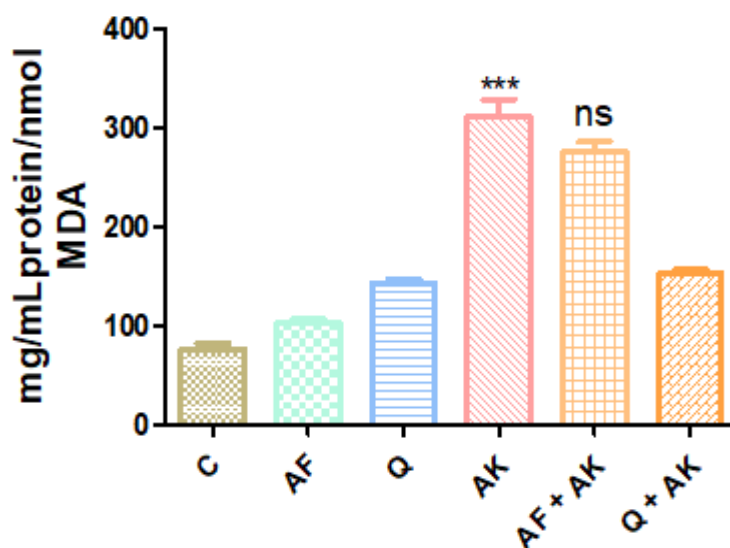


Fig. 8 Concentración de MDA sobre el **tejido de hígado de rata**: **C** (sin tratamiento/control); **AF** (amortiguador de fosatos, pH 7.4 0.1 mL); **Q** (quercetina, 100mg/kg); **AK** (ácido kaínico, 10 mg/kg); **AF+AK** (amortiguador de fosatos, pH 7.4 0.1 mL + ácido kaínico, 10 mg/kg); **Q +AK** (quercetina, 100mg/kg + ácido kaínico, 10 mg/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n =6 por triplicado, *** p<0.0001 AK vs. todos los grupos; AF + AK ns.

8.3. RINÓN

Finalmente, en la **Figura 9** se reportan los resultados de las concentraciones de MDA del tejido de riñón de rata. Los grupos (C, AF y Q) se ilustran primero, en ellos se observan las siguientes concentraciones de MDA ya que no se les administró AK: C (74.43mg/mlprot/nmol MDA), AF (98.81mg/mlprot/nmol MDA) y Q (93.93 mg/mlprot/nmol MDA), estos representan los valores promedio basal. Sin embargo, el grupo al que sólo se le administró AK obtuvo un incremento máximo de MDA, lo que equivale al 100% de daños ocasionados por efecto de la lipoperoxidación. El grupo que contiene AF+AK, no presento diferencias estadísticamente significativas con el grupo de AK ya que obtuvo un incremento de MDA de 266.66 mg/mlprot/nmol, el cual corresponde a un promedio de 91.74% de daño. Finalmente, en el grupo de Q+AK se observa un incremento de MDA fue de 115.8 mg/mlprot/nmolMDA, por lo que corresponde a un promedio de daño por lipoperoxidación del 39.83%, lo que es igual a un decremento de MDA del 60.16% con respecto al grupo que sólo contiene AK, presentado estos dos grupos diferencias estadísticamente significativas.

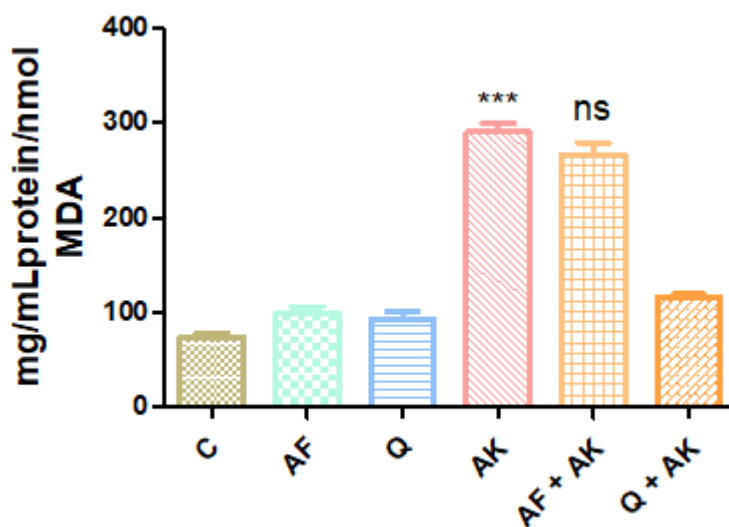


Fig. 9 Concentración de MDA sobre el **tejido de riñón cerebro de rata**: **C** (sin tratamiento/control); **AF** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL); **Q** (quercetina, 100mg/kg); **AK** (ácido kaínico, 10 mg/kg); **AF+AK** (amortiguador de fosfatos, pH 7.4 0.1 mL + ácido kaínico, 10 mg/kg); **Q +AK** (quercetina, 100mg/kg + ácido kaínico, 10 mg/kg). Los datos representan la media \pm la D.E. de n =6 por triplicado, *** p<0.0001 AK vs. todos los grupos; AF + AK ns.

9. DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado que el AK es capaz de inducir estado de estrés oxidante (involucrado en gran cantidad de enfermedades), es utilizado en modelos de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, para generar crisis convulsivas en animales y debido a que genera un aumento sostenido de las concentraciones de iones de Ca^{2+} al medio intracelular, provoca excitotoxicidad y con ello la formación de radicales libres, que inducen la oxidación de lípidos de la membrana (lipoperoxidación), la síntesis de óxido nítrico y la activación de enzimas involucradas en el catabolismo de proteínas (activación de proteasas e inhibición de la síntesis de proteínas), fosfolípidos (activación de fosfolipasas) y ácidos nucleicos. (Lorigados *et al.*, 2013; Haglid *et al.*, 1994).

Una manera para cuantificar los niveles de estrés oxidante *in vitro*, es mediante la evaluación de las concentraciones de malondialdehído, del cual ya se había mencionado que es un producto de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, por lo que nos indica el daño por lipoperoxidación inducida por AK (Niedernhofer *et al.*, 2003; Del Río, 2005).

En los resultados de este trabajo se observó que los tratamientos de todos los tejidos a los que sólo se les administro AK obtuvieron la mayor concentración de MDA, el cual al ser un marcador bioquímico de oxidación lipídica nos sugiere una mayor estimulación para la formación RNOS, esto debido a que el AK activa los receptores de glutamato que incitan la entrada de un flujo abundante de Ca^{2+} al interior de la célula y eso favorece la formación de diferentes RNOS como: OH^{\bullet} , O^{2-} , ONOO^- (una vía de daño celular es la activación de óxido nítrico sintasa (NOS), cuyo producto reacciona con el su peróxido y forma el peroxinitrito), y H_2O_2 (Bruce & Baudry, 1995).

También existen evidencias que reportan que incrementa la concentración de NO_2^- y que ocurría una degeneración de las neuronas pertenecientes a la región CA1 y CA3 del hipocampo (Baluchnejadmojarad & Roghani, 2012; Khamse *et al.*, 2015).

En los estudios realizados por [Cock, \(2007\)](#) & [Mohd, et al., \(2015\)](#), describen que el AK sobre activa los receptores AMPA kainato lo cual produce que la membrana neuronal se despolarice de manera continua llevando a una excitotoxicidad, por el incremento Ca^{2+} intracelular, lo que provoca una disfunción mitocondrial que de igual manera va ligada a la formación de ROS y por lo tanto de estrés oxidativo esto dirige una condición de oxidación sobre los lípidos en las membranas celulares y mitocondriales, así como también puede causar daño a las proteínas, al DNA y finalmente neurodegeneración ([Zsurka & Kunz, 2015](#)). Lo cual también explicaría por que se observaron estos incrementos de MDA en los grupos a los que sólo se les administro el prooxidante AK en los 4 diferentes tejidos de cerebro.

Existen otros trabajos que respaldan los resultados del presente estudio, al observar también un incremento de MDA después de haber administrado AK, por ejemplo, en el trabajo de [Mohanam & Yamamoto, \(2002\)](#) se observó el efecto de la melatonina sobre la lipoperoxidación causada por la administración de AK, se concluyó que tanto la exposición *in vivo* como *in vitro* al AK en efecto incremento la oxidación de lípidos en el encéfalo, así como el daño al ADN mitocondrial debido a la producción de OH^{\bullet} .

Otro ejemplo de este incremento de MDA, sería el estudio realizado por [Gupta et al., \(2002\)](#), en el que proponen el efecto protector del trans-resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por AK; se observó que los niveles de MDA en el encéfalo se incrementaron de manera significativa tras la administración de AK en comparación al grupo control.

Las evidencias ilustran a la quercetina como un potente antioxidante, y que puede prevenir el daño contra una variedad de insultos oxidativos debido a que estructuralmente es capaz de secuestrar RNOS, quelar ([Wang et al., 2016](#)).

Con los resultados de este trabajo, se obtuvo que en el grupo al que se le administró Q+AK se puede observar una disminución considerable en cuanto a la concentración de MDA al comparar contra el grupo al que solo le fue administrado AK, que recordemos equivale al 100% de lipoperoxidación sobre los todos los tejidos de cerebro (corteza, cerebelo, hemisferios y médula), así

como de hígado y riñón. Esto nos sugiere que al recibir quercetina como tratamiento previo al AK ocurrió un decremento en la lipoperoxidación (concentraciones de MDA) y por lo tanto en la formación de RNOS (estrés oxidante). Esto nos demostraría que el papel antioxidante del metabolito quercetina incluye desde disminuir RNOS y daño por lipoperoxidación tanto en el cerebro como en hígado y riñón. Existen diversos estudios que respaldan los resultados observados en este estudio, así como evidencias que lo convierten en un potencial neuroprotector y en general protector en contra del estrés oxidante y lipoperoxidación generado a causa de la excitotoxicidad por la administración de AK.

En primer lugar un mecanismo propuesto es por las características de la estructura química de la quercetina, por ejemplo la presencia del grupo orto-dihidroxilo en el anillo B (grupo catecol), responsable de brindar estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones (Pérez- Trueba & Martínez- Sánchez, 2001; Martínez-Flores, *et al.* 2002).

También los grupos OH⁻ (la presencia de grupos hidroxilo libres en el esqueleto químico de la quercetina juega un papel importante para su actividad antioxidante), en conjugación con el grupo 4-oxo en los anillos A y C así como el grupo carbonilo presente en la posición 4 y el doble enlace en los carbonos 2-3 del anillo C (Pérez- Trueba & Martínez- Sánchez, 2001; Martínez-Flores, *et al.* 2002).

Estas posiciones, participan en la acción antioxidante por lo que son capaces de catalizar el transporte de electrones, atrapar radicales libres (retira especialmente las formas de aniones superóxidos, radicales hidroxilo, peróxidos lipídicos e hidroperóxidos) y quelar iones metálicos transitorios (Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺), por otro lado también se ha observado que es capaz de inhibir oxidasas tales como la xantina oxidasa y la óxido nítrico sintasa (NOS) (Pérez- Trueba & Martínez- Sánchez, 2001; Martínez-Flores, *et al.* 2002; Gutiérrez-Guerrero, 2008; Suganthy *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016)

Otros trabajos reportan que se ha utilizado la quercetina como neuroprotector en diversos modelos de excitotoxicidad y generación de especies reactivas, por

ejemplo, en el de [Kanter et al., \(2016\)](#), se valoró el efecto neuroprotector que ejerce la quercetina en contra del daño y neurotoxicidad que genera el estrés oxidante inducido por cadmio (Cd) sobre el hipocampo, se observó que el grupo de Cd incremento de manera significativa los niveles de MDA así como las enzimas SOD y CAT, sin embargo el grupo al que se le agrego Cd + Q disminuyo de manera significativa los niveles de MDA en el tejido. Resultados similares obtuvieron ([Unsal C. et al., 2015](#)), tras haber administrado por 30 días Cd con un pretratamiento de quercetina las concentraciones de MDA habían disminuido en comparación al grupo solo de Cd y las enzimas antioxidantes (SOD, GSP y CAT) habían incrementado en el tejido de corteza frontal. Concluyendo que el tratamiento con quercetina tiene un potente efecto en la neurodegeneración tras la exposición a Cd y neuroprotector por la quercetina.

Otro estudio que respalda lo observado en el presente estudio, en cuando a la capacidad de la quercetina de disminuir los niveles de MDA, es el de [González-Esquivel et al., \(2015\)](#) donde reportó la acción de la quercetina cuando se administraron nanopartículas de dióxido de titanio (molécula tóxica), en él se observó los efectos que ejerce quercetina sobre el estrés oxidante en hígado y riñón cuando se administró quercetina 5 días previos a la exposición de dióxido de titanio (TiO₂) se cuantifico la concentración de MDA, y las enzimas antioxidantes GR y GPx. Sus resultados arrojaron que la quercetina incremento las enzimas GR y GPx, disminuyó los niveles de MDA.

Por otro lado, en cuanto a los tejidos de hígado y riñón, cabe mencionar que son de interés para este trabajo ya que son órganos importantes porque tienen un rol tanto en el metabolismo como en la detoxificación de sustancias que ingresan al organismo. También es importante destacar que al administrar el AK vía intraperitoneal, este viaja por el torrente sanguíneo y es distribuido a nivel sistémico por lo que supone un daño en órganos como los riñones y el hígado además del SNC.

En este trabajo se demostró también con base en los resultados obtenidos, que hay un efecto protector de la quercetina sobre los órganos hígado y riñón después de haber administrado AK, esto porque al disminuir las concentraciones

de MDA en los tejidos de estos dos órganos nos indica que los niveles de lipoperoxidación decrecieron y por lo tanto también la formación de RNOS. Lo que nos sugiere el efecto antioxidante de la quercetina actuó sobre el estrés oxidante y excitotoxicidad generado por el AK.

Estudios que apoyan estos resultados son como el realizado por (Uthra *et al.*, 2017), ellos observaron el efecto tóxico sobre hígado y riñón de la acrilamida en presencia quercetina, sus resultados arrojaron que la exposición de 1/3 de la LD₅₀ de acrilamida en ratas durante 10 días indujo toxicidad, esto se evidencio con un incremento sustancial de la lipoperoxidación y un decremento en las enzimas antioxidantes. Sin embargo, al administrar acrilamida con quercetina se obtuvo que los niveles de lipoperoxidación disminuyeron a causa de su actividad atrapadora de radical hidroxilo y peroxilo así como de interferir en la formación de lipoperoxidación al reaccionar con los radicales libres involucrados en ella.

Por otro lado, el papel de la mitocondria es importante en la oxidación lipídica, ya que es el principal productor de RNOS dentro de la célula, en el cerebro es el encargado de proveer ATP para la neurotransmisión, de la regulación de la concentración de Ca²⁺ pre y post sinápticamente (Rahman, 2015; Murphy, 2009). Se han reportado diversos efectos directos de quercetina sobre la mitocondria, que pueden apoyar el presente trabajo, por ejemplo, Devienne *et al.*, (2007) & Lagoa *et al.*, (2011), describen que la quercetina fue capaz de atrapar O²⁻ y disminuir la producción de H₂O₂ así como disminuir los niveles de lipoperoxidación mediante la quelación de Fe²⁺. En otros estudios, describen que previene la oxidación de GSH, así como la generación de hidroperóxidos y lipoperoxidación en cerebros de ratón (Franco *et al.*, 2007; Waseen & Parvez, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Por las evidencias que existen de estudios anteriores y en conjunto con los resultados obtenidos en este trabajo, en cuanto a la disminución de MDA cuando se administró Q previamente al AK, se propone que la quercetina tiene un efecto regulatorio sobre los RNOS producidos específicamente en la mitocondria tras ocurrir una alteración (disfunción mitocondrial) debida al flujo masivo de Ca²⁺ intracelular causado por la excitotoxicidad generada por la administración de AK.

Finalmente, otro mecanismo que se ha reportado previamente y por el cual se puede proponer que la quercetina ejerce su efecto en el grupo de Q+AK, es uno similar al de las benzodiazepinas (BDZs), fármacos moduladores e inhibitorios a nivel del SNC. Las BDZs interactúan con los receptores GABA_A (proteínas transmembranales que forman un canal iónico permeable al ion Cl⁻ y son ligando de GABA). Cuando GABA (principal neurotransmisor inhibitorio) se une al receptor, el canal iónico se abre y permite el flujo del ion Cl⁻, e inhibe el canal de Ca²⁺ y por lo tanto disminuye la excitotoxicidad y formación de especies reactivas de manera intracelular (Wasowski & Marder, 2012).

Estudios previos han caracterizado un modelo de las interacciones ligando/receptor o bien, flavonoide (en este caso la quercetina) /receptor GABA_A, para correlacionar las características estructurales y fisicoquímicas de estos compuestos con su afinidad por los diferentes sitios del receptor (Marder *et al.*, 1998; Hanrahan *et al.*, 2001; Kahnberg *et al.*, 2002; Wasowski & Marder, 2012).

10. CONCLUSIÓN

La administración de la quercetina previamente a la del ácido kaínico disminuyó las concentraciones de MDA y por lo tanto de lipoperoxidación en los órganos de cerebro, hígado y riñón de rata. Esta evidencia sugiere que gracias al efecto antioxidante de la quercetina se ejerció tanto neuroprotección como protección en hígado y riñón en contra de los radicales libres. Lo cual nos permite proponer a este metabolito como una alternativa a enfermedades asociadas al estrés oxidante, así como neurodegenerativas. Sin embargo, aún se necesitan diversos estudios para determinar específicamente los mecanismos de acción de la quercetina.

11. PERSPECTIVAS

La investigación futura debe centrarse en la evaluación de las enzimas antioxidantes en el cerebro (SOD, CAT, GSH, GSP, etc.) en combinación con la administración de quercetina y ácido kaínico, estudios histológicos para observar cambios morfológicos tanto en células del SNC como en las del hígado y los riñones, verificar la interacción de la quercetina con los receptores GABA_A.

12. REFERENCIAS

1. Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*. 2008; 269 (2): 315-325.
2. Boots A, Haenen G, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 585 (2-3):325-337.
3. Ren S, Suo Q, Du W, Pan H, Yang M, Wang R. Quercetin permeability across blood-brain barrier and its effect on the viability of U251 cells. *Journal of Sichuan University Medical Science Edition*. 2010; 41(5): 751,759.
4. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 2004; 24(10): 851-874.
5. Martínez-Flores S., González J, Culebras J, Tuñón J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2002; 17(6): 271-278.
6. Boots A, Li H, Schins R, Duffin R, Heemskerk J, Bast A et al. The quercetin paradox. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007; 222(1): 89-96.
7. Pérez Trueba G, Martínez Sánchez Z G. Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farmacológica Bonarense*. 2001; 20(4): 297-306.
8. D'Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia*. 2015; 106: 256-271.
9. Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008; 373(4): 545-549.
10. Nabavi S, Russo G, Daglia M, Nabavi S. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat! *Food Chemistry*. 2015; 179: 305-310.

11. Costa L, Garrick J, Roquè P, Pellacani C. Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016: 1-10
12. Ramasarma T. Generation of H₂O₂ in biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1982;694(1):69-93.
14. Milei J, Forcada P, Fraga C, Grana D, Tritto I, Jannelli G, Chiariello M, Ambrosio G. Lipoperoxidación de membranas y daño ultraestructural por estrés oxidativo en isquemia-reperfusión miocárdica. *Revista Argentina de Cardiología*. 2006; 74 (1): 12-18.
15. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero F. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*. 2002;286(1):135-141.
16. Bailey S, Landar A, Darleyusmar V. Mitochondrial proteomics in free radical research. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005; 38 (2): 175-188
17. Fu P, Xia Q, Sun X, Yu H. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2012; 30(1): 1-41.
18. Lozada S, García L. Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Revista Asociación Colombiana de Dermatología*. 2009; 17: 172 – 179.
19. Lieberman M. *Bioquímica, biología molecular y genética*. 6th ed. Cincinnati, Ohio: Wolters Kluwer; 2014.
20. Yu B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*. 1994; 75(1): 139–162.
21. Bergamini C, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current Pharmaceutical Design*. 2004;10(14):1611-1626.

22. Corrales L, Muñoz-Ariza M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 2012; 10 (18): 135-250.
23. Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*. 2012; 17(8): 852-870.
24. Naqui A, Britton C, Cadenas E. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annual Review Biochemistry*. 1996; 55: 137-66.
25. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology*. 1996; 271(5): C1424-C1437.
26. Turrens J. Fuentes intracelulares de especies oxidativas en condiciones normales y patológicas. *Antioxidantes y Calidad de Vida*. 1994; 1: 9-16.
27. Esposito L, Kokoszka J, Waymire K, Cottrell B, MacGregor G, Wallace D. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 28(5): 754-766.
28. Venereo-Gutiérrez J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2002; 31(2): 126-133.
29. Chen Q, Vazquez E, Moghaddas S, Hoppel C, Lesnefsky E. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(38): 36027-36031.
31. Murphy M. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 2009; 417(1): 1-13.
32. Rugo R, Secretan M, Schiestl R. X radiation causes a persistent induction of reactive oxygen species and a delayed reinduction of TP53 in normal human diploid fibroblasts. *Radiation Research*. 2002; 158(2): 210-219.

33. Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, Wada Y, Nakamura H, Inanami O. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012; 53: 260–270.
34. Mackerness S, John C, Jordan B, Thomas B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters*. 2001; 489(2-3): 237-242.
35. Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Bäuml W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophysical Journal*. 2006; 91(4): 1452-1459.
36. Fenton H. LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894; 65(0): 899-910.
37. Haber F, Weiss J. Über die katalyse des hydroperoxydes (on the catalysis of hydroperoxide). *Naturwissenschaften* 1932; 20(51): 948–950.
38. Gurgueira S, Lawrence J, Coull B, Murthy G, González-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environmental Health Perspectives*. 2002; 110(8): 749-755.
38. den Hartigh L, Lamé M, Ham W, Kleeman M, Tablin F, Wilson D. Endotoxin and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient fine particulate matter from Fresno, California initiate human monocyte inflammatory responses mediated by reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro*. 2010; 24(7): 1993-2002.
39. Miljevic B, Fairfull-Smith K, Bottle S, Ristovski Z. The application of profluorescent nitroxides to detect reactive oxygen species derived from combustion-generated particulate matter: Cigarette smoke – A case study. *Atmospheric Environment*. 2010; 44(18): 2224-2230.

40. Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003;35(4):327-340.
41. Poljšak B, Fink R. The Protective Role of Antioxidants in the Defence against ROS/RNS-Mediated Environmental Pollution. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014; (2014); 1-22.
42. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*. 1989; 58(1): 79-110.
43. Reilly P, Bulkley G. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *British Journal of Surgery*. 1990; 77(12): 1323-1324.
44. Jerlick A, Pitt AR, Schaur RJ, Spickett CM. Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 28(5): 673-682.
45. Fraga C, Shigenaga M, Park J, Degan P, Ames B. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990; 87(12): 4533-4537.
46. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species:role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*. 1996; 313(Pt 1): 17-29.
47. Lothman E, Collins R. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Research*. 1981; 218(1-2): 299-318.
48. Zheng X, Zhang H, Luo Q, Zhu J. Kainic acid-induced neurodegenerative model:potentials and limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011:1-10.
49. McGeer EG, McGeer PL. Some factors influencing the neuro-toxicity of intrastriatal injections of kainic acid. *Neurochemical Research*. 1978; 3(4): 501–517.

50. Darstein M, Petralia RS, Swanson GT, Wenthold RJ, Heinemann SF. Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23(22): 8013-9.
51. Lee JK, Won JS, Singh AK, Singh I. Statin inhibits kainic acid-induced seizure and associated inflammation and hippocampal cell death. *Neuroscience Letters*. 2008; 440(3): 260–264.
52. Zhang, X.-M., & Zhu, J. Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines. *Current Neuropharmacology*. 2011; 9(2): 388–398.
53. Lorigados L, Orozco S, Morales L, Estupiñán B, García I, Rocha L. Excitotoxicity and neuronal death in epilepsy. *Biotechnology Applications*. 2013; 30(1): 9-16.
54. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 1999; 81(3): 163-221.
55. Heath P, Shaw P. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*. 2002; 26(4): 438-458.
56. García-Galloway E. Muerte neuronal excitotóxica: integración entre las rutas de señalización del IGF-I y el glutamato [Doctorado]. Universidad Complutense de Madrid; 2003.
57. Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna M, Schröder N, Quevedo J, Benfato M. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters*. 2000; 291(3): 179-182.
58. Kim H, Jhoo W, Bing G, Shin E, Wie M, Kim W et al. Phenytoin prevents kainate-induced neurotoxicity via antioxidant mechanisms. *Brain Research*. 2000; 874(1): 15-23.

59. Patel M, Liang L, Roberts II L. Enhanced hippocampal F2-isoprostane formation following kainate-induced seizures. *Journal of Neurochemistry*. 2008; 79(5): 1065-1069.
60. Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Research*. 1974; 77(3): 507–512.
61. Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL. It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia*. 1999; 40:120-2.
62. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun AY. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*. 2005; 31(1-3) :3-16.
63. Espitia O, Buch M, Uscátegui A. Estado epiléptico en niños. *Med UNAB (Universidad Autónoma de Bucaramanga)*. 2010; 13: 22-30.
64. Pereno GL. Fisiopatología de la Epilepsia del Lóbulo Temporal: Revisión del Proceso de Muerte Neuronal a la Neuroplasticidad. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento* 2010, 2 (1): 46-57.
65. Sun A, Cheng Y, Bu Q, Oldfield F. The biochemical mechanisms of the excitotoxicity of Kainic acid. *Molecular and Chemical Neuropathology*. 1992; 17(1): 51-63.
66. Bruce A, Baudry M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995; 18(6): 993-1002.
67. Floyd R. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1999; 222(3): 236-245.
68. Torres-Zambrano M, Bustos J, Granados F. Fisiopatología del estado epiléptico. *Acta Neurológica Colombia*. 2011; 27 (1);11-20.
69. Alfaro-Rodríguez A. Efecto de la carbamazepina sobre la organización del ciclo vigilia-sueño, en un modelo de epilepsia inducida por el ácido kaínico [Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.

70. Báez Mendoza R. Evaluación de los cambios en la ansiedad y la conducta compulsiva inducida por ácido kaínico en rata [Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.
71. Zheng X, Zhang H, Luo Q, Zhu J. Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011; 2011:1-10.
72. Mohd N, Sirajudeen K, Asari M, Muzaimi M, Mummy S, Sulaiman S. Kainic acid-induced excitotoxicity experimental model: protective merits of natural products and plant extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 2015:1-15.
73. Malagón J. Estado de mal epiléptico en pediatría. *Medicina Actualización en Neurología Infantil IV*. 2013; 73:77-82.
74. Rodríguez-Violante M, Cervantes-Arriaga A, Vargas-Cañas S, Corona T. Papel de la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas. *Archivos de Neurociencias*. 2010; 15 (1) 39-46.
75. Luna-Ortiz P, Flores-Chávez P, Martínez-Rosas M. Las mitocondrias como blanco terapéutico. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 2014; 37 (4)283-296.
76. Patel M. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy. *Free Radical Research*. 2002; 36(11): 1139-1146.
77. Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Neurochemical Research*. 2003; 28:1563–1574.
78. Haglid KG, Wang S, Qiner Y, Hamberger A. Excitotoxicity. Experimental correlates to human epilepsy. *Molecular Neurobiology*. 1994; 9(1-3): 259-63.
79. Almeida A, Heales S, Bolaños J, Medina J. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Research*. 1998; 790(1-2): 209-216.

80. Nicholls DG, Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in Neurosciences*. 2000; 23(4): 166-74.
81. Murchison D, Griffith WH. Mitochondria buffer non-toxic calcium loads and release calcium through the mitochondrial permeability transition pore and sodium/calcium exchanger in rat basal forebrain neurons. *Brain Research*. 2000; 854(1-2): 139-51.
82. Patel M. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and epilepsy. *Free Radical Research*. 2002; 36(11): 1139-1146.
83. Chuang Y, Chang A, Lin J, Hsu S, Chan S. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Epilepsia*. 2004; 45(10): 1202-1209.
84. Liang L, Patel M. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 40(2): 316-322.
85. Waldbaum S, Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2010; 42(6): 449-455.
86. Rowley S, Patel M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 62: 121-131.
87. Rowley S, Liang L, Fulton R, Shimizu T, Day B, Patel M. Mitochondrial respiration deficits driven by reactive oxygen species in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*. 2015; 75: 151-158.
88. Niedernhofer L, Daniels J, Rouzer C, Greene R, Marnett L. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(33): 31426-31433.
89. Sakharov D, Elstak E, Chernyak B, Wirtz K. Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591. *FEBS Letters*. 2005; 579(5): 1255-1260.

90. Klaunig J, Kamendulis L, Hocevar B. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*. 2009; 38(1): 96-109.
91. Brewer M. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2011; 10(4): 221 - 247
92. Lowry OH, Rosebrough NJ, Randall J. *Biological Chemistry*. 1951;1993: 265-275.
93. Janero D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990; 9(6): 515-540.
94. Del Río D, Stewart AJ & 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.
95. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Coenzyme Q10 ameliorates neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy in rat. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012; 49(1): 194-201.
96. Khamse S, Sadr S, Roghani M, Hasanzadeh G, Mohammadian M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(12):1818-1825.
97. Cock H. The role of mitochondria in status epilepticus. *Epilepsia*. 2007; 48(8): 24-27.
95. Zsurka G, Kunz W. Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *The Lancet Neurology*. 2015; 14(9): 956-966.
97. Mohanan P, Yamamoto H. Preventive effect of melatonin against brain mitochondria DNA damage, lipid peroxidation and seizures induced by kainic acid. *Toxicology Letters*. 2002; 129(1-2): 99-105.

98. Gupta Y, Briyal S, Chaudhary G. Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced seizures and oxidative stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002; 71(1-2): 245-249.
99. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016; 56: 21-38.
100. Suganthy N, Devi KP, Nabavi SF, Braidy N, Nabavi SM. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 84: 892-908.
101. Kanter M, Unsal C, Aktas C, Erboğa M. Neuroprotective effect of quercetin against oxidative damage and neuronal apoptosis caused by cadmium in hippocampus. *Toxicology and Industrial Health*. 2016; 32(3): 541-550.
102. Unsal C, Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Role of quercetin in cadmium-induced oxidative stress, neuronal damage, and apoptosis in rats. *Toxicology and Industrial Health*. 2015; 31(12): 1106-1115.
103. González-Esquivel A, Charles-Niño C, Pacheco-Moisés F, Ortiz G, Jaramillo-Juárez F, Rincón-Sánchez A. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress in liver and kidney induced by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2015; 25(3): 166-175.
104. Uthra C, Shrivastava S, Jaswal A, Sinha N, Reshi M, Shukla S. Therapeutic potential of quercetin against acrylamide induced toxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 86: 705-714.
105. Rahman S. Pathophysiology of mitochondrial disease-causing epilepsy and status epilepticus. *Epilepsy & Behavior*. 2015; 49:71-75.
106. Murphy M. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 2009; 417(1): 1-13.

107. Devienne KF, Cálgaro-Helena AF, Dorta DJ, Prado IM, Raddi MS, Vilegas W, Uyemura SA, Santos AC, Curti C. Antioxidant activity of isocoumarins isolated from *Paepalanthusbromelioides* on mitochondria. *Phytochemistry*. 2007; 68(7): 1075-80.
108. Lagoa R, Graziani I, Lopez-Sanchez C, Garcia-Martinez V, Gutierrez-Merino C. Complex I and cytochrome C are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2011; 1807(12): 1562-72.
109. Franco J, Braga H, Stringari J, Missau F, Posser T, Mendes B, Leal RB, Santos A, Dafre A, Pizzolatti M, Farina M. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chemical Research in Toxicology*. 2007; 20(12): 1919-26.
110. Waseem M, Parvez S. Neuroprotective activities of curcumin and quercetin with potential relevance to mitochondrial dysfunction induced by oxaliplatin. *Protoplasma*. 2016; 253(2): 417-30.
111. de Oliveira M, Nabavi S, Braidy N, Setzer W, Ahmed T, Nabavi S. Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. *Biotechnology Advances*. 2016; 34(5): 532-549.
112. Marder M, Viola H, Bacigaluppo J, Colombo M, Wasowski C, Wolfman C. Detection of benzodiazepine receptor ligands in small libraries of flavone derivatives synthesized by solution phase combinatorial chemistry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998; 249(2): 481-485.
113. Hanrahan J, Chebib M, Johnston G. Flavonoid modulation of GABA_A receptors. *British Journal of Pharmacology*. 2011; 163(2): 234-245.
114. Kahnberg P, Lager E, Rosenberg C, Schougaard J, Camet L, Sterner O. Refinement and evaluation of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABA_A receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45(19): 4188-4201.

115. Wasowski C, Marder M. Flavonoids as GABA_A receptor ligands: the whole story? *Journal of Experimental Pharmacology*. 2012; 23(4):9-24.