



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE *Heterotheca inuloides* EN LA
LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR LA
ADMINISTRACION DE ÁCIDO KAÍNICO EN
MURINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NATALIA HERNÁNDEZ VELASCO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ELVIA COBALLASE URRUTIA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS

1. Datos del alumno Hernández Velasco Natalia 044 55 75 43 24 31 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 310051390
2. Datos del tutor Doctora Elvia Coballase Urrutia
3. Datos del sinodal 1 Doctora María del Carmen Minaña Solís
4. Datos del sinodal 2 Doctora María de la Luz Navarro Angulo
5. Datos del sinodal 3 Doctora Verónica Monroy Martínez
6. Datos del sinodal 4 Biólogo Francisco Estrada Rojo
7. Datos del trabajo escrito Evaluación del efecto del extracto metanólico de <i>Heterotheca inuloides</i> en la lipoperoxidación inducida por la administración de ácido kaínico en murino 2017 53 pp

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el Instituto Nacional de Pediatría bajo el número de protocolo (016/2014) y al financiamiento de Fondos Federales 2015.

La donación del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* fue por parte del Dr. Guillermo Delgado Lamas (Instituto de Química, Laboratorio de Productos Naturales, UNAM).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Dedico ésta tesis con todo mi amor a mi mamá Marcelina Hernández Velasco quien con todo su cariño, apoyo y esfuerzo ha logrado darme la confianza para llegar a donde estoy. Sin ella, nada de esto sería posible... MUCHAS GRACIAS MAMÁ, TE AMO ☪

A mi hermano Andrés, cuya risa y ocurrencias me han motivado en momentos difíciles y de desesperación... TE AMO HERMANO ☪

A mi tutora, Dra. Elvia Coballase Urrutia por toda su paciencia, cariño, enseñanzas y apoyo incondicional que me han formado en todo este tiempo. MUCHAS GRACIAS DRA. ELVIA ☪

A mis dedicados, pacientes y entusiastas colegas-amigos de laboratorio Ana Paulina, Montserrat, Omar y Tere. Su esfuerzo y aportación fue indispensable para la elaboración y finalización de este trabajo... MUCHAS GRACIAS COMPAÑEROS ☪

A mis sinodales Dra. María del Carmen Miñana, Dra. María de la Luz, Dra. Verónica Monroy y Biol. Francisco Estrada por dedicar tiempo a la revisión y correcciones realizadas, así como la enseñanza recibida a lo largo de la carrera... MUCHAS GRACIAS A TODOS ☪

A Saray, mi más preciada amiga de la carrera, que me ha acompañado todo este tiempo y cuyo carisma me ha sacado muchas sonrisas... MUCHAS GRACIAS SARAY POR TU AMISTAD ☪

INDICE

Índice de cuadros y figuras	I
Abreviaturas	II
Resumen	III
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de <i>Heterotheca inuloides</i>	1
1.1.1. Descripción de la planta	1
1.1.2. Distribución geográfica	2
1.1.3. Usos tradicionales del árnica mexicana	2
1.1.4. Composición química	3
1.1.5. Propiedades Biológicas	4
1.2. Especies Reactivas y Estrés Oxidante	5
1.2.1. Generalidades	5
1.2.2. Radicales libres	5
1.3 Antecedentes	8
1.3.1 <i>Heterotheca inuloides</i> y su efecto antioxidante	8
1.4. Lipoperoxidación	8
1.4.1. Definición de Lipoperoxidación	8
1.4.2. Generalidades	8
1.4.3. Efectos biológicos de la lipoperoxidación	9
1.4.4. Cuantificación de la lipoperoxidación: Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA)	10
1.5. Agentes Antioxidantes	11
1.5.1. Antioxidantes de alto peso molecular: SOD: Cu-Zn SOD y Mn SOD; Catalasa; Glutación peroxidasa (GPx); Glutación reductasa GR; Glutación-S-transferasa (GST).	12
1.5.2. Antioxidantes de bajo peso molecular: Glutación (GSH); Vitamina C (ácido ascórbico); Vitamina E; Flavonoides.	13
1.6. Ácido Kaínico	14
1.6.1. Características químicas	14
1.6.2. Generalidad del AK	14
1.6.3. Propiedades biológicas	14

1.6.4. Participación del estrés oxidante y lipoperoxidación por ácido kaínico	15
2. Justificación	17
3. Pregunta de investigación	17
4. Hipótesis	17
5. Objetivo general	17
5.1 Objetivos particulares	17
6. Metodología	18
6.1 Reactivos	18
6.2 Sujetos experimentales	18
7. Desarrollo Experimental	18
7.1 Obtención y clasificación de <i>Heterotheca inuloides</i>	18
7.2 Preparación de los extractos	19
7.3 Experimentos <i>in vivo</i>	19
7.3.1 Homogenados	20
7.4 Cuantificación de proteínas	20
7.5 Determinación de la lipoperoxidación	21
7.6 Análisis estadístico	21
8. Resultados	22
8.1 Determinación de la Lipoperoxidación	22
9. Discusión	27
10. Conclusión	34
11. Referencias bibliográficas	35

Índice de cuadros y figuras

Cuadros

1. Compuestos aislados del extracto acetónico y metanólico de *Heterotheca inuloides*.
2. Principales radicales y no radicales que conforman a las especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN).
3. Enzimas antioxidantes de alto peso molecular.
4. Antioxidantes de bajo peso molecular.
5. Tratamientos, dosis, vías de administración y duración.

Figuras

1. Ejemplar de *Heterotheca inuloides*.
2. Metabolitos secundarios aislados de *H.inuloides*.
3. Mecanismo en cadena de los radicales libres durante la lipoperoxidación.
4. Formación del aducto fluorescente rojo entre MDA y TBA.
5. Estructura del Ácido Kaínico.
6. Cascada de daño inducido por AK.
7. Efecto de la lipoperoxidación en cerebelo.
8. Efecto de la lipoperoxidación en corteza.
9. Efecto de la lipoperoxidación en médula oblongada.
10. Efecto de la lipoperoxidación en hemisferios.
11. Efecto de la lipoperoxidación en hígado
12. Efecto de la lipoperoxidación en riñón.
13. Disminución de los valores de lipoperoxidación.
14. a) Estructura de un flavonoide; b) Características estructurales y biológicas de un flavonoide.

ABREVIATURAS

3-NT	3- Nitrotirosina
4 HNE	4-hidroxinonenal
8-OHdG	8-hidroxi-2-deoxiguanosina
AK	Ácido Kaínico
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHA	Barrera Hematoencefálica
BHA	Hidroxitolueno butilado
BHT	Butilhidroxitolueno
BNF-κB	Factor Nuclear Kappa B
CAT	Catalasa
COX-1	Ciclooxigenasa- 1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
Cu/Zn SOD	Superóxido Dismutasa Cobre/ Zinc
DFO	Deferoxaminamesilato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracil
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FAD+	Flavín adenín dinucleótido
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reductasa
GSH	Glutación
GST	Glutación- S- Transferasa
HCl	Ácido Clorhídrico
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
INF γ	Interferón gamma
MCP-1	Proteína Químico atrayente de Monocitos-1
MDA	Malondialdehído
Mn- SOD	Superóxido Dismutasa Manganeso
mRNA	ARN mensajero
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
Nrf2	Factor de transcripción Nrf2
O²•	Superóxido
OH•	Radical Hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
Prxs	Peroxirredoxinas
PTM	Modificación postraducciona
PTZ	Pentilinetetrazol
SOD	Superóxido Dismutasa
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TMPO	1,1,3,3 tetrametoxipropano
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
Trx	Tiorredoxina

RESUMEN

En múltiples investigaciones, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) son partícipes en múltiples enfermedades tanto a nivel nervioso (Alzheimer, Epilepsia, Parkinson) y sistémico (Diabetes, Cáncer, Síndrome Metabólico). El establecimiento del estrés oxidante por medio de las especies reactivas afecta la actividad del sistema de defensa antioxidante, disminuido ante el aumento de las especies reactivas. De esta manera, *Heterotheca inuloides*, planta endémica y de gran uso tradicional en México, presenta funciones biológicas entre las que destacan las de tipo antiinflamatorio y antioxidante. Lo anterior debido a la composición química que presenta. El extracto metanólico de *H.inuloides* presenta una gran cantidad de metabolitos que han demostrado favorecer un efecto antioxidante, por lo cual, en este trabajo se evaluó el efecto del extracto en la lipoperoxidación inducida por Ácido Kaínico (AK) en tejidos de cerebro (hemisferios, corteza, médula y cerebelo), hígado y riñón. Para ello se estudiaron 6 grupos de ratas macho Wistar de 180-220 g. (n=6) divididos en grupo Control (C), sin tratamiento; Amortiguador de fosfatos (AF) –vehículo- (1.5 ml/kg) (vo); Extracto metanólico de *H. inuloides* (M) (100 mg/kg) (vo); AK (10 mg/kg) (ip); AK (10 mg/kg) diluido en AF (1.5 ml/kg) (ip) (AK+AF) y AK (10 mg/kg) (ip) en presencia de M (100 mg/kg) (vo) (AK+M). Se realizó la determinación de la lipoperoxidación por el método de TBARS y el análisis estadístico comprendió un ANOVA (1 vía) y posterior prueba de Dunnett ($p < 0,05$). En todos los tejidos, los grupos con AK+M disminuyeron significativamente los niveles de daño por MDA en el siguiente orden: cerebelo (87.84%), corteza (86.13%), médula (79.08%), hemisferios (71.07%), hígado (54.88%) y riñón (47.63%). Por lo cual proponemos que el extracto metanólico de *H. inuloides* ejerce un efecto antioxidante y como potencial neuroprotector. Lo cual se relaciona a la estructura de los metabolitos del extracto que actúan en sinergia al donar electrones y neutralizar especies reactivas que favorecen la disminución del daño por estrés oxidante. Debido a estos resultados, se considera al extracto metanólico de *H. inuloides* como un potencial agente antioxidante y posible alternativa terapéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas al estrés oxidante.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Heterotheca inuloides* (*H. inuloides*)

Los orígenes del término “árnica”, se remonta a 1533 cuando Hildegard of Bingen introdujo este término en su libro llamado "PHYSICA", para designar a este grupo de plantas con “propiedades mágicas” para el tratamiento de torceduras y contracturas. En 1978, en España, el término árnica se introdujo en los hospitales debido a la efectividad del uso del *Árnica montana* L. El alcance de este vocablo tuvo influencia en México debido a la colonización europea al nuevo mundo y este es el caso de *H. inuloides* (Obón *et al.*, 2012).

1.1.1. Descripción de la planta

Heterotheca inuloides (del griego *Heteros*= diferente y *theca*= envoltura) especie de la familia Asteraceae, es una planta endémica de uso tradicional en la farmacopea mexicana conocida como árnica mexicana, cuateteco, árnica de monte o acahual. Se encuentra en los climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Planta herbácea perenne o anual de hasta 1.5 m de alto, con tallos erectos y de numerosas pubescencias. Sus hojas son anchas y alargadas, con flores amarillas liguladas y agrupadas en forma de disco (De Rzedowski y Rzedowski, 2001).



Figura 1. Ejemplar de *Heterotheca inuloides*.

1.1.2. Distribución geográfica

H.inuloides es una planta originaria de México que se distribuye de los 2250 a 3300 msnm. Se encuentra en la Ciudad de México, Aguascalientes, Jalisco, Durango, Nayarit, Colima, Guanajuato, Chihuahua, Guerrero (Coyuca de Catalán), Hidalgo (Ocampo), Zacatecas, Estado de México, Michoacán (Zitácuaro, Coalcoman de Vázquez), Morelia (Ocampo), Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz (Argueta *et al.*, 1994; Villaseñor-Ríos y Espinosa, 1998; De Rzedowski y Rzedowski, 2001).

1.1.3. Usos tradicionales del árnica mexicana

El uso de plantas como alternativa terapéutica al tratamiento de diferentes padecimientos es de las prácticas más comunes en los pueblos indígenas de México. Actividad que hoy en día se ha extendido a las zonas urbanas. Existe predisposición a utilizar con más frecuencia ciertos tipos de plantas que ofrecen cura rápida y eficaz, este es el caso de *H. inuloides* (Andrade-Cetto, 2009). Hoy en día, *H.inuloides* se encuentra en los mercados tradicionales y establecimientos locales bajo diferentes presentaciones, tales como tabletas, tinturas, pomadas e infusiones. *H.inuloides* posee múltiples cualidades curativas por las cuales es utilizada, sin embargo, el efecto antiinflamatorio de esta planta es el más relevante y por la que es conocida (Heinrich *et al.*, 2014).

Existe gran variedad de usos que se le dan a *H.inuloides*, la planta se utiliza completa para elaborar infusiones o agua de tiempo que alivian el dolor de pulmón, corazón, dolores musculares, reumáticos, estomacales, en riñones y úlceras. Toda la parte aérea (flores, pétalos y estambres) se utiliza en la elaboración de infusiones para lavar heridas, moretones, llagas, salpullido o espinillas; para tratar dolores de vientre, dolor de muelas y rozaduras. Se aplica en forma de compresas, macerado, pomada o cataplasma. El follaje se utiliza como analgésico para dolor de pecho, gastritis y contusiones (traumas); hervidas sirven para desinfectar heridas e inducir el apetito. En el campo de la veterinaria, *H.inuloides* se emplea para aliviar problemas circulatorios, del aparato digestivo, como desinflamatorio, tratar heridas y problemas cutáneos (De Rzedowski y Rzedowski, 2001; Villaseñor-Ríos y Espinosa, 1998).

1.1.4. Composición química

A través de espectroscopia UV, resonancia magnética y espectrometría de masas (Jerga *et al.*, 1990) se han logrado identificar gran cantidad de compuestos de *H.inuloides* como triterpenos, esteroides, poliacetilenos y flavonoides (Delgado *et al.*, 2001). Específicamente de los extractos acetónico y metanólico se han logrado aislar compuestos químicos como poliacetilenos, cadinanos, triterpenos, esteroides, sesquiterpenos, flavonoides y glicósidos flavonoides (Cuadro 1).

Cuadro 1. Compuestos aislados del extracto acetónico y metanólico de *Heterotheca inuloides*.

Extracto	Composición química (% en el extracto)	Referencias
Acetónico	Cadalen-15-ácido oíco, 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-uno-dicadalen-7-hidroxicadalen-7-hidroxi-4 α H-3,4-dihidro-cadalen-1 α , hidroxi-1 (4H)-isocadalen-4-uno, 1 α -hidroxi-4 α H-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-ácido oíco, 7-(3,3-dimetil aliloxi) cumarina, cariolan-1, 9 β -diol, quercetina, estigmasterol, β -sitosterol, cariolan-1,9 β -diol, D-chiro-inositol, quercetina-3,7,3'-trimetil éter, quercetina-3,7,3',4'-tetrametil éter, eriodictiol-7,4'-dimetil éter, (1R,4R)-1-hidroxi-4H-1,2,3,4-tetrahidrocadalen-15-ácido oíco, 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona	Haraguchi <i>et al.</i> , 1997 Gené <i>et al.</i> , 1998 Segura <i>et al.</i> , 2000 Delgado <i>et al.</i> , 2001 Coballase <i>et al.</i> , 2010 Rodríguez-Chávez <i>et al.</i> , 2015, 2016
Metanólico	Quercetina (0.19), quercetina 3-O-glucósido, kaempferol, kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol-osoforosido, D-chiro-inositol, espinasterol, spinasteril-3-O- β -D-glucopiranosido 7-hidroxi-4 β H-3,4-dihidro-cadalen-15-ácido oíco (0.004), 7-hidroxicadalen-7-hidroxi-4 β H-3,4-dihidro-cadalen-15-ácido oíco (0.002)	Kubo <i>et al.</i> , 1994 Haraguchi <i>et al.</i> , 1997 Delgado <i>et al.</i> , 2001

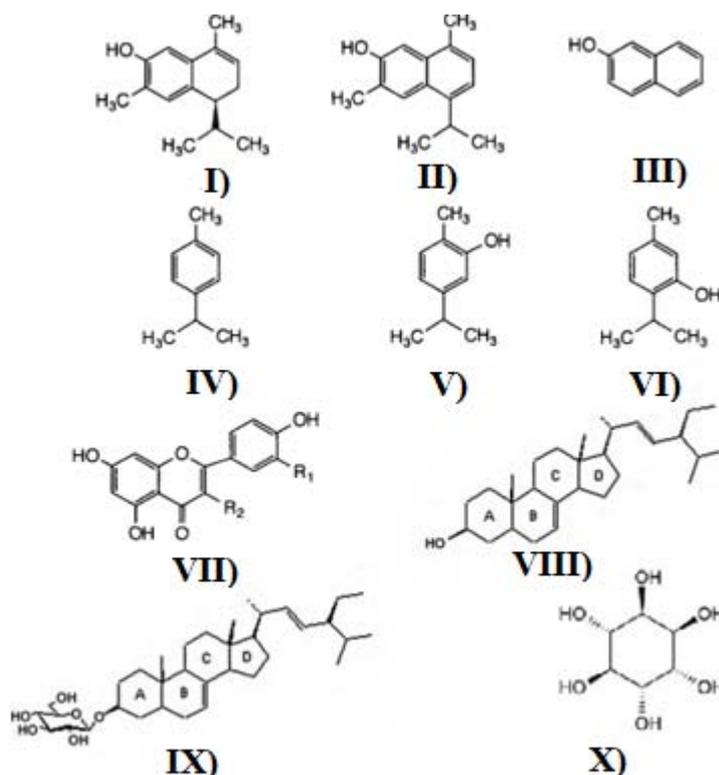


Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *H.inuloides*. I) 7-hidroxi-3,4-dihidricadaleno; II) 7-hidroxicadaleno; III) β -naftol; IV) P-cimeno; V) Carvacrol; VI) Timol; VII) Quercetina; VIII) Espinasterol; IX) Espinasteril-3-O-b-O-glicopiranósido; X) D-chiro-inositol. (Modificado de Haraguchi *et al.*, 1997; Delgado *et al.*, 2001).

1.1.5. Propiedades Biológicas

Desde la década de los noventa, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha logrado caracterizar las propiedades biológicas de *H.inuloides*. El efecto antiinflamatorio se logró comprobar en un modelo de daño inducido por carragenano en el que se obtuvieron fracciones acuosas que disminuyeron la inflamación provocada por los edemas que originó esta sustancia, así como el efecto analgésico seguido de su aplicación (Gené *et al.*, 1998). En otro modelo de edema inducido por aceite de crotón, los metabolitos de *H.inuloides* disminuyeron la inflamación así como la inhibición de las vías COX-1 y COX-2 (Segura *et al.*, 2000). A través del análisis de los metabolitos de *H. inuloides* se logró descubrir su actividad antibacterial al inhibir bacterias Gram-positivas y su efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* (Kubo *et al.*, 1994).

1.2. Especies Reactivas y Estrés Oxidante

1.2.1. Generalidades

Los primeros estudios que demostraron la existencia de los radicales libres (RL) datan del siglo XIX cuando Moses Gomberg, profesor de la Universidad de Michigan, descubrió el radical trifenilmetilo ($\text{Ph}_3\text{C}\cdot$) (Gomberg, 1900). En 1929, la importancia de los radicales adquirió popularidad cuando Friedrich Paneth y Wilhelm Hofeditz lograron producir el radical metilo ($\text{CH}_3\cdot$) (Paneth y Hofeditz, 1929). Mientras que en 1933, Morris Kharash y Franz Mayo descubrieron el "efecto del peróxido" y su implicación en el desarrollo de materiales sintéticos. En 1954, Gerschman *et al.*, propusieron que los efectos tóxicos del O_2 estaban atribuidos a la formación de RL.

Años después, en 1968, el descubrimiento de que los sistemas biológicos producían gran cantidad de radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) durante el metabolismo (McCord y Fridovich, 1968), dio origen al concepto de *estrés oxidante* en 1970. En 1978, estudios sobre la respiración mitocondrial determinaron la importancia de este proceso metabólico para la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y su papel en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Boveris *et al.*, 1977; Nohl y Hegner, 1978).

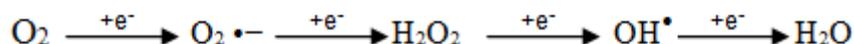
1.2.2. Radicales libres

Son resultado de la ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula. La presencia de los electrones desapareados le confiere al radical reactividad específica. El más simple de los radicales libres es el átomo de hidrógeno, contiene un protón y un sólo electrón desapareado que le confiere su característica como radical (Aruoma, 1998). Entre los principales RL que existen están los que derivan del oxígeno y del nitrógeno, sin embargo, no menos importantes están los que se generan del hidrógeno, carbono y metales de transición (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

El oxígeno, elemento indispensable para los organismos aeróbicos, se trata del último aceptor de electrones en la cadena respiratoria para generar la formación de agua (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006), este es requerido por los sistemas

enzimáticos en los que intervienen las defensas antioxidantes. Cuando las especies reactivas se encuentran en grandes concentraciones, se produce el estrés oxidante. Este se define como el desequilibrio entre la generación y eliminación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

La reacción general para la formación de ERO se lleva a cabo de acuerdo a la siguiente reducción univalente del oxígeno (Hansberg, 2002):



En esta se reduce el oxígeno al anión superóxido reacción en la que se incorpora un electrón, a peróxido de hidrógeno al aceptar 2 electrones y a radical hidroxilo al aceptar 3 electrones. Los radicales de importancia son el hidroxilo, el superóxido, el oxígeno singulete Σ , el óxido nítrico y el peroxilo. Sin embargo, los no radicales como el peroxinitrito, ácido hipocloroso y peróxido de hidrógeno, oxígeno singulete Δ y ozono contribuyen a la generación de radicales (Poljšak y Fink, 2014). Cuando dos radicales se acoplan, estos unen sus electrones desapareados y forman un no radical. De la misma forma, el radical interactúa con el no radical y forma otro radical que genera una reacción en cadena (Gutteridge y Halliwell, 1989).

Entre las diferentes vías que generan especies reactivas podemos encontrar (Cadenas, 1989):

- a) Derivados de la cadena respiratoria (Mitocondria)
- b) Productos de reacciones que catalizan metales.
- c) Polución atmosférica.
- d) Producción de neutrófilos y macrófagos en procesos inflamatorios.
- e) Irradiación de rayos UV, rayos X y gamma.

Como ya se mencionó, el metabolismo respiratorio es de las principales vías que generan radicales libres (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1985). Múltiples reacciones de oxidación ocurren principalmente en el citoplasma, membrana nuclear, retículo endoplásmico y peroxisomas.

El anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroxilo (OH^\bullet) son especies que predominan en la célula. Mientras que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito (ONOO^-), a pesar de no

ser radicales contribuyen a la generación del estado REDOX en la célula. El $O_2^{\bullet -}$ se forma por medio de la liberación de electrones a través de la membrana mitocondrial y la cadena de transporte de electrones, varias moléculas pueden interactuar con el O_2 para generar esta especie reactiva, tales como la adrenalina, dopamina y componentes mitocondriales (Fridovich, 1975). Los fagocitos también liberan grandes cantidades de $O_2^{\bullet -}$ como parte de sus mecanismo de defensa (Babior y Woodman, 1990). El H_2O_2 se produce a través de la cadena de transporte de electrones así como por la auto oxidación de pequeñas moléculas y la dismutación del $O_2^{\bullet -}$ por la superóxido dismutasa (SOD). Aunque el H_2O_2 no es reactivo por sí solo, cuando se presentan metales reducidos en el medio y a través de la reacción de Fenton se genera la formación de OH^{\bullet} , radical sumamente reactivo que ataca las moléculas próximas a él (Halliwell, 1996). El peroxinitrito ($ONOO^-$), se forma por la reacción del óxido nítrico con el superóxido, lo cual favorece la formación del OH^{\bullet} . Los principales radicales libres y no radicales se indican en cuadro 3.

Cuadro 2. Principales radicales y no radicales que conforman a las especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (modificado de Halliwell, 1996).

	Radicales	No radicales
ERO	Anión Superóxido $O_2^{\bullet -}$ Hidroxilo OH^{\bullet} Peroxilo RO_2^{\bullet} Hidroperoxilo Oxígeno singulete $\Sigma (^1O_2)$	Peróxido de Hidrógeno H_2O_2 Ácido Hipocloroso $HOCl$ Ozono O_3 Oxígeno singulete $^1\Delta (^1O_2)$
ERN	Óxido Nítrico NO^{\bullet}	Peroxinitrito $ONOO^-$

Las ERO y ERN intervienen en una gran en diferentes patologías, entre las que destacan las de tipo neurodegenerativo como el Parkinson, enfermedad de Huntington, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Ohkawa *et al.*, 1979; Emerit y Chaudiere, 1989; Karmazyn, 1989; Janero, 1990 y Reed, 2011).

1.3. Antecedentes

1.3.1 *Heterotheca inuloides* y su efecto antioxidante

A pesar de que los estudios con *H. inuloides* son escasos, existe evidencia de su potencial efecto antioxidante principalmente de los metabolitos obtenidos de sus inflorescencias. En el trabajo de Haraguchi *et al.*, (1997) se demostró su poder antioxidante sobre la oxidación del ácido linoleico en más de un 80%, así como su efecto barrador (en inglés *scavenger*) sobre los radicales anión superóxido y el radical DPPH. Asimismo, los metabolitos de esta planta inhibieron la lipoperoxidación mitocondrial inducida por Fe (III) y ADP sobre NADH o NADPH. En los trabajos de Coballase *et al.*, 2011, sobre un modelo de daño oxidante inducido con tetracloruro de carbono (CCl₄) se observó el efecto hepatoprotector del extracto metanólico de esta planta. En los trabajos de Rodríguez-Chávez *et al.*, (2015), los metabolitos de *H. inuloides* presentaron actividad antioxidante *versus* el H₂O₂. En ese mismo trabajo se pudo observar que los derivados de esta planta favorecieron la extensión del ciclo de vida del nematodo *Caenorhabditis elegans*.

1.4 Lipoperoxidación

1.4.1. Definición de Lipoperoxidación

La lipoperoxidación es la oxidación de ácidos grasos que se origina por el aumento de radicales libres a través de reacciones en cadena sobre membranas y lipoproteínas (Witting, 1980; Halliwell, 1996). Los productos del anión superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo participan en el inicio de la lipoperoxidación (Mayumi *et al.*, 1993).

1.4.2. Generalidades

El término de lipoperoxidación se originó en 1980 (Reed, 2011). La lipoperoxidación se empezó a estudiar en base al deterioro de los alimentos en 1930 (Niki, 2008). Es hasta 1975 que Hermann Esterbauer descubrió que el glutatión (GSH) en reacción con los grupos carbonilos conjugados, lo cual resultaba en la formación de acroleína, alquenos 4-hidroxi-2 y grupos sulfhidrilo generados en los sistemas biológicos. En 1978, Erwin Schauenstein y Hermann Esterbauer descubrieron aldehídos reactivos con grupos

sulfhidrilo a través de uniones tioéster (Reed, 2011). Tales uniones estarían implicadas en la inhibición de rutas metabólicas como la glicólisis, síntesis de proteínas y respiración (Schauenstein y Esterbauer, 1978). Lo anterior generó la hipótesis de que la lipoperoxidación producía aldehídos α - β -insaturados. En 1980, Esterbauer y colaboradores descubrieron uno de los aldehídos más reactivos, el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), un fuerte citotóxico hepático (Benedetti *et al.*, 1980; Winkler *et al.*, 1984).

1.4.3. Efectos biológicos de la lipoperoxidación

La lipoperoxidación ocurre a través de la interacción del oxígeno con los ácidos grasos poliinsaturados que generan gran cantidad de aldehídos electrofílicos (Reed, 2011). Este proceso comprende una fase de iniciación en la que se forma un radical lipídico ($L\cdot$); seguida de una fase de propagación en la cual el O_2 produce radicales peroxilo ($LOO\cdot$), este genera la reacción en cadena de formación de especies reactivas al extraer H de los lípidos para formar hidroperóxidos lipídicos (Fig.3). La reacción llega a su fase de terminación cuando dos radicales reaccionen interactúan entre sí y generan un no radical y oxígeno o bien, cuando los radiales reaccionan con agentes antioxidantes que estabilizan las especies reactivas. Sin embargo, cuando el hidroperóxido lipídico se descompone, genera subproductos como los isoprostanos (Roberts y Morrow, 1997; Fukuda *et al.*, 2009), neuroprostanos (Musiek *et al.*, 2008; Reed, 2011), el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Doorn y Petersen, 2003; Reed, 2011), acroleína (Esterbauer *et al.*, 1991; Calingasan *et al.*, 1999) y el malondialdehído (MDA) (Ohkawa *et al.*, 1979; Janero, 1990).

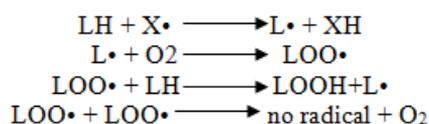


Figura 3. Mecanismo en cadena de los radicales libres durante la lipoperoxidación (modificado de Reed, 2011).

1.4.4. Cuantificación de la lipoperoxidación: Prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA)

La lipoperoxidación puede ser cuantificada en los sistemas biológicos mediante reacciones químicas (Janero, 1990). Una de las más utilizadas es la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA), reacción colorimétrica descrita por Kohn y Liversedge en 1944. Se lleva a cabo entre el TBA y el subproducto de la lipoperoxidación, el MDA (Ohkawa *et al.*, 1979). El mecanismo de reacción depende del pH del sustrato y de los lipoperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados con más de tres dobles enlaces (Dahle *et al.*, 1962). El hidroperóxido del ácido linoléico obtenido por la acción de la peroxidación enzimática es el compuesto que reacciona con el TBA para originar el aducto fluorescente de color rojo (Ohkawa *et al.*, 1979; Janero, 1990). De manera específica, la formación del aducto se lleva a cabo por el ataque nucleofílico entre el carbono 5 del TBA y el carbono 1 del MDA seguido de la reacción de deshidratación y la formación del aducto con una molécula de TBA secundaria (Fig. 5).

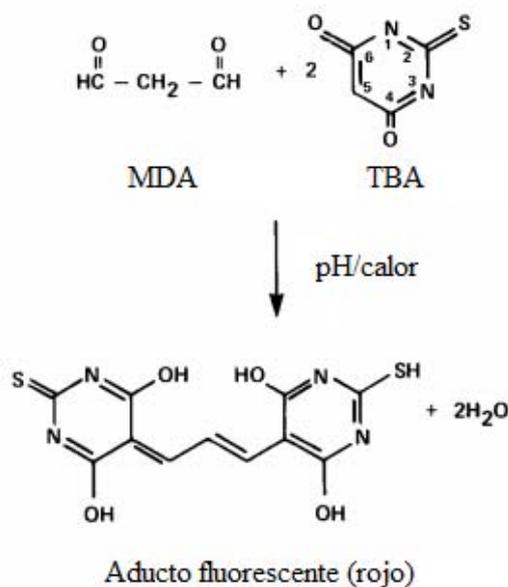


Fig.4. Formación del aducto fluorescente rojo entre MDA y TBA (modificado de Janero, 1990).

1.5. Agentes Antioxidantes

Se conocen como antioxidantes a las moléculas que previenen o retardan la oxidación del sustrato oxidable y que actúan como donadores de electrones (agente reductor) (Halliwell y Gutteridge, 1985).

De acuerdo a su cinética, los antioxidantes se clasifican en seis categorías (Flora, 2009):

- a) Antioxidantes que rompen cadenas por medio de la reacción con radicales peroxilo con uniones débiles de O-H o N-H, tales como fenoles, hidroquinonas, aminas aromáticas y aminofenoles.
- b) Antioxidantes que rompen cadenas con radicales alquilo: quinonas, nitronas e iminiquinonas.
- c) Antioxidantes que descomponen hidroperóxidos: sulfuros, fosforo y trifosfato.
- d) Antioxidantes que desactivan metales: diaminas, hidroxiácidos y compuestos bifuncionales.
- e) Terminación de cadenas cíclicas por antioxidantes: aminas aromáticas, radicales nitroxilo y compuestos metálicos de valencia variables.
- f) Acción sinérgica de diferentes antioxidantes: fenoles sulfuro, en los cuales los grupos fenólicos reaccionan con los radicales peroxilo y los grupos sulfuro con hidroperóxidos.

Los antioxidantes a nivel celular y molecular inactivan las ERO y en bajas concentraciones inhiben o retrasan el proceso oxidante al interrumpir la reacción en cadena de los radicales. Los antioxidantes tienen la capacidad de quelar iones metálicos, los cuales son responsables de la generación de ERO. La quelación es la formación de un complejo de iones metálicos en los cuales el ion metálico está asociado con un donador de electrones con o sin carga (ligando). La eficacia del ligando depende de la afinidad al metal, ya sea exógeno o endógeno (Flora, 2009). Se han producido antioxidantes sintéticos como el BHA (hidroxianisol butilado) o el BHT (butil hidroxitolueno), sin embargo su uso prolongado ha demostrado ser tóxico (Namiki, 1990).

Los antioxidantes de alto peso molecular y de bajo peso molecular conforman el sistema de defensa necesario contra las ERO (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013).

1.5.1. Antioxidantes de alto peso molecular: SOD: Cu-Zn SOD y Mn SOD; Catalasa; Glutación peroxidasa (GPx); Glutación reductasa GR; Glutación-S-transferasa (GST).

Cuadro 3. Enzimas antioxidantes de alto peso molecular (Modificado de Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013).

Enzima	Características	Reacción general
Superóxido dismutasa (SOD)	Cu-Zn SOD: en citoplasma, homodímero de 32.5 kDa	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow[\text{Cu-Zn SOD, Mn-SOD}]{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$
	Mn-SOD: en matriz mitocondrial, homotetrámero de 95 kDa.	
Catalasa (CAT)	En mitocondria y peroxisomas; tetrámero de 240 kDa.	$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{CAT}} 2H_2O + O_2$
Glutación peroxidasa (GPx)	Cuenta con múltiples isoformas; tetrámero de 85 kDa.	$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{\text{GPx}} GSSG + H_2O$ $ROOH + 2GSH \xrightarrow{\text{GPx}} GSSG + ROH + H_2O$
Glutación reductasa (GR)	En citoplasma y mitocondria, 120 kDa, coenzima FAD ⁺ en su sitio activo. Cuenta con dos subunidades de proteínas	$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{GR}} NADP^+ + 2GSH$
Glutación-S-transferasa (GST)	Dividida en cuatro familias mayores (α , μ , π , θ) y cuatro menores (δ , σ , κ , ω).	$RX + GSH \xrightarrow{\text{GST}} RSG + HX$
Tiorredoxina (Trx)	En el retículo endoplásmico; peso de 12 kDa,	$\text{Trx}(-SH)_2 + \text{proteína-S}_2 \xrightarrow{\text{Trx}} \text{Trx-S}_2 + \text{proteína}(-SH)_2$
Peroxirredoxinas (Prxs)	Diméricas de aprox. 23 kDa; con residuos de cisteína en su centro catalítico.	$\text{Prx}(-SH)_2 + 2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Prx}} \text{Prx-S}_2 + 2H_2O + O_2$ <p>Trx puede regenerar la forma reducida de Prx:</p> $\text{Prx-S}_2 + \text{Trx}(-SH)_2 \xrightarrow{\text{Prx}} \text{Prx}(-SH)_2 + \text{Trx-S}_2$

1.5.2. Antioxidantes de bajo peso molecular: Glutación (GSH); Vitamina C (ácido ascórbico); Vitamina E; Selenio; Flavonoides.

Cuadro 4. Antioxidantes de bajo peso molecular.

Antioxidante	Características	Localización	Referencia
Glutación (GSH)	Tripéptido de glutamato, cisteína y glicina. No enzimático. Su capacidad antioxidante se debe al compuesto tiol en conjunto con el sulfuro, los cuales pueden reacomodarse después de la pérdida de un electrón.	Citosol, núcleo, mitocondria y hepatocitos.	Hwang <i>et al.</i> , 1992 Karoui <i>et al.</i> , 1996 Masella <i>et al.</i> , 2005 Hammond <i>et al.</i> , 2007.
Vitamina C	Es soluble en agua, actúa como donador de electrones (agente reductor). En conjunto con la vitamina E regenera el α -tocoferol.	Plasma	Young, 2001
Vitamina E	Se presenta en ocho formas isoméricas de dos subestructuras, el tocoferol y el tocotrienol. El α -tocoferol es la forma más activa de la vitamina E. Su grupo hidroxilo libre en el anillo aromático es responsable de las propiedades antioxidantes	Se incorpora a la membrana celular como estabilizadora y constituyente.	Burton e Ingold, 1989 Kojo, 2004.
Selenio	Es un elemento constituyente de las proteínas (llamadas selenoproteínas).	Forma parte de las enzimas de alto peso como la GPx, yodotina deosinasa, metionina sulfóxido reductasa B, selenoproteínas P y W.	Burk y cols., 2003 Lu y Holgrem, 2008
Polifenoles	Se trata de compuestos polifenólicos presentes en gran cantidad de plantas compuestos de dos anillos fenilo (A y B) ligados mediante un anillo pirano (C). Deben su actividad a la presencia de fracciones fenólicas hidroxilo OH en su estructura. Los flavonoides actúan como terminadores de las reacciones en cadena de los radicales libres y como quelantes de iones metálicos.	Se trata de compuestos polifenólicos presentes en gran cantidad de plantas y alimentos (vinos, té, chocolate).	Kandaswami y Middleton, 1994 Rice Evans <i>et al.</i> , 1996 Mikamo <i>et al.</i> , 2000 Rice Evans, 2001 Schroeter <i>et al.</i> , 2002 Furusawa <i>et al.</i> , 2005 Quideau, 2006

1.6. Ácido Kaínico (AK)

1.6.1. Características químicas

El ácido kaínico (ácido 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina) tiene una estructura cíclica cuya fórmula molecular es $C_{10}H_{15}NO_4$ (Fig. 5)

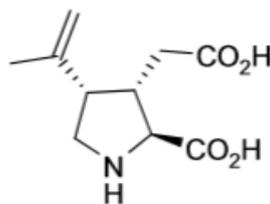


Fig. 5. Estructura del Ácido Kaínico (tomado de Jane *et al.*, 2009).

Por su estructura química es un análogo del L-glutamato (Coyle, 1987; Wang *et al.*, 2005) y cuyas propiedades biológicas se describen más adelante.

1.6.2. Generalidades del AK

El AK fue aislado a principios de 1950 del alga roja japonesa *Digenea simplex* (Murakami *et al.*, 1953; Coyle, 1987; Wang *et al.*, 2005). Más tarde en 1970, se comprobó que inducía respuesta excitatoria en las neuronas corticales de rata (Shinozaki y Konishi, 1970). Los primeros estudios que demostraron el efecto de la aplicación del AK sobre neuronas del hipocampo se publicaron en 1978 en los se demostró que la inyección intraventricular de AK en ratas causaba la degeneración neuronal en la región CA3 del hipocampo (Nadler *et al.*, 1978).

1.6.3. Propiedades biológicas

Los primeros reportes de las propiedades biológicas del AK datan del año 1950 después de la segunda guerra mundial en Japón, en donde se utilizaba para remover parásitos intestinales de *Ascaris lumbricoides* (Zheng *et al.*, 2011).

Es a partir de mediados del siglo XX, que se reporta al AK como un análogo cíclico del glutamato (Vincent y Mulle, 2009; Bloss y Hunter, 2010), por lo que, se le atribuyen propiedades como una sustancia de tipo excitador en el sistema nervioso, además de

actuar como una neurotoxina (Vincent y Mulle, 2009). Debido a esto, el AK se comenzó a utilizar como epileptogénico en modelos de daño neurodegenerativo a través de la interacción con los receptores kainato (rKA) presentes en el sistema nervioso (Zheng *et al.*, 2011). La acción del AK se atribuye a su unión a los receptores Kainato (rKA), los cuáles son tetrámeros homo y heteroméricos ensamblados por la combinación de cinco subunidades diferentes (GluK1–GluK5) (Carta *et al.*, 2014).

El AK en exceso al actuar sobre sus receptores kainato induce gran número de eventos celulares como el flujo de Ca^{2+} , la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y disfunción mitocondrial, lo que deriva en apoptosis y necrosis (Olney *et al.*, 1974; Donaldson *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 2005). Se ha visto que la liberación de altas cantidades de glutamato (Coyle y Puttfarcken, 1993; Dykens, 1994) y posterior liberación de Ca^{2+} , representan uno de los factores determinantes en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas debido a la excitotoxicidad (Dabbeni-Sala, 2001; Zheng *et al.*, 2011). De acuerdo a Wang *et al.*, (2005), la administración sistémica de AK en roedores genera cambios patológicos entre los que destacan las convulsiones, cambios de conducta, estrés oxidativo por ERO y ERN, muerte neuronal y activación de la glía.

1.6.4. Participación del estrés oxidante y lipoperoxidación por ácido kaínico

Los receptores de AK modulan la actividad excitatoria pre y post sináptica (Campbell *et al.*, 2007; Youn y Randic, 2004), la activación de estos genera la despolarización en la membrana y el incremento del flujo de calcio celular, elemento que activa la cascada de muerte neuronal (Brorson *et al.*, 1994) (fig. 6). Debido al efecto del AK sobre sus receptores, la mitocondria recarga grandes cantidades de Ca^{2+} (Babcock *et al.*, 1997), por lo que se genera la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Reynolds y Hasting, 1995).

La administración del AK genera ERO y ERN, esto se comprueba por la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la disminución de la actividad antioxidante en el cerebro de rata (córtex, cerebelo, tallo cerebral) (Swamy *et al.*, 2009). La estimulación de estos receptores produce óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) el cual modula la

transmisión de glutamato así como la inducción de cambios en la señalización neuronal (Nakaki *et al.*, 2000; Prast y Philippu, 2001).

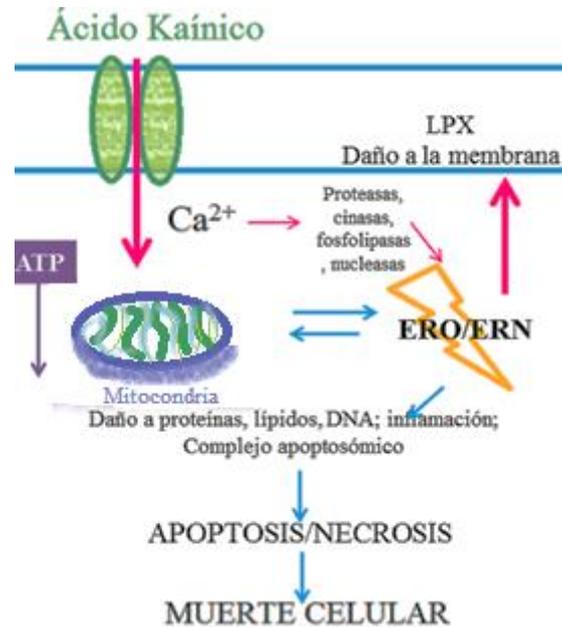


Fig.6. Cascada de daño inducido por AK (Modificado de Wang *et al.*, 2005).

La hiperexcitabilidad por AK provoca crisis convulsivas que generan inflamación, que como se mencionó antes, COX-2 genera muerte neuronal por la producción de ERO (Kim *et al.*, 2011) y estimula la pérdida de neuronas del hipocampo después de la administración de AK. Las convulsiones generan productos de la lipoperoxidación, tales como isoprostanos F(2) e isofuranos los cuales también generan inflamación. Lo anterior determina su importancia como marcador de daño por estrés oxidativo *in vivo* (Patel *et al.*, 2007). El $NO\bullet$ interviene a través de la activación de la microglía y macrófagos, debido a que el AK genera ERO y ERN en la neuroglia. Las ERO producidas desestabilizan las membranas y ocurre una despolarización mediada por la activación del receptor AMPA/KA, misma que genera una disfunción relacionada con las enfermedades neurodegenerativas (Carriedo *et al.*, 1998)

2. Justificación

Se ha visto que el extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* ofrece un efecto protector ante el daño por estrés oxidante. El estrés oxidante es uno de los principales agentes de daño en múltiples trastornos neurológicos y sistémicos. La medicina tradicional ofrece gran cantidad de especies vegetales como el árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*), la cual ha demostrado tener propiedades antioxidantes debido a la presencia de flavonoides. Por lo cual, el uso de compuestos de origen natural representan una opción terapéutica accesible

3. Pregunta de investigación

¿La administración previa del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* modificará los niveles de lipoperoxidación en ratas con daño inducido por ácido kaínico?

4. Hipótesis

La administración del extracto metanólico disminuirá los niveles de lipoperoxidación inducidos por ácido kaínico, en los diferentes órganos de las ratas estudiadas.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* en la lipoperoxidación presente en diferentes órganos de roedor posterior a la administración sistémica de ácido kaínico.

5.1 Objetivos particulares

5.1.1 Cuantificar los niveles de proteína para evaluar la lipoperoxidación presentes en los tejidos de rata estudiados posterior a la administración ácido kaínico, en presencia y ausencia del extracto metanólico de *H. inuloides* mediante el método Lowry.

5.1.2 Determinar los niveles de lipoperoxidación en los diferentes tejidos de rata estudiados posterior a la administración ácido kaínico en presencia y ausencia del extracto metanólico de *H. inuloides* mediante la prueba del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

6. Metodología

6.1 Reactivos

El sulfato de cobre (II) (CuSO_4), 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMPO), tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, reactivo Fenol Folin & Ciocalteu, TRITON X-100 (Octilfenoxipolietoxietanol), carbonato de sodio (Na_2CO_3), albúmina sérica bovina (ASB), ácido clorhídrico (HCl), ácido tiobarbitúrico (TBA), Deferoxaminamesilato (DFO) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). El potasio dihidrógenofosfato, el di-sodio dihidrógeno fosfato, el sodio hidróxido (NaOH) y ácido tricloroacético (TCA) de MERCK-México SA. El ácido kaínico ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$) de Tocris Bioscience, agua estéril inyectable (Pisa).

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

6.2 Sujetos experimentales

Para el manejo y uso de animales y eliminación de desechos se siguieron los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-1995), con registro en el Instituto Nacional de Pediatría (INP, número de protocolo 016/2014). Se utilizaron ratas macho juveniles cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) de 180- 220 g., se dividieron en seis grupos con una $n=6$. Se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Pediatría en cajas de acrílico transparente, condiciones de temperatura (21 ± 1 °C), humedad relativa (50-60%) e iluminación luz/oscuridad de 12/12 hr., aire filtrado (5 mm., de partículas) con intercambio de 18 veces/h. Se proporcionaron dietas comerciales estándar esterilizadas *ad libitum* (Harlan 2018S Teklad) y agua filtrada.

7. Desarrollo experimental

7.1 Obtención y clasificación de *Heterotheca inuloides*

El extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* fue una del Dr. Guillermo Delgado Lamas del Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM.

Los ejemplares de *Heterotheca inuloides* fueron recolectados en Zacapoaxtla, Puebla, México y clasificado por la Bióloga Myrna Mendoza Cruz (Myrna Mendoza C 15, 375).

7.2 Preparación de los extractos

Se obtuvieron las inflorescencias de *H.inuloides* (2 Kg), las cuales se colocaron en una cámara de secado a 37 °C. Posteriormente se depositaron en recipientes de vidrio (capacidad de 2L) a los cuáles se agregó 1.5 L de metanol y se dejó reposar durante 24 horas. El sobrenadante obtenido se coló y se repitió el proceso con el triturado tres veces más. Para evaporar lo solventes, los sobrenadantes se colocaron en rotovapores y se obtuvo el extracto puro (15 gramos en total) (Coballase, 2010).

7.3 Experimentos *in vivo*

Para los experimentos *in vivo* el extracto metanólico se disolvió en amortiguador de fosfatos pH 7.2. Los tratamientos de AK, AF y M se aplicaron durante seis días (a excepción del grupo C que no recibió tratamiento) los cuales se describen en el cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos, dosis, vías de administración y duración.

Grupos experimentales	Dosis	Vía de administración	Duración (días)
Control	Sin tratamiento	-	1-6
Amortiguador de fosfatos (A.F)	1.5 ml/kg	Oral	1-6
Extracto metanólico (M)	100 ml/kg	Oral	1-6
Ácido Kaínico (A.K)	1 dosis de 10 ml/kg	Intraperitoneal	6*
AK+A.F	10 ml/kg / 1.5 ml/kg	Intraperitoneal	6*
A.K+M	10 ml/kg / 100 ml/kg	Intraperitoneal/Oral	6* / 1-6

* Para los grupos con Ácido Kaínico, este se aplicó el último día de tratamiento (sexto día).

La administración vía oral se realizó con sondas de alimentación estéril (calibre 5 FR, long. 38.5 cm., TECMED, Estado de México) para los grupos con A.F y M. Los grupos con Ácido Káínico fueron inyectados con jeringas ultra finas (BD Ultra Fine de 0.3ml o 3/10 cc) vía intraperitoneal. El sexto día de tratamiento posterior a la aplicación del AK, se realizó la observación conductual durante 4 horas con el objetivo de corroborar el efecto de esta sustancia. Los animales fueron sacrificados por decapitación (Guillotina de 10 lb., World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, EUA) y se extrajo el cerebro (seccionado en corteza, médula oblongada, hemisferios y cerebelo), hígado y riñón. Los órganos extraídos se mantuvieron en ultracongelador a -80 °C hasta su uso.

7.3.1 Homogenados

Se pesó con una balanza analítica (AE-CB) 1gr. de cada órgano y se homogenizó con amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 7.4 /Tritón-X100 al 10%) con un politrón (Polytron PT 10-35). Se centrifugaron los tejidos a 64, 396 G por 30 min., y se obtuvo el sobrenadante para realizar las pruebas correspondientes a cuantificación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951), y determinación de la lipoperoxidación por el método de TBARS (Janero, 1990).

7.4 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas de cada tejido analizado (cerebelo, corteza, hemisferios, médula oblongada e hígado y riñón) se realizó mediante el método colorimétrico de Lowry, el cual presenta una gran sensibilidad y rango de aplicación (1 μ g/mL a 1.5 mg/mL) que permite la valoración cuantitativa de proteínas por absorbancia. Para ello se realizó la curva patrón con albúmina bovina sérica (0.01 g/ml) y agua destilada y se prepararon los siguientes reactivos: A) Carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 M; B) Sulfato Cúprico al 1%; C) Tartrato sódico potásico al 2% y D) Mezcla de los reactivos A, B y C. El reactivo AB se agregó a la curva y a las muestras (sobrenadante) y se dejó reposar por 10 minutos. A continuación se añadió el reactivo de Folín-Ciocalteu y se dejó reposar por 30 minutos. Las absorbancias se leyeron a 660 nm en espectrofotómetro (EPOCH Biotek Instruments, Inc, Highland Park, EUA).

Los resultados fueron expresados en mg/mL de proteína y se utilizaron para obtener los valores de lipoperoxidación de cada tejido.

7.5 Determinación de la lipoperoxidación

Para la determinación de la lipoperoxidación inducida por Ácido Kaínico se utilizó el método colorimétrico de la reacción del ácido tiobarbitúrico y las especies reactivas (TBARS). La formación de un complejo de color rosado a rojizo es el indicativo de la reacción entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el malondialdehído (MDA), un subproducto de la lipoperoxidación presente en los tejidos. Se utilizó la técnica de Janero (1990), en la cual se realizó la curva patrón con TMPO. Para las muestras se utilizaron las diluciones 1:10 de cerebro y 1:50 de hígado y riñón. El reactivo TBA se preparó con TBA, HCl, TCA y DFO disuelto en agua desionizada. La solución de TBA se mantuvo en oscuridad. Posteriormente en placas de poliestireno de 96 pozos (Costar, Corning, NY, USA) se colocó 50 μ l de muestra por triplicado (dilución) y se agregaron 250 μ l de solución TBA. En un baño maría a temperatura de ebullición (Thermomix 1420) se colocó la placa durante 15 min., hasta notar un cambio de color en las muestras. Las placas se enfriaron a temperatura ambiente y se obtuvieron las absorbancias a 530 nm en espectrofotómetro (EPOCH Biotek Instruments, Inc, Highland Park, EUA). Los resultados fueron expresados en mg de proteína/nmol MDA debido a que se utilizaron los valores de proteína obtenidos en el punto anterior.

7.6 Análisis estadístico

Los datos fueron representados con la media \pm la D.E. de n=6, por triplicado, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y prueba de comparación múltiple Dunett (GraphPad Prism 5.0, USA). Se consideró una $p < 0.05$ para ser estadísticamente significativa.

8. Resultados

8.1 Determinación de la lipoperoxidación

Los valores de la concentración de MDA en las muestras analizadas permitieron demostrar el daño por estrés oxidante debido al AK.

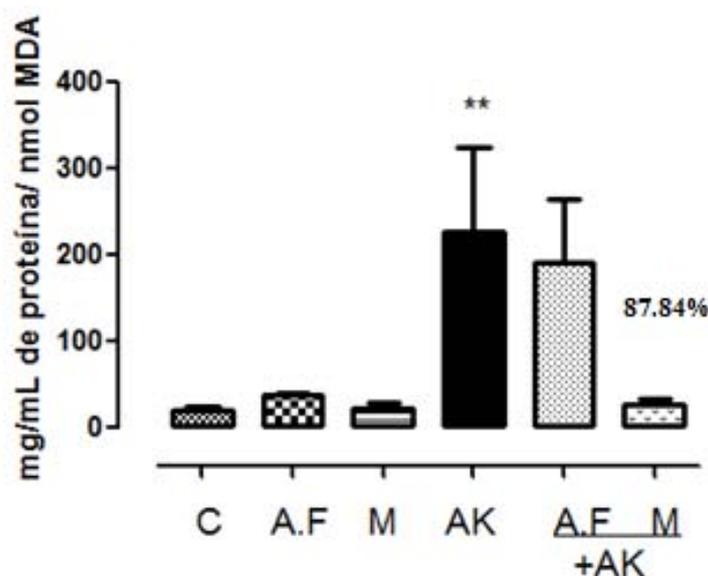


Figura 7. Efecto de la lipoperoxidación en cerebelo: Control (C) sin tratamiento; A.F= amortiguador de fosfatos [1.5 mL/Kg; ip] –vehículo-; A.K= Ácido Kaínico [10 mg/Kg; ip], M= Metanólico [100 mg/Kg; ip] + A.K [10 mg/kg ; ip]; A.F+A.K= Ácido Kaínico disuelto en amortiguador de fosfatos [1.5 mL/Kg + 10 mg/Kg (ip) y AK+M= extracto metanólico [100 mg/Kg ; vo] + Ácido Kaínico [10mg/kg ; ip]. Los datos son presentados como la media \pm D.E de n=6, por triplicado. F (10.9); ** $p < 0.0004$ vs los grupos C, A.F, M, AK y AK+M. Grupo AK *ns* respecto al grupo A.F+A.K.

La figura 7 muestra los valores de MDA en cerebelo, observándose al grupo AK con un valor promedio de 228 mg/mL de proteína/ nmol de MDA que representa el 100% de daño. El grupo C, A.F y M presentaron valores basales (sin efectos de la lipoperoxidación) que fueron de 19.67, 38.98 y 23.18 mg/mL de proteína/ nmol de MDA respectivamente. El grupo de A.F+AK no presentó significancia vs el grupo AK, lo cual nos indica que el amortiguador de fosfatos no modifica la acción del AK. El grupo AK+M mostró un decremento de MDA estadísticamente significativo de 87.84% respecto al grupo AK y con un valor promedio de 27.72 mg/mL de proteína/ nmol de MDA, valor similar a los grupos con valores basales.

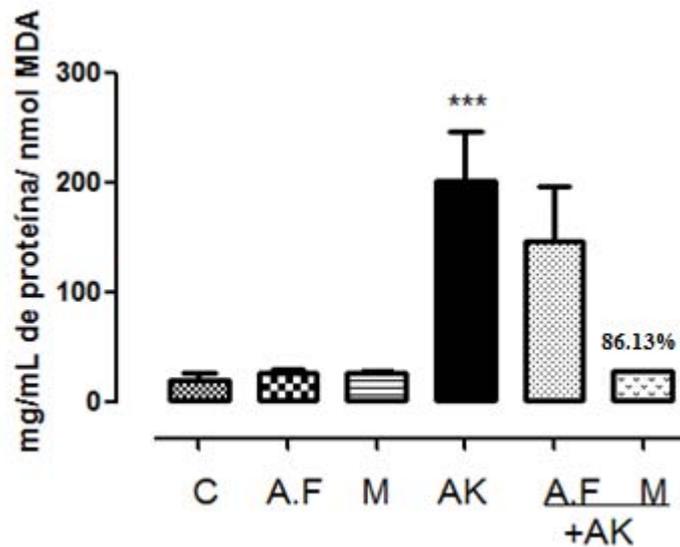


Figura 8. Efecto de la lipoperoxidación en corteza. Los datos son presentados como la media \pm D.E de $n=6$, por triplicado. $F(24.9)$; $***p < 0.0001$ vs los grupos C, A.F, M, AK y AK+M. Grupo AK *ns* respecto al grupo A.F+A.K.

En corteza (figura 8), el grupo AK presentó el mayor efecto de la lipoperoxidación con un valor promedio de 201.2 mg/mL de proteína/ nmol de MDA, que corresponde al 100% de daño. Respecto a los grupos sin tratamiento de AK, los valores basales promedio de MDA fueron los siguientes: 20.02 (C), 27.23 (A.F), 26.16 (M) mg/mL de proteína/ nmol de MDA respectivamente. El grupo A.F+AK no presentó significancia vs el grupo AK. El grupo AK+M presentó un decremento del 86.13% de disminución de daño respecto al grupo AK y con valor promedio de 27.89 72 mg/mL de proteína/ nmol de MDA.

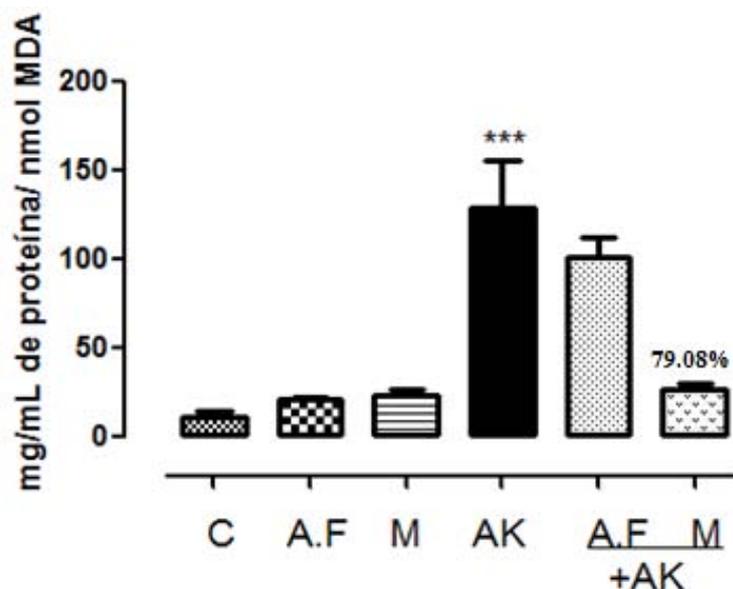


Figura 9. Efecto de la lipoperoxidación en médula oblongada. Los datos son presentados como la media \pm D.E de $n=6$, por triplicado. $F(53.3)$; $***p < 0.0001$ vs los grupos C, A.F, M, AK y AK+M. Grupo AK *ns* respecto al grupo A.F+A.K.

El efecto de la lipoperoxidación en médula oblongada (figura 9), presenta un valor promedio de daño por AK de 128.8 mg/mL de proteína/ nmol de MDA (100% de daño). Los grupos C, A.F, M presentaron valores basales de MDA de 11.31, 20.84 y 23.16 mg/mL de proteína/ nmol de MDA) respectivamente. El grupo de A.F+AK no presenta significancia respecto *vs* el grupo AK. El grupo AK+M disminuyó un 79.08% la lipoperoxidación por MDA respecto al grupo AK, lo cual representa un 26.94 mg/mL de proteína/ nmol de MDA que se acerca a los valores basales de los grupos C, A.F y M.

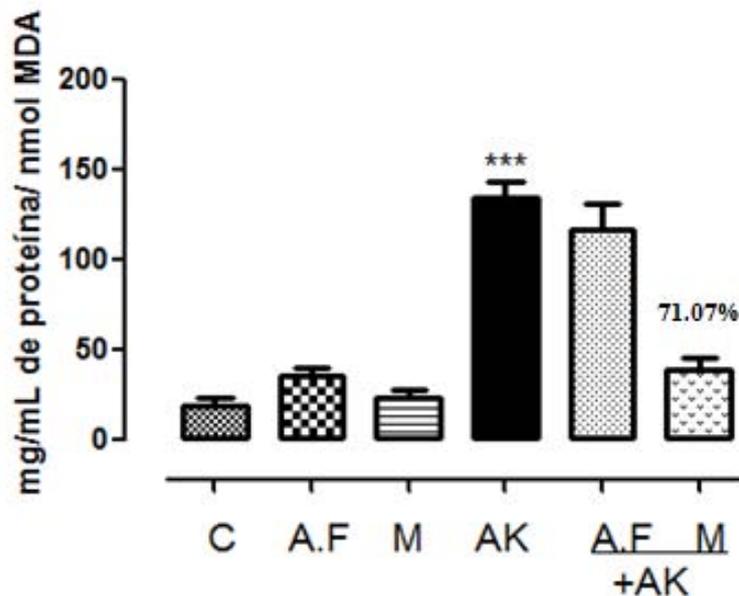


Figura 10. Efecto de la lipoperoxidación en hemisferios. Los datos se presentan como la media \pm D.E de n =6, por triplicado. F (116); *** p < 0.0001 *vs* los grupos C, A.F, M, AK y AK+M.

Grupo AK *ns* respecto al grupo A.F+A.K.

La figura 10 de hemisferios muestra el grupo AK con un valor promedio de 134.1 mg/mL de proteína/ nmol de MDA (100% de daño). Los grupos C, A.F y M presentaron valores basales de MDA de 19.59, 36.11 y 23.78 mg/mL de proteína/ nmol de MDA respectivamente. El grupo de A.F+AK no presenta significancia respecto al grupo AK. Mientras tanto el grupo AK+M disminuyó los valores de MDA en un 71.07% (38.79 mg/mL de proteína/ nmol de MDA) respecto al grupo AK.

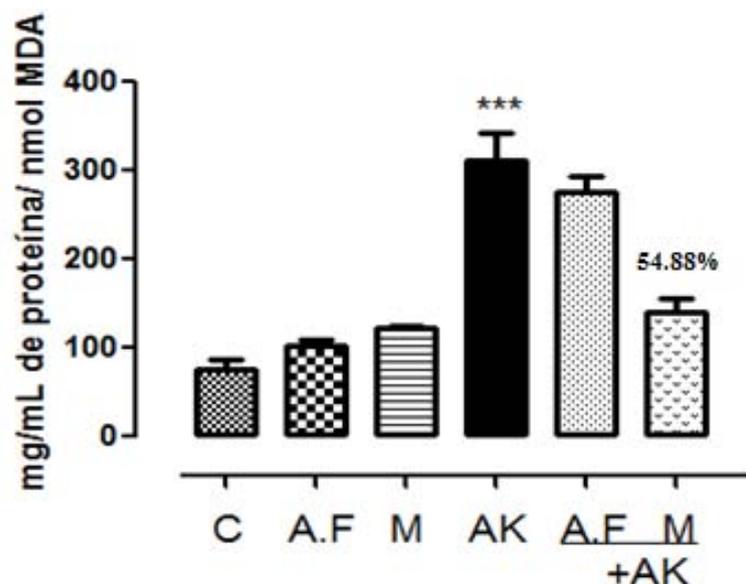


Figura 11. Efecto de la lipoperoxidación en hígado. Los datos se presentan como la media \pm D.E de $n=6$, por triplicado. F (100); *** $p < 0.0001$ vs los grupos C, A.F, M, AK y AK+M. Grupo AK *ns* respecto al grupo A.F+A.K.

En hígado (figura 11) el valor del grupo AK presenta el mayor valor de daño con un 311.23 mg/mL de proteína/ nmol de MDA (100% de daño). Los grupos basales presentaron valores de 76.09 (C), 102.40 (A.F) y 122.06 (M) mg/mL de proteína/ nmol de MDA respectivamente. El grupo A.F+AK no presenta significancia vs el grupo AK. El grupo AK+M presenta una disminución de MDA de un 54.88% (140.4 mg/mL de proteína/ nmol de MDA) respecto al 100% de daño en el grupo AK.

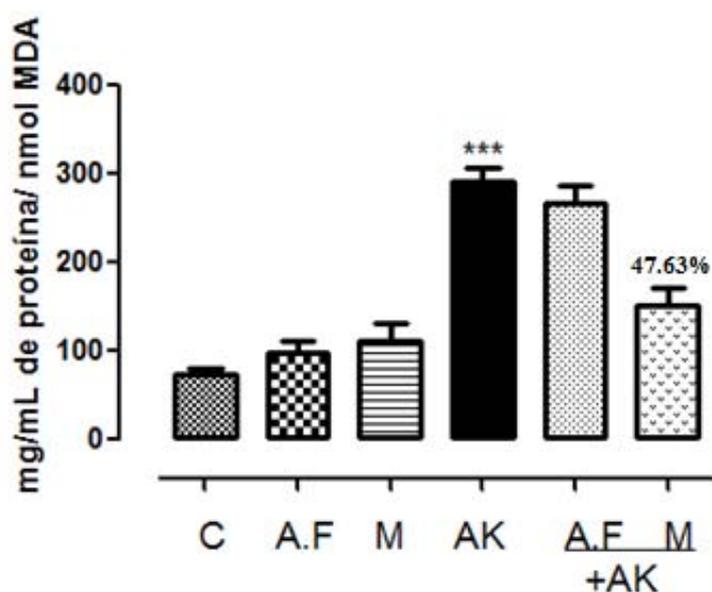


Figura 12. Efecto de la lipoperoxidación en riñón. Los datos se presentan como la media \pm D.E de $n=6$, por triplicado. F (92.2); *** $p < 0.0001$ vs los grupos C, A.F, M, AK y AK+M. Grupo AK *ns* respecto al grupo A.F+A.K.

En la figura 12 de riñón, el grupo AK tuvo un valor promedio de 290.67 mg/mL de proteína/ nmol de MDA. Se observan los valores basales en los grupos C, A.F y M de 74.43, 98.81 y 112.53 mg/mL de proteína/ nmol de MDA respectivamente. El grupo AF+AK no presentó significancia vs el grupo AK. El grupo AK+M disminuyó en un 47.63% (152.2 mg/mL de proteína/ nmol de MDA) los valores de MDA en riñón, respecto al 100% de daño por el AK.

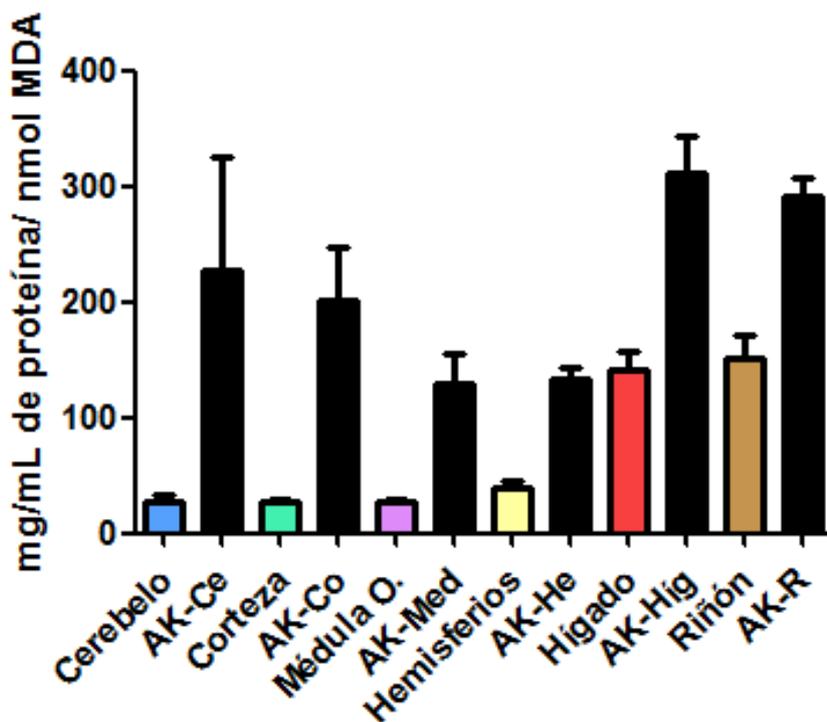


Figura 13. Disminución de los valores de lipoperoxidación posterior a la administración del extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* (mg/mL de proteína / nmol de MDA) respecto a los grupos con AK en todos los tejidos: cerebelo, corteza, médula oblongada, hemisferios, hígado y riñón. Grupos AK en negro.

En la figura 13 se presenta a todos los grupos AK+M y la disminución del MDA posterior a la administración del el extracto metanólico de *H. inuloides*. En negro se presenta a los grupos AK de caja tejido analizado. La relación es tejido dependiente, por lo cual, los valores para cerebro son menores a los de hígado y riñón.

9. Discusión

Se ha propuesto que la producción de especies reactivas es uno de los principales eventos que determinan el daño en diferentes tejidos o células. En este sentido, el estrés oxidante interviene en un gran número de enfermedades neurodegenerativas y a nivel sistémico como: la epilepsia, Parkinson, enfermedad de Huntington, Alzheimer, diabetes, síndrome metabólico, artritis reumatoide, aterosclerosis, envejecimiento, entre otros.

En este trabajo se estudió el efecto del ácido kainico como prooxidante, análogo del glutamato que genera despolarización y favorece la hiperexcitabilidad neuronal e interviene en la formación y aumento de especies reactivas. La entrada masiva de Ca^{2+} genera daño celular por activación de la glía y mediadores inflamatorios (Bruce y Baudry, 1995; Chen *et al.*, 2004; Ravizza *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008), estrés oxidante del retículo endoplásmico (Sokka *et al.*, 2007), alteración en el funcionamiento mitocondrial, neurodegeneración (Nadler, 1981; Ben-Ari, 1985; Vincent y Mulle, 2009; Szaroma *et al.*, 2012; Quincozes-Santos *et al.*, 2014; Mohd Sairazi *et al.*, 2015) y necrosis (Coyle y Puttfarcken, 1993; Choi, 1993; Cock, 2002; Waldbaum y Patel, 2010). Esta sustancia presenta gran afinidad por la región CA1, CA3 y giro dentado del hipocampo (Campbell *et al.*, 2007) que presentan gran riqueza de receptores kainato, favorecen la liberación de glutamato y el flujo excesivo de Ca^{2+} (Youn y Randic, 2004; Campbell *et al.*, 2007), que determinan el daño por excitotoxicidad (Nadler, 1981; Ben-Ari, 1985; Ben-Ari y Cossart, 2000; McKhann *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2014; Rowley *et al.*, 2015, MohdSairazi *et al.*, 2015). De esta manera, uno de los organelos más importantes en la generación de ATP, regulación de Ca^{2+} y que interviene principalmente en la formación de ERO y ERN es la mitocondria (Quincozes-Santos *et al.*, 2014; Nicholls y Budd, 1998).

La consecuencias del incremento de calcio en la mitocondria es la desregulación de la cadena respiratoria que disminuye la síntesis de ATP y favorece la sobreproducción de ERO y ERN, por lo que se genera falla bioenergética y posterior neurodegeneración (Nicholls y Budd, 1998; Kritis *et al.*, 2015). Los resultados de este daño son la disfunción sináptica, fallo en la plasticidad neuronal y muerte celular vía apoptosis, necrosis y/o autofagia. De esta manera, los eventos antes mencionados contribuyen al

daño por lipoperoxidación y posterior desestabilización de la membrana (Nicholls y Budd, 1998). Un mecanismo propuesto por el cual se genera el MDA por AK, es debido a las crisis que inducen la formación del radical superóxido debido al incremento en la expresión de la NADPH y la óxido nítrico sintasa (NOS) (Pan *et al.*, 2008), así como la presencia de metales como el Cu^{2+} y Fe^{2+} (Liang *et al.*, 2000). Por otro lado, el radical $\text{OH}\bullet$, modifica la excitabilidad neuronal en conjunto con el peróxido de hidrógeno (no radical) (Murphy, 2009; Zeng *et al.*, 2013; Hauck y Bernlohr, 2016), que favorece la oxidación de proteínas, lípidos y DNA.

Los resultados de este trabajo mostraron que los grupos experimentales tratados con AK presentaron el máximo de daño por lipoperoxidación. El incremento en los niveles de MDA, comprueba el establecimiento del estrés oxidante por AK, lo que ha sido reportado en los trabajos de Kim *et al.*, 2011; Friedman *et al.*, 2013 y Si *et al.*, 2016. Resultados similares con el modelo de AK ha sido reportados por Frantseva *et al.* 2000, Tejada *et al.*, 2007, Pérez-Vizcaino *et al.*, 2009 y Shin *et al.*, 2011 por mencionar algunos. Los eventos ocasionados por AK son el estrés oxidante (principalmente), ruptura de la barrera hematoencefálica (BHA), la astrogliosis, activación de mediadores inflamatorios como el factor nuclear kappa (BNF- κ B), incremento de la susceptibilidad al daño neuronal por excitotoxicidad y posterior muerte celular (Shin *et al.*, 2014).

Liang *et al.*, (2000) demostraron que la administración sistémica de AK en ratas generaba el incremento del radical superóxido en hipocampo y mediaba la muerte neuronal. Otro posible mecanismo es la formación del radical superóxido por el incremento en la expresión de la NADPH y la sintasa de óxido nítrico (Pan *et al.*, 2008), así como la presencia de metales como el Cu^{2+} y Fe^{2+} (Liang *et al.*, 2000). Asimismo, el radical $\text{OH}\bullet$, modifica la excitabilidad neuronal en conjunto con el peróxido de hidrógeno (no radical) (Murphy, 2009; Zeng *et al.*, 2013; Hauck y Bernlohr, 2016), oxidando proteínas, lípidos y DNA.

Se ha observado que el AK favorece el incremento del NO en cerebro (Alderton *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2008). El NO en el cerebro modula el flujo sanguíneo e interviene en la liberación de neurotransmisores debido a que atraviesa las membranas celulares (Valko *et al.*, 2006). Cuando este aumenta en el organismo, participa en la generación de especies reactivas como el peroxinitrito (ONOO^-) en presencia del radical

superóxido ($O_2 \cdot^-$), anión altamente reactivo que oxida de manera directa proteínas, lípidos y DNA (Lipton *et al.*, 1993; Szabó *et al.*, 2007). De esta manera también se activan vías apoptóticas y la potenciación del daño por excitotoxicidad debido a la recaptura de glutamato, la modulación de la fosforilación oxidativa y la modificación postraduccional (PTM) (Aguiar *et al.*, 2012). Otros modelos de daño que evidencian el incremento de NO, son el arginina, bicuculina, pentilene tetrazol (PTZ), pilocarpina (Chavko *et al.*, 2003; Mollace *et al.*, 1991; Osonoe *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Chuang *et al.*, 2007; Maggio *et al.*, 1995). Por otro lado se ha reportado que el daño en hipocampo por la administración de AK recluta áreas que comprenden los astrocitos y microglía, así como de mediadores proinflamatorios que contribuyen al proceso neurodegenerativo (McGeer *et al.*, 1988; Matsumoto *et al.*, 1992). Otro de los mecanismos de daño neuronal debido al AK es la activación de citocinas en la glía, las cuáles se sabe participan en la degeneración neuronal. Este daño incrementa cuando se generan otros mediadores inflamatorios como la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en conjunto con la IL-1 β (Ravizza *et al.*, 2005; Zhang y Zhu, 2011). Los resultados obtenidos en los tejidos cerebrales demostraron actividad tejido-dependiente, pues las diferencias de MDA se pueden atribuir a la distribución de los receptores afines a glutamato y que en este caso se activan por el AK. Lo cual favorece la activación de los mecanismos de daño antes mencionados.

En hígado y riñón, los niveles de MDA aumentaron significativamente respecto a los grupos control, lo cual ha sido reportado también por Szaroma *et al.*, (2012), en el cual la administración del AK vía intraperitoneal generó la disminución de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx). Se ha propuesto que el AK genera daño en el hígado debido a la exposición a esta sustancia, lo que ha sido reportado por Tang *et al.*, (1998), a través del incremento de marcadores de daño como la 8-OH-dG. Sin embargo, el efecto en hígado permanece desconocido. En cuanto a la nefrotoxicidad también se demuestra la participación del estrés oxidante asociado al incremento en los niveles de la lipoperoxidación, este desbalance induce el crecimiento de tumores por el daño al DNA y la activación de vías de proliferación celular (Gorrini *et al.*, 2013). Sin embargo, en los trabajos de Trujillo Silva (2015) y Szaroma *et al.*, (2012), se demuestra que ocurre la reducción de las enzimas antioxidantes, GSH, GPx, CAT y GR, disminución de la actividad de Nrf2 y la nitración de proteínas por NO. Sin embargo,

ambos órganos intervienen en el metabolismo y detoxificación, por lo cual los valores de daño por MDA fueron mayores.

Los grupos tratados previamente con el extracto metanólico de *H. inuloides* y en presencia de AK presentaron la disminución del daño causado por MDA. De esta manera el valor de protección fue de 87.84% en cerebelo, 86.13% en corteza, médula oblongada con 79.08% y hemisferios con 71.07%, estos valores fueron similares a los grupos C, A.F y M. En el caso de hígado, la disminución del daño fue del 54.88% y en riñón de 47.63%, sin embargo, los valores se mantuvieron cercanos a los grupos control.

Estudios recientes se han centrado en buscar alternativas para el tratamiento de enfermedades sistémicas y neurodegenerativas. A través de múltiples estudios se ha demostrado que la adición a la dieta de complementos de origen vegetal disminuyen el daño por estrés oxidante debido a la composición química que estos presentan (Parihar y Hemnani, 2003). Los antioxidantes presentes en estos complementos son capaces de donar radicales hidrógeno que previenen la oxidación y efectos secundarios como la lipoperoxidación (Škrovánková *et al.*, 2012). Diversos trabajos han reportado, el efecto benéfico de antioxidantes exógenos que inhiben la liberación de calcio, mejoran el sistema antioxidante, disminuyen la generación de especies reactivas y la lipoperoxidación (Coyle y Puttfarcken *et al.*, 1993; Cui *et al.*, 2005; Sok *et al.*, 2005; Hou, 2011).

Entre los fitoquímicos que favorecen el efecto antioxidante están los compuestos fenólicos, flavonoides, polifenoles, alcaloides, taninos, antocianinas, carotenoides y terpenoides (Masella, *et al.*, 2004; Parihar y Hemnani, 2003; Ullah *et al.*, 2014; Ozkan *et al.*, 2016). Es importante resaltar que además de su actividad antioxidante, estos compuestos presentan efecto quelante, antiinflamatorio, antitumoral, anticancerígeno, antibacterial, antiviral y antiapoptótico (Süntar *et al.*, 2010; Mahdy *et al.*, 2011; Özkan y Erdoğan, 2011; Albayrak y Aksoy, 2012; Aktumsek *et al.*, 2013; Dalar y Konczak, 2013; Ozbilgin *et al.*, 2013; Sarikurkcü *et al.*, 2015 y Zengin *et al.*, 2014, 2015, 2016).

Los fitoquímicos presentes en especies vegetales como el té verde y rojo, olivo, *Gingko biloba*, *Panax ginseng*, berberina, curcumina y el árnica mexicana presentan estructuras químicas que determinan sus propiedades, principalmente la capacidad antioxidante. La

acción antioxidante de los flavonoides depende de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, lo que impide que se lleven a cabo reacciones catalizadoras que intervienen en su formación (principalmente la reacción de Fenton y Haber-Weiss) (López-Luengo, 2001; Cheng *et al.*, 2002), por lo que pueden inhibir la lipoperoxidación y tienen la capacidad de favorecer el sistema enzimático antioxidante (GSH, SOD, GR, GPx) (Parihar y Hemnani, 2003).

De los compuestos más abundantes dentro de los polifenoles se encuentran los flavonoides, estos presentan estructura del tipo C₆-C₃-C₆ con dos anillos aromáticos A y B (tipo benceno) unidos entre sí por un anillo de pirano C (Martínez-Florez *et al.*, 2002). Los flavonoides son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático (polifenólicas) y su capacidad antioxidante está asociada a la presencia de los grupos hidroxilo, por lo que un mayor número de estos grupos potencia su efecto (Silva *et al.*, 2002). Los compuestos fenólicos poseen uno o más anillos aromáticos y uno o más grupos hidroxilo, los cuales donan un átomo de hidrógeno o electrones a los radicales libres y favorecen su estabilización (Škrovánková *et al.*, 2012). De manera específica, un flavonoide está compuesto por sustituyentes hidroxilo en la posición 5 del anillo A y 3 del anillo C; un grupo catecol en las posiciones 3' y 4' del anillo B y un enlace doble en la posición 2 y 3 conjugado con la función 4-oxo (Furuno *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2011) (Fig. 8).

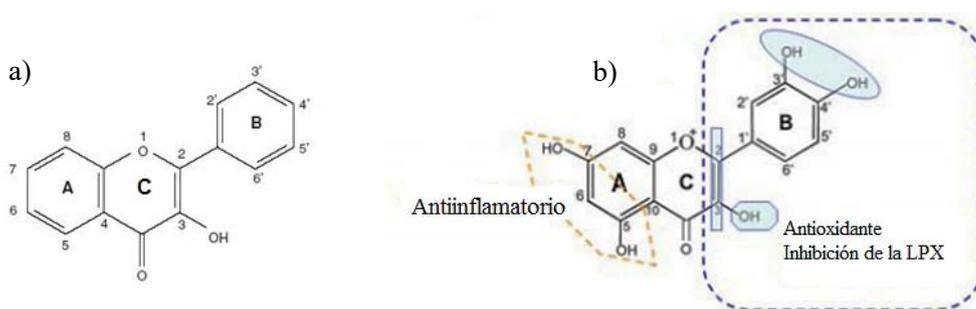


Fig. 14. a) Estructura de un flavonoide; b) Características estructurales y biológicas (Modificado de Yi *et al.*, 2011).

Cuando el anillo B tiene más de dos grupos hidroxilo se favorece la actividad antioxidante (Heim *et al.*, 2002), estos sustituyentes estabilizan radicales como el superóxido, hidroxilo, peróxido y peroxinitrito, al transferir electrones que favorecen su

forma estable, el radical aroxil. En cuanto a la actividad quelante, se ha propuesto que existen sitios de unión al grupo catecol del anillo B (posición 3' y 4') y la presencia de estos grupos favorecen la actividad antioxidante. De esta manera, los principales metales Fe^{2+} y Cu^{+} que catalizan la formación del radical hidroxilo, son inhibidos e imposibilitados para participar en la lipoperoxidación lipídica (van Acker *et al.*, 1996). El grupo hidroxilo en la posición 4' del anillo B actúa como inhibidor y reduce la xantina/ xantina oxidasa que interviene en la producción del radical superóxido (Wang *et al.*, 2006). Todas estas características convierten a los flavonoides en excelentes atrapadores de radicales libres y por lo tanto su capacidad como potentes antioxidantes, los cuáles en su mayoría son metabolitos presentes en el extracto metanólico de *H. inuloides*.

La caracterización de los metabolitos secundarios del extracto metanólico de *H. inuloides* demuestra que pueden actuar en sinergia, debido a la estructura que presentan, los cuáles han sido caracterizados en los trabajos de Kubo *et al.*, 1994, Haraguchi *et al.*, 1997 y Coballase *et al.*, 2010, dentro de los cuales se encuentran: Quercetina, quercetina 3-O-glucósido, kaempferol, kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol-osofofosido, D-chiro-inositol, espinasterol, carvacrol, timol, spinasteril-3-O- β -D-glucopiranosido 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno y 7-hidroxicadaleno. De estos compuestos Haraguchi *et al.*, 1996, demostraron que los metabolitos del extracto metanólico de *H.inuloides*: 7-hidroxi-4bH-3,4-dihidro-cadaleno y 7-hidroxicadaleno inhiben la lipoperoxidación en hígado. La actividad de los metabolitos mencionados sobre la lipoperoxidación estaría relacionada a la capacidad que poseen para disminuir la concentración de superóxido, prevenir la iniciación de la reacción en cadena de la lipoperoxidación al atrapar radicales libres y su capacidad de quelar metales que determinan la formación de radicales libres (OH^{\bullet}).

Otro posible mecanismo de acción propuesto de los flavonoides es como posibles ligando para los receptores GABA_A que regulan la entrada de Cl^- y favorecen la disminución de la hiperexcitabilidad por aumento de Ca^{2+} (Marder y Paladini, 2002; Hou, 2011). De esta manera, los flavonoides al ser metabolizados rápidamente por el organismo, actúan como metabolitos secundarios que activan los receptores GABA_A (Fernández *et al.*, 2006), lo anterior debido a las características fisicoquímicas de estos con los sitios del receptor. Se ha propuesto que el carbono 3' del anillo B y el anillo A

en posición 6 son los sitios de mayor afinidad al receptor de GABA_A (Marder *et al.*, 1998; Kahnberg, *et al.*, 2002; Marder, 2012), y ejercerían efecto similar al de las benzodiazepinas, anestésicos, barbitúricos, entre otros.

En este trabajo se estudió el posible mecanismo de acción del extracto metanólico de *H. inuloides* por lo cual se propone que este efecto neuroprotector, hepatoprotector y nefroprotector se atribuye a los compuestos fenólicos que integran este extracto y su capacidad antioxidante que favoreció la disminución del MDA en los tejidos estudiados.

10. Conclusión

En este estudio observamos la participación del estrés oxidante a través de la neurotoxicidad, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad por la administración de ácido kaínico. Esta sustancia generó el aumento del marcador de daño, el malondialdehído (MDA) en los tejidos estudiados. De esta manera, el extracto metanólico de *Heterotheca inuloides* produce un efecto antioxidante y protector al disminuir los valores de la lipoperoxidación en los grupos tratados con Ácido Kaínico. Este efecto se atribuye a los metabolitos presentes en el extracto que posiblemente actúan en sinergia para disminuir el daño por estrés oxidante. Por lo cual, el tratamiento con el extracto metanólico de *H.inuloides* representa un agente terapéutico para patologías relacionadas con el sistema nervioso central y en segundo plano con enfermedades a nivel sistémico.

11. Referencias bibliográficas

1. Aguiar C, Almeida A, Araújo P, Abreu R, Chaves E, Vale O *et al.* Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012; 2012:1-12.
2. Aktumsek A, Zengin G, Guler G, Cakmak Y, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 55:290-296.
3. Albayrak S, Aksoy A. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Two Endemic Anthemis Species in Turkey. *Journal of Food Biochemistry*. 2012; 37 (6):639-645.
4. Alderton W, Cooper C, Knowles R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001; 357 (3): 593.
5. Andrade-Cetto A. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 122(1):163-171.
6. Argueta A, Gallardo M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México, D.F.: Instituto Nacional Indigenista; 1994. 1786 pp
7. Aruoma O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1998; 75(2):199-212.
8. Babcock D. Mitochondrial Participation in the Intracellular Ca²⁺ Network. *The Journal of Cell Biology*. 1997; 136(4):833-844.
9. Babior B, Woodman R. Chronic granulomatous disease. *Seminars in Hematology*. 1990; 27: 247-259.
10. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends in Neurosciences*. 2000; 23(11):580-587.
11. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1985; 14 (2):375-403.

12. Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1980; 620 (2):281-296.
13. Bloss E, Hunter R. Hippocampal kainate receptors. *Vitamins & Hormones*. 2010; 82:167–184.
14. Boveris A, Martino E, Stoppani A. Evaluation of the horseradish peroxidase-scopoletin method for the measurement of hydrogen peroxide formation in biological systems. *Analytical Biochemistry*. 1977; 80 (1):145-158.
15. Brorson, J, Manzolillo P, Miller R. Ca^{2+} entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neuroscience*. 1994; 14 (1): 187-197
16. 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.
17. Burk R, Hill K, Motley A. Selenoprotein Metabolism and Function: Evidence for More than One Function for Selenoprotein P. *Journal of Nutrition*. 2003; 133 (5): 1517-1520.
18. Burton G, Ingold K. Vitamin E as an *in Vitro* and *in Vivo* Antioxidant. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1989; 570 (1 Vitamin E):7-22.
19. Cadenas E. Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annual Review of Biochemistry*. 1989; 58 (1):79-110.
20. Calingasan N, Uchida K, Gibson G. Protein-Bound Acrolein. *Journal of Neurochemistry*. 1999; 72 (2):751-756.
21. Campbell S, Mathew S, Hablitz J. Pre- and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology*. 2007; 53 (1):37-47.
22. Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, Bandala C, Carmona-Aparicio L *et al*. Role of Oxidative Stress in Refractory Epilepsy: Evidence in Patients and Experimental Models. *IJMS*. 2013; 14 (1):1455-1476.

23. Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*. 2006; 17: 164-173.
24. Carriedo S, Yin H, Sensi S, Weiss J. Rapid Ca^{2+} entry through Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels triggers marked intracellular Ca^{2+} rises and consequent oxygen radicals production. *Journal of Neuroscience*. 1998; 18: 7727–7738.
25. Carta M, Fièvre S, Gorlewicz A, Mulle C. Kainate receptors in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 2014; 39(11):1835-1844.
26. Chavko M, Auker C, McCarron R. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. *Nitric Oxide*. 2003; 9(1):18-23.
27. Chen Z, Duan R, Quezada H, Mix E, Nennesmo I, Adem A *et al*. Increased microglial activation and astrogliosis after intranasal administration of kainic acid in C57BL/6 mice. *Journal of Neurobiology*. 2004; 62(2):207-218.
28. Cheng F, Jen J, Tsai T. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *Journal of Chromatography B*. 2002;781 (1-2):481-496.
29. Choi B. Oxygen, antioxidants and brain dysfunction. *Yonsei Medical Journal*. 1993; 34(1):1.
30. Chuang Y, Chen S, Lin T, Liou C, Chang W, Chan S *et al*. Upregulation of nitric oxide synthase II contributes to apoptotic cell death in the hippocampal CA3 subfield via a cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following induction of experimental temporal lobe status epilepticus in the rat. *Neuropharmacology*. 2007; 52 (5):1263-1273.
31. Coballase Urrutia E. El árnica (*Heterotheca inuloides*) protector contra el daño provocado por los radicales libres. [Doctorado]. UNAM; 2010.
32. Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Medina-Campos O *et al*. Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*. 2010; 276 (1):41-48.
33. Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B, Edna García-Cruz M, Ramírez-Morales A *et al*. Hepatoprotective effect of

- acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2011; 63(4):363-370.
34. Cock H. The role of mitochondria and oxidative stress in neuronal damage after brief and prolonged seizures. *Progress in Brain Research*. 2002; 135:187-196.
 35. Coyle J, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993; 262(5134):689-695.
 36. Coyle J. Kainic acid: insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration. *Ciba Foundation Symposium*. 1987; 126: 186–203.
 37. Cui H, Kim M, Sok D. Protection by Petasignolide A, a Major Neuroprotective Compound in the Butanol Extract of *Petasites japonicas* Leaves, against Oxidative Damage in the Brains of Mice Challenged with Kainic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53 (22):8526-8532.
 38. Dabbeni-Sala F. Kainic acid induces selective mitochondrial oxidative phosphorylation enzyme dysfunction in cerebellar granule neurons: protective effects of melatonin and GSH ethyl ester. *The FASEB Journal*. 2001; 15(10):1786-1788
 39. Dahle L, Hill E, Holman R. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1962; 98(2):253-261.
 40. Dalar A, Konczak I. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Industrial Crops and Products*. 2013; 44:383-390.
 41. De Rzedowski y Rzedowski J. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Pátzcuaro: Instituto de Ecología A.C.; 2001. 1406 pp
 42. Delgado G, del Socorro Olivares M, Chávez M, Ramírez-Apan T, Linares E, Bye R *et al*. Antiinflammatory Constituents from *Heterotheca inuloides*. *J Nat Prod*. 2001; 64(7):861-864.

43. Donaldson P, Duce I, Usherwood P. Calcium accumulation precedes the degenerative effects of L-glutamate on locust muscle fibres. *Brain Research*. 1983; 274(2):261-265.
44. Doorn J, Petersen D. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chemico-Biological Interactions*. 2003; 143-144:93-100.
45. Dykens J. Isolated Cerebral and Cerebellar Mitochondria Produce Free Radicals when Exposed to Elevated Ca^{2+} and Na^{+} : Implications for Neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*. 1994; 63(2):584-591.
46. Emerit J, Chaudiere J. En: Miquel J, Quintanilha A, Weber H. *CRC Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 1989. 360 pp
47. Esterbauer H, Schaur R, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1991; 11(1):81-128.
48. Fernández S, Wasowski C, Loscalzo L, Granger R, Johnston G, Paladini A, Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glucosides. *European Journal of Pharmacology*. 2006; 539(3):168-176.
49. Flora S. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009; 2(4):191-206.
50. Frantseva M, Perez Velazquez J, Tsoraklidis G, Mendonca A, Adamchik Y, Mills L *et al*. Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. *Neuroscience*. 2000; 97(3):431-435.
51. Freeman B, Crapo J. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*. 1982; 47(5): 412-426
52. Fridovich I. Superoxide Dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1975; 44(1):147-159.

53. Friedman L, Goldstein B, Rafiuddin A, Roblejo P, Friedman S. Lack of resveratrol neuroprotection in developing rats treated with kainic acid. *Neuroscience*. 2013; 230: 39-49.
54. Fukuda M, Kanou F, Shimada N, Sawabe M, Saito Y, Murayama S *et al*. Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease. *Biomed Res*. 2009; 30(4):227-233.
55. Furuno K, Akasako T, Sugihara N. The Contribution of the Pyrogallol Moiety to the Superoxide Radical Scavenging Activity of Flavonoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2002; 25(1):19-23.
56. Furusawa M, Tanaka T, Ito T. Antioxidant activities of hydroxyl flavonoids. *Journal of Health Sciences*. 2005; 51(3): 376-378
57. Gayathri V, Neelima R, Mohanan P. Protective Effect of Melatonin on Kainic Acid Induced-Liver Damage and Immune Modulatory Cytokines. *Immunome Res*. 2014; 1-11.
58. Gené, Segura L, Adzet T, Marin E, Iglesias J. *Heterotheca inuloides*: Anti-inflammatory and analgesic effect. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 60(2):157-162.
59. Gerschman R, Gilbert D, Nye S, Dwyer P, Fenn W. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science*. 1954; 119 (3097):623-626.
60. Gomberg M. An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *Journal of the American Chemical Society*. 1900; 22(11):757-771.
61. Gorrini C, Harris I, Mak T. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013;12(12):931-947.
62. Gutteridge J, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillière's Clinical Haematology*. 1989; 2(2):195-256.
63. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*. 1985; 1(4):331-332.
64. Halliwell B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*. 1996; 16(1):33-50.

65. Hammond C, Marchan R, Krance S, Ballatori N. Glutathione Export during Apoptosis Requires Functional Multidrug Resistance-associated Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282 (19):14337-14347.
66. Hansberg W. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*. 2002; 26:19-54.
67. Haraguchi H, Ishikawa H, Sanchez Y, Ogura T, Kubo Y, Kubo I. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1997; 5(5):865-871.
68. Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, Sanchez Y, Ogura T, Kubo I. Inhibition of Lipid Peroxidation by Sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1996; 48 (4):441-443.
69. Hauck A, Bernlohr D. Oxidative Stress and Lipotoxicity. *Journal of Lipid Research*. 2016; 57 (11):1976-1986.
70. Hayes J, McLellan L. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*. 1999; 31(4):273-300.
71. Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13 (10):572-584.
72. Heinrich M, Frei Haller B, Leonti M. A Perspective on Natural Products Research and Ethnopharmacology in Mexico: The Eagle and the Serpent on the Prickly Pear Cactus. *J Nat Prod*. 2014; 77(3):678-689.
73. Hou C. Pu-Erh tea and GABA attenuates oxidative stress in kainic acid-induced status epilepticus. *Journal of Biomedical Science*. 2011; 18(1):75.
74. Hwang C, Sinskey A, Lodish H. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*. 1992; 257(5076):1496-1502.
75. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y *et al*. An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes

- through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997; 236 (2):313-322.
76. Jane D, Lodge D, Collingridge G. Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology*. 2009; 56(1):90-113.
77. 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.
78. Jerga C, Merfort I, Willuhn G. Flavonoidaglykaaus den Blüten von *Heterotheca inuloides*. *Planta Med*. 1990; 56(01):122-123.
79. Jerrett S, JeVerson D, Mengel C. Seizure H₂O₂ and lipidperoxidase in brain during exposure to oxygen under high pressure. *Aeroesp. Med*. 1973; 44: 40–44.
80. Kahnberg P, Lager E, Rosenberg C, Schougaard J, Camet L, Sterner O *et al*. 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.
81. Kandaswami C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In *Free Radicals in Diagnostic Medicine*; Amstron, D., Ed.; PlenumPress: New York. 1994; 366: 351-376.
82. Karmazyn M. Synthesis and relevance of cardiac eicosanoids with particular emphasis on ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol*. 1989; 67(8):912-921.
83. Karoui H, Hogg N, Frejaville C, Tordo P, Kalyanaraman B. Characterization of Sulfur-centered Radical Intermediates Formed during the Oxidation of Thiols and Sulfite by Peroxynitrite. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(11):6000-6009.
84. Kim B, Kim M, Leem Y. Hippocampal neuronal death induced by kainic acid and restraint stress is suppressed by exercise. *Neuroscience*. 2011; 194: 291-301.
85. Kojo S. Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Curr Med Chem*. 2004; 11(8):1041-1064.

86. Kraft A, Lee J, Johnson D, Kan Y, Johnson J. Neuronal sensitivity to kainic acid is dependent on the Nrf2-mediated actions of the antioxidant response element. *Journal of Neurochemistry*. 2006; 98(6):1852-1865.
87. Kritis A, Stamoula E, Paniskaki K, Vavilis T. Researching glutamate- induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015; 9.
88. Kubo I, Muroi H, Kubo A, Chaudhuri S, Sanchez Y, Ogura T. Antimicrobial Agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica*. 1994; 60(03):218-221.
89. Liang L, Ho Y, Patel M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience*. 2000; 101(3):563-570.
90. Lipton S, Choi Y, Pan Z, Lei S, Chen H, Sucher N *et al.* A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993; 364(6438):626-632.
91. López-Luengo M. Flavonoides. *Offarm*. 2001; 21(4):108-113.
92. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193:265-275.
93. Lu J, Holgrem A. Selenoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;284(2):723
94. Lu M, Zhang X, Mix E, Quezada H, Jin T, Zhu J *et al.* TNF- α receptor 1 deficiency enhances kainic acid-induced hippocampal injury in mice. *Journal of Neuroscience Research*. 2008; 86(7):1608-1614.
95. Maggio R, Fumagalli F, Donati E, Barbier P, Racagni G, Corsini G *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase dramatically potentiates seizures induced by kainic acid and pilocarpine in rats. *BrainResearch*. 1995; 679(1):184-187.
96. Mahdy H, Tadros M, Mohamed M, Karim A, Khalifa A. The effect of Ginkgo biloba extract on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neurochemistry International*. 2011; 59 (6):770-778.
97. Marder M, Paladini A. GABA-A-Receptor Ligands of Flavonoid Structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2002; 2(8):853-867.

98. Marder M, Viola H, Bacigaluppo J, Colombo M, Wasowski C, Wolfman C *et al.* 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.
99. Marder M. Flavonoids as GABA_A receptor ligands: the whole story?. *Journal of Experimental Pharmacology*. 2012; 9-24.
100. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 2002; 12(6):271-278.
101. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005; 16(10):577-586.
102. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorn W *et al.* Extra Virgin Olive Oil Biophenols Inhibit Cell-Mediated Oxidation of LDL by Increasing the mRNA Transcription of Glutathione-Related Enzymes. *The Journal of Nutrition*. 2004; 134:784-791.
103. Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M. Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*. 1992; 37(1-2):23-33.
104. Mayumi T, Schiller H, Bulkley G. In *Free Radical: From Basic Science to Medicine*; Poli G, Albamo E, Dianzani M. Birkhauser Verlag: Switzerland, 1993; 438-457.
105. McCord J, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 1968; 243: 5753–5760.
106. McGeer P, Itagaki S, Boyes B, McGeer E. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*. 1988; 38(8):1285-1285.

107. McKhann G, Wenzel H, Robbins C, Sosunov A, Schwartzkroin P. Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience*. 2003; 122(2):551-561.
108. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269: 9397–9400
109. Mikamo E, Okada Y, Semma M, Ito Y, Morimoto T, Nakamura M. Studies on structural correlation with antioxidant activity of flavonoids. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi*. 2000; 7:97-101.
110. MohdSairazi N, Sirajudeen K, Asari M, Muzaimi M, Mummedy 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.
111. Mollace V, Bagetta G, Nisticò G. Evidence that L-arginine possesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. *NeuroReport*. 1991; 2(5):269-272.
112. Murakami S, Takemoto T, Shimizu S. Studies on the effective principles of *Diagenea simplex* Aq. I. Separation of the effective fraction by liquid chromatography. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 1953; 73: 1026–1028.
113. Murphy M. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009; 417(1):1-13.
114. Musiek E, Brooks J, Joo M, Brunoldi E, Porta A, Zanoni G *et al*. Electrophilic Cyclopentenone Neuroprostanes Are Anti-inflammatory Mediators Formed from the Peroxidation of the Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Docosahexaenoic Acid. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(29):19927-19935.
115. Nadler J, Perry B, Cotman C. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature*. 1978; 271(5646):676-677.
116. Nadler J. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sciences*. 1981; 29(20):2031-2042.

117. Nakaki T, Mishima A, Suzuki E, Shintani F, Fujii T. Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through N-methyl d-aspartate receptors in rat cerebellum. *Neuroscience Letters*. 2000; 290(3):209-212.
118. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1990; 29(4):273-300.
119. Nicholls D, Budd S. Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria. *BioFactors*. 1998;8(3-4):287-299.
120. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors*. 2008; 34(2):171-180.
121. Nohl H, Hegner D. Do Mitochondria Produce Oxygen Radicals in vivo? *European Journal of Biochemistry*. 1978; 82(2):563-567.
122. Obón C, Rivera D, Verde A, Fajardo J, Valdés A, Alcaraz F, Carvahlo. *Árnica: A multivariate analysis of the botany and ethnopharmacology of a medicinal plant complex in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 144(1):44-56.
123. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979; 95(2):351-358.
124. Olney J, Rhee V, Ho O. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Research*. 1974; 77(3):507-512.
125. Osonoe K, Mori N, Suzuki K, Osonoe M. Antiepileptic effects of inhibitors of nitric oxide synthase examined in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *BrainResearch*. 1994; 663(2):338-340.
126. Ozbilgin A, Durmuskahya C, Kayalar H, Ostan I. Assessment of in vivo antimalarial activities of some selected medicinal plants from Turkey. *ParasitologyResearch*. 2013; 113(1):165-173.
127. Özkan A, Erdoğan A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turk J Biol*. 2011; 32:735-742.

128. Ozkan G, Kamiloglu S, Ozdal T, Boyacioglu D, Capanoglu E. Potential Use of Turkish Medicinal Plants in the Treatment of Various Diseases. *Molecules*. 2016; 21(3):257.
129. Pan H, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Patel V, Mukhopadhyay B, Gao B *et al.* Cannabidiol Attenuates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Decreasing Oxidative/Nitrosative Stress, Inflammation, and Cell Death. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008; 328(3):708-714.
130. Paneth F, Hofeditz W. *Über die Darstellung von freiem Methyl*. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*. 1929; 62(5):1335-1347.
131. Parihar M, Hemnani T. Phenolic antioxidants attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced excitotoxicity. *Journal of Biosciences*. 2003; 28(1):121-128.
132. Patel M, Liang L, Hou H, Williams B, Kmiec M, Swartz H *et al.* Seizure-induced formation of isofurans: novel products of lipid peroxidation whose formation is positively modulated by oxygen tension. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 264-270.
133. Pérez-Vizcaino F, Duarte J, Jiménez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*. 2009; 61(1):67-75.
134. 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.
135. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*. 2001; 64(1):51-68.
136. Quideau S. Flavonoids. *Chemistry, Biochemistry and Applications*. *Angewandte Chemie*. 2006; 118(41):6939-6941.
137. Quincozes-Santos A, Bobermin L, Tramontina A, Wartchow K, Tagliari B, Souza D *et al.* Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: Neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicology in Vitro*. 2014; 28(4):544-551.

138. Ravizza T, Rizzi M, Perego C, Richichi C, Veliskova J, Moshe S *et al.* Inflammatory Response and Glia Activation in Developing Rat Hippocampus after Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2005; 46(5):113-117.
139. Reed T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 51(7):1302-1319.
140. Rendeiro C, Rhodes J, Spencer J. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochemistry International*. 2015; 89: 126-139.
141. Reynolds I, Hastings T. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *Journal of Neuroscience*. 1995; 15(5): 318-3327.
142. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996; 20(7):933-956.
143. Rice-Evans C. Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*. 2001; 8(7):797-807.
144. Roberts II L, Morrow J. The generation and actions of isoprostanes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1997; 1345(2):121-135.
145. Rodríguez-Chávez J, Coballase-Urrutia E, Nieto-Camacho A, Delgado-Lamas G. Antioxidant Capacity of “Mexican Arnica” *Heterotheca inuloides* Cass Natural Products and Some Derivatives: Their Anti-Inflammatory Evaluation and Effect on *C. Elegans* LifeSpan. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015; (2015):1-11.
146. Rodríguez-Chávez J, Gómez-Vidales V, Coballase-Urrutia E, Ortega-Cuéllar D, Delgado-Lamas G. *Heterotheca inuloides* (Mexican arnica) metabolites protect *Caenorhabditis elegans* from oxidative damage and inhibit nitric oxide production. *RSC Adv*. 2016; 6(15):12032-12041.
147. 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.

148. Ryan K, Liang L, Rivard C, Patel M. Temporal and spatial increase of reactive nitrogen species in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*. 2014; 64:8-15.
149. Sarikurkcu C, Zengin G, Oskay M, Uysal S, Ceylan R, Aktumsek A. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2015; 70:178-184.
150. Schauenstein E, Esterbauer H. Formation and properties of reactive aldehydes. *Ciba Found Symp*. 1978;(67):225-44.
151. Schroeter H, Boyd C, Spencer J, Williams R, Cadenas E, Rice Evans C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging*. 2002; 23(5):861-880.
152. Segura L, Freixa B, Ringbom T, Vila R, Perera P, Adzet T *et al*. Anti-Inflammatory Activity of Dichloromethane Extract of *Heterotheca inuloides* *in Vivo* and *in Vitro*. *Planta med*. 2000; 66 (6): 553-555.
153. Sharma A, Jordan W, Reams R, Hall D, Snyder P. Temporal Profile of Clinical Signs and Histopathologic Changes in an F-344 Rat Model of Kainic Acid–induced Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Toxicologic Pathology*. 2008; 36(7):932-943.
154. Shin E, Jeong J, Chung Y, Kim W, Ko K, Bach J *et al*. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochemistry International*. 2011; 59(2):122-137.
155. Shin H, Kim H, Heo R, Kim H, Choi W, Kwon H *et al*. Tonicity-responsive enhancer binding protein haplodeficiency attenuates seizure severity and NF- κ B-mediated neuroinflammation in kainic acid-induced seizures. *Cell Death Differ*. 2014; 21(7):1095-1106.
156. Shinozaki H, Konishi S. Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain Research*. 1970; 24(2):368-371.
157. Si P, Zhen J, Cai Y, Wang W, Wang W. Salidroside protects against kainic acid-induced status epilepticus via suppressing oxidative stress. *Neuroscience Letters*. 2016; 618:19-24.

158. Silva M, Santos M, Caroço G, Rocha R, Justino G, Mira L. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research*. 2002; 36(11):1219-1227.
159. Singh R, Pathak D. Lipid Peroxidation and Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase, Superoxide Dismutase, Catalase, and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activities in FeCl₃-Induced Epileptogenic Foci in the Rat Brain. *Epilepsia*. 1990; 31(1):15-26.
160. Škrovánková S, Mišurcová L, Machů L. Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2012; 67:75-139.
161. Sok D, Oh S, Kim Y, Kang H, Kim M. Neuroprotection by extract of *Petasites japonicus* leaves, a traditional vegetable, against oxidative stress in brain of mice challenged with kainic acid. *European Journal of Nutrition*. 2005; 45(2):61-69.
162. Sokka A, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Inhibition Protects against Excitotoxic Neuronal Injury in the Rat Brain. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27(4):901-908.
163. Süntar I, Akkol E, Yalçın F, Koca U, Keleş H, Yesilada E. Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 129(1):106-114.
164. Swamy M, Sirajudeen K, Chandran G. Nitric oxide (NO), citrulline–NO cycle enzymes, glutamine synthetase, and oxidative status in kainic acid–mediated excitotoxicity in rat brain. *Drug and Chemical Toxicology*. 2009; 32(4):326-331.
165. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007;6(8):662-680.
166. Szaroma W, Dziubek K, Greń A, Kreczmer B, Kapusta E. Influence of the kainic acid on antioxidant status in the brain, liver and kidneys of the mouse. *Acta Physiologica Hungarica*. 2012; 99(4):447-459.

167. Tang L, Reiter R, Li Z, Ortiz G, Yu B, Garcia J. Melatonin reduces the increase in 8-hydroxy-deoxyguanosine levels in the brain and liver of kainic acid-treated rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998; 178(1):299–303.
168. Tejada S, Sureda A, Roca C, Gamundí A, Esteban S. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine. *Brain Research Bulletin*. 2007; 71 (4):372-375.
169. Trujillo-Silva D. Efecto del tratamiento antioxidante sobre el estrés oxidante y el daño renal en la nefrotoxicidad experimental [Doctorado]. UNAM; 2015.
170. Ullah I, Park H, Kim M. Anthocyanins Protect against Kainic Acid-induced Excitotoxicity and Apoptosis via ROS-activated AMPK Pathway in Hippocampal Neurons. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2014;20(4):327-338
171. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 160(1):1-40.
172. van Acker S, van den Berg D, Tromp M, Griffio D, van Bennekom W, van der Vijgh W, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free RadicBiol Med*. 1996; 20(3):331-42.
173. Villaseñor-Ríos J, Espinosa-García F. Catálogo de malezas de México: Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica; 1998. 449 pp
174. Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*. 2009; 158(1):309-323.
175. 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.
176. Wang L, Tu Y, Lian T, Hung J, Yen J, Wu M. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54 (26):9798-9804.
177. Wang Q, Theard M, Pelligrino D, Baughman V, Hoffman W, Albrecht R *et al*. Nitric oxide (NO) is an endogenous anticonvulsant but not a mediator of the

- increase in cerebral blood flow accompanying bicuculline-induced seizures in rats. *Brain Research*. 1994; 658(1-2):192-198.
178. Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun G, Sun A. Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. *MN*. 2005; 31(1-3): 003-016.
179. Willmore L, Rubin J. Antiperoxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. *Neurology*. 1981; 31(1):63-63.
180. Willuhn G, Schneider R. Sesquiterpene, Triterpene und Sterine aus Blüten von *Heterotheca inuloides* ("Mexikanische Arnikablüten"). *Archiv der Pharmazie*. 1987; 320(5):393-396.
181. Winkler P, Lindner W, Esterbauer H, Schauenstein E, Schaur R, Khoschsorur G. Detection of 4-hydroxynonenal as a product of lipid peroxidation in native Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1984; 796(3):232-237.
182. Witting L. In *Free Radicals in Biology*. Ed. Academic Press: New York. 1980; 4:295-319.
183. Yi L, Jin X, Chen C, Fu Y, Zhang T, Chang H *et al*. Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12(12):5471-5489.
184. Youn D, Randic M. Modulation of excitatory synaptic transmission in the spinal substantia gelatinosa of mice deficient in the kainate receptor GluR5 and/or GluR6 subunit. *The Journal of Physiology*. 2004; 555(3):683-698.
185. Young I. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54(3):176-186.
186. Zeng L, Zhang H, Xu C, Bian Y, Xu X, Xie Q *et al*. Neuroprotective effects of flavonoids extracted from licorice on kainate-induced seizure in mice through their antioxidant properties. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2013; 14(11):1004-1012.

187. Zengin G, Sarikurkcu C, Aktumsek A, Ceylan R, Ceylan O. A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*. 2014; 53:244-251.
188. Zengin G, Sarikurkcu C, Uyar P, Aktumsek A, Uysal S, Kocak M *et al.* *Crepis foetida* L. *subsp. rhoeadifolia* (Bieb.) Celak. as a source of multifunctional agents: Cytotoxic and phytochemical evaluation. *Journal of Functional Foods*. 2015; 17:698-708.
189. Zengin G, Sarikurkcu C, Aktumsek A, Ceylan R. Antioxidant potential and inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's diseases and diabetes mellitus by monoterpene-rich essential oil from *Sideritis galatica* Bornm. endemic to Turkey. *Rec. Nat. Prod.* 2016; 10: 195–206.
190. Zhang X, Duan R, Chen Z, Quezada H, Mix E, Winblad B *et al.* IL-18 deficiency aggravates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in C57BL/6 mice due to an overcompensation by IL-12. *Experimental Neurology*. 2007; 205(1):64-73.
191. Zhang X, Zhu J. Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines. *Current Neuropharmacology*. 2011;9(2):388-398.
192. Zheng X, Zhang H, Luo Q, Zhu J. Kainic Acid-Induced Neurodegenerative Model: Potentials and Limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011:1-10