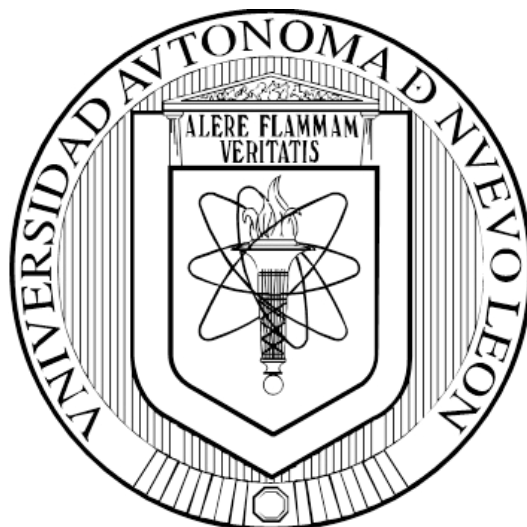


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



Evaluación del efecto neuroprotector de extractos de *Datura innoxia* y *Turnera diffusa* en un modelo *in vitro* de neurotoxicidad

POR

Q.F.B. JESÚS VÉLEZ HUERTA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

AGOSTO, 2018

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *Datura innoxia* Y
Turnera diffusa EN UN MODELO *IN VITRO* DE NEUROTOXICIDAD

Aprobación de la Tesis

DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO
Presidente

DRA. MONICA A. RAMÍREZ CABRERA
Co-Directora

DR. JUAN MANUEL DE JESÚS FAVELA HERNÁNDEZ
Co-Director externo

DR. FRANCISCO G. AVALOS ALANÍS
Secretario

DRA. MA. DEL ROSARIO GONZÁLEZ GONZÁLEZ
Vocal

DRA. MA. ARACELI HERNÁNDEZ RAMÍREZ
Sub-Directora de Posgrado

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *Datura innoxia* Y
Turnera diffusa EN UN MODELO *IN VITRO* DE NEUROTOXICIDAD

Revisión de la Tesis

DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO

Director

DRA. MÓNICA A. RAMÍREZ CABRERA

Co-Directora

DR. JUAN MANUEL DE JESÚS FAVELA HERNÁNDEZ

Co-Director externo

DRA. SANDRA LETICIA GRACIA VÁSQUEZ

Comité tutorial

DRA. MA.DEL ROSARIO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Comité tutorial

DR. FRANCISCO G. AVALOS ALANÍS

Comité tutorial

RESUMEN

Q.F.B. Jesús Vélez Huerta

Fecha de Graduación: Agosto 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Evaluación del efecto neuroprotector de extractos de *Datura inoxia* y *Turnera diffusa* en un modelo *in vitro* de neurotoxicidad

Número de páginas: 91

Candidato al grado de Maestría en

Ciencias con Orientación en Farmacia

Propósito y Método del Estudio: Las enfermedades neurodegenerativas son un abanico de condiciones en las cuales principalmente se afectan las células en el cerebro, así como la médula espinal ocasionando pérdida de funcionalidad y muerte celular, resultando en degeneración progresiva de las células neuronales, provocando problemas de movimiento e insuficiencia mental. Actualmente se han considerado a cuatro padecimientos dentro de las principales enfermedades neurodegenerativas a nivel global, entre ellas se encuentran: en primer lugar la enfermedad de Alzheimer que en 2017 se habían reportado aproximadamente 800 000 casos en México; posteriormente la enfermedad de Parkinson, cuya estimación en el año 2013 superaba los 500 000 casos reportados; después, se encuentran dos padecimientos que a causa de la falta de infraestructura diagnóstica a nivel nacional solo se han reportado estimaciones de su prevalencia, es así que el número de casos aproximados para la enfermedad de Huntington es de 8000 pacientes, mientras que para la esclerosis lateral amiotrófica el número oscila entre 5000 y 7000 pacientes hasta el año 2014. A pesar de que actualmente se cuenta con fármacos para el tratamiento de dichas enfermedades, no se observa mejoría o cura alguna para la evolución y desarrollo de estos padecimientos. Además, las terapias actuales presentan una serie de efectos adversos, fallas terapéuticas y la limitante de tener ventanas terapéuticas muy estrechas. Mientras que el principal problema de la investigación concerniente es que presenta metodologías poco reproducibles. Es por esta razón que resulta importante ampliar las opciones terapéuticas mediante la búsqueda de nuevas alternativas que puedan coadyuvar al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, y debido a que las plantas medicinales proporcionan una fuente de compuestos con actividad biológica resulta importante obtener información y evidencia científica sobre los efectos neuroprotectores que presentan las plantas de *D. inoxia* y *T. diffusa*. Dichos efectos se determinaron mediante la evaluación citotóxica en línea celular VERO, la evaluación de actividad neurotóxica en línea celular PC-12, la determinación de efecto neuroprotector en un modelo de neurotoxicidad inducido por glutamato, el establecimiento de actividad antioxidante por ensayo de captación de radical DPPH y la actividad antiapoptótica por ensayo de inhibición de caspasa-3.

Contribuciones y Conclusiones: Los extractos D1, D2, D3 y T1 no son citotóxicos en línea celular VERO en todas las concentraciones evaluadas mientras que el extracto T2 no es citotóxico en el rango de 3.125 µg/mL a 50 µg/mL. El extracto T3 es citotóxico en todas las concentraciones evaluadas. Los extractos D1, D2 y D3 no son neurotóxicos en línea celular PC-12 a bajas concentraciones. El extracto T1 no es neurotóxico a concentraciones de 3.125 µg/mL a 50 µg/mL. Mientras que, el extracto T2 no es

neurotóxico a partir de 12.5 µg/mL y en el caso del extracto T3 no es neurotóxico en concentraciones bajas. Los extractos D1 y D2 presentan efecto neuroprotector a partir de la concentración de 3.125 µg/mL a 50 µg/mL, mientras que el extracto D3 lo presenta en el rango de 3.125 µg/mL a 12.5 µg/mL. Los extractos T1, T2 y T3 presentaron efecto neuroprotector en el rango de 3.125 µg/mL a 12.5 µg/mL. Los extractos D1, D2 y D3 presentan una baja actividad antioxidante con valor de porcentaje de inhibición <10% en todas las concentraciones evaluadas. Por otra parte, el extracto T1, es el que presenta mayor actividad antioxidante a una concentración de 200 µg/mL. Los extractos D1 y T1 presentaron actividad antiapoptótica similar al control positivo de neuroprotección.

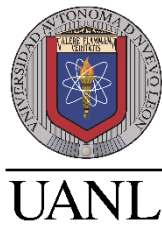
Firma de los directores de tesis

Dr. Omar González Santiago
Director de Tesis

Dra. Mónica A. Ramírez Cabrera
Co-directora de Tesis

Dr. Juan Manuel de Jesús Favela Hernández
Co-director externo

AGRADECIMIENTOS



Se agradece a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el financiamiento del proyecto.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada.



A la Facultad de Ciencias Químicas por la infraestructura y las facilidades otorgadas para el presente trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Omar González Santiago, por haberme confiado el proyecto, así como por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

A la Dra. Mónica A. Ramírez Cabrera, no hay palabras suficientes para agradecer por todo el apoyo, por su entereza y compromiso para que el presente trabajo se lograra, por siempre tener palabras de ánimo y la mejor actitud.

Al Dr. Juan Manuel Favela por confiarme los extractos de las plantas y por su apoyo en la resolución de dudas.

A la Dra. Sandra Gracia, Dra. Ma. Del Rosario Gonzáles y al Dr. Francisco Avalos, por las observaciones, comentarios realizados y por compartir sus conocimientos para la mejora y cumplimiento del presente trabajo.

Al Dr. Eder U. Arredondo Espinoza, por brindarme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, por sus observaciones y comentarios para la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

*A la memoria de Marcos Vélez Huerta
quien siempre depositó su confianza y cariño en mí.*

A mi familia, por siempre apoyar y respaldar todas mis decisiones, por siempre estar presente en mi vida y enseñarme el valor de ésta.

A mi madre, la señora Ventura Huerta por enseñarme a ser fuerte y siempre luchar por mis objetivos, por siempre desear lo mejor para mí y enseñarme a salir adelante, por ser el pilar de mi vida y dar su mejor esfuerzo para que yo tuviera lo necesario en mi desarrollo personal y profesional, por su confianza, apoyo y amor infinito e incondicional pues aún con la distancia de por medio, nunca dejó de estar presente en mi cotidianidad.

A Rosario Vélez, por el apoyo incondicional y el cariño brindado en mi desarrollo personal y profesional, por acompañarme en cada uno de mis objetivos y darme las palabras de aliento para no claudicar, por todo el compromiso adquirido y ser el sostén de la familia y darnos el mejor regalo que en el mundo pueda existir.

A mi otra madre, Marina Vélez, por siempre desear un mejor futuro para mí, por el cariño y el apoyo brindado en cada una de las etapas de mi vida, por su búsqueda que me enseñó a siempre luchar por lo que quiero.

A Santiago Ramírez, porque con su sola presencia y sonrisa me motiva a luchar para un futuro y una vida mejor, por ser el mejor regalo que en el mundo pueda existir.

A mis amigos y compañeros, Jorge, Reyna, Karla y Alex, por todo lo aprendido en este andar, por lo compartido, por los consejos, ratos de diversión y estudio juntos, por compartir los buenos y malos momentos, así como por compartir un objetivo mutuo. Gracias a cada uno de ustedes.

Al M.E. José G. Camacho, por todo el apoyo brindado en cada etapa de mi desarrollo personal y profesional, por el tiempo y las experiencias compartidas, por las enseñanzas sobre la vida y la motivación a seguir siempre adelante.

A mis amigos de toda la vida, Carmen Aguilar y Ofir Ramírez, por siempre apoyar cada uno de mis objetivos, por su comprensión y cariño, por todas las risas y experiencias que hemos tenido en nuestra vida compartida.

“La disciplina, tarde o temprano vencerá, a la inteligencia”

-Yokoi Kenji

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedades neurodegenerativas	1
1.1.1 Enfermedad de Parkinson	2
1.1.2 Enfermedad de Alzheimer	3
1.1.3 Esclerosis lateral amiotrófica	4
1.1.4 Enfermedad de Huntington	5
1.1.5 Tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas	6
1.2 Neuroprotección	9
1.3 Proceso de excitotoxicidad	10
1.3.1 Receptores de aminoácidos excitatorios	11
1.3.2 Mecanismos moleculares de excitotoxicidad	13
1.4 Tipos de neuroprotección	17
1.4.1 Papel de antioxidantes en enfermedades neurodegenerativas	18
1.5 Características de las plantas <i>Datura innoxia</i> y <i>Turnera diffusa</i>	19
1.5.1 Contenido químico de <i>D. innoxia</i>	22
1.5.2 Contenido químico de <i>T. diffusa</i>	23
1.6 Antecedentes	25

1.6.1	Evaluaciones <i>in vitro</i> de <i>T. diffusa</i>	25
1.6.2	Evaluaciones <i>in vitro</i> de <i>D. inoxia</i>	28
1.6.3	Evaluación <i>in vivo</i> de <i>T. diffusa</i>	31
1.7	Hipótesis.....	32
1.8	Justificación.....	32
1.9	Objetivo general.....	33
1.9.1	Objetivos específicos.....	33
CAPÍTULO 2.....		34
MATERIALES Y MÉTODOS.....		34
2.1	Material y reactivos.....	34
2.1.2	Equipos e instrumentos.....	35
2.1.3	Reactivos.....	35
2.2	Extractos.....	36
2.3	Métodos.....	37
2.3.1	Evaluación de la actividad citotóxica mediante el ensayo de MTT....	39
2.3.2	Evaluación de la actividad neurotóxica mediante el ensayo de WST-1	41
2.3.3	Evaluación del efecto neuroprotector mediante el ensayo de WST-1	43
2.3.4	Evaluación de la actividad antioxidante.....	44
2.3.5	Evaluación de la actividad antiapoptótica.....	46
2.4	Manejo de los residuos.....	49
CAPÍTULO 3.....		50
RESULTADOS.....		50
3.1	Actividad citotóxica.....	50
3.1.1	Evaluación citotóxica de <i>D. inoxia</i>	51

3.1.2 Evaluación citotóxica de <i>T. diffusa</i>	52
3.2 Actividad neurotóxica.....	54
3.2.1 Evaluación neurotóxica de <i>D. inoxia</i>	54
3.2.2 Evaluación neurotóxica de <i>T. diffusa</i>	56
3.3 Actividad neuroprotectora.....	58
3.3.1 Evaluación neuroprotectora de <i>D. inoxia</i>	58
3.3.2 Evaluación neuroprotectora de <i>T. diffusa</i>	60
3.4 Actividad antioxidante.....	62
3.4.1 Actividad antioxidante de <i>D. inoxia</i>	62
3.4.2 Actividad antioxidante de <i>T. diffusa</i>	63
3.4.3 Actividad antioxidante de ácido ascórbico.....	65
3.5 Actividad antiapoptótica.....	66
 CAPÍTULO 4	 68
 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	 68
4.1 Citotoxicidad y neurotoxicidad	68
4.2 Actividad neuroprotectora <i>D. inoxia</i>	72
4.3 Actividad neuroprotectora <i>T. diffusa</i>	75
 CAPÍTULO 5.....	 78
 CONCLUSIONES	 78
 CAPÍTULO 6.....	 80
6.1 REFERENCIAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Datura innoxia</i>	20
2. <i>Turnera diffusa</i>	21
3. Principales compuestos reportados de <i>D. innoxia</i>	23
4. Principales compuestos reportados de <i>T. diffusa</i>	24
5. Evaluación citotóxica de extractos de <i>D. innoxia</i> (D1: metanólico, D2: clorofórmico y D3: hexánico) en línea celular VERO.....	51
6. Evaluación citotóxica de extractos de <i>T. diffusa</i> (T1: etanólico, T2: hexánico y T3: clorofórmico) en línea celular VERO.....	52
7. Evaluación de actividad neurotóxica de extractos de <i>D. innoxia</i> (D1: metanólico, D2: clorofórmico y D3: hexánico) en línea celular PC-12.....	54
8. Evaluación de la actividad neurotóxica de extractos de <i>T. diffusa</i> (T1: etanólico, T2: hexánico y T3: clorofórmico) en línea celular PC-12.....	56
9. Evaluación de la actividad neuroprotectora de extractos de <i>D. innoxia</i> (D1: metanólico, D2: clorofórmico y D3: hexánico) en línea celular PC-12.....	58
10. Evaluación de la actividad neuroprotectora de extractos de <i>T. diffusa</i> (T1: etanólico, T2: hexánico y T3: clorofórmico) en línea celular PC-12.....	60
11. Evaluación antioxidante de extractos de <i>D. innoxia</i> (D1: metanólico, D2: clorofórmico y D3: hexánico) por inhibición del radical DPPH.....	62
12. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de <i>T. diffusa</i> (T1: etanólico, T2: hexánico y T3: clorofórmico) por inhibición del radical DPPH.....	63
13. Evaluación de la actividad antioxidante del control positivo de neuroprotección (ácido ascórbico 100 µM).....	65
14. Evaluación de la actividad antiapoptótica de extractos de <i>D. innoxia</i> y <i>T. diffusa</i>	66

Nomenclatura

°C	Grados Celsius
μmol	Micromol
A-549	Células de cáncer de pulmón
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
BCS	Baja California Sur
C-33	Células de carcinoma de cérvix
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad
CONAFOR	Comisión nacional forestal
D1	Extracto metanólico de <i>Datura innoxia</i>
D2	Extracto clorofórmico de <i>Datura innoxia</i>
D3	Extracto hexánico de <i>Datura innoxia</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
DTT	Ditriotreitol

EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Poder antioxidante reductor de hierro
g	Gramos
GABA	Ácido gamma-amino butírico
GAE	Equivalente de Ácido Gálico
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
h	Horas
H ₂ O	Agua
Hep G2	Células de cáncer de hígado
Hex	Hexano
HT-29	Células de cáncer de colon
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria
kDa	Kilodalton
MAO	Mono amina oxidasa
MCF-7	Células de cáncer de mama
MDA-MB-231	Células de adenocarcinoma humano de mama
MeOH	Metanol
mg	Miligramos

mGluR	Receptor Metabotrópico de Glutamato
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NL	Nuevo León
nm	Nanómetro
NMDA	<i>N</i> -Metil-D-Aspartato
NMDARs	Receptores de NMDA
nNOS	Sintasa de óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PARP-1	poly-ADP-ribosa polimerasa-1
PBN	α -fenil- <i>N</i> -terbutilnitrona
PC-12	Células de feocromocitoma de médula supradrenal de rata
pH	Potencial hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI-1640	Medio Roswell Park Memorial Institute

SFB	Suero fetal bovino
SH-SY5Y	Células de neuroblasto humano
SiHA	Células de cáncer de cérvix
SOD-1	Superóxido Dismutasa 1
T1	Extracto etanólico de <i>Turnera diffusa</i>
T2	Extracto clorofórmico de <i>Turnera diffusa</i>
T3	Extracto hexánico de <i>Turnera diffusa</i>
T-47D	Células de glándula mamaria, humano
t-BHP	Terc butilo Hidroperóxido
THP-1	Células de leucemia humana
TUNEL	Transferase-mediated dUTP Nick end-labeling
VERO	Células de riñón de mono verde
WST-1	Sal de tetrazolio soluble en agua
μL	Microlitro

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades neurodegenerativas

El proceso de neurodegeneración se refiere a una pérdida estructural progresiva o de funciones neuronales, incluyendo la muerte de estas células. Muchas enfermedades neurodegenerativas incluyendo la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington, ocurren como un resultado de procesos neurodegenerativos y son incurables debido al proceso de pérdida de funcionalidad celular (Abdipranoto, *et al.* 2008).

Entre las causas etiológicas de los desórdenes neurodegenerativos se encuentran los daños causados por mutaciones en genes no relacionados, pérdida del equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, generación de proteínas mutantes no funcionales, entre otras.

Además, durante el transcurso de padecimientos neurodegenerativos, el cuerpo pierde el balance entre la producción de pro oxidantes y los sistemas de

defensa antioxidantes; de tratarse de estrés oxidativo leve, los sistemas antioxidantes bastan para recuperar dicho balance; por el contrario, en el caso de estrés oxidativo grave, se ocasionan alteraciones importantes a nivel de metabolismo celular; entre las principales cabe destacar degradación del ácido desoxirribonucleico (ADN), incremento en la concentración de calcio intracelular, descompartimentalización de iones de Fe^{+2} y Cu^{+2} catalíticos, daño a los transportadores membranales de iones y otras proteínas específicas, además de peroxidación de lípidos (Dorado, *et al.* 2003).

1.1.1 Enfermedad de Parkinson

Entre las principales enfermedades o padecimientos neurodegenerativos, se encuentra la enfermedad de Parkinson que consiste en un desorden de movimiento crónico y progresivo, lo que significa que los síntomas continúan y empeoran con el paso del tiempo. El Parkinson involucra el mal funcionamiento y muerte de células nerviosas en el cerebro, principalmente a las neuronas de la *substantia nigra* (substancia negra: porción heterogénea del mesencéfalo, y un elemento importante del sistema de ganglios basales). Estas neuronas producen dopamina que es necesaria para el control del movimiento por el cerebro y relacionado a la coordinación. Conforme la enfermedad progresa, la cantidad de dopamina producida en el cerebro disminuye, dejando a una persona incapaz de controlar sus movimientos de manera normal (Elkouzi, 2018).

Entre las causas principales de pérdida de funcionalidad se encuentran las debidas a la destrucción de neuronas contenedoras de neuromelanina, la *substantia nigra*, el *locus coeruleus* (locus cerúleo), y el grupo medular C1 y C3. La *substantia nigra* tiene características que la hacen vulnerable al ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS), como niveles bajos de glutatión y vitamina E, y niveles altos de hierro libre (pro oxidante), mono amina oxidasa (MAO), óxido nítrico (radical pro oxidante neurotóxico) y neuromelanina (resultado de auto oxidación, condensación y polimerización de dopamina y de sus productos de oxidación) (Dorado, *et al.* 2003).

1.1.2 Enfermedad de Alzheimer

Es un desorden neurodegenerativo, crónico progresivo, caracterizado por tres principales grupos de síntomas. El primer grupo (disfunción cognitiva), incluye pérdida de memoria, dificultades del lenguaje y disfunción ejecutiva (pérdida de nivel mayor de planeación y habilidades de coordinación intelectual). El segundo grupo comprende síntomas psiquiátricos y trastornos de comportamiento, entre los que destacan cuadros de depresión, alucinaciones, ilusiones, agitación y síntomas determinados colectivamente como no cognitivos. El tercer grupo está constituido por dificultad para realizar actividades de la vida cotidiana. Los síntomas de la enfermedad de Alzheimer evolucionan de pérdida leve de memoria a demencia grave (Burns, *et al.* 2009)

En los cerebros de los pacientes afectados por este padecimiento, se muestran placas amiloides, y ovillos neurofibrilares, además de incremento significativo en los niveles de lipoperoxidación y en los niveles de 4-hidroxinonenal, así como el daño en neuronas hipocampales causado por placas de proteínas β -amiloides, esto se debe a la acumulación de especies ROS, el daño puede ser a lípidos y ATPasas, lo que lleva a un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{+2} ; los β -amiloides causan daño a los transportadores de alta afinidad al glutamato, la microglia activada que rodea las placas seniles es fuente de óxido nítrico y especies derivadas de oxígeno; y en presencia de metales de transición producen radicales libres (Michels, 2008).

1.1.3 Esclerosis lateral amiotrófica

Es una enfermedad progresiva y de mal pronóstico que provoca debilidad de los músculos voluntarios. La causa principal es desconocida, pero su patogénesis es principalmente debida a mutaciones genéticas, en las que la mayoría son de fenotipo único, excepto para Esclerosis Lateral Amiotrófica tipo 1, que es causada por una mutación en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD-1). Entre las principales características clínicas destacan las alteraciones funcionales de las neuronas motora superior e inferior. Los síntomas de daño de la neurona motora superior incluyen enlentecimiento del habla, espasticidad,

hiperreflexia, signo de Hoffman o de Babinsky. Los signos de la neurona motora inferior incluyen atrofia, fasciculaciones y debilidad (Fallas, *et al.* 2010).

En esta enfermedad los pacientes sufren de una mutación en el gen CuZnSOD, que causa aumento en la generación de radicales libres, resultando en muerte de neuronas motoras por apoptosis por activación de las caspasas 1 y 3, provocando el aumento en los niveles de interleucina-1 e inducción de respuesta inflamatoria local en la microglía y por lo tanto; el número de neuronas afectadas incrementa (Dorado, *et al.* 2003).

1.1.4 Enfermedad de Huntington

Se define como un trastorno neurodegenerativo progresivo de transmisión autosómica dominante. Clínicamente se caracteriza por la combinación de corea y otros movimientos anormales, deterioro cognitivo progresivo, síntomas psiquiátricos y conductuales. La causa etiológica establecida es una mutación expansiva (CAG) en el primer exón del gen IT15, situado en el cromosoma 4p16.3. Este gen se expande 210 kb y codifica para la huntingtina, una proteína de 348 kDa, de expresión ubicua en el núcleo o citoplasma de las células de diversos tejidos, incluidas las neuronas GABAérgicas de los ganglios basales (neuronas que producen y secretan GABA y tienen principalmente funciones de inhibición en los receptores de vertebrados adultos) ocasionando incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno,

lo que concluye en incremento de los niveles de glutamato con efecto neurotóxico (Michels, 2008). La proteína mutante forma agregados nucleares, además el cerebro presenta una atrofia cortical en relación directa con el grado de evolución de la enfermedad. En los cortes coronales el hallazgo característico es la atrofia del estriado, fundamentalmente del núcleo caudado, lo que condiciona un incremento en el tamaño de las astas frontales de los ventrículos laterales al perder la impronta de la cabeza del núcleo caudado. Entre las características clínicas de la enfermedad se encuentran alteraciones motoras de las cuales destacan: corea, distonia, bradiquinesia, mioclonias, trastorno de la marcha, disfagia, disartria, impersistencia motora y rigidez. En los padecimientos cognitivos se encuentran: disfunción ejecutiva, déficit de cognición social, inatención, demencia; dentro de las cuestiones afectivas se describen: irritabilidad, impulsividad, cambios de humor, depresión, apatía, psicosis, ansiedad y síntomas obsesivo/compulsivo. Otras características clínicas asociadas son: pérdida de peso, incontinencia, constipación, insomnio y epilepsia (Mason, *et al.* 2016; Rodríguez, *et al.* 2013).

1.1.5 Tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas

Las farmacoterapias disponibles para la enfermedad de Parkinson, se dirigen principalmente a la sintomatología, porque ningún agente ha demostrado proveer neuroprotección definitiva contra la enfermedad. La selección de la

farmacoterapia debe incluir las consideraciones de los beneficios a corto plazo y las consecuencias a largo plazo. El manejo general del tratamiento farmacológico para la enfermedad de Parkinson inicia con inhibidores de la mono amino oxidasa, como la rasagilina; conforme avanza la enfermedad y existe la necesidad de un mayor control sintomático se añade a la monoterapia un anticolinérgico o amantadina; posteriormente, para el control de la bradiquinesia o rigidez, se añade un agonista de dopamina o carbidopa-levodopa (Chen, *et al.* 2007).

En la enfermedad de Alzheimer el tratamiento farmacológico de primera elección es el empleo de inhibidores de la acetilcolinesterasa, los reportes indican que tienen un efecto moderado pero importante en la modificación de los síntomas en una minoría substancial de gente con la enfermedad y son generalmente bien tolerados. Otra opción farmacoterapéutica para el caso de la enfermedad de Alzheimer moderada a severa, es el empleo del antagonista parcial glutamatérgico, memantina; sin embargo, su uso está restringido en el Reino Unido por el Servicio Nacional de Salud y no es recomendado por el Instituto Nacional para la Salud y Excelencia Clínica (Burns, *et al.* 2009).

La terapia farmacológica para esclerosis lateral amiotrófica se encuentra bastante limitada, pues el único tratamiento aprobado por parte de la Food and Drug Administration (FDA) es el empleo de riluzol, del cual se ha demostrado que incrementa el tiempo de supervivencia de tres a seis meses, el tratamiento disminuyó ligeramente la pérdida de fuerza del músculo de las extremidades. Los pacientes que reciben el tratamiento con riluzol, permanecen más tiempo en una

etapa leve de la enfermedad y la eficacia del tratamiento se ha tomado como evidencia en apoyo de la teoría de la excitotoxicidad por glutamato de la patogénesis. Por otro lado, los antagonistas de glutamato incluyen aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina). Para el caso de lamotrigina y dextrometorfano, no tienen efecto benéfico en ensayos clínicos (Rowland, *et al.* 2001).

La evidencia existente para el establecimiento de la terapia farmacológica de la enfermedad de Huntington es limitada, ya que, se trata de un padecimiento relativamente raro y resulta complicado reclutar un número lo suficientemente grande de pacientes que satisfagan los requerimientos de estudios de fase II/III. Además, de que una vez iniciada la enfermedad, puede seguir diferentes cursos en diferentes pacientes; por lo tanto, la presentación clínica puede variar conforme al tiempo en un paciente individual con algunas características clínicas que son destacadas en etapas tempranas (por ejemplo, la corea), volviéndose menos notables conforme la enfermedad progresa, llegando incluso a la existencia de una combinación variada de síntomas que dificultan el tratamiento específico para cada paciente. Entre las opciones terapéuticas enfocadas al tratamiento sintomático de corea se encuentran: antagonistas de receptores de dopamina (olanzapina, sulpirida, amisulfirida, haloperidol, risperidona), inhibidores de transportador vesicular de monoamina (tetrabenazina), cannabinoides (nabilona), medicamentos presuntamente glutamatérgicos (amantadina); para el tratamiento de distonía, se emplean: medicación GABAérgica (benzodiacepinas como clonazepam y diazepam), botox; la

administración de fármacos para el caso de bradiquinesia: agonistas de dopamina (levodopa, apomorfina y considerar disminuir la dosis de medicamentos para corea), para mioclonias se consideran medicamentos GABAérgicos, para trastorno de movimiento contemplar el empleo de medicamentos presuntamente glutamatérgicos, en el caso de disfagia, consiste de un tratamiento ajustado contemplado para trastorno de movimiento (Mason, *et al.* 2016).

1.2 Neuroprotección

El fenómeno de neuroprotección se refiere a los mecanismos y estrategias usadas para proteger contra daño nervioso o degeneración y así prevenir la pérdida funcional del sistema nervioso central. Los neuroprotectores no son capaces de revertir el daño ocasionado, pero pueden proteger del daño adicional de las células nerviosas y retrasar su degeneración (Cadet, *et al.* 2017). El daño a nivel neuronal se debe a diferentes mecanismos, variando para cada una de las enfermedades neurodegenerativas. Los mecanismos de daño a nivel neuronal son: Estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, cambios inflamatorios, acumulación de hierro, sobreproducción de proteínas cerebrales. En los procesos que se llevan a cabo en las enfermedades neurodegenerativas estos mecanismos se encuentran estrechamente relacionados, siendo de esta forma

que el proceso de excitotoxicidad puede desencadenar cada uno de los mecanismos de daño neuronal (Cadet, *et al.* 2017; Stocchetti, *et al.* 2015).

1.3 Proceso de excitotoxicidad

Se refiere a muerte neuronal causada por la sobreactivación de receptores de aminoácidos excitatorios. Al inicio de los estudios sobre el proceso de excitotoxicidad, se evidenció que presenta relación con la patogénesis de enfermedades neurológicas agudas y crónicas. Después, se vinculó la liberación de aminoácidos excitatorios con muerte celular anóxica en cultivos hipocampales. Además, se estableció la relación de la entrada de calcio con la muerte celular retardada, causada por los efectos de aminoácidos excitatorios, así como la generación de radicales libres y óxido nítrico, los cuales pueden conducir a un estado de estrés oxidativo. Se estableció el papel de los aminoácidos excitatorios en enfermedades neurológicas agudas; sin embargo, el efecto es de mayor relevancia en las enfermedades neurológicas crónicas, entre las cuales se incluyen las enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson. A pesar de la abundante evidencia sobre excitotoxicidad en estas enfermedades agudas y crónicas, muy pocos tratamientos han mostrado eficacia en la etapa de ensayos clínicos (Lau, *et al.* 2010).

Actualmente, las investigaciones se han encaminado al estudio de canales iónicos no glutamatérgicos, responsables del balance iónico así como diafonía existente entre rutas de señalización relacionadas con muerte celular implicadas en procesos de excitotoxicidad (Katzung, 2016; Lau, *et al.* 2010).

1.3.1 Receptores de aminoácidos excitatorios

Los receptores fueron clasificados en cuatro distintas clases farmacológicas en el cerebro de mamíferos, nombrados de acuerdo a sus agonistas naturales: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), kainato, *N*-Metil-D-Aspartato (NMDA), y el receptor metabotrópico sensible a quisqualato. Los sitios AMPA y kainato, son responsables de la transmisión sináptica convencional rápida, mediante la presencia de un canal ionotrópico. Los receptores de NMDA (NMDARs) regulan el flujo de Ca^{2+} y Na^+ , son cerrados por Mg^{2+} , y han sido implicados fisiológicamente en procesos de aprendizaje y plasticidad sináptica. Los sitios metabotrópicos, actúan mediante proteínas G para activar a fosfolipasa C o disminuir AMP cíclico. La activación de la familia de receptores de aminoácidos excitatorios metabotrópicos codifica subunidades mGluR1-8, las subunidades mGluR1 y mGluR5 están unidas por una proteína G a fosfolipasa C la cual genera inositol fosfato y que ocasiona liberación de calcio de los almacenamientos intracelulares. Con respecto al daño citotóxico, el grupo 1 de la familia de mGluRs es asociado con la postsinapsis y parece potenciar el flujo de Ca^{2+} mediado por NMDAR. Los receptores metabotrópicos

restantes de glutamato, están constituidos por mGluR2,3 y mGluR4,6,7,8 los cuales están relacionadas con la inhibición de la formación de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). Estos receptores colectivamente llamados mGluRs, respectivamente, son principalmente encontrados en la presinapsis y disminuyen el flujo de Ca^{2+} vía NMDARs (Katzung, 2016; Lau, *et al.* 2010).

Los receptores de AMPA, kainato y NMDA son miembros de la súper familia de canales de cierre iónico sensibles a glutamato. Cuatro subunidades de aproximadamente 900 aminoácidos de longitud con cuatro regiones que cubrían la membrana fueron inicialmente identificados como receptores AMPA, cada subunidad tiene una única distribución en el cerebro y cuyas subunidades son GluR5-7, KA1, KA2, las cuales participan en la formación de receptores de kainato. KA2 forma canales heteroméricos activos cuando son expresados con GluR5. Estas subunidades están localizadas en neuronas hipocampales donde muy frecuentemente también se encuentran subunidades NMDA. Los receptores AMPA varían en su permeabilidad al calcio. GluR1, GluR3 y GluR4 muestran fuerte tensión de voltaje de rectificación interna y permeabilidad al calcio. En contraste, GluR2 tiene relación corriente-voltaje lineal y cuando se coexpresa con otras subunidades se suprime su fuerte rectificación interna y suprime la permeabilidad al calcio. Una mutación de arginina a glutamina cambia la rectificación y confiere permeabilidad al calcio a GluR2. La secuencia de genes codifica para glutamina, pero, esto cambió a arginina como resultado de edición de RNA. Una secuencia similar de aminoácidos resulta en una asparagina en posición 598 en NMDAR1. Una mutación de asparagina a glutamina resulta en

disminución de permeabilidad al calcio. Una subunidad de NMDAR denominada NR1 fue inicialmente clonada y secuenciada en 1991, esta proteína de 938 aminoácidos tiene casi 25% de homología a las subunidades de AMPA y kainato. Cuando este receptor es expresado muestra apropiada farmacología de agonismo y antagonismo, un sitio de coagonismo de glicina, permeabilidad al calcio, inhibición de zinc y bloqueo voltaje dependiente bloqueado por Mg^{2+} . NMDAR también es regulado por pH extracelular, el cual puede ser importante durante las convulsiones e isquemia (Lau, *et al.* 2010).

1.3.2 Mecanismos moleculares de excitotoxicidad

Calcio

En 1985 se demostró que el proceso de neurotoxicidad retrasada era calcio dependiente, lo cual ayudó en la explicación del mecanismo de excitotoxicidad. Además, se demostró que quelantes de calcio reducen el daño celular por dicho proceso. Posteriormente, se demostró que cargas de calcio en cultivos de neuronas corticales se correlacionan con posterior degeneración neuronal, mientras que las concentraciones de calcio intracelular no fueron relacionadas a la degeneración neuronal. En 1992, se demostró que existen tres fases de calcio intracelular antes de muerte celular en neuronas hipocampales cultivadas. Existe una fase inicial de incremento de calcio intracelular perdurable de 5 – 10 minutos, seguidas por una fase latente de aproximadamente 2 horas en el cual el calcio regresa a la normalidad. La tercera fase consiste de un

incremento gradual sostenido en calcio intracelular que alcanza una meseta asociada con muerte celular. Se han evidenciado dos mecanismos de excitotoxicidad mediada por calcio. El primer mecanismo sugiere la entrada de calcio vía canales de NMDA, es más tóxico que aquel que entra por otras fuentes, ya que, NMDAR media la mayoría de los efectos excitotóxicos de glutamato. Además de la relación con la producción de niveles tóxicos de óxido nítrico. Un segundo mecanismo propone que la mayoría de la concentración de calcio liberado por glutamato es secuestrada dentro de la mitocondria más que el calcio libre en el citoplasma. Se ha demostrado que en la mitocondria, el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es el mayor medio de eflujo de Ca^{2+} , ya que, amortigua el flujo de calcio inducido por glutamato en cultivo de neuronas corticales. El incremento en calcio mitocondrial también lleva a disfunción metabólica por la disminución del pH intracelular y a su vez, la disfunción mitocondrial puede llevar a la producción de radicales libres y activación de caspasas, eventualmente, causando muerte celular (Lau, *et al.* 2010).

Radicales libres

El daño inducido por kainato a neuronas cerebelares podría ser atenuado por la enzima superóxido dismutasa, alopurinol y captadores de radicales hidroxilo como manitol. Se ha demostrado que la depleción de glutatión exagera la excitotoxicidad, mientras que, los captadores de radicales libres α -tocoferol, ácido ascórbico y ubiquinona, muestran efectos neuroprotectores. Los 21 aminoesteroides y α -fenil-*N*-terbutilnitrona (PBN), el cual capta radicales libres también protege contra excitotoxicidad *in vitro*. El análogo de vitamina E, Trolox

protege a neuronas cultivadas de toxicidad mediada por AMPA. Las neuronas corticales cultivadas que sobreexpresan la enzima superóxido dismutasa, son resistentes al proceso de neurotoxicidad por glutamato e inducida por isquemia. Se vinculó el proceso de excitotoxicidad a generación de radicales libres, dicha evidencia se demostró mediante el empleo de resonancia electrónica paramagnética, la cual, muestra que NMDA dosis dependiente incrementa la formación de superóxido en neuronas cerebelares cultivadas *in vitro*. Los efectos son bloqueados por antagonistas de NMDA o por remoción de Ca^{2+} extracelular, estos efectos se confirman mediante la exposición de mitocondria cortical aislada a $2.5 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$, el cual es similar a las concentraciones que se producen en el contexto de excitotoxicidad y que conduce a la generación de radicales libres. En los sinaptosomas, NMDA, ácido kaínico y AMPA estimulan la generación de radicales libres. La excitotoxicidad producida por glutamato causa áreas localizadas de fluorescencia del colorante diclorodihidrofluoresceína en los márgenes del cuerpo celular, que resulta dependiente de la activación de NMDAR y entrada de calcio, el cual fue bloqueado por un desacoplador del transportador de electrones mitocondrial, lo que sugiere que el sistema calcio dependiente tiene un papel crítico en la producción de especies reactivas de oxígeno posterior a la exposición al glutamato. Además, se demostró que la toxicidad por NO (óxido nítrico), así como la toxicidad por calcio, fue dependiente de NMDARs (Lau, *et al.* 2010).

Óxido nítrico

Una de las marcas distintivas de neurodegeneración excitotóxica es la producción de NO. Originalmente se demostró que los inhibidores de NOS (óxido nítrico sintasa) y hemoglobina, la cual capta NO, bloquean la neurotoxicidad por glutamato *in vitro*. Se demostró que el pretratamiento de cultivos con quiscualato, el cual preferencialmente mata neuronas expresoras de NOS, previene neurotoxicidad por glutamato en los cultivos. Se demostró que NMDARs están unidos a vía nNOS por una proteína de densidad postsináptica de peso molecular de 95kDa (PSD-95). Dicha proteína se une al C terminal de la subunidad NR2B vía un dominio PDZ1 y al N terminal de nNOS vía dominio PDZ2. En este modelo, un microambiente se forma en la postsinapsis, mientras el Ca^{2+} entra a la neurona y activa nNOS (óxido nítrico sintasa neuronal), vía calmodulina. Una vez formado, NO tiene un número de propiedades señalizadoras fisiológicas. Aunque, NO puede interactuar con el radical libre superóxido para formar peroxinitrito, un potente oxidante que puede causar nitración proteica, oxidación proteica, peroxidación lipídica y dañar directamente a DNA, llevando a muerte celular. Recientemente se ha mostrado la relación directa de NO con neurotoxicidad a través de interaccionar con poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) GAPDH (Lau, *et al.* 2010).

1.4 Tipos de neuroprotección

El objetivo de un neuroprotector es limitar la muerte neuronal después del daño al sistema nervioso central y protegerlo de degeneración prematura y otras causas de muerte neuronal. Los agentes neuroprotectores deben contrarrestar los efectos de la neurodegeneración o pérdida de la funcionalidad neuronal (Stocchetti, *et al.* 2015). Los agentes con propiedades neuroprotectoras se han agrupado en las siguientes categorías:

- *Captadores de radicales libres*: Estos agentes convierten los radicales libres inestables en moléculas mayores mas estables con menor o nula capacidad de dañar a la célula ya que pueden ser metabolizadas por el cuerpo. Entre los principales captadores de radicales libres se encuentran los agentes antioxidantes (Cadet, *et al.* 2017).
- *Agentes antiexcitotóxicos*: Son agentes que pueden bloquear los receptores de glutamato y de esta manera, prevenir la excitotoxicidad y neurodegeneración. La amantadina, parece ser un ejemplo de antiexcitotóxico en la enfermedad de Parkinson al cambiar la manera en que interacciona el glutamato con su receptor (Cadet, *et al.* 2017).
- *Inhibidores de apoptosis*: Se refiere a inhibir un proceso de muerte natural de las células conforme la edad avanza y el cuerpo crece. Teóricamente, los agentes antiapoptóticos disminuirían este proceso en neuronas.

Actualmente este tipo de terapia está siendo empleada en la investigación de tratamiento contra el cáncer (Clark, *et al.* 2016).

- *Agentes antiinflamatorios*: Generalmente empleados para alivio del dolor, pero también pueden verse involucrados en el proceso inflamatorio involucrado en el empeoramiento de la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (Stocchetti, *et al.* 2015).
- *Factores neurotróficos*: Este grupo de biomoléculas promueve el crecimiento neuronal. Sin embargo, aún no es posible establecer un tratamiento clínico para este tipo de moléculas (Clark, *et al.* 2016).
- *Quelantes de iones metálicos*: Al existir niveles elevados de hierro en los padecimientos de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, se consideran opciones terapéuticas a las sustancias que puedan disminuir de manera gradual dichas concentraciones de hierro. Sin embargo, aún existe escasa evidencia de su posible uso de manera terapéutica (Arun, *et al.* 2013).

1.4.1 Papel de antioxidantes en enfermedades neurodegenerativas

El estrés oxidativo ha surgido como un factor causante de la patología de varios desordenes neurodegenerativos. Actualmente existen diversas propuestas terapéuticas probadas a nivel experimental y clínico cuyos resultados

no han sido exitosos a pesar de observar mejoría funcional, la razón de este fracaso, radica en metodologías poco reproducibles e inadecuadas o por ser tratamientos con ventanas terapéuticas muy estrechas que las hacen poco factibles para ser usadas en la clínica, entre las alternativas terapéuticas se encuentran el empleo de antioxidantes como el neuropéptido NAP (octapéptido derivado de ADNP con secuencia NAPVSIPQ), metalotioneína, resveratrol, S-alil cisteína, el tetrapéptido DAHK (con secuencia Asp-Ala-His-Lys) y dapsona. Se emplean antiexcitotóxicos como bilobalida, quercetina, riluzol. Antiinflamatorios como SB-239063 (inhibidor de p38 MAPK), dexametasona/hemooxigenasa, y antiapoptóticos entre los cuales se emplean YGY-E (flavonoide glucosídico) y Dan Shen (salvia roja asiática). De tal forma, que resulta importante ampliar las opciones terapéuticas que puedan ofrecer ventajas sobre las propuestas actualmente existentes, entre ellas, el uso de la fitoterapia, cuyo empleo es altamente aceptable y de la cual se han realizado una gran variedad de estudios para demostrar su eficacia y seguridad (Díaz, *et al.* 2012).

1.5 Características de las plantas *Datura innoxia* y *Turnera diffusa*

La planta *Datura innoxia*, (*D. innoxia*) también conocida como toloache, chamico, nacazcul, tecuyani, tecuyai y x-toh-k'u, es una especie en la familia de las solonaceas, es una planta de arbustos, la cual florece en el periodo de junio a noviembre y es nativa de Centroamérica, puede encontrarse en los bosques

mediterráneos y típicamente alcanza una longitud de 120 a 180 cm de acuerdo a lo establecido por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2018). Los tallos y hojas están cubiertos con pelos suaves. Las flores son blancas y su forma se parece a una trompeta. Adicionalmente, la longitud de la flor es de 15 a 17 cm aproximadamente y consiste de cinco segmentos. En una fase prematura, los botones florales se encuentran erectos, pero tienden a inclinarse después de algún tiempo a causa de las semillas, además de la producción de un fruto espinoso (Mustafa, *et al.* 2017).



Figura 1. *Datura innoxia*

El género *Turnera* engloba 135 especies de partes tropicales y cálidas de América y dos de África. El género fue asignado de diversas maneras a su propia familia (Turneraceae) o a la familia Passifloraceae. *Turnera diffusa*, (*T. diffusa*), también conocida como damiana, es originaria de México y Centroamérica, presenta forma biológica arbustífera de 60 cm a 1 m de altura. El periodo de florecimiento es de junio a noviembre. En cuanto a su distribución geográfica, a

nivel nacional la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), establece que se localiza principalmente en los estados de Chihuahua, Querétaro, Guerrero, Oaxaca, Baja California Sur, San Luis Potosí, Coahuila, Sinaloa, Nayarit, Zacatecas, Tamaulipas y Puebla (CONAFOR, 2018).



Figura 2. *Turnera diffusa*

Para establecer las propiedades y efectos medicinales de las plantas, tanto el género *Datura*, como *Turnera*, han sido investigadas ampliamente desde la perspectiva farmacológica, de tal manera que, para el caso del género *Datura* desde el siglo XVI, se han establecido usos de medicación tradicional de la cual existe evidencia respecto a sus efectos psicotrópicos, anticolinérgicos, analgésicos, antiinflamatorios, narcóticos y por sus propiedades antiespasmódicas, se le empleó para problemas de la piel o para el tratamiento del asma (Saki, *et al.* 2014; Scarlato, *et al.* 1945); mientras que para el género *Turnera*, las hojas se emplean con fines medicinales mediante infusiones o preparación de licores. Entre los usos medicinales se encuentran principalmente como expectorante para problemas de vías respiratorias, bronquitis y tosferina. También se emplea en padecimientos gástricos como disentería, dispepsia,

malaria, dolores de estómago e intestino, así como para el tratamiento de algunos tipos de parálisis. Se le atribuyen efectos estimulantes, diuréticos, afrodisíacos, actividades antiinflamatorias y antiulcerosas y recientemente sus propiedades antioxidantes (CONAFOR 2018; Piacente, *et al.* 2002; Salazar, *et al.* 2008).

En la actualidad, existe poca evidencia que respalde la teoría acerca del efecto neuroprotector del empleo de las plantas de la especie *D. inoxia* y *T. diffusa*, aunque son ampliamente usadas como remedios medicinales desde hace tiempo atrás, poco se sabe sobre los mecanismos de acción a nivel molecular y las células diana en las que interactúan para lograr los efectos anteriormente descritos; sin embargo, se han descrito efectos en nivel neurológico y psiquiátrico que pudiesen deberse a cualidades neuroprotectoras en diferente grado (Hajimehdipoor, *et al.* 2016; Saki, *et al.* 2014; Salazar, *et al.* 2008).

1.5.1 Contenido químico de *D. inoxia*.

De acuerdo a investigaciones realizadas a las plantas de la especie *D. inoxia*, para caracterización del contenido químico, se han establecido componentes principales; entre ellos destacan alcaloides como higrina, tropinona, metilecgonina, apotropina, apoescopolamina, escopolamina, hiosciamina, atropina, 6 β -hidroxihiosciamina y gran variedad de alcaloides del grupo tropano, los cuales tienen efectos antagonistas en receptores

muscarínicos; por lo tanto, son capaces de disminuir el dolor a través del sistema nervioso central. Además de contener aminoácidos e intermediarios del ciclo del ácido cítrico, así como taninos, saponinas, esteroides, flavonoides y terpenos (Abbas, *et al.* 2016; Kursinszki, *et al.* 2005; Nguyen, *et al.* 2015).

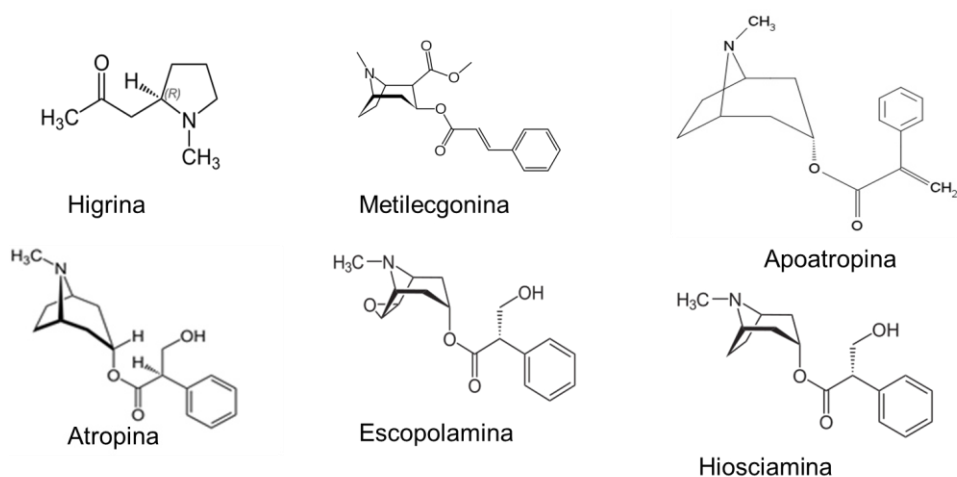


Figura 3. Principales compuestos reportados de *D. innoxia*

1.5.2 Contenido químico de *T. diffusa*

Respecto al contenido químico reportado para las plantas de la especie *T. diffusa*, se sabe que contiene un aceite esencial en el que se han identificado los monoterpenos 1-8-cineol, para-cimeno, alfa y beta-pineno. Además, en las hojas se han identificado, el componente fenílico arbutína, el compuesto alicíclico tetrafilín B y el alcaloide cafeína, este último también presente en las ramas, donde se han identificado además el flavonoide gonzalistosín, el esteroide beta-sitosterol y los alcanos hexacosanol, n-triacontano y tricosan-2-ona, también

compuestos como ácido deshidrofluorosénico, fluorosensadiol, metilorselinato, ermanina, tetracosan-4-ólido, heptacosan-4-ólido, octacosan-4-ólido, nonacosan-4-ólido y triacontan-4-ólido han sido aislados (Salazar, *et al.* 2008).

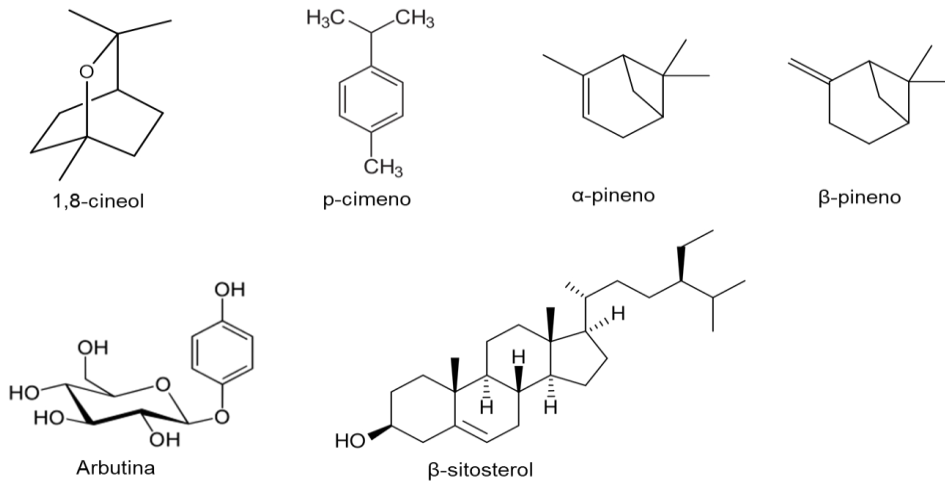


Figura 4. Principales compuestos reportados de *T. diffusa*

1.6 Antecedentes

1.6.1 Evaluaciones *in vitro* de *T. diffusa*

En 2008, Salazar *et al.* determinaron la actividad antioxidante y citotóxica de un grupo de plantas del noreste de México. Entre las plantas evaluadas se encontraba *T. diffusa* silvestre, a la que se le realizaron pruebas de actividad de captación de DPPH, determinación de contenido fenólico total, determinación de inhibición de actividad de xantina oxidasa y citotoxicidad, concluyéndose que las sustancias responsables para la actividad antioxidante en los extractos obtenidos de las hojas, tallo y raíz de *T. diffusa*, podrían ser los compuestos fenólicos, con un contenido de 3.0 ± 1.5 , 4.1 ± 1.9 y 1.5 ± 0.8 (g/100 g de muestra) respectivamente. Los resultados de captación de radicales DPPH fueron de 75.3 ± 5.8 del extracto de hojas, 86.8 ± 5.3 del extracto de tallos y de 85.8 ± 3.0 (%) del extracto de raíz, también se concluyó que estos extractos no presentaron citotoxicidad en el cultivo celular de bazo de ratón Balb/c a concentración de 2.5 mg/mL y por lo tanto podrían ser considerados con el propósito de prevenir la oxidación y proveer beneficios a la salud general (Salazar, *et al.* 2008).

En 2011, Torres *et al.* evaluaron el efecto protector de extractos metanólicos de *T. diffusa* contra el daño inducido por tetracloruro de carbono (CCl₄) en línea celular Huh7 de hepatoma humano. Los efectos de los extractos fueron evaluados de acuerdo a las pruebas de determinación de actividad

antioxidante, viabilidad celular, niveles de aspartato aminotransferasa para evaluación del daño hepático y malonildialdehído antes y después de la exposición de las células a CCl₄; resultando que todos los extractos redujeron los niveles de DPPH por arriba de 50%. Además, los extractos fueron empleados para evaluación de actividad hepatoprotectora y resultaron no ser tóxicos, concluyendo que el efecto hepatoprotector pudiera deberse a sus propiedades antioxidantes (Torres, *et al.* 2011)

En 2011, Bezerra *et al.* evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* de extracto hidroalcohólico de *T. diffusa*, por la medición de la lipoperoxidación de homogenados de cerebro de rata de la cepa Wistar, mediante la evaluación del valor Q_{1/2} (concentración que inhibe 50% de peroxidación) con un resultado de 7.32 µg/mL, lo cual es indicativo de una baja actividad antioxidante en la metodología empleada. Por rastro observacional, se evaluó la toxicidad aguda de la planta, mediante medición de actividad motora, coordinación motora y tiempo de sueño inducido por pentobarbital determinando baja toxicidad y sin efecto estimulante o depresivo en ratones albinos suizos (Bezerra, *et al.* 2011).

En 2014, Soriano *et al.* evaluaron el efecto de condiciones ambientales en el contenido antioxidante de *T. diffusa* de la región noroeste y noreste de México, obteniendo como resultado la capacidad antioxidante total con un rango de 382.42 a 863.03 mM GAE (equivalente de ácido gálico)/ g peso seco en hojas secas y de 294.79 a 346.01 mM GAE/ g peso seco en tallos mediante la técnica de DPPH. Siendo mayor el contenido de vitamina C, el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante total en las plantas de la región noroeste

(BCS: Baja California Sur) en comparación con las colectadas en la región noreste (NL: Nuevo León) de México (Soriano, *et al.* 2014).

En 2015, Avelino *et al.* evaluaron la posible actividad citotóxica del extracto metanólico de *T. diffusa* en cinco líneas de células tumorales: SiHa (cáncer de cérvix), C-33 (carcinoma de cérvix), Hep G2 (cáncer de hígado), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), T-47D (glándula mamaria humana) y fibroblastos humanos normales. Los resultados muestran que el extracto metanólico, presenta mayor actividad en células de cáncer de mama MDA-MB-231 con un IC₅₀ de 30.67 ± 3.50 µg/mL, en comparación con las otras líneas celulares cancerígenas y con los fibroblastos humanos con un valor de IC₅₀ de 63.24 ± 3.26 µg/mL. También en la fracción mayormente activa se aislaron dos componentes, arbutina y apigenina. Concluyeron que, los valores de IC₅₀, sugieren que el extracto metanólico de *T. diffusa* presenta potencial como terapia anticancerígena (Avelino, *et al.* 2015).

En 2017, Bernardo *et al.* evaluaron la inhibición de enzimas del sistema nervioso central y el retraso del proceso de excitotoxicidad por glutamato en células SH-SY5Y (neuroblastoma humano) por la vía de daño oxidativo, mediante la exposición de extractos de cinco plantas, entre las que se encontró que el extracto acuoso de *T. diffusa*, presentó mayor potencial neuroactivo por inhibición de las enzimas mono amino oxidasa A con valor de IC₅₀ de 129.80 ± 11.97 µg/mL, de la acetilcolinesterasa con IC₂₅ de 0.352 ± 0.011 mg/mL y de butirilcolinesterasa con valor de IC₂₅ de 0.370 ± 0.036 mg/mL. Se determinó que el proceso de citotoxicidad se dió a concentraciones superiores de 0.500 mg/mL. Además, se

estableció que el pretratamiento con el extracto promovió un desplazamiento hacia la derecha de la curva de respuesta de muerte de células neuronales. Por lo tanto, se vió significativamente reducida la fase temprana de especies reactivas intracelulares después de la exposición a glutamato y *t*-BHP (Terc Butilo Hidroperóxido), sugiriendo que la neuroprotección de células SH-SY5Y, fue en parte por mecanismos antioxidantes (Bernardo, *et al.* 2017).

1.6.2 Evaluaciones *in vitro* de *D. inoxia*

En 2014, Arulvasu *et al.* purificaron, identificaron y evaluaron propiedades antioxidantes de *D. inoxia* con mayor actividad en una fracción proteica, con porcentajes de inhibición de radical DPPH de 42.20% a 45.89%; y actividad anticancerígena de una proteína bioactiva de hojas de *D. inoxia*, cuyos resultados obtenidos demuestran alta citotoxicidad en la línea celular HT-29 (cáncer de colon), además de potencial actividad anticáncer (Arulvasu, *et al.* 2014).

En 2015, Ananth *et al.* analizaron la actividad antioxidante de varios extractos de hojas de *D. stramonium* mediante métodos estándar adoptados para evaluar dicha actividad y la naturaleza fitoquímica de la planta empleada. El valor calculado de IC₅₀ para cada uno de los extractos fue de 84.54 ± 4.62 µg/ml para el extracto acuoso, de 92.648 ± 30.368 µg/ml para el etanólico, 106.158±25.33 µg/ml para el etilacetato, 81.34 ± 2.94 µg/ml para el hexánico y de 63.997 ± 25.244 µg/ml para el estándar (ácido ascórbico). Por lo tanto, establecen que los

fitoquímicos de la planta presentan potente actividad captadora de radicales (Ananth, *et al.* 2015).

En 2015, Fatima *et al.* evaluaron el impacto de la variación de polaridad de solventes en el porcentaje de recuperación del extracto de la planta *D. inoxia*, entre los que se incluyeron: etanol, metanol, acetato de etilo, cloroformo, acetona, n-hexano y dimetilsulfóxido (DMSO). El resultado del porcentaje de recuperación máximo de 33.28% obtenido del extracto acuoso de hojas. Se realizó la determinación del contenido fenólico total del destilado de agua con un resultado de 29.91 ± 0.12 mg/g de peso seco y del contenido de flavonoides se obtuvo un valor de 15.68 ± 0.18 mg/g de peso seco. El valor de capacidad captadora de radicales DPPH fue de IC₅₀ de 16.14 µg/ml mostrado por el extracto de acetato de etilo-acetona del tallo. La capacidad antioxidante total del extracto acuoso de hoja fue de 46.98 ± 0.24 mg de equivalentes de ácido ascórbico / g peso seco y el potencial de poder de reducción de 15.35 ± 0.61 mg de equivalentes de ácido ascórbico / g peso seco. Los resultados del ensayo de citotoxicidad de “camarón de salmuera” (*Artemia sp*) expuesta a extractos de hoja, tallo y fruto, fueron de LC₅₀ ≤ 100 µg/ml. Para el caso de la exposición de la línea celular THP-1 a extractos clorofórmico del fruto fue de IC₅₀ 4.52 µg/ml y el del extracto n-hexánico fue de IC₅₀ 3.49 µg/ml (Fatima, *et al.* 2015).

En 2016, Hajimehdipoor *et al.* evaluaron la actividad antioxidante e inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa de algunas plantas entre las que se incluye a *D. inoxia*, en una provincia de Irán, obteniendo resultados en los que presenta actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa con porcentaje de inhibición

de $34.02 \pm 6.0\%$, con actividad antioxidante ante DPPH con valor de IC_{50} de $58.6 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$, pero con poca actividad antioxidante en el ensayo de poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) con porcentaje de reducción de hierro de 45.2 ± 1.4 (Hajimehdipoor, *et al.* 2016)

En 2016, Roy, *et al.* evaluaron la actividad citotóxica y antioxidante de extractos de *D. metel*. El contenido fenólico total y contenido flavonoide se determinó por los métodos de Folin-Ciocalteu y con el ensayo de cloruro de aluminio. El ensayo de citotoxicidad *in vitro* se realizó en línea celular *Vero*, mediante el método de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol), cuyos resultados demuestran que el extracto metanólico por el método en frío de *D. metel* presentó actividad citotóxica de 3 mg/mL. Para el caso de la actividad antioxidante se realizó por el método de captación de radicales de DPPH obteniéndose los resultados de IC_{50} de $650 \pm 22.21 \mu\text{g/ml}$ y $600 \pm 23.71 \mu\text{g/ml}$ de los extractos acuoso y metanólico por método soxhlet, respectivamente y de $800 \mu\text{g/ml}$ por el método en frío. Mientras que de las semillas fueron de $600 \mu\text{g/ml}$ por soxhlet y $700 \pm 19.08 \mu\text{g/ml}$ y $600 \pm 18.71 \mu\text{g/ml}$ de los extractos acuoso y metanólico, respectivamente por el método en frío. Concluyendo que las partes evaluadas de las plantas tienen una alta actividad antioxidante (Roy, *et al.* 2016).

En 2016, Esmaili *et al.* evaluaron la actividad citotóxica de 26 extractos metanólicos de plantas empleadas con fines medicinales, entre los cuales se evaluó el efecto de *D. inoxia*. La metodología empleada fue la exposición a las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama), A-549 (cáncer de pulmón), Hep G2 y HT-29 y aplicación del ensayo de reducción de MTT; se concluyó la actividad

citotóxica de cuatro de los extractos probados ante las cuatro líneas celulares evaluadas, mientras que en el caso de *D. inoxia* solo presentó actividad ante las líneas celulares MCF-7 y HT-29 (Esmaeili, *et al.* 2016).

1.6.3 Evaluación *in vivo* de *T. diffusa*

En 2013, Gomes *et al.* evaluaron los efectos de extractos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* y *Heteropterys tomentosa* en apoptosis hipocampal de ratas ancianas; con el fin de determinar la existencia de un efecto protector. Las ratas macho de la línea Wistar fueron divididas en tres grupos y recibieron un tratamiento con extractos hidroalcohólicos de las plantas y un grupo recibió solución salina. Un quinto grupo de ratas macho adulto-joven recibieron solución salina durante el mismo periodo, usando el ensayo inmunohistoquímico de TUNEL, (Transferase-mediated dUTP Nick end-labeling), el porcentaje de apoptosis en el hipocampo de los animales fue evaluado no observándose diferencias significativas entre el porcentaje de células apoptóticas en el hipocampo de animales ancianos y del grupo control de animales jóvenes, respecto a los animales tratados crónicamente con los extractos de las tres plantas, el porcentaje de apoptosis en el hipocampo de los animales ancianos no difiere del porcentaje de apoptosis en el hipocampo del grupo control. Concluyeron que el tratamiento con los extractos hidroalcohólicos de las plantas,

no ocasionaron apoptosis de las células hipocampales de ratas ancianas (Bezerra, *et al.* 2013).

1.7 Hipótesis

Al menos uno de los extractos de *D. inoxia* y *T. diffusa* presenta efecto neuroprotector en un modelo *in vitro* de neurotoxicidad por glutamato.

1.8 Justificación

Las enfermedades neurodegenerativas representan un problema de salud y económico importante para la sociedad.

Los tratamientos actuales no detienen el progreso de estas enfermedades por lo cual es importante la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas dirigidas a su tratamiento.

Dado que las plantas representan una fuente importante de nuevos medicamentos y debido al gran uso de estas con fines medicinales, resulta importante evaluar los efectos neuroprotectores que puedan resultar de la administración de las plantas que se van a estudiar, *D. inoxia* y *T. diffusa*.

Es necesario obtener evidencia y soporte de carácter formal para futuras aplicaciones medicinales de las plantas en la población. De esta forma se podría proporcionar una alternativa a la gama de tratamientos convencionales para las enfermedades neurodegenerativas.

1.9 Objetivo general

Evaluar el efecto neuroprotector de extractos de *D. inoxia* y *T. diffusa* en un modelo *in vitro* de neurotoxicidad por glutamato.

1.9.1 Objetivos específicos

2. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos de *D. inoxia* y *T. diffusa* en línea celular VERO mediante el ensayo de MTT.
3. Evaluar la actividad neurotóxica de los extractos de *D. inoxia* y *T. diffusa* en la línea celular PC-12 mediante el ensayo de WST-1.
4. Evaluar la actividad neuroprotectora de los extractos en línea celular PC-12 en presencia de glutamato mediante el ensayo de WST-1.
5. Evaluar el efecto antioxidante de los extractos de *D. inoxia* y *T. diffusa* por el método de DPPH.
6. Determinación de actividad antiapoptótica por ensayo de caspasa-3.
7. Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material y reactivos

2.1.1 Material biológico

Los ensayos de citotoxicidad fueron evaluados en la línea celular VERO (ATCC[®], CCL-81[™]) contemplada como células de crecimiento normal, se realizaron por triplicado en tres días diferentes, mientras que los ensayos de neuroprotección y neurotoxicidad, se realizaron sobre la línea celular PC-12 (ATCC[®], CRL-1721), correspondiente a glándula adrenal de rata y considerada como línea celular neuronal. Las líneas celulares empleadas se conservaban congeladas a -80°C en el ultracongelador del Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica.

2.1.2 Equipos e instrumentos

Agitador / Placa de calentamiento (Corning), balanza analítica HR200 (AND), bomba de vacío A530 (HSENG), cámara Neubauer, campana de flujo laminar CFL102V (VICHI México), centrífuga refrigerada Sorvall ST16R (Thermo-Scientific), congelador horizontal -20°C CH10 (Tororey), esterilizador eléctrico autoclave 25x (All American), estufa de incubación MIDI 40 CO₂ Incubator (Thermo-Fisher), frascos de vidrio 1 L (Kimax), frascos de vidrio 250 mL (Kimax), frascos de vidrio de 100 mL (Pyrex), invertoscopio TCM 400 (Labomed), lector de microplaca ELISA ELx800 (Biotek instruments), lector fluorómetro de microplaca Fluoroskan ascent (Thermo-Fisher), microcentrífuga Micro CL 17R (Thermo-Scientific), microplaca de 96 pocillos fondo plano (Costar), microplaca de 96 pocillos fondo redondo (Costar), pipetas estériles desechables 10 mL (Costar), potenciómetro pHep tester (Hanna instruments), sistema de purificación de agua Simplicity UV (Millipore), tubos Falcon 15 y 50 mL (Corning), ultracongelador horizontal -80°C HERA FREEZE HFC series (Thermo-Fisher).

2.1.3 Reactivos

2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) D9132 (Sigma-Aldrich), ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico, agua destilada, alcohol etílico, alcohol isopropílico, alcohol metílico, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazolio (MTT) M5655 (Sigma-Aldrich), cloruro de potasio CP170126-01 (DEQ), cloruro de sodio 561-1 (DEQ), dimetilsulfóxido D4540 (Sigma-Aldrich), dodecil sulfato de sodio DSS170126-01 (DEQ), fosfato de potasio dibásico anhidro FPDA170126-01 (DEQ), fosfato de sodio dibásico anhidro FSDA170126-01 (DEQ), L-Ácido glutámico G8415 (Sigma-Aldrich), medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) MEP12-10LT (Caisson), medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) RPP12-10LT (Caisson), penicilina – estreptomina 1%, Suero fetal bovino (SFB) (Caisson), tripsina (Caisson), Tritón X-100 H5142 (Promega).

2.2 Extractos

Los extractos de las hojas de las plantas fueron obtenidos como colaboración con el Dr. Juan Manuel Favela Hernández. Se contaron con seis extractos de diferente grado de polaridad, para *D. inoxia* se obtuvieron los extractos: metanólico (D1), clorofórmico (D2) y hexánico (D3). En el caso de *T. diffusa*, se obtuvieron los extractos: etanólico (T1), clorofórmico (T2) y hexánico (T3).

Dichos extractos fueron congelados y conservados en un congelador de -20 °C del Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica. Para realizar los ensayos los extractos se disolvieron en DMSO al 5% y posteriormente en medio EMEM (Medio Esencial Mínimo de Eagle) para el ensayo de citotoxicidad y medio

RPMI-1640 (medio Roswell Park Memorial Institute) para el ensayo de evaluación de efecto neuroprotector y neurotóxico.

2.3 Métodos

Para la evaluación del efecto neuroprotector y el establecimiento del mecanismo principal relacionado a este efecto, se realizaron una serie de ensayos enfocados en medir las respuestas fisiopatológicas del proceso de excitotoxicidad y establecer la manera en la que la exposición a concentraciones controladas de los diferentes extractos, afectaban el comportamiento de éstas. Entre los efectos existentes en el proceso de excitotoxicidad, destacan la producción de especies reactivas de oxígeno, incremento de la concentración de calcio intracelular y activación de las vías de señalización que culminan en apoptosis celular. Además, se determinó la respuesta citotóxica de los extractos en la línea celular VERO.

El cultivo de la línea celular VERO se realizó en EMEM suplementado con 10% de SFB, mientras que para la línea celular PC-12, se realizó en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB. Ambas líneas celulares se incubaron en condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ por 48 horas o hasta formación de monocapa (ATCC®, 2018).

Para los ensayos de actividad citotóxica, evaluación de la actividad neurotóxica y evaluación del efecto neuroprotector se prepararon placas de 96 pocillos una vez alcanzada la confluencia de 70%-90% en los frascos de cultivo de línea celular VERO o PC-12. La concentración celular empleada fue de 10 000 células / 0.1 mL, las cuales se colocaron en cada uno de los pocillos y se incubó a condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ de 24 a 48 horas o hasta la formación de monocapa, para el posterior tratamiento con los extractos a evaluar.

Para el ensayo de actividad antiapoptótica por la metodología de caspasa-3, se prepararon placas de 6 pocillos una vez alcanzada la confluencia de 70%-90% en los frascos de cultivo de línea celular PC-12. La concentración celular empleada fue de 1 000 000 células / 0.1 mL, las cuales se colocaron en cada uno de los pocillos y se incubó a condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ de 24 a 48 horas o hasta la formación de monocapa, para el posterior tratamiento con los extractos a evaluar.

La parte experimental correspondiente a la evaluación de la respuesta neuroprotectora y citotóxica de los extractos se realizaron en el cuarto de cultivo número dos del Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.3.1 Evaluación de la actividad citotóxica mediante el ensayo de MTT

La reducción del tetrazolio mide algunos aspectos del metabolismo general o una actividad enzimática como marcador de células viables. Se requiere la incubación del reactivo con un número determinado de células viables para convertir el sustrato a un producto coloreado que puede ser detectado por un lector de microplaca. Bajo condiciones estándar de cultivo, la incubación del sustrato con células viables resultará en la generación de una señal que es proporcional al número de células viables. Cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir el sustrato a producto, esta diferencia es la base fundamental para muchos de los ensayos de citotoxicidad mediada por la exposición a compuestos.

La respuesta de la exposición a los extractos de las plantas fue establecida con la realización de ensayos de citotoxicidad por la técnica de reducción de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazan llevado a cabo por la acción del complejo succinato-deshidrogenasa mitocondrial de las células metabólicamente activas (Denizot, *et al.* 1986)

Formada la monocapa de la línea celular VERO en las placas de 96 pocillos se hizo el recambio de medio EMEM fresco en cada pocillo y posteriormente se depositaron 0.1 mL de los extractos por dilución seriada para dar concentraciones finales de 200 µg/mL a 3.125 µg/mL. Como controles positivos de citotoxicidad se depositaron 0.1 mL de Tritón X-100 al 1% y DMSO grado reactivo; además de colocar DMSO al 5% para descartar actividad debida

al disolvente y como control negativo se consideró a los pocillos con células y medio de cultivo.

Una vez depositados los extractos, los controles y realizadas las diluciones correspondientes, se incubó la placa de 96 pocillos en condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ por un lapso de tiempo de 24 horas. Después de transcurrido el tiempo de exposición de las células a los extractos, se retiró el medio de la placa de 96 pocillos y se colocaron 0.1 mL de una solución de MTT (0.5 mg/mL) en cada pocillo y se incubó la placa en condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ por 3 horas.

Finalizado el periodo de incubación, se retiró la solución de MTT y se adicionó en cada pocillo 0.2 mL de una solución de alcohol isopropílico / ácido clorhídrico al 10% colocando la placa en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de absorbancia a longitud de onda de 570 nm.

Los cálculos para obtener el porcentaje de viabilidad se realizaron con el empleo de la siguiente ecuación:

$$Viabilidad (\%) = \frac{(ABSx - ABSo) * 100}{(ABSctl - ABSo)}$$

Donde:

ABSx = Absorbancia de la muestra (Células + extracto)

ABSo = Absorbancia del blanco (Medio + MTT)

ABSctl = Absorbancia del control (Células + medio)

Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar y se realizó el cálculo del IC₅₀ para cada extracto y se realizó la prueba de ANOVA para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo y los extractos expuestos.

2.3.2 Evaluación de la actividad neurotóxica mediante el ensayo de WST-1

La línea celular PC-12 empleada para la evaluación de la actividad neurotóxica de los extractos de las plantas, tiene su tejido de origen en la glándula adrenal de rata (feocromocitoma), son células pequeñas de forma irregular, crecen en racimos flotantes, ligeramente adheridas. Por lo tanto, requieren de mayor tiempo para la formación de monocapa.

Transcurridas 48 horas de incubación y formada la monocapa de la línea celular PC-12, en las placas de 96 pocillos. Se hizo el recambio de medio RPMI-1640 y posteriormente se depositaron 0.1 mL de los extractos por dilución seriada para dar concentraciones finales de 200 µg/mL a 3.125 µg/mL. Como control positivo de neurotoxicidad se depositó 0.1 mL de glutamato 10 mM; además de colocar DMSO al 5% para descartar actividad debida al disolvente. Como control negativo se consideró a los pocillos con células y medio de cultivo.

Una vez depositados los extractos, los controles y realizadas las diluciones correspondientes, se incubó la placa de 96 pocillos en condiciones de 37 °C, 5%

de CO₂ por un lapso de tiempo de 24 horas. Después de transcurrido el tiempo de exposición de las células a los extractos, se retiró el medio de la placa de 96 pocillos y se colocaron 0.1 mL de una solución de WST-1 (0.5 %) en cada pocillo y se incubó la placa en condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ por 2 horas (Denizot, *et al.* 1986).

Finalizado el periodo de incubación, se realizó la lectura de absorbancia a longitud de onda de 450 nm.

Los cálculos para obtener el porcentaje de viabilidad se realizaron con el empleo de la siguiente ecuación:

$$Viabilidad (\%) = \frac{(ABSx - ABSo) * 100}{(ABSctl - ABSo)}$$

Donde:

ABSx = Absorbancia de la muestra (Células + extracto)

ABSo = Absorbancia del blanco (Medio + WST-1)

ABSctl = Absorbancia del control (Células + medio)

Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar; se realizó el cálculo del IC₅₀ para cada extracto y se realizó la prueba de ANOVA para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo y los extractos expuestos.

2.3.3 Evaluación del efecto neuroprotector mediante el ensayo de WST-1

Formada la monocapa de la línea celular PC-12 en las placas de 96 pocillos, se retiró el medio y se colocaron 0.1 mL de medio RPMI-1640 fresco en cada pocillo, posteriormente, se realizó el pretratamiento de las células depositando 0.1 mL de los extractos preparados a concentraciones de 200 µg/mL a 3.123 µg/mL, por dilución seriada, ó bien, colocando 0.1 mL del control positivo de neuroprotección (ácido ascórbico 100 µM); con posterior incubación a 37 °C, 5% de CO₂ durante 4 horas. Cumplido el pretratamiento, se depositaron 0.1 mL de glutamato 5 mM y se incubó por 16 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Así mismo, se colocó DMSO al 5% para descartar actividad debida al disolvente y como control negativo se consideró a los pocillos con células y glutamato 5 mM (Bernardo, *et al.* 2017; Denizot, *et al.* 1986; Torres, *et al.* 2011).

Transcurrido el tiempo de exposición de las células a los extractos y los controles, se retiró el medio de la placa de 96 pocillos y se colocaron 0.1 mL de una solución de WST-1 en cada pocillo y se incubó la placa en condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ por 2 horas (Denizot, *et al.* 1986).

Finalizado el periodo de incubación, se realizó la lectura de absorbancia a longitud de onda de 450 nm.

Los cálculos para obtener el porcentaje de viabilidad se realizaron con el empleo de la siguiente ecuación:

$$Viabilidad (\%) = \frac{(ABSx - ABSo) * 100}{(ABSctl - ABSo)}$$

Donde:

ABSx = Absorbancia de la muestra (Células + extracto)

ABSo = Absorbancia del blanco (Medio + WST-1)

ABSctl = Absorbancia del control (Células + medio)

Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar; se realizó el cálculo del IC₅₀ para cada extracto y se realizó la prueba de ANOVA para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo y los extractos expuestos.

2.3.4 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue determinada empleando el radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo, (DPPH), el cual, tiene una banda de absorción a 517 nm, que desaparece por la actividad de un compuesto antioxidante al reducir el radical libre DPPH (Okawa, *et al.* 2001).

Se preparó una solución de DPPH a concentración de 100 µM y una serie de soluciones de ácido ascórbico a concentraciones de 300, 200, 100, 80, 60, 40, 20 µg/mL para la realización de la curva de calibración y se colocaron de forma descendente en la placa de 96 pocillos de fondo redondo, las soluciones de DPPH y de ácido ascórbico se prepararon empleando metanol como disolvente.

En los pocillos restantes, se colocaron 0.1 mL de metanol (Hajimehdipoor, *et al.* 2016).

Los extractos de las plantas a evaluar se disolvieron en metanol para obtener la concentración de 200 µg/mL y se colocaron en los pocillos superiores, posteriormente, se diluyeron de forma seriada hasta la concentración de 3.125 µg/mL. Después de colocados los extractos de las plantas, se colocaron 0.1 mL de la solución de DPPH 100 µM y se incubó la placa en oscuridad a temperatura ambiente. Como control, se contempló la solución del radical DPPH 100 µM en 0.1 mL de metanol.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de la absorbancia en el lector de microplaca ELISA a longitud de onda de 517 nm.

Los cálculos para obtener el porcentaje de inhibición se realizaron con el empleo de la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{((ABSctl - ABSx) * 100)}{ABSctl}$$

Donde:

ABSctl = Absorbancia del control (DPPH + metanol)

ABSx = Absorbancia de la muestra (Extracto + DPPH)

Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar, se realizó el cálculo del IC₅₀ para cada extracto y para el ácido ascórbico. Se realizó la prueba de ANOVA para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los extractos expuestos.

2.3.5 Evaluación de la actividad antiapoptótica

La activación de la caspasa 3, (CPP32/apopain), tiene un sustrato específico para la secuencia de aminoácidos Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), y rompe diferentes proteínas incluyendo poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), proteína quinasa DNA-dependiente, proteína quinasa C δ y actina (Molecular Probes, 2003).

La evaluación de la actividad antiapoptótica se realizó con el empleo del kit EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #2, el cual permite la detección de apoptosis, por el incremento de la actividad de caspasa-3 y otras proteasas específicas de la secuencia DEVD (p.ej. caspasa 7). El fundamento del ensayo es el rompimiento del sustrato rodamina 110 bis-(amida *N*-CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-ácido aspártico) (Z-DEVD-R110). Este sustrato es una bisamida derivada de rodamina 110 (R110) que tiene unidos covalentemente los péptidos DEVD a cada grupo amino de R110. De este modo, se suprime la absorción visible del colorante y su fluorescencia. Por rompimiento enzimático, el sustrato bisamida no fluorescente es convertido a la monoamida fluorescente y después al más fluorescente R110, en un proceso de dos pasos. Ambos productos de la hidrólisis exhiben propiedades espectrales similares a los de fluoresceína, con picos de excitación y emisión a longitudes de onda de 496 nm y 520 nm, respectivamente. Además, del sustrato Z-DEVD-R110.

Para la realización del ensayo de actividad antiapoptótica, se consideraron los extractos con mejores resultados de actividad neuroprotectora y a la

concentración en la que disminuía el efecto neurotóxico, de esta manera se emplearon los extractos D1 y T1.

Formada la monocapa de la línea celular PC-12 en las placas de 6 pocillos, se retiró el medio y se colocaron 1 mL de medio RPMI-1640 fresco en cada pocillo y posteriormente se realizó el pretratamiento de las células depositando 1 mL de los extractos preparados a concentración de 12.5 µg/mL, ó bien colocando 2 mL del control positivo neuroprotección (ácido ascórbico 100 µM) y como control negativo se emplearon células sin tratamiento. Además, se empleó un control extra de podofilotoxina (12.2 µg/mL) como inductor de apoptosis y células tratadas con glutamato 5mM; con posterior incubación a 37°C, 5% de CO₂ durante 4 horas. Cumplido el pretratamiento, se depositaron 0.1 mL de glutamato 5 mM y se incubó por 12 horas a 37°C, 5% de CO₂.

2.3.5.1 Ensayo de caspasa 3

Transcurrido el tiempo de exposición de las células a los extractos y los controles, se retiró el medio de la placa de 6 pocillos y se cosecharon las células, posteriormente se lavaron con PBS. Se preparó una solución de trabajo de buffer de lisis celular 1X, agregando 50 µL del buffer de lisis 20X (componente C) a 950 µL de agua des ionizada. Se resuspendió cada muestra celular o control en 50 µL del buffer de lisis celular 1X y se sometieron a ciclos de congelamiento-descogelamiento por 30 minutos. Se preparó una solución de buffer de reacción 2X, agregando 400 µL de buffer de reacción 5X (componente D) y 10 µL de DTT 1M a 590 µL de agua des ionizada. El lisado celular fue centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos.

Se realizó la cuantificación de proteínas por metodología de Bradford para hacer los ajustes de concentración de proteínas y establecer la actividad debida a caspasa-3. De acuerdo a la concentración total de proteína obtenida; se ajustó a concentración de 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se complementó con buffer de lisis 1X para obtener un volumen final de 50 μL .

Una vez realizado el ajuste de concentración proteica; se transfirieron 50 μL del sobrenadante de cada muestra a pocillos individuales de microplaca (por triplicado), respetando el orden de exposición a extractos. Se cubrió e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. A la par de incubación de las muestras, se preparó una solución de trabajo del sustrato 2X, mezclando 10 μL de Z-DEVD-R110 5 mM con 990 μL de buffer de reacción 2X. Transcurrido el tiempo de incubación, se depositaron 50 μL de la solución de trabajo del sustrato 2X a cada muestra y control. La microplaca fue cubierta e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos.

Se preparó una curva de estándar R110, diluyendo la solución *stock* de R110 5 mM en buffer de reacción 1X a concentraciones de 0 a 25 μM . Se depositaron 0.1 mL de la solución estándar en pocillos vacíos antes de la medición de fluorescencia.

La fluorescencia fue medida a 496 nm/ 520 nm usando filtros de excitación y emisión. Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar. Se realizó la prueba de ANOVA para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los extractos expuestos y el grupo control (Molecular Probes, 2003).

2.4 Manejo de los residuos

Los residuos generados durante la fase de cultivo celular, como fueron frascos de cultivo, cajas de 96 pocillos y cajas de 6 pocillos, fueron esterilizados y colocados en bolsas rojas para su posterior recolección.

Los contenedores empleados fueron:

A: Soluciones salinas pH 6.8, soluciones de sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.

E: Muy tóxico, cancerígeno orgánico.

Bolsa roja: Frascos de cultivo, microplacas de 6 y 96 pocillos, reservorios para medios de cultivo, combitips, tubos Falcon de 50 y 15 mL, tubos eppendorf.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Actividad citotóxica

La evaluación del efecto citotóxico de los extractos de *T. diffusa* y *D. inoxia* se determinó en la línea celular VERO, mediante la determinación del porcentaje de viabilidad celular con el ensayo de reducción de MTT.

3.1.1 Evaluación citotóxica de *D. inoxia*

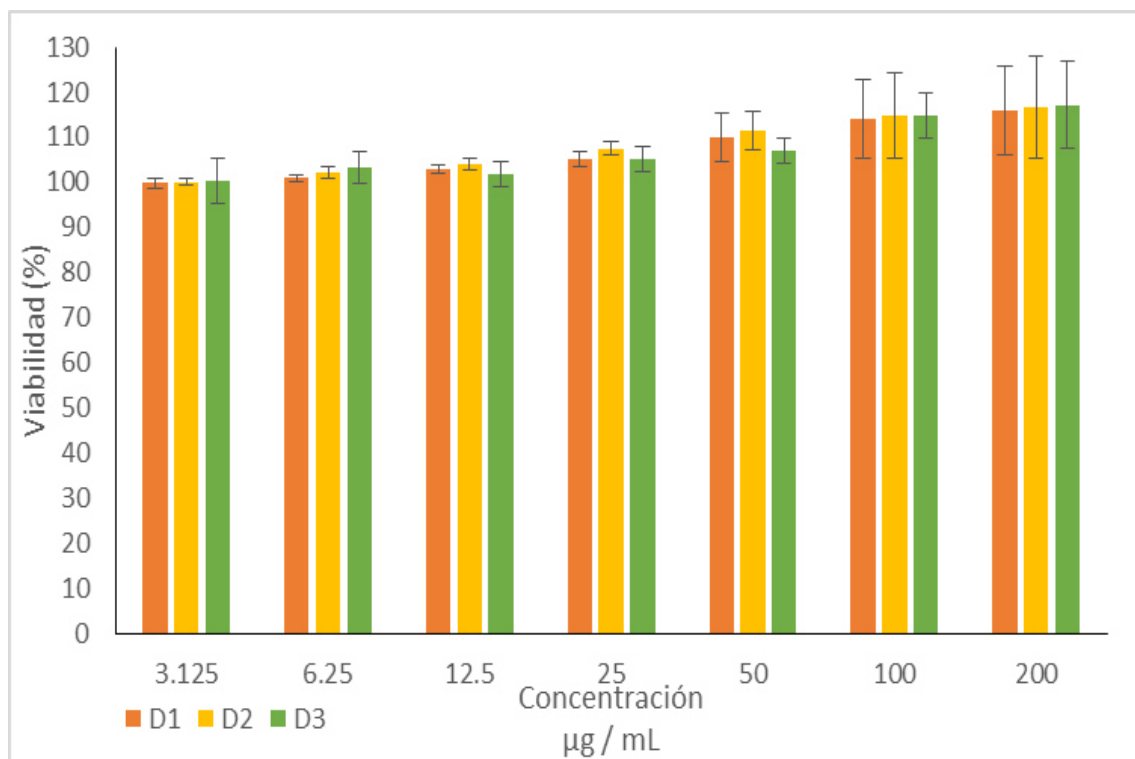


Figura 5. Evaluación citotóxica de extractos de *D. inoxia* (D1: metanólico, D2: clorofórmico y D3: hexánico) en línea celular VERO

Los resultados de la evaluación citotóxica correspondientes a los tres extractos de *D. inoxia*, (D1: metanólico, D2: clorofórmico, D3: hexánico), no mostraron reducción de la viabilidad celular por debajo de 50% en concentraciones de 3.125 µg/mL a 200 µg/mL durante 24 horas de exposición. Los IC₅₀ calculado para los tres extractos son de >200 µg/mL.

Como resultados de la prueba de ANOVA, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres extractos a las diferentes concentraciones evaluadas.

3.1.2 Evaluación citotóxica de *T. diffusa*

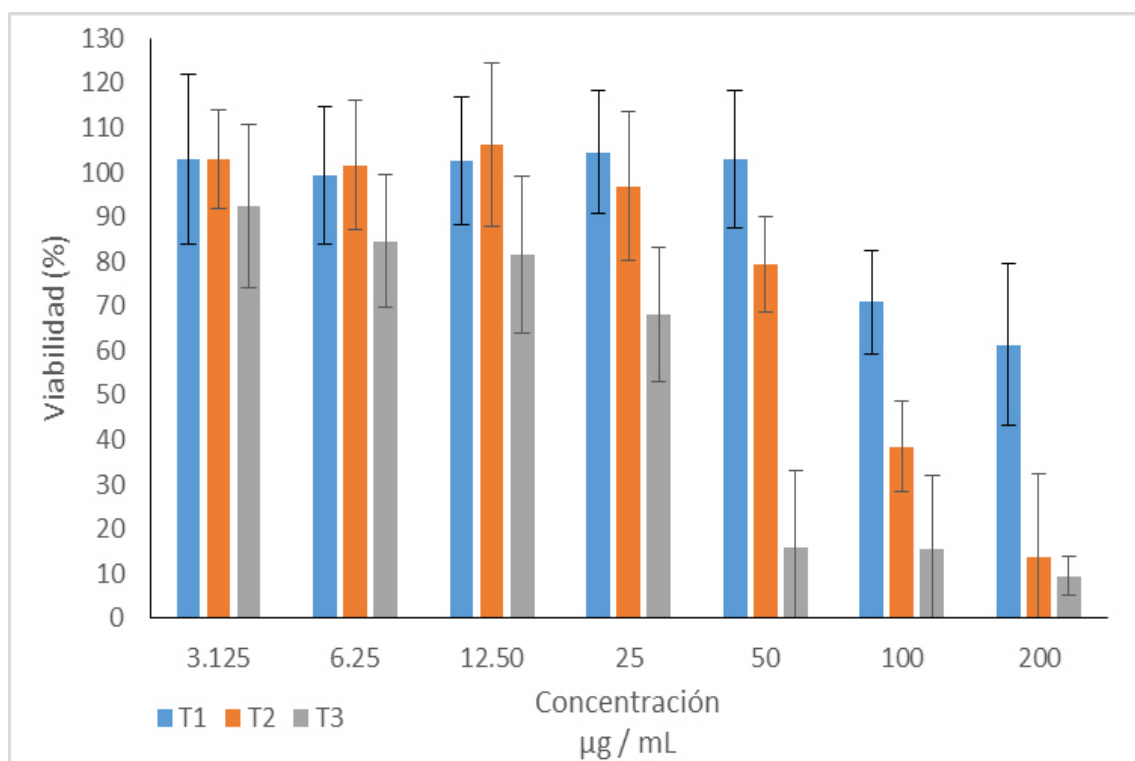


Figura 6. Evaluación citotóxica de extractos de *T. diffusa* (T1: etanólico, T2: hexánico y T3: clorofórmico) en línea celular VERO

Para el caso de la actividad citotóxica de los extractos de *T. diffusa*. Se observó que el extracto T1 (etanólico), presentó valores de viabilidad celular superiores al 60%; siendo el valor de 61.37% el correspondiente a la concentración de 200 µg/mL, la que resultó en el menor porcentaje de viabilidad celular. El extracto T2, (hexánico), presentó porcentajes de viabilidad celular menores a 50% siendo estos de 38.41% y de 13.83% a concentraciones de 100 µg/mL y de 200 µg/mL, respectivamente. Estos porcentajes de viabilidad celular resultaron ser los más bajos en el caso de dicho extracto. El extracto T3

(clorofórmico), obtuvo en tres concentraciones, valores menores al 50%. Las concentraciones en las que se obtuvieron los valores menores fueron 200 µg/mL, 100 µg/mL y 50 µg/mL, y resultados obtenidos fueron 9.39%, 15.5% y 15.9%, respectivamente. Los IC₅₀ obtenidos para los extractos fueron >200 µg/mL para el caso de T1, 86.99 µg/mL para el extracto T2 y de 27.85 µg/mL para el T3.

El ensayo estadístico de ANOVA se realizó separando las concentraciones de 50 µg/mL a 200 µg/mL; ya que, no se lograron apreciar las diferencias estadísticas al realizar el análisis de las siete concentraciones de los tres extractos ($p=0.09$). Al realizar esto, se observó que a concentraciones altas (50 µg/mL a 200 µg/mL) se logró poner en evidencia las diferencias entre los tres extractos con un valor $p= 0.037$, siendo éste $p<0.05$ y con el ensayo de Tukey se determinó que las diferencias se encontraban entre el extracto T1 y T3. Para el resto de las concentraciones, (de 3.125 µg/mL a 25 µg/mL); el valor $p= 0.0019$, demostrando de esta forma que existían diferencias estadísticas y con la prueba de Tukey se estableció que los extractos entre los que se presentaron las diferencias fueron el T1 y T3 y los extractos T2 y T3, estableciendo de esta manera que el extracto T3 es el más citotóxico en el rango de concentraciones evaluadas y que la diferencia entre el extracto T1 y T2 no es estadísticamente significativa.

3.2 Actividad neurotóxica

La evaluación del efecto neurotóxico de los extractos de *T. diffusa* y *D. inoxia* se determinó en la línea celular PC-12, mediante la determinación del porcentaje de viabilidad celular con el ensayo de reducción de WST-1.

3.2.1 Evaluación neurotóxica de *D. inoxia*

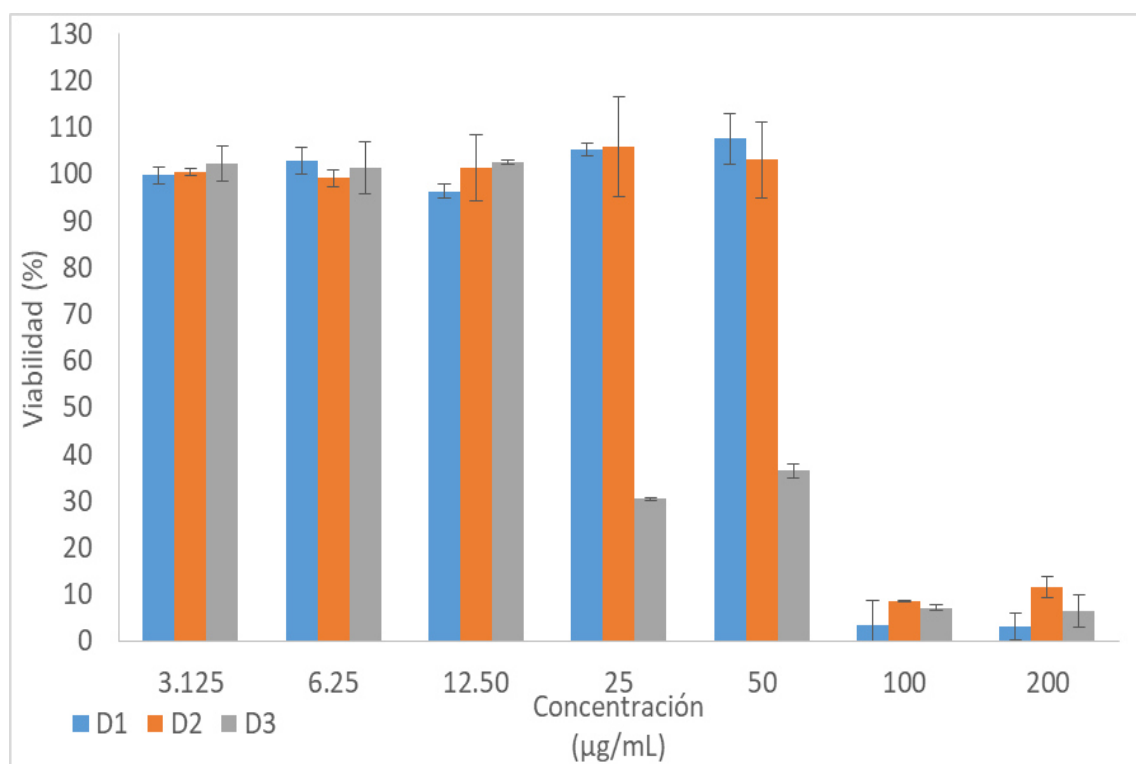


Figura 7. Evaluación de actividad neurotóxica de extractos de *D. inoxia* (D1: metanólico, D2: clorofórmico y D3: hexánico) en línea celular PC-12

Los resultados de la evaluación neurotóxica realizada a los tres extractos de *D. inoxia*, mostraron reducción de la viabilidad celular por debajo de 50% a concentraciones de 100 µg/mL y 200 µg/mL durante 24 horas de exposición para

los extractos D1 y D2. Los valores de viabilidad celular obtenidos para el extracto D1 a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$, fueron 3.39% y 3.14%, respectivamente. Mientras, el extracto D2 a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$, obtuvo porcentajes de 8.62% y 11.63%, respectivamente. El efecto de neurotoxicidad observada en el extracto D3, se presentó a concentraciones de 25 $\mu\text{g/mL}$ a 200 $\mu\text{g/mL}$, con valores de y 30.46% a concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, 36.49 a 50 $\mu\text{g/mL}$, 7.25% a 100 $\mu\text{g/mL}$ y 6.59% 200 $\mu\text{g/mL}$. Los IC_{50} calculados para los tres extractos son de 66.53 $\mu\text{g/mL}$, 76.73 $\mu\text{g/mL}$ y 30.23 $\mu\text{g/mL}$, correspondientes a los extractos D1, D2 y D3, respectivamente.

El resultado de la prueba de ANOVA realizada a los extractos reportó un valor de $p=0.66$, denotando de esta manera que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los extractos. Por lo tanto, se realizó la prueba de ANOVA por separado para los extractos a concentraciones altas, (50 $\mu\text{g/mL}$ a 200 $\mu\text{g/mL}$) resultando en un valor $p=0.79$ y observándose de esta manera que no existió diferencia estadística significativa entre los extractos evaluados a concentraciones altas y la misma situación se presentó en los extractos a concentraciones bajas (3.125 $\mu\text{g/mL}$ a 25 $\mu\text{g/mL}$) con un valor $p=0.43$.

3.2.2 Evaluación neurotóxica de *T. diffusa*

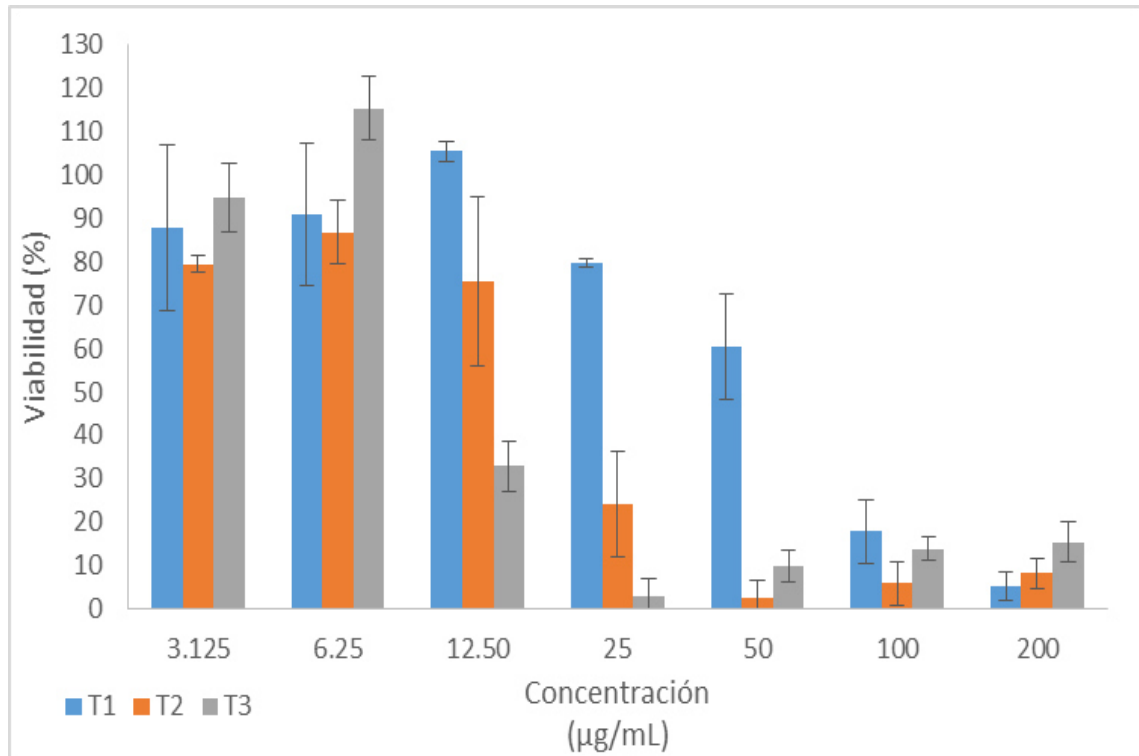


Figura 8. Evaluación de la actividad neurotóxica de extractos de *T. diffusa* (T1: etanólico, T2: hexánico y T3: clorofórmico) en línea celular PC-12

En los resultados de la evaluación de neurotoxicidad realizada a los tres extractos de *T. diffusa*, se observaron valores menores a 50% de viabilidad celular causada por los tres extractos, variando la concentración en la que se llevaba a cabo dicho fenómeno. Para el extracto T1, a concentración de 100 µg/mL, se observaron valores de viabilidad celular de 17.74%, y de 5.13% a concentración de 200 µg/mL, a partir de la concentración de 50 µg/mL se presentaron valores por arriba del 50%. Los valores de viabilidad celular del extracto T2 fueron de 23.95%, 2.57%, 5.81% y 8.10% para las concentraciones

de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL, respectivamente. A partir de la concentración de 12.5 µg/mL se presentaron valores superiores al 50%. En el caso del extracto T3, los valores obtenidos fueron de 32.85%, 3.03%, 9.75%, 13.83% y 15.37% en concentraciones de 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL, respectivamente. A partir de la concentración de 6.25 µg/mL se presentaron valores superiores al 50%.

El resultado de la prueba de ANOVA realizada a los extractos en siete concentraciones, reportó un valor de $p=0.47$, (considerando la existencia de diferencias estadísticamente significativas siendo $p<0.05$) se observa que no existieron diferencias significativas entre los extractos. Por lo tanto, se realizó la prueba de ANOVA por separado para los extractos a concentraciones altas, (50 µg/mL a 200 µg/mL) resultando en un valor $p= 0.32$ y observándose de esta manera que no existió diferencia estadísticamente significativa entre los extractos evaluados a concentraciones altas y la misma situación se presentó en los extractos a concentraciones bajas (3.125 µg/mL a 25 µg/mL) con un valor $p=0.47$.

3.3 Actividad neuroprotectora

3.3.1 Evaluación neuroprotectora de *D. inoxia*

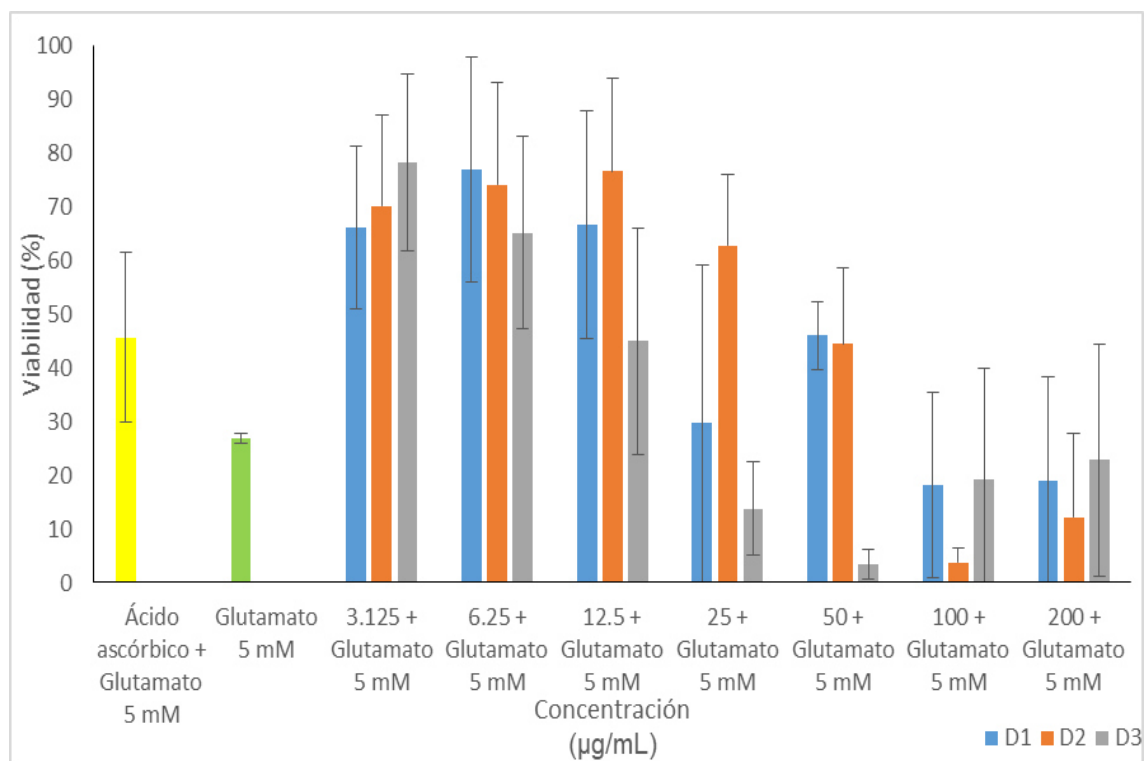


Figura 9. Evaluación de la actividad neuroprotectora de extractos de *D. inoxia* (D1: metanólico, D2: clorofórmico y D3: hexánico) en línea celular PC-12

El efecto neuroprotector del extracto D1 se observó en las concentraciones de 3.125 µg/mL, 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL y 50 µg/mL, al obtener valores de viabilidad celular de 63.13%, 76.97%, 66.66% y 45.99% respectivamente. Dichos resultados se encuentran por encima del ácido ascórbico (100 µM), empleado como control positivo de neuroprotección y cuyo resultado fue de 45.65 %. Para el extracto D2, se observó a partir de la concentración de 3.125 µg/mL, 6.25

$\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$, con valores de 70.21%, 74.09%, 76.60% y 62.79%, respectivamente. Los valores de neuroprotección del extracto D3, fueron de 78.19% y 65.21% y se observaron a concentraciones de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ y 6.25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

El resultado de la prueba de ANOVA realizada a los controles de neuroprotección (ácido ascórbico 100 μM), neurotoxicidad (glutamato 5 mM) y a los extractos en siete concentraciones, reportó un valor de $p= 0.29$, (considerando la existencia de diferencias estadísticamente significativas siendo $p<0.05$) se observa que no existieron diferencias estadísticas entre los extractos. Por lo tanto, se realizó la prueba de ANOVA por separado para los extractos a concentraciones altas, (50 $\mu\text{g/mL}$ a 200 $\mu\text{g/mL}$) resultando en un valor $p= 0.11$ y observándose de esta manera que no existió diferencia estadísticamente significativa entre los extractos evaluados a concentraciones altas. Para el caso de los extractos a concentraciones bajas (3.125 $\mu\text{g/mL}$ a 25 $\mu\text{g/mL}$) se obtuvo un valor $p=0.01$ denotando la existencia de diferencias estadísticas entre los grupos evaluados y por lo tanto se realizó la prueba de Tukey en la cual se observó que los grupos entre los que existe diferencia fueron el extracto D2 y el control de glutamato 5 mM. Mientras que, no existió diferencia entre los extractos evaluados y el control de neuroprotección de ácido ascórbico.

3.3.2 Evaluación neuroprotectora de *T. diffusa*

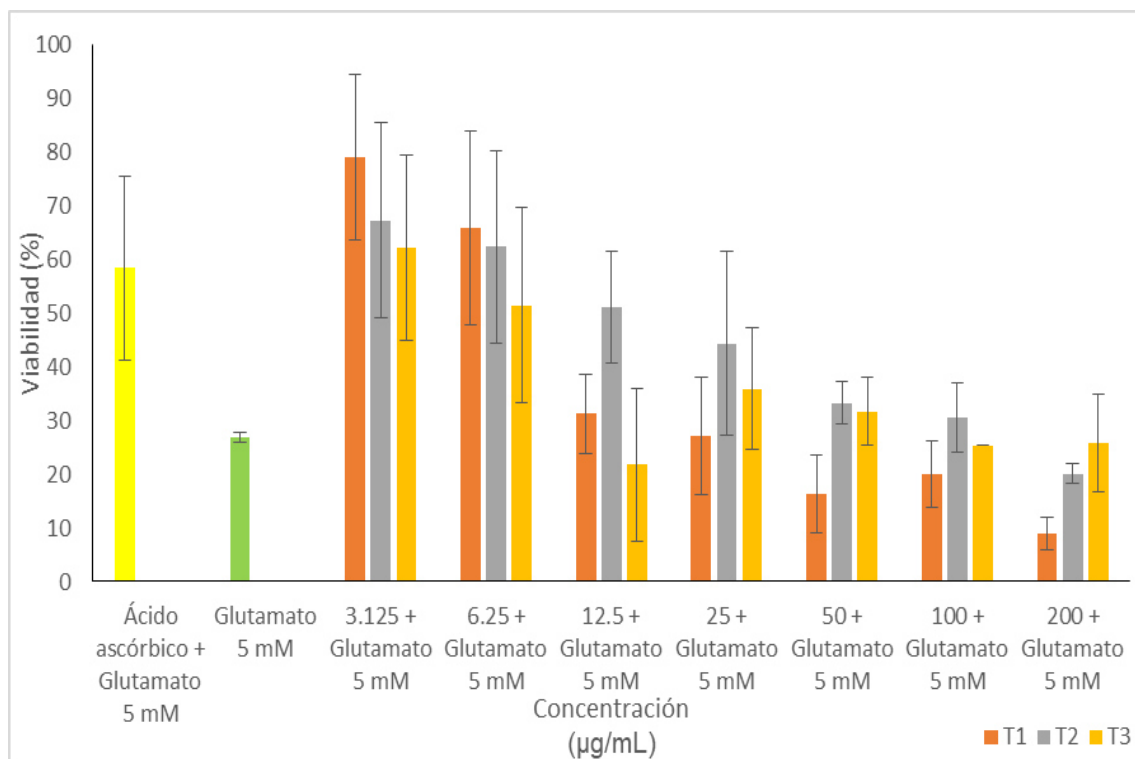


Figura 10. Evaluación de la actividad neuroprotectora de extractos de *T. diffusa* (T1: etanólico, T2: hexánico y T3: clorofórmico) en línea celular PC-12

Los valores de neuroprotección observados por encima del ácido ascórbico (58.39%), fueron los pertenecientes al extracto T1, con resultados de 79.06% y 65.88% a concentraciones de 3.125 µg/mL y 6.25 µg/mL, respectivamente. Los resultados del extracto T2, fueron 67.32% y 62.42%, a concentraciones de 3.125 µg/mL y 6.25 µg/mL, respectivamente. En el caso del extracto T3, solo se observó el efecto a concentración de 3.125 µg/mL con un valor de 62.11%.

Se realizó la prueba de ANOVA a los controles de neuroprotección (ácido ascórbico 100 μ M), neurotoxicidad (glutamato 5 mM) y a los extractos, separando las concentraciones altas, (50 μ g/mL a 200 μ g/mL) de las concentraciones bajas (3.125 μ g/mL a 25 μ g/mL) y obteniendo de esta manera un valor $p = <0.0001$ y de $p = 0.05$, respectivamente. Considerando la existencia de diferencias estadísticamente significativas siendo $p < 0.05$, se observa que solo en el análisis de concentraciones altas, existieron las diferencias. Posteriormente con la prueba de Tukey se obtuvo que entre los grupos en los que se presentaron las diferencias fueron: el ácido ascórbico 100 μ M y glutamato 5 mM, ácido ascórbico y T1, ácido ascórbico y T2, ácido ascórbico y T3, glutamato 5 mM y T1, T1 y T2, T1 y T3. Observando de esta manera que a concentraciones de 50 μ g/mL a 200 μ g/mL no existe efecto neuroprotector de los extractos. Mientras que, en el análisis de concentraciones bajas, no se observó diferencia estadística entre los extractos y el grupo control de neuroprotección. Por lo tanto, a estas concentraciones de 3.125 μ g/mL a 25 μ g/mL los extractos presentan efecto neuroprotector similar al grupo control de ácido ascórbico 100 μ M.

3.4 Actividad antioxidante

3.4.1 Actividad antioxidante de *D. inoxia*

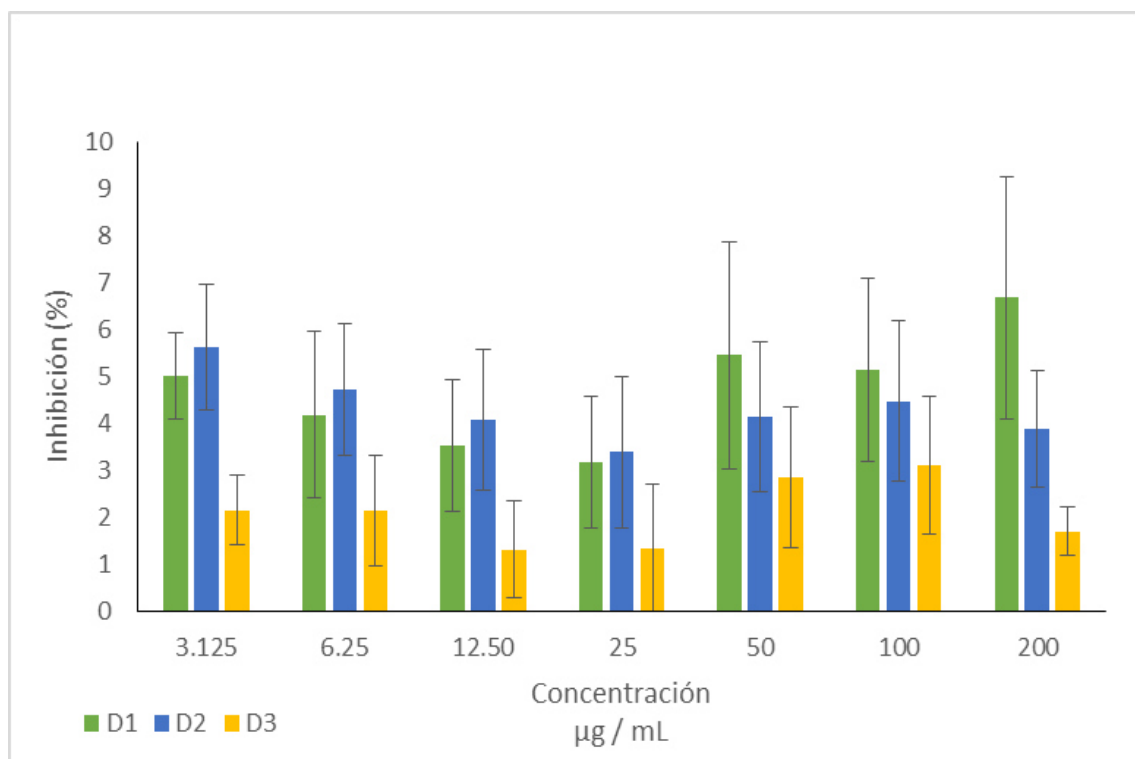


Figura 11. Evaluación antioxidante de extractos de *D. inoxia* (D1: metanólico, D2: clorofórmico y D3: hexánico) por inhibición del radical DPPH

Los resultados del porcentaje de inhibición del radical DPPH, por los extractos de *D. inoxia* fueron menores del 50% y el IC_{50} obtenido para dichos extractos fue $>200 \mu\text{g/mL}$. El extracto que presentó mayor actividad fue el extracto D1 con un porcentaje de inhibición de 6.69% a concentración de $200 \mu\text{g/mL}$; mientras que, el extracto con menor actividad resultó ser el D3 con un valor de 1.31% a concentración de $12.5 \mu\text{g/mL}$.

La prueba de ANOVA realizada estableció que existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados al obtener un valor $p = <0.001$, (considerando la existencia de diferencias estadísticas al ser $p < 0.05$). Posteriormente, se realizó la prueba de Tukey para determinar entre cuales grupos se encontraba la diferencia y el resultado fue que las diferencias se presentaron entre los extractos D1 y D3 y los extractos D2 y D3. Estableciendo de esta forma que el extracto D3 es el que presenta menor actividad antioxidante.

3.4.2 Actividad antioxidante de *T. diffusa*

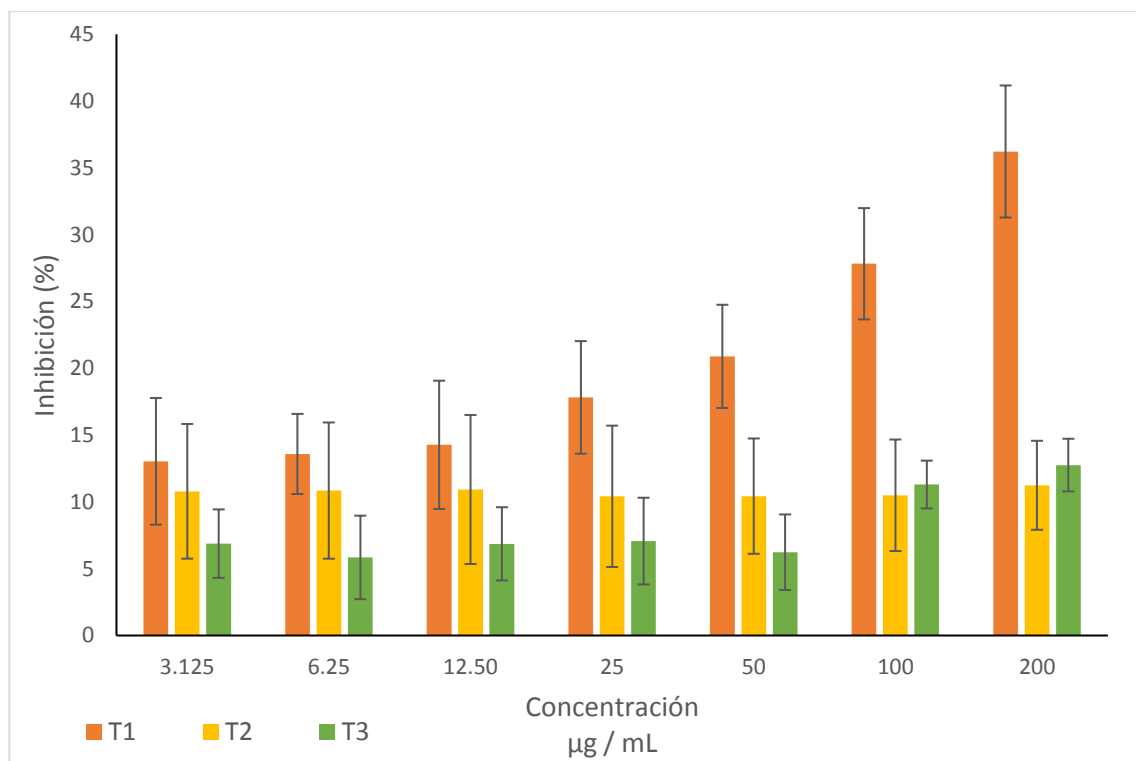


Figura 12. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *T. diffusa* (T1: etanólico, T2: hexánico y T3: clorofórmico) por inhibición del radical DPPH

Los extractos de la planta *T. diffusa* no presentaron porcentajes de inhibición del radical DPPH iguales o mayores al 50% y el IC₅₀ de dichos extractos fue de >200 µg/mL. El extracto con mayor actividad antioxidante fue el T1 con valor porcentaje de inhibición de 36.23% en concentración de 200 µg/mL; mientras que el extracto con menor actividad fue el T3, con porcentajes de inhibición de 5.84 % a concentración de 6.25 µg/mL.

Los resultados de la prueba de ANOVA establecieron la existencia de diferencias estadísticamente significativas con un valor $p= 0.0008$, (considerando la existencia de significancia estadística al ser $p<0.05$), y al realizar la prueba de comparación múltiple de Tukey, se obtuvo que los grupos de datos entre los que existía diferencia fueron los extractos T1 y T2 y los extractos T1 y T3. Estableciendo de esta manera que el extracto T1 es el que presenta mayor actividad antioxidante.

3.4.3 Actividad antioxidante de ácido ascórbico

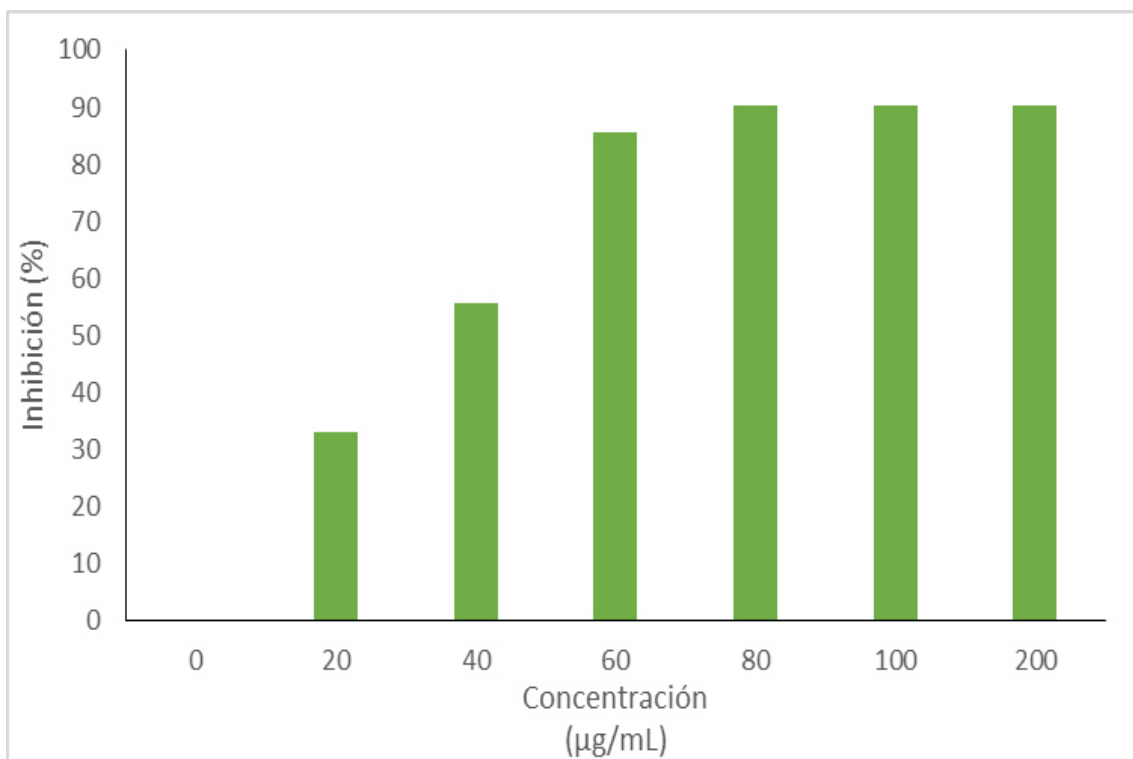


Figura 13. Evaluación de la actividad antioxidante del control positivo de neuroprotección (ácido ascórbico 100 µM)

Los porcentajes de inhibición del radical DPPH de los extractos de las plantas, se compararon con relación a los porcentajes de inhibición del control, que en este caso fue ácido ascórbico; del cual, se obtuvieron valores de 90.19% a concentración de 200 µg/mL con un valor de IC₅₀ de 4.44 µg/mL.

3.5 Actividad antiapoptótica

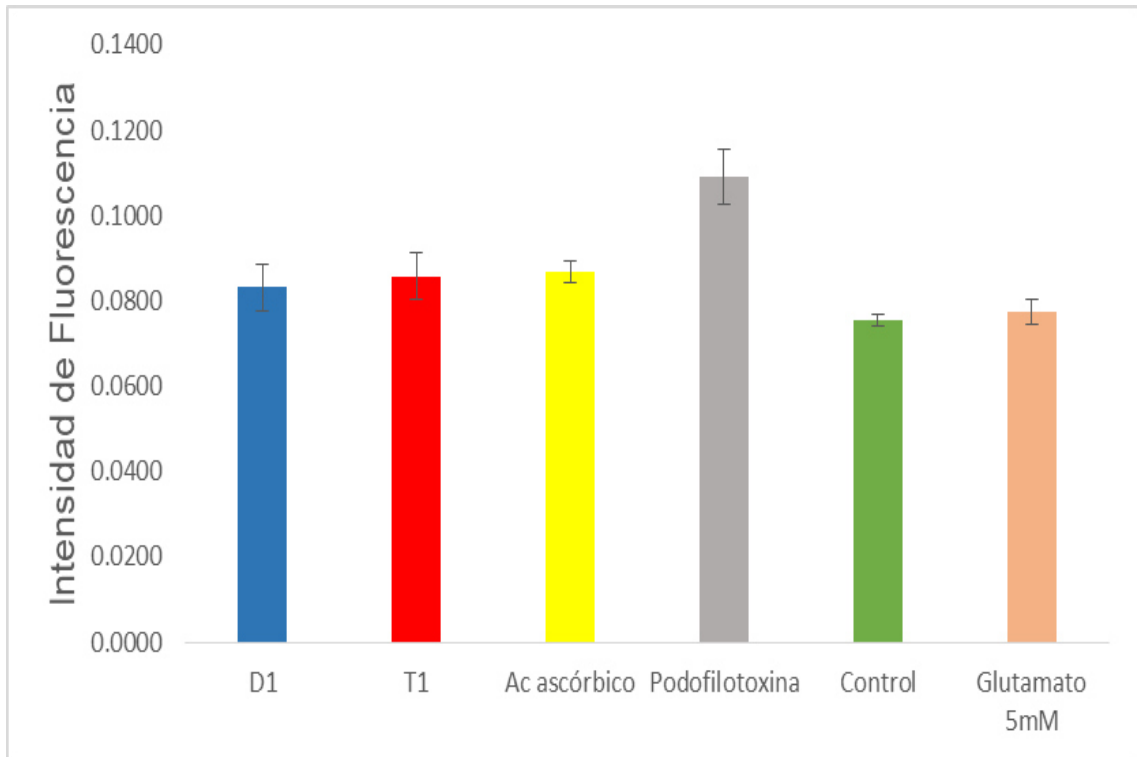


Figura 14. Evaluación de la actividad antiapoptótica de extractos de *D. inoxia* y *T. diffusa*

La determinación de la actividad antiapoptótica de los extractos de la planta se realizó a concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que, a esta concentración no se observaron efectos citotóxicos, neurotóxicos y es a partir de ésta en la que se empezó a presentar efecto neuroprotector. La evaluación de esta actividad consistió en la inhibición de la caspasa-3 comparada con el control positivo que consistió de ácido ascórbico 100 μM , como control negativo fueron células sin tratamiento y contra la respuesta inducida por glutamato 5 mM.

Se realizó el ensayo de ANOVA en el cual se consideró que había diferencias estadísticamente significativas si el valor de p era <0.05 y el valor

obtenido fue de $p= 0.01$, indicando que si existen diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto; se realizó la prueba de Tukey para determinar entre que grupos existía dicha diferencia y el resultado fue que entre el control positivo (ácido ascórbico $100 \mu\text{M}$), considerado como neuroprotector y el grupo sin tratamiento existía dicha diferencia. Sin embargo, al comparar el extracto D1 y T1 con el control positivo de ácido ascórbico, no existía diferencia estadísticamente significativa, así como tampoco existía al compararlos contra el control negativo de neuroprotección que consistió en glutamato 5 mM .

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluó la actividad biológica de los extractos de *D. inoxia* y *T. diffusa* a diferentes concentraciones con el fin de determinar la actividad neuroprotectora por parte de los extractos de las dos plantas y establecer su actividad citotóxica en la línea celular VERO. Además, para establecer el posible mecanismo neuroprotector se realizaron ensayos mediante los cuales se evaluó la forma en la que los extractos llevan a cabo el proceso de neuroprotección. Dichos ensayos fueron la determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de captación del radical libre estable DPPH, determinación de la actividad neurotóxica en la línea celular PC-12 y actividad antiapoptótica por parte de estos extractos.

4.1 Citotoxicidad y neurotoxicidad

Los resultados obtenidos para el caso de los extractos de *D. inoxia* establecen que no presenta efectos citotóxicos a las concentraciones de

3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, empleadas en la línea celular VERO, determinando un IC_{50} de $>200 \mu\text{g}/\text{ml}$. En 2016, Roy y cols realizaron el ensayo de citotoxicidad en línea celular VERO de extractos por método soxhlet y en frío de *D. metel* a concentraciones de 0.1 a 10 mg/mL , determinaron el IC_{50} de los extractos de semillas por el método soxhlet, fueron de 7.5 mg/mL y 5 mg/mL , para el extracto acuoso y metanólico, respectivamente. Mientras que, los IC_{50} para la extracción en frío de las semillas fueron de 3.5 mg/mL y 5.5 mg/mL para los extractos acuoso y metanólico, respectivamente. Respecto a los IC_{50} de los extractos del fruto por el método soxhlet fueron de 5 mg/mL y 4 mg/mL para los extractos acuoso y metanólico, respectivamente y para los extractos en frío fueron de 7 mg/mL y 3 mg/mL , respectivamente. Además de la línea celular VERO, también, Fátima y cols, emplearon otras líneas celulares de la misma índole consideradas “no tumorales” como es el caso del bioensayo de citotoxicidad de “camarón de salmuera” (*Artemia sp*) expuesta a extractos de hoja, tallo y fruto de la planta, fueron de $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$, por lo cual se consideraron altamente tóxicos en este ensayo; mientras que, el LC_{50} del control positivo empleado (doxorubicina) fue de 85.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Otra línea celular empleada no tumoral fue HEK-293 empleada por Cheshomi en 2016 y en la cual, de la misma manera que en el presente trabajo, no se reportaron valores citotóxicos por parte del extracto metanólico de pétalos de la flor de *D. inoxia* a concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Con los resultados obtenidos y los reportados se observa que los extractos de *D. inoxia* no presentan citotoxicidad a bajas concentraciones, y que es necesario incrementar la concentración para que se presenten los fenómenos de citotoxicidad y reducción de la viabilidad celular, por lo tanto; resultan en una

opción factible para ser considerados una opción terapéutica y continuar con los análisis enfocados en los fenómenos de neuroprotección. Sin embargo, no se han reportado resultados de evaluaciones realizadas en líneas celulares neuronales. Por lo tanto, resulta difícil comparar los resultados obtenidos en el presente estudio a causa de la falta de bibliografía existente al respecto. De los resultados obtenidos se observa que el fenómeno de neurotoxicidad de los extractos de *D. inoxia* solo se presenta a concentraciones altas (100 µg/ml y 200 µg/ml), que es comparable con los resultados reportados en otras líneas celulares “normales” no tumorales, en los cuales también solo se presenta citotoxicidad a concentraciones altas (Cheshomi, *et al.* 2016; Fatima, *et al.* 2015; Roy, *et al.* 2016). El análisis estadístico realizado confirma que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los extractos y su actividad citotóxica y neurotóxica a concentraciones altas y concentraciones bajas.

En el caso de *T. diffusa*, se obtuvieron valores de IC₅₀ de >200 µg/mL para el extracto etanólico, 86.99 µg/mL para el extracto hexánico y 27.85 µg/mL para el extracto clorofórmico, siendo este último el más citotóxico, mientras que, el extracto etanólico fue el menos citotóxico. No se han reportado ensayos de citotoxicidad en línea celular VERO; sin embargo; se han realizado ensayos de actividad citotóxica en otras células “no tumorales”, entre las células empleadas se encuentran el cultivo primario de células mononucleares de bazo de ratón Balb/c la cual se expuso al extracto metanólico de hojas y tallos de la planta en concentraciones de 5, 50 250 y 2500 µg/mL y presentó citotoxicidad a concentración de 2.5 mg/mL, mediante el ensayo exclusión por azul de tripano,

realizado por Salazar y cols. Además, Avelino y cols realizaron la evaluación del extracto metanólico de hojas y tallos de la planta a concentraciones de 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 y 100 µg/mL mediante el ensayo de MTT en fibroblastos humanos con un IC₅₀ de 63.24 ± 3.26 µg/mL, También, por parte de Gomes y cols realizaron el ensayo de citotoxicidad del extracto hidroetanólico de la parte aérea de la planta a concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/mL en cultivo primario de astrocitos de corteza de rata mediante la técnica de colorante Hoechst 33342 observándose que la citotoxicidad se presentaba a concentraciones superiores a 100 µg/mL hasta 1000 µg/mL (Avelino, *et al.* 2015; Gomes, *et al.* 2016; Salazar, *et al.* 2008).

De esta manera se observa que el fenómeno de citotoxicidad por extractos de *T. diffusa*, se presenta a altas concentraciones y varía de acuerdo al tipo de extracto y de la línea celular empleada. Respecto al extracto etanólico empleado en el presente estudio, no resultó citotóxico a las concentraciones evaluadas y es equiparable a lo reportado por Gomes y Salazar. En el caso de la evaluación de neurotoxicidad, Bernardo y cols establecieron que a concentraciones superiores de 0.500 mg/mL del extracto acuoso se produjo el efecto de neurotoxicidad en la línea celular SH-SY5Y (neuroblastoma). En el presente trabajo el extracto con menor actividad neurotóxica fue el extracto etanólico (T1), ya que, el fenómeno de neurotoxicidad se presentó a concentraciones altas (100 µg/mL y 200 µg/mL), posteriormente el extracto T2 presentó neurotoxicidad a concentraciones de 25 µg/mL a 200 µg/mL y el extracto con mayor actividad neurotóxica fue el extracto T3 pues la actividad neurotóxica disminuyó hasta la

concentración de 6.25 µg/mL. Sin embargo, el análisis estadístico realizado confirma que no existen diferencias estadísticas significativas entre la actividad neurotóxica de los extractos a bajas y altas concentraciones. Mientras que, para el caso de la actividad citotóxica, sí existe diferencia significativa, resultando así en que el extracto T3 es más citotóxico que el extracto T1 y T2 a todas las concentraciones evaluadas. Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado bibliográficamente, se observa que existen similitudes respecto al efecto citotóxico con la línea celular SH-5YSY (Bernardo, *et al.* 2017; Gomes, *et al.* 2016).

4.2 Actividad neuroprotectora *D. inoxia*

Para la evaluación de actividad neuroprotectora, se observó que los extractos D1 y D2 comenzaron a tener actividad similar al control de ácido ascórbico a concentración de 50 µg/mL, ya que se obtuvieron valores de viabilidad celular de 45.99% y de 44.52%, respectivamente. Mientras que el control de neuroprotección presentó valores de 45.65%. Se observó que conforme disminuye la concentración de extracto, incrementaba el valor de viabilidad celular expuesta al proceso de excitotoxicidad por glutamato 5 mM y conforme al análisis estadístico realizado, se puede observar que los extractos tienen efecto similar al control de neuroprotección empleado (ácido ascórbico 100 µM) y que el extracto que más desplazó el valor de viabilidad celular fue el

extracto D2 por encima del control negativo (glutamato 5 mM). De acuerdo con la investigación bibliográfica realizada, no se han realizado ensayos de la evaluación del efecto neuroprotector de extractos de *D. inoxia* en líneas celulares neuronales.

Acorde a lo establecido en las respuestas celulares resultantes en el proceso de excitotoxicidad por glutamato, el efecto neuroprotector puede darse como resultado de actividad antioxidante por parte de los extractos de la planta evaluados. De esta manera, en el ensayo de actividad antioxidante de *D. inoxia* se obtuvieron resultados de porcentaje de inhibición menores al 10% y valores de IC₅₀ de >200 µg/mL, siendo menor la actividad antioxidante en comparación con el ácido ascórbico empleado como control positivo, el cual tuvo valores de IC₅₀ de 8.0 µg/mL observándose mucho mayor actividad del control. Otros estudios han determinado actividades de captación de radical DPPH mayores, entre estos resultados se encuentran valores de IC₅₀ de 58.6 ± 0.5 µg/ml para el extracto metanólico de las hojas de la planta de acuerdo a lo declarado por Hajimehdipoor y cols en 2016. Fátima y cols en 2015 reportaron mayor actividad por el extracto acuoso de la hoja con un valor de IC₅₀ de 22.83 µg/ml y el extracto con menor actividad fue el n-hexano con valor de IC₅₀ de 383.31 µg/mL. Se observa que existen diferencias considerables entre lo reportado y lo obtenido en el presente estudio respecto a actividad antioxidante de los extractos de la hoja, ya que existe diferencia entre los resultados con mayor actividad antioxidante y el tipo de solvente empleado, mientras Hajimehdipoor reporta mayor actividad antioxidante para los extractos de disolventes polares como el extracto

metanólico, Fátima y cols reportaron mayor actividad para el extracto de tallo de etil acetato que es poco polar y para el extracto acuoso de la hoja y que el extracto acuoso del fruto resultó ser el de mayor actividad para esta parte anatómica de la planta, y en el caso del presente trabajo, el extracto con mayor actividad corresponde al etanólico, siendo este el más polar de los solventes empleados. Ananth y cols en 2015 obtuvieron que el extracto con mayor actividad antioxidante fue el hexánico con un IC_{50} de $81.34 \pm 2.94 \mu\text{g/mL}$, de esta manera difiriendo de lo reportado con anterioridad respecto al tipo de extracto con mayor actividad antioxidante y siendo en este caso el solvente menos polar el que presentó mayores resultados. En 2017, Fátima y cols realizaron la determinación de la actividad antioxidante de extracto etanólico de hojas y frutos de la planta y declararon porcentajes de inhibición de DPPH de 50.33% y 77.33% en hojas y frutos, respectivamente; que en comparación con los resultados obtenidos en el presente trabajo, expresados en porcentaje de inhibición fueron menores de 10%, el extracto D1 resultó ser el de mayor porcentaje de inhibición con 6.69% a concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, existen diferentes factores que afectan la actividad antioxidante de los distintos extractos de las plantas y resulta difícil establecer de manera universal el extracto con mayor actividad antioxidante. El análisis estadístico realizado señaló que existen diferencias estadísticamente significativas entre la actividad antioxidante de los tres extractos, siendo que los extractos D1 y D2 presentan mayor actividad que el extracto D3 (Ananth, *et al.* 2015; Fatima, *et al.* 2015, 2017; Hajimehdipoor, *et al.* 2016).

Para evaluar si la inhibición de apoptosis era otro posible mecanismo de neuroprotección, se realizó el ensayo de inhibición de actividad de caspasa-3 (Figura 14), en la que al realizar el análisis estadístico, se observó que no existía diferencia estadística entre la actividad de caspasa-3 y el control positivo de neuroprotección. Actualmente no se han realizado estudios de neuroprotección o de inhibición de caspasa-3 a extractos de *D. inoxia*, por lo tanto, no es posible comparar los resultados con algún antecedente existente.

4.3 Actividad neuroprotectora *T. diffusa*

En el ensayo para la determinación de actividad neuroprotectora, a concentraciones altas (50 µg/mL a 200 µg/mL) no se observó dicho efecto, puesto que, conforme al análisis estadístico, no existieron diferencias entre el control positivo de neuroprotección (ácido ascórbico 100 µM) y los tres extractos evaluados a dichas concentraciones. Sin embargo, a concentraciones bajas (3.125 µg/mL a 25 µg/mL), no existió diferencia estadísticamente significativa entre los extractos evaluados y el control positivo, considerando de esta forma que presentaban actividad similar. En 2017, Bernardo y cols mediante un modelo similar de neuroprotección, establecieron que el pretratamiento con extracto acuoso de *T. diffusa* retrasa el daño oxidativo ocasionado por el proceso de excitotoxicidad mediada por glutamato y desplazó el valor de LC₅₀ mediante la reducción de especies reactivas intracelulares. Cabe destacar que Porres y cols

evaluaron el potencial neuroprotector de los monoterpenos α -pineno y 1,8-cineol contra estrés oxidativo inducido por H_2O_2 en la línea celular PC-12 y reportaron los efectos de protección de viabilidad celular y morfología, inhibición de producción de ROS, atenuación de cambios inducidos por H_2O_2 en el estado de antioxidantes endógenos y reducción de la actividad de caspasa-3. Y conforme a lo reportado por Alcaráz y cols en 2007, ambos monoterpenos (α -pineno y 1,8-cineol) se encuentran presentes en *T. diffusa* (Alcaraz, *et al.* 2007; Bernardo, *et al.* 2017; Porres, *et al.* 2016).

Considerando que el efecto de neuroprotección se puede deber a la actividad antioxidante de los extractos, en los resultados de captación de DPPH por los extractos de *T. diffusa* se observa el mayor porcentaje de inhibición de 36.23% a concentración de 200 μ g/mL obtenido por el extracto etanólico (T1) y cabe destacar, que en las evaluaciones de citotoxicidad no se presentó esta actividad a dicha concentración. El menor porcentaje de inhibición corresponde al extracto clorofórmico (T3), ya que a valores no citotóxicos (25 μ g/mL), su actividad antioxidante fue de 7.06 % siendo que en comparación por lo reportado por Salazar y cols en 2008 fueron valores de $75.3 \pm 5.8\%$ de actividad antioxidante del extracto metanólico de las hojas a concentración de 1 mg/mL. Torres y cols en 2011 reportaron actividad antioxidante de $82.4 \pm 4.6\%$ para el extracto hidroalcohólico de hojas a concentración de 1000 μ g/mL. Respecto a lo obtenido por el análisis estadístico, se observa que el extracto T1 tiene mayor actividad antioxidante que los extractos T2 y T3 al existir diferencia estadística entre ellos. De acuerdo a lo declarado por Garza y cols en 2011 uno de los

compuestos con mayor actividad antioxidante es luteolina 8-C- β -[6-deoxi-2-O-(α -1-ramnopiranozil)-xilo-hexopiranos-3-ulosido]. Cuyo IC₅₀ es de 5.56 μ g/mL y solo se encuentra reportado en *T. diffusa* como fuente de origen natural (Garza, *et al.* 2011; Salazar, *et al.* 2008; Torres, *et al.* 2011).

Para establecer si la inhibición de apoptosis podría ser otro posible mecanismo de neuroprotección, se realizó el ensayo de inhibición de actividad de caspasa-3 (Figura 14), en la que al realizar el análisis estadístico, se observó que no existía diferencia estadística entre la actividad de caspasa-3 y el control positivo de neuroprotección. Conforme a lo reportado por Porres y cols respecto a la inhibición de la actividad de la caspasa-3, se observan diferencias, ya que, en sus resultados el H₂O₂ induce el doble de porcentaje respecto al control; es decir un 200.64 \pm 2.7% y la reducción de la actividad por parte de los monoterpenos fueron del 70% para ambas concentraciones evaluadas de 1,8-cineol y la reducción de 50% a 25 μ M y 30% a 10 μ M de α -pineno; mientras que en los resultados obtenidos en el presente trabajo no se observó reducción de la actividad de la caspasa-3 respecto el grupo control. Sin embargo, mediante el análisis estadístico no se observó diferencias estadísticamente significativas entre el extracto T1 y el control positivo de neuroprotección empleado (ácido ascórbico 100 μ M). Cabe destacar que son metodologías que difieren respecto al inductor de la caspasa-3, así como de las concentraciones de los monoterpenos que se emplearon y el contenido presente en los extractos evaluados.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Los extractos D1, D2, D3 y T1 no son citotóxicos en línea celular VERO en todas las concentraciones evaluadas mientras que el extracto T2 no es citotóxico en el rango de 3.125 µg/mL a 50 µg/mL. El extracto T3 es citotóxico en todas las concentraciones evaluadas.

Los extractos D1, D2 y D3 no son neurotóxicos en línea celular PC-12 a bajas concentraciones. El extracto T1 no es neurotóxico a concentraciones de 3.125 µg/mL a 50 µg/mL. Mientras que, el extracto T2 no es neurotóxico a partir de 12.5 µg/mL y en el caso del extracto T3 no es neurotóxico en concentraciones de 3.125 µg/mL y 6.25 µg/mL.

Los extractos D1 y D2 presentan efecto neuroprotector a partir de la concentración de 3.125 µg/mL a 50 µg/mL, mientras que el extracto D3 lo presenta en el rango de 3.125 µg/mL a 12.5 µg/mL. Los extractos T1, T2 y T3 presentaron efecto neuroprotector en el rango de 3.125 µg/mL a 12.5 µg/mL.

Los extractos D1, D2 y D3 presentan una baja actividad antioxidante con valor de porcentaje de inhibición <10% en todas las concentraciones evaluadas. Por otra parte, el extracto T1, es el que presenta mayor actividad antioxidante a una concentración de 200 µg/mL.

Los extractos D1 y T1 presentaron actividad antiapoptótica similar al control positivo de neuroprotección.

Los extractos D1 y T1 representan las mejores opciones, ya que, presentaron actividad neuroprotectora similar al control positivo de neuroprotección en línea celular PC-12 a partir de concentración de 3.125 µg/mL hasta 12.5 µg/mL. Además, fueron los que menos efectos citotóxicos y neurotóxicos presentaron a bajas concentraciones.

La hipótesis propuesta es aceptada, ya que, un extracto de *D. inoxia* y un extracto de *T. diffusa* presentaron efecto neuroprotector en el modelo *in vitro* de neurotoxicidad por glutamato.

CAPÍTULO 6

6.1 REFERENCIAS

1. Abbas, M., Shahid, M., Sheikh, M., Muhammad, G. 2014. "Phytochemical screening of plants used in folkloric medicine: Effect of extraction method and solvent". *Asian Journal of Chemistry* 26(18):1–6. (2014).
2. Abdipranoto, A., Wu, S., Stayte, S. y Vissel, B. 2008. "The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development". *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 7(2):187–210. (2008).
3. Alcaraz, L., Real, s., Suchy, V. y Svajdenka, E. 2007. "Differences in essential oil production and leaf structure in pheno-types of damiana (*Turnera diffusa* willd." *Journal of Plant Biology* 50(3):378–82. (2007).
4. Ananth, A. y S. Rajan. "In-vitro antioxidant activity of *Datura stramonium* L . leaves". *Pelagia Research Library*. 6(4):147–51. (2015).
5. "Vero ATCC ® CCL-81™ Cercopithecus aethiops kidney normal". Fecha

de acceso: 11 de abril de 2018 (<https://www.atcc.org/Products/All/CCL-81.aspx#culturemethod>).

6. Arulvasu, C., Shakthi, S.K., Babu, G. y Radhakrishnan, N. "Purification and identification of bioactive protein from leaves of *Datura innoxia* P.mil". *Biomedicine and Preventive Nutrition* 4(2):143–49. (2014).
7. Arun, T., Tomassini, V., Sbardella E. 2013. "Targeting ASIC1 in primary progressive multiple sclerosis: evidence of neuroprotection with amiloride". *Brain* 136(1):106–15. (2013).
8. Avelino, M.C., Cruz, M.C., Jiménez, F.E. y Reyes, J. "Cytotoxic activity of the methanolic extract of *Turnera diffusa* Willd on Breast Cancer Cells". *Journal of Medicinal Food* 18(3):299–305. (2015).
9. Bernardo, J., Ferreres, F., Gil A., Valentão, P. y Andrade, P. "Medicinal species as MTDLs: *Turnera diffusa* Willd. Ex Schult inhibits CNS enzymes and delays glutamate excitotoxicity in SH-SY5Y cells via oxidative damage". *Food and Chemical Toxicology* 106:466–76. (2017).
10. Bezerra, A.G., Mendes, F.R., Tabach, R. y Carlini, E.A. "Effects of a hydroalcoholic extract of *Turnera diffusa* in tests for adaptogenic activity". *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(1):121–27. (2011).
11. Bezerra, A., Smaili, S., Silva, G., y Carlini, E. "Effects of Panax ginseng, *Turnera diffusa* and *Heteropterys tomentosa* extracts on hippocampal apoptosis of aged rats". *Einstein (São Paulo)* 11(55 11):163–67. (2013).
12. Burns, A. y S. Iliffe. "Alzheimer's disease". *Bmj* 338(1):b158–b158.

Recuperado (<http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.b158>). (2009).

13. Cadet, J. y Davies, K. "Oxidative DNA damage & repair: An introduction". *Free Radical Biology and Medicine* 107:2–12. (2017).
14. Chen, J.J., D. Pharm, y Swope, D. "Pharmacotherapy for Parkinson ' s disease". *Pharmacotherapy*. Vol (27)12Pt 2:161S-173S. (2007)
15. Cheshomi, H., Aldaghi, L.S. y Seresht, H.R. "Cytotoxicity of the methanol extract of *Datura innoxia* Petals on MCF-7 and HEK-293 Cell Lines". *Journal of Biomedicine* 1(2). (2016).
16. Clark, I.A. y Vissel, B. "Excess cerebral TNF causing glutamate excitotoxicity rationalizes treatment of neurodegenerative diseases and neurogenic pain by anti-TNF agents". *Journal of Neuroinflammation* 13(1):236. (2016).
17. CONABIO. "*Datura innoxia* - ficha informativa". Fecha de acceso: 13 de marzo de 2018 (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/datura-innoxia/fichas/ficha.htm>).
18. CONAFOR - CONABIO. "Fichas técnicas del Sistema de Información para la Reforestación *Turnera diffusa* Willd". Fecha de acceso: 13 de marzo de 2018 ([http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/1014Turnera diffusa.pdf](http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/1014Turnera%20diffusa.pdf)).
19. Denizot, F. y Lang, R. "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival". *Journal of Immunological Methods* 89(2):271–77. (1986).

20. Díaz, A. y Ríos, C. “Agentes Y Mecanismos Neuroprotectores Relacionados”. *Mensaje Bioquímico* XXXVI:171–99. (2012).
21. Dorado, C., Vargas, C. y Arancibia, S. 2003. “Estrés oxidativo y neurodegeneración”. *Medigraphic.com MG Rev Fac Med UNAM* 46(6). (2003).
22. Elkouzi, A. “Parkinson’s Foundation: Better Lives. Together.” Fecha de acceso: 13 de marzo de 2018 (<http://www.parkinson.org/understanding-parkinsons/what-is-parkinsons>).
23. Esmaeili, S., Irani, M., Zehan, M., Keramatian, B., Harandi, T.Z., Moghadam, M. “Cytotoxic Activity of Some Medicinal Plants from Iran”. 3(1):43–47. (2016).
24. Fallas, M. “Esclerosis lateral amiotrófica”. *Revista medica de costa rica y centroamerica* 67(591):89–92. (2010).
25. Fatima, H., Khan, K., Zia, M., Ur-Rehman, T., Mirza, B. Haq, I. “Extraction optimization of medicinally important metabolites from *Datura innoxia* Mill.: An in vitro biological and phytochemical investigation”. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15(1). (2015).
26. Fatima, I., Hussain, T., Rafay, M., Akram, M., Bano, S. y Shabbir, S. “Evaluation of antioxidant activity of leaves and fruits extracts of five medicinal plants”. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 30(5):1625–28. (2017).
27. Garza, A., Salazar, M.L., Salazar, R., Pérez, J. y Waksman, N. “Correlation

- between chromatographic fingerprint and antioxidant activity of *Turnera diffusa* (Damiana)". *Planta Medica* 77(9):958–63. (2011).
28. Gomes, A., Negri, G., Duarte, J.M., Smalli, S.S. y Carlini, E.A. "Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of *Turnera diffusa* Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death". *Einstein (São Paulo)* 14(1):56–63. (2016)
29. Hajimehdipoor, H., L. Ara, H. Moazzeni, y S. Esmaili. "Evaluating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of some plants from Kohgiluyeh va Boyerahmad province , Iran". 3(6):1–7. (2016).
30. Katzung, B. G. 2016. "Introducción : naturaleza , desarrollo y regulación de los fármacos". en *Farmacología básica y clínica Lange*. (2016).
31. Kursinszki, L., Hank, H., László, I. y Szke, E. "Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 β - hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A* 1091(1–2):32–39. (2005).
32. Lau, A. y M. Tymianski. 2010. "Excitotoxicity". Pp. 515–35 en *Comprehensive Toxicology*, vol. 13. (2010).
33. Mason, S.L. y Barker, R.A. "Advancing pharmacotherapy for treating Huntington's disease: a review of the existing literature". *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 17(1):41–52. (2016).
34. Michels, L "A question of balance." *Nature* 452(1–2):707–8. (2008).

35. Mustafa, B., Mustafa, I., Cahfer, G. Selcuk, E. y Serkan, D. "Anticholinergic toxicity related to the use of *Datura innoxia*". *Journal of emergency medicine: Case reports* (2):24–26. (2017).
36. Nguyen, T.K.O., Jamali, A., Lanoue, A., Gontier, E. y Dauwe, R. "Unravelling the architecture and dynamics of tropane alkaloid biosynthesis pathways using metabolite correlation networks". *Phytochemistry* 116(1):94–103. (2015).
37. Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T. y Ono, M. "DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24(10):1202–5. (2001).
38. Piacente, S., Camargo, E.S.S., Zampelli, A., Gracioso, J.S., Souza, A.R., Pizza, C. y Vilegas, W. "Flavonoids and arbutin from *Turnera diffusa*". *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 57(11–12):983–85. (2002).
39. Porres, M., González, E., Carretero, M.E. y Gómez, M.P. "In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole against H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells". *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 71(7–8):191–99. (2016).
40. "EnzChek® Caspase-3 Assay Kit # 2". *Cell* 2–4. Molecular Probes. (2003).
41. Rodríguez, J., V. Díaz, Y. Rojas, Y. Rodríguez, y E. Núñez. "Actualización

- en enfermedad de Huntington”. *General Universitario Vladimir Ilich Lenin* 17(1):546–57. (2013).
42. Rowland, LP. y Shneider, NA. “Amyotrophic Lateral Sclerosis”. *New England Journal of Medicine* 344(22):1688–1700. (2001).
43. Roy, S., Pawar, S. y Chowdhary, A. “Evaluation of in vitro cytotoxic and antioxidant activity of *Datura metel* Linn. and *Cynodon dactylon* Linn. extracts”. *Pharmacognosy Research* 8(2):123. (2016).
44. Saki, K., Bahmani, M., Rafieian, M., Hassanzadazar, H., Dehghan, K., Bahmani, F. y Asadzadeh, J. “The most common native medicinal plants used for psychiatric and neurological disorders in Urmia city, northwest of Iran”. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(S2):S895–901. (2014).
45. Salazar, R., Pozos, E., Cordero, P., Perez, J., Salinas, C. Waksman, N. “Determination of the antioxidant activity of plants from northeast Mexico”. *Pharmaceutical Biology* 46(3):166–70. (2008).
46. Scarlato, E. y Ferrari, L.A. “Daturas y brugmansias. Las aliadas de los brujos”. *Ciencia e investigación* 2(66):6–18. (2016).
47. Soriano, L.A.A., Alcaraz, L., Méndez, L.C., Puente, M.E., Rivera, F. y Zenteno, T. “Antioxidant responses of damiana (*Turnera diffusa* Willd) to exposure to artificial ultraviolet (UV) radiation in an *in vitro* model; part I; UV-C radiation.” *Nutrición hospitalaria* 29(5):1109–15. (2014).
48. Stocchetti, N., Taccone, F., Citerio, G. “Neuroprotection in acute brain injury: An up-to-date review”. *Critical Care* 19(1):186. (2015).

49. Torres, L., Muñoz, L.E., Rivas, A.M., Trujillo, K., Salazar, R., Waksman, N. y Cordero, P. "Protective effect of four Mexican plants against CCl₄ - induced damage on the Huh7 human hepatoma cell line". *Annals of Hepatology* 10(1):73–79. (2011).