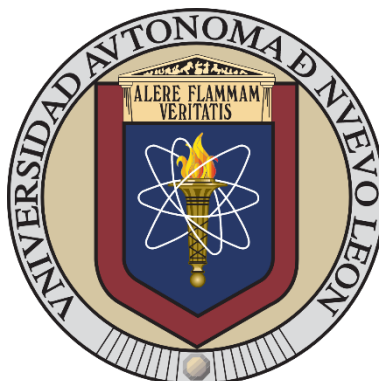


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE  
EXTRACTOS DE *Oenothera rosea* Y *Solanum nigrum* L.**

**Por**

**KEVIN LEONARDO LÓPEZ SIMENTAL**

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

**Diciembre 2022**

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *Oenothera rosea* Y *Solanum nigrum* L.

Aprobación de la Tesis

---

DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA

**Presidente**

---

DRA. KARLA RAMÍREZ ESTRADA

**Secretario**

---

DRA. PATRICIA GONZÁLEZ BARRANCO

**Vocal**

---

DRA. MARIA ELENA CANTÚ CARDENAS

**Sub-Directora de Posgrado**

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EXTRACTOS DE *Oenothera rosea* Y *Solanum nigrum* L.

Revisión de la Tesis

---

DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA  
**Asesora**

---

DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO  
**Co-Asesor**

---

DR. JUAN MANUEL DE JESÚS FAVELA HERNÁNDEZ  
**Co-Asesor externo**

---

DRA. PATRICIA GONZÁLEZ BARRANCO  
**Comité tutorial**

---

DRA. ELIZABETH OROZCO BELTRÁN  
**Comité tutorial**

---

DRA. KARLA RAMÍREZ ESTRADA  
**Comité tutorial**

---

DRA. MARIA ELENA CANTÚ CARDENAS  
**Sub-Directora de Posgrado**

## RESUMEN

Q.F.B Kevin Leonardo López Simental

Fecha de graduación: Diciembre 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del estudio:** Evaluación *in vitro* del efecto neuroprotector de extractos de *Oenothera rosea* y *Solanum nigrum* L.

**Número de páginas:** 73

Candidato al grado de maestría en  
Ciencias con Orientación en Farmacia

**Propósito y Método del estudio:** Las enfermedades a nivel neurológico surgen por alteraciones en la bioquímica, estructura o función del sistema nervioso central o periférico que pueden finalizar en la muerte neuronal, la degeneración de axones o la pérdida de células gliales. Las enfermedades neurodegenerativas más comunes alrededor del mundo son: la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, y otras como la epilepsia y el accidente cerebrovascular. En los últimos años ha habido un incremento considerable en el número de pacientes y muertes causadas por estos tipos de enfermedades alrededor del mundo, en el año 2019 según la Organización Mundial de la Salud se registraron un total de 533,172 muertes por este tipo de patologías. Aunque los tratamientos pueden ser de ayuda en las primeras etapas de las enfermedades estos suelen perder efectividad ya que sólo se enfocan en disminuir la sintomatología y no en detener el origen o la progresión de las patologías. Un mecanismo de toxicidad presente en estos padecimientos es la excitotoxicidad la cual ocurre al haber una sobre estimulación de los receptores de glutamato, lo cual ocasiona que aumente el flujo de calcio y se genere estrés oxidativo y apoptosis. La neuroprotección se define como la disminución del daño neuronal provocado por uno o más mecanismos tóxicos causantes: el estrés oxidativo, la acumulación de proteínas amiloides o la excitotoxicidad. Se ha observado que **algunas** plantas tienen la capacidad de proveer neuroprotección, por lo que es importante evaluar sus extractos. La planta *Oenothera rosea* L'Hér. ex Aiton es una planta que está ampliamente distribuida por el territorio mexicano, en la bibliografía se ha **reportado** que sus extractos poseen actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antioxidante, anticancerígena, así como efecto antiplaquetario e hipolipemiante. *Solanum nigrum* L. es una planta que se encuentra en todo el continente americano, en la bibliografía se **reportado** que posee actividad hepatoprotectora,

antimicrobiana, cardioprotectora, anticancerígena, analgésica, antiinflamatoria y antioxidante. Debido a que ambas plantas cuentan con metabolitos con actividad farmacológica **publicada**, es de interés realizar ensayos para evaluar si cuentan con propiedades neuroprotectoras. En el presente estudio se obtuvieron extractos de las plantas y se les evaluó la **neurotoxicidad** y su actividad neuroprotectora (usando el modelo por exposición a glutamato) en la línea celular PC12, mediante el ensayo de MTT y además se realizó un análisis fitoquímico cualitativo.

**Contribuciones y conclusiones:** De los 9 extractos evaluados, los extractos metanólicos de las hojas de *O. rosea*, de las hojas de *S. nigrum* y el extracto hexánico de los frutos de *S. nigrum* mostraron menor toxicidad, disminuyendo muy poco la viabilidad celular. Los extractos metanólicos presentaron efecto neuroprotector en las concentraciones de 25 a 6.25 µg/mL, mientras que el extracto hexánico de *S. nigrum* sólo presentó efecto neuroprotector a 25 µg/mL.

#### **Firma de los directores de tesis**

---

DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA  
**Directora de Tesis**

---

DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO  
**Co-Director**

---

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

## AGRADECIMIENTOS



A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el financiamiento del proyecto.



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



A la Facultad de Ciencias Químicas por brindar la infraestructura necesaria para  
el proyecto.

Agradezco la Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera por su gran disposición y  
apoyo para que el proyecto se terminara en tiempo y forma.

Al Dr. Omar González Santiago por su constante apoyo a lo largo del proyecto.

Al Dr. Juan Manuel J. Favela Hernández por la estancia de investigación y por proporcionar los extractos utilizados en el proyecto.

Al jefe del Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos, el Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza, por siempre estar atento, teniendo disponibles los materiales y equipos del laboratorio que se utilizaron en el trabajo.

A Jesús Vélez por brindarme la capacitación para trabajar en el cuarto de cultivo celular y por su constante apoyo para resolver dudas de la parte experimental a lo largo del proyecto.

A la jefa del Laboratorio de Metabolismo Celular, la Dra. Karla Ramírez Estrada por permitirme realizar las pruebas fitoquímicas cualitativas y estar siempre al pendiente de lo que necesitara.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Patricia González Barranco, la Dra. Elizabeth Orozco Beltrán y la Dra. Karla Ramírez Estrada por sus observaciones y comentarios.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, a mis padres Juan López y Laura Simental por brindarme su cariño y apoyo incondicional para lograr cualquiera de mis objetivos, a mis hermanas Melissa López y Ana López por estar siempre en la mejor disposición para ayudarme y escucharme.

A Ana Laura Valdez por estar siempre a mi lado, por ser una gran luz en mi vida, por ser mi mejor amiga y por motivarme a ser una mejor persona.

A mis amigos Guillermo, Antonio, Edgar, Rafael, Emmanuel, Sebastián y Roger por los grandes momentos que hemos pasado juntos, por estar siempre disponibles para escucharme o para pasar un rato alegre.



## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Enfermedades Neurológicas .....	1
1.1.2 Enfermedad de Parkinson.....	2
1.1.3 Enfermedad de Alzheimer.....	2
1.1.4 Enfermedad de Huntington .....	3
1.1.5 Esclerosis Lateral Amiotrófica .....	3
1.1.6 Epilepsia .....	4
1.1.7 Accidente Cerebrovascular .....	5
1.2 Mecanismos de Toxicidad en Enfermedades Neurológicas.....	5
1.2.1 Excitotoxicidad.....	6
1.2.1.1 Alta Concentración de Glutamato .....	6
1.2.1.2 Aumento del Flujo de Calcio .....	8
1.2.1.3 Producción de Óxido Nítrico .....	9
1.2.2 Estrés Oxidativo.....	10
1.3 Tratamiento de Las Enfermedades Neurológicas .....	11
1.4 Neuroprotección .....	12

1.5 Características de las Plantas <i>Oenothera rosea</i> y <i>Solanum nigrum</i> L. ....	15
1.5.1 <i>Oenothera rosea</i> .....	15
1.5.2 <i>Solanum nigrum</i> .....	17
1.6 Antecedentes .....	18
1.7 Justificación.....	20
1.8 Hipótesis .....	21
1.9 Objetivo General .....	21
1.9.1 Objetivos Específicos.....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
2.1 Material y Reactivos .....	23
2.1.1 Material Biológico .....	23
2.1.2 Equipos e Instrumentos .....	23
2.1.3 Reactivos.....	24
2.2 Extractos .....	25
2.3 Métodos .....	26
2.3.1 Ensayo Preliminar de Neurotoxicidad .....	27
2.3.2 Evaluación de la Neurotoxicidad de los Extractos.....	28
2.3.3 Evaluación de la Neuroprotección de los Extractos.....	28
2.3.4 Análisis Fitoquímico Cualitativo.....	29
2.4 Análisis de Resultados .....	30
2.5 Disposición de Residuos .....	30
3. RESULTADOS.....	32

3.1 Evaluación Neurotóxica Preliminar .....	32
3.1.2 <i>Oenothera rosea</i> .....	33
3.1.2 <i>Solanum nigrum</i> .....	34
3.2 Evaluación de la Actividad Neurotóxica.....	35
3.2.1 Evaluación Neurotóxica del extracto Metanólico de las Hojas de <i>Oenothera rosea</i> .....	35
3.2.2 Evaluación Neurotóxica del Extracto Metanólico de las Hojas de <i>Solanum nigrum</i> .....	37
3.2.3 Evaluación Neurotóxica del Extracto Hexánico de los frutos de <i>Solanum nigrum</i> .....	38
3.3 Evaluación de la Actividad Neuroprotectora .....	39
3.3.1 Evaluación de la Actividad Neuroprotectora del Extracto Metanólico de las Hojas de <i>Oenothera rosea</i> .....	40
3.3.2 Evaluación de la Actividad Neuroprotectora del Extracto Metanólico de las Hojas de <i>Solanum nigrum</i> .....	41
3.3.3 Evaluación de la Actividad Neuroprotectora del Extracto Hexánico de frutos de <i>Solanum nigrum</i> .....	42
3.4 Análisis Fitoquímico .....	44
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	45
4.1 Neurotoxicidad de los Extractos .....	45
4.1.1 Neurotoxicidad del Extracto Metanólico de Hojas <i>Oenothera rosea</i> .....	45
4.1.2 Neurotoxicidad del Extracto Metanólico de Hojas de <i>Solanum nigrum</i> .....	46
4.1.3 Neurotoxicidad del Extracto Hexánico de Frutos de <i>Solanum nigrum</i> .....	47

4.2 Actividad Neuroprotectora de los Extractos .....	48
4.2.1 Actividad Neuroprotectora del Extracto Metanólico de Hojas de <i>Oenothera rosea</i> .....	48
4.2.2 Actividad Neuroprotectora del Extracto Metanólico de Hojas de <i>Solanum nigrum</i> .....	49
4.2.3 Actividad Neuroprotectora del Extracto Hexánico de Frutos de <i>Solanum nigrum</i> .....	50
5. CONCLUSIONES.....	52
6. REFERENCIAS.....	54

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Medicamentos Utilizados para Enfermedades Neurológicas	13
II. Ejemplos de Metabolitos con Actividad Farmacológica	15
III. Resultados de Pruebas Cualitativas	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	<i>Oenothera rosea</i>	17
2.	<i>Solanum nigrum</i>	19
3.	Evaluación neurotóxica de los extractos de <i>O. rosea</i>	36
4.	Evaluación neurotóxica de los extractos de <i>S. nigrum</i>	37
5.	Evaluación neurotóxica del extracto metanólico de hojas de <i>O. rosea</i>	38
6.	Evaluación neurotóxica del extracto metanólico de hojas de <i>S. nigrum</i>	39
7.	Evaluación neurotóxica del extracto hexánico de frutos de <i>S. nigrum</i>	41
8.	Evaluación de la actividad neuroprotectora del extracto metanólico de hojas de <i>O. rosea</i>	43
9.	Evaluación de la actividad neuroprotectora del extracto metanólico de hojas de <i>S. nigrum</i>	45
10.	Evaluación de la actividad neuroprotectora del extracto hexánico de frutos de <i>S. nigrum</i>	46

## LISTA DE SÍMBOLOS

\*  $P \leq 0.05$

\*\*  $P \leq 0.01$

\*\*\*  $P \leq 0.001$

## NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ANOVA	Análisis de varianza
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
Apaf-1	Factor activador de la proteasa apoptótica
C9orf72	Cromosoma 9 fragmento abierto de lectura 72
cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAAT	Transportadores de aminoácidos excitatorios
FUS	Proteína de unión al ARN FUS
GABA	Ácido gamma-amino butírico
HT-22	Línea celular de neuronas de hipocampo de ratón



L	Litros
m	Metros
MCU	Uniportador Mitocondrial de Calcio
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaOH	Hidróxido de sodio
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
OCLO	Extracto clorofórmico de hojas de <i>Oenothera rosea</i>
OHEX	Extracto hexánico de hojas de <i>Oenothera rosea</i>
OMET	Extracto metanólico de hojas de <i>Oenothera rosea</i>
PC-12	Línea celular de feocromocitoma de rata
RPMI-1640	Medio Roswell Park Memorial Institute
SHCLO	Extracto clorofórmico de hojas de <i>Solanum nigrum</i>
SHHEX	Extracto hexánico de hojas de <i>Solanum nigrum</i>

SHMET	Extracto metanólico de hojas de <i>Solanum nigrum</i>
SFCLO	Extracto clorofórmico de frutos de <i>Solanum nigrum</i>
SFHEX	Extracto hexánico de frutos de <i>Solanum nigrum</i>
SFMET	Extracto metanólico de frutos de <i>Solanum nigrum</i>
SOD1	Superóxido dismutasa 1
TARDBT	Proteína de unión al ADN TAR

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Enfermedades Neurológicas**

Las enfermedades neurológicas surgen por alteraciones en la bioquímica, estructura o función del sistema nervioso central o periférico que pueden finalizar en la muerte neuronal, la degeneración de axones o la pérdida de células gliales (Costa et al., 2011). Hoy en día las más comunes son: la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis amiotrófica lateral y los daños causados por un accidente cerebrovascular y la epilepsia, aunque cada uno de estos padecimientos cuenta con mecanismos patológicos específicos, también comparten algunos otros mecanismos de toxicidad de los que se hablará más adelante. En los últimos años ha habido un incremento considerable en el número de pacientes y muertes causadas por este tipo de enfermedades alrededor del mundo, en el año 2019 según la Organización mundial de la Salud se registraron un total de 533,172 muertes por este tipo de patologías (Feigin et al., 2021).

### 1.1.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la aparición de bradiquinesia, inestabilidad postural, rigidez y temblor en reposo, esto se debe a la muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y de neuronas noradrenérgicas en el locus coeruleus. El principal marcador de esta enfermedad son los cuerpos de Lewy (agregados de alfa sinucleína y otros componentes), los cuales son observados en estudios *post mortem* (Kouli et al., 2018). Del año 1990 al año 2016 el número de pacientes de esta enfermedad ha ido en aumento, de 2.5 a 6.1 millones alrededor del mundo y se proyecta que para el año 2040 alcance los 12 millones. En México hubo 68,715 pacientes y 2,299 muertes asociadas a esta enfermedad en el año 2016 (Dorsey et al., 2018; Erkinen et al., 2018).

### 1.1.3 Enfermedad de Alzheimer

Esta enfermedad se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo como pérdida de memoria, cambios de comportamiento, hasta llegar a una completa pérdida de la capacidad para realizar actividades cotidianas. El principal marcador de esta enfermedad es la acumulación del péptido beta-amiloide en

tejido cerebral, así como cambios en la estructura celular debido a la hiperfosforilación de la proteína asociada a microtúbulos Tau. Actualmente ocupa el primer lugar a nivel mundial ya que afecta a alrededor de 50 millones de pacientes alrededor del mundo (De-Paula et al., 2012; Lynch, 2020)

#### 1.1.4 Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington tiene como origen la mutación presente en la proteína llamada hungtintina que ocasiona que adquiera una conformación tóxica y que cause la muerte neuronal. Los síntomas aparecen entre los 30 y 50 años como una combinación de problemas motores, cognitivos y de comportamiento que empeoran hasta llegar a la muerte, la expectativa de vida de estos pacientes es de 15 a 20 años. Esta enfermedad cuenta con una variada prevalencia mundial de 2.71 por cada 100,000, se cree que en México hay alrededor de 8,000 pacientes con esta enfermedad (Bates et al., 2015; Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 2017)

#### 1.1.5 Esclerosis Lateral Amiotrófica

En la Esclerosis Lateral Amiotrófica el cerebro y la médula espinal se ven afectados principalmente por la agregación de proteínas como SOD1 y TDP-43,

mutaciones en los genes SOD1, FUS, C9orf72 y TARDBP están estrechamente relacionadas con esta enfermedad, se pueden observar síntomas como falla motora en las extremidades así como dificultad para hablar y deglutir, en estadios avanzados de la enfermedad incluso podría provocar la muerte por paro cardiorrespiratorio, la expectativa de vida de estos pacientes oscila entre 20 y 48 meses desde la aparición de síntomas que regularmente aparecen al inicio de la adultez. La incidencia de esta enfermedad en Norte América es de 5.20 y en Latinoamérica de 3.41 por cada 100,000 y en México hubo 6,000 casos diagnosticados al 2018 (Brown et al., 2021; Chio et al., n.d.; Consejo Nacional para el Desarrollo y la Inclusión de las Personas con Discapacidad, 2018).

#### 1.1.6 Epilepsia

Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de convulsiones causadas por la hiperexcitabilidad de las neuronas, así como descargas eléctricas repentinas y sincronizadas; causando alteraciones en las sensaciones, emociones, comportamiento, espasmos musculares y pérdida de conciencia. Hay diversos factores que pueden desencadenar esta patología, entre los cuales están los traumas en la cabeza, convulsiones en la niñez, hipoxia o una convulsión o serie de convulsiones que duren más de cinco minutos (*status epilepticus*), esto causa una liberación de glutamato excesiva lo que conduce finalmente a muerte neuronal (Green et al., 2021). La prevalencia de esta

enfermedad alrededor del mundo es del 1 al 2% la cual aumenta rápidamente ya que se estima que se diagnostican alrededor de 5 millones de pacientes año con año (World Health Organization, 2022). En México se contabilizaron al año 2017 entre 95,000 y 177,000 pacientes con epilepsia es decir del 1.08-2% (Valdés-Galván et al., 2019).

### 1.1.7 Accidente Cerebrovascular

El accidente cerebrovascular es la segunda causa de muerte más común y la tercera más común en causar discapacidad mundialmente. Hay dos principales tipos, isquémico y hemorrágico siendo el primero el más recurrente ya que el 87% de los ACV son de este tipo. El daño neuronal ocurre en el momento de isquemia en el tejido cerebral, lo que ocasiona un déficit de oxígeno y nutrientes que lleva a muerte neuronal. Durante este estado de isquemia la homeostasis iónica se ve afectada despolarizando la célula y liberando neurotransmisores, principalmente glutamato (Wu & Tymianski, 2018).

## **1.2 Mecanismos de Toxicidad en Enfermedades Neurológicas**

En todas las enfermedades que afectan el sistema nervioso central hay daños en las funciones normales de las neuronas, la excitotoxicidad es uno de los

principales factores neurotóxicos, en el que participan el glutamato, el aumento en el flujo de calcio, y el óxido nítrico, estos causan estrés oxidativo y crisis energéticas que promueven disfunción sináptica, daños en la plasticidad y muerte neuronal (Abushouk et al., 2017; Nishimura et al., 2021; Spencer & Lein, 2014).

### 1.2.1 Excitotoxicidad

El término excitotoxicidad se refiere a una sobreestimulación de los receptores de aminoácidos excitatorios causada por el aumento en las concentraciones de glutamato, este aumento puede darse por un desbalance en la síntesis, liberación y degradación del glutamato, este fenómeno ha sido observado en enfermedades neurodegenerativas, así como en accidente cerebrovascular y epilepsia. El aumento en el flujo de calcio por la activación del receptor ionotrópico de glutamato (NMDAR) es la principal vía de excitotoxicidad, en algunos tipos de células neuronales pueden ocurrir otros mecanismos de excitotoxicidad relacionados con glutamato (Lau & Tymianski, 2010; Pál, 2018).

#### 1.2.1.1 Alta Concentración de Glutamato

El glutamato es el aminoácido con mayor presencia en el cerebro (5-15 mmol/kg), siendo el mayor intermediario entre las señales del sistema nervioso central, para que ejerza su función, este tiene que ser liberado al espacio



extracelular por medio de exocitosis para ser reconocido por los receptores ionotrópicos del glutamato principalmente los tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR), una vez realizada su función es necesario que ocurra una recaptación de este neurotransmisor ya que una acumulación de este podría generar excitotoxicidad. La cantidad necesaria de glutamato para generar un daño neuronal es aproximadamente de 2-5  $\mu\text{M}$ , la recaptación es llevada a cabo por los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT1-5) los cuales son expresados por todas las células del sistema nervioso central, con mayor presencia en los astrocitos y oligodendrocitos, ya que en estos se realiza mayoritariamente el transporte de glutamato (95%) manteniéndolo a concentraciones bajas en el espacio extracelular, de 25-600nM (Green et al., 2021; Zhou & Danbolt, 2014). Los EAAT llevan a cabo el transporte de glutamato con la ayuda de la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ . Una vez que el glutamato se encuentra en el citosol del astrocito, la enzima glutamina sintetasa lo convierte a glutamina para posteriormente ser transportado al espacio extracelular, donde es tomado por la neurona post-sináptica donde actúa la enzima glutaminasa obteniendo nuevamente glutamato, éste es finalmente empaquetado en vesículas para su posterior liberación en el espacio sináptico (Green et al., 2021).

Existen diferentes tipos de receptores de glutamato entre los que se encuentran el  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole- propionic acid (AMPA), kainate, N-metil-D- aspartato (NMDA), y el receptor metabotrópico quisqualato sensitivo. Los receptores AMPA, kainato y NDMA están implicados en la

plasticidad sináptica y el aprendizaje, por otra parte, los receptores metabotrópicos se encargan de la activación de la fosfolipasa C o la disminución de AMP cíclico. El receptor NMDA cuenta con distintos sitios que le confieren actividad farmacológica agonista o antagonista, entre ellos se encuentran: un sitio de unión de glicina como co-agonista, un poro con permeabilidad para calcio, inhibición por zinc y un bloqueo dependiente de voltaje por el ion magnesio; así mismo este receptor es sensible al pH, en situaciones en las cuales el pH se encuentre disminuido por el aumento en la concentración de protones, como en convulsiones e isquemias, la actividad del receptor se inhibe (Lau & Tymianski, 2010). Como se ha mencionado anteriormente la activación del receptor NMDA ocasiona la mayor toxicidad neuronal, pero en la línea celular PC12 (modelo neuronal ampliamente utilizado) ocurre otro proceso tóxico independiente de este receptor, en el cual la interacción del glutamato con receptores no-NMDA ocasiona una disminución en las concentraciones de cistina que tendrán como consecuencia una reducción considerable de glutatión en el interior de la célula, esto provocará que se genere estrés oxidativo ya que el glutatión es uno de los principales agentes antioxidantes de las células (Kritis et al., 2015).

#### 1.2.1.2 Aumento del Flujo de Calcio

El  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para el correcto funcionamiento neuronal ya que está involucrado en el control de las respuestas dendríticas a los neurotransmisores,

en la regulación de la expresión génica, así como en el inicio de la liberación de los neurotransmisores desde los axones presinápticos terminales. Este ión se ubica principalmente en el espacio extracelular con una concentración de alrededor de 1.2 mM, en el citosol su concentración es mucho menor, esta se encuentra alrededor de los 100nM (Gleichmann & Mattson, 2011). Se ha demostrado que la excitotoxicidad es dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$ , el aumento de las concentraciones de este elemento en las neuronas está relacionado con muerte neuronal. La mitocondria tiene la capacidad de captar calcio para posteriormente liberarlo al citosol por medio del Uniportador Mitocondrial de Calcio (MCU), una prolongada despolarización puede aumentar la hidrólisis de ATP mediante la alteración en la actividad de la ATP sintasa causando una crisis energética. De igual forma el aumento en las concentraciones de calcio mitocondrial lleva a la formación de radicales libres y activación de caspasas (enzimas asociadas con la señal apoptótica).

#### 1.2.1.3 Producción de Óxido Nítrico

La producción de óxido nítrico es uno de los marcadores de excitotoxicidad ya que la sintasa de óxido nítrico neuronal se encuentra unida a los receptores NMDA por lo que también se ve afectada por la entrada de calcio, el aumento en las concentraciones de óxido nítrico ocasiona una inhibición reversible del complejo IV de la cadena respiratoria, esto es causado por la competencia del

óxido nítrico con el oxígeno, el óxido nítrico puede reaccionar con el oxígeno para formar peroxinitrilo un compuesto con poder superoxidante, el aumento en las concentraciones de óxido nítrico favorece la liberación de glutamato al espacio extracelular lo cual aumenta sus efectos tóxicos (Lau & Tymianski, 2010; Plotegher et al., 2021).

### 1.2.2 Estrés Oxidativo

La acumulación especies reactivas de oxígeno ocurre cuando hay una producción excesiva de estos o su neutralización es insuficiente, cuando esto pasa estos pueden ocasionar daños a proteínas, lípidos e incluso al material genético de las neuronas, lo cual se conoce como estrés oxidativo. La muerte neuronal mediada por estas sustancias se da principalmente cuando causan alteraciones en el complejo 1 de la mitocondria en la cadena transportadora de electrones ocasionando una considerable disminución en el ATP y liberación de citocromo C, el cual una vez en citoplasma se une al factor activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1), la cual se une a la caspasa 9 provocando la activación de la caspasa 3, dando como resultado apoptosis (Ott et al., 2007). La excitotoxicidad está relacionada con la generación de radicales libres, todos los receptores de aminoácidos excitatorios promueven la generación de estos compuestos mediante el aumento en las concentraciones de calcio el cual es posteriormente captado por la mitocondria (Lau & Tymianski, 2010).

### 1.3 Tratamiento de Las Enfermedades Neurológicas

Aunque actualmente existe una gran variedad de medicamentos para tratar las distintas patologías que afectan el sistema nervioso, la gran mayoría solo trata de aminorar los síntomas sin proporcionar un verdadero beneficio terapéutico que ayude a detener o curar la enfermedad en su totalidad (ver Tabla 1).

TABLA 1

#### Medicamentos Utilizados para Enfermedades Neurológicas

Patología	Medicamento	Grupo	Efecto causado
<b>Alzheimer</b> (Breijyeh & Karaman, 2020; Erkinen et al., 2018; Kornhuber et al., 1994)	Donepezilo	Inhibidores de la acetilcolin-esterasa	Este grupo de fármacos ayuda a mantener las concentraciones de acetilcolina
	Memantina	Antagonistas del receptor NMDA	Presentan efecto neuroprotector al regular la entrada de Ca <sup>2+</sup> en la célula
	Aducanumab	Anticuerpos monoclonales	Reduce las placas del péptido beta amiloide en el cerebro
<b>Parkinson</b> (Kalia & Lang, 2015)	Levodopa	Levodopa	Es convertida en dopamina
	Pramipexol	Agonistas de dopamina	Estimulan los receptores de dopamina
	Selegilina	Inhibidores de la mono amino oxidasa tipo B	Retrasa la degradación de dopamina
<b>Huntington</b> (Erkinen et al., 2018; Yero & Rey, 2008)	Tetrabenazina	Medicamentos para controlar el movimiento	Inhiben la recaptación de dopamina, norepinefrina y serotonina ocasionando su degradación
	Haloperidol	Antipsicóticos	Bloquea los receptores de dopamina
	Amantadina	Antagonistas del receptor NMDA	Presentan efecto neuroprotector al regular la entrada de Ca <sup>2+</sup> en la célula

<b>Esclerosis Lateral Amiotrófica</b> (Doble, 1996; Kiernan et al., 2011)	Riluzole	Antagonistas del receptor NMDA	Presentan efecto neuroprotector al regular la entrada de Ca <sup>2+</sup> en la célula, de igual forma inhibe la liberación de ácido glutámico.
<b>Epilepsia</b> (Khateb et al., 2021)	Ácido valproico	Anticonvulsivos	incrementa la actividad del receptor GABA, así como supresión de la neurotransmisión y la modificación de monoaminas

El uso de medicamentos neuroprotectores brinda una gran ayuda ya que sirven como coadyuvantes a las terapias ya que aunque estos no tengan una acción directa para la cura de la patología, brindan protección a eventos tóxicos que ocurren en todos estos tipos de enfermedades, tal es el caso del accidente cerebrovascular, en este padecimiento se busca proteger a las neuronas del desbalance de nutrientes que se presenta en un evento isquémico, recientemente se incluía el uso de Mg<sup>2+</sup> como neuroprotector, ya que este regula el flujo de calcio y previene la neurotoxicidad, este tratamiento de emergencia ha quedado en desuso debido a que se debe de administrar en los primeros minutos del evento isquémico (Powers et al., 2019).

#### 1.4 Neuroprotección

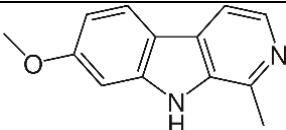
El término neuroprotección se refiere a la capacidad de una molécula o grupo de moléculas de prevenir la muerte de células neuronales, por medio de la

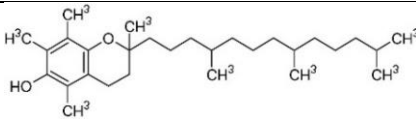
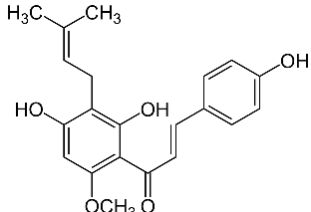
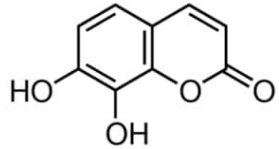
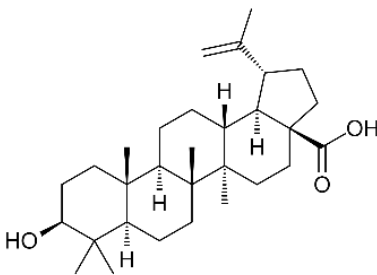
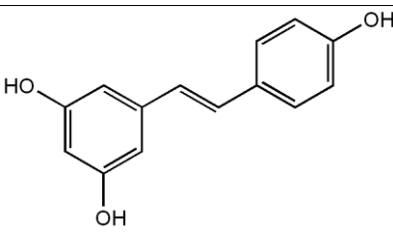
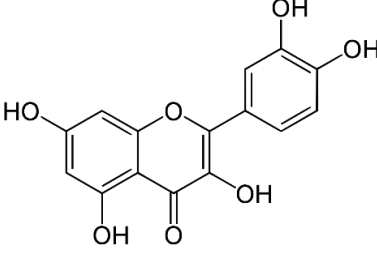
inhibición de procesos que generen toxicidad como la excitotoxicidad, estrés oxidativo y agregación de proteínas amiloides (Schapira, 2010).

Se ha observado que ciertos compuestos presentes en plantas poseen actividad neuroprotectora al disminuir considerablemente la muerte neuronal en estudios *in vitro* e *in vivo* (ver TABLA 2). Los principales compuestos activos son sintetizados mediante el metabolismo secundario vegetal y estos se clasifican en polifenoles, flavonoides, cumarinas, esteroides, terpenos y alcaloides. Los principales mecanismos de neuroprotección de estos compuestos son: la capacidad de captar radicales libres, la quelación de iones metálicos, la modulación de enzimas asociadas con estrés oxidativo (mieloperoxidasa, superóxido dismutasa, etc), la inhibición de generación de especies reactivas de oxígeno, modulación de la activación del receptor ionotópico de glutamato (NMDA), la atenuación del flujo de  $Ca^{2+}$  mitocondrial, disminuyendo la expresión de citocromo C previniendo la activación de la caspasa-3 y la reducción de los procesos inflamatorios (Mohamed et al., 2019; Pérez-Hernández et al., 2016).

TABLA 2

Ejemplos de Metabolitos con Actividad Farmacológica

Nombre	Planta de origen	Mecanismo	Estructura
Harmina (Alcaloide) (Li et al., 2011)	<i>Peganum harmala</i>	Promueve la expresión de transportadores	

		de aminoácidos excitatorios	
Vitamina E (Polifenol)  (Cong et al., 2016)	Diversas fuentes	Actividad antiapoptótica y antioxidante	
Xanthohumol (Flavonoide)  (C. C. Wang et al., 2020)	<i>Humulus lupulus</i> L	Inhibe la liberación de glutamato	
Dafnetina (cumarina)  (Yang et al., 2014)	<i>Daphne odora</i> Var. <i>marginata</i>	Inhibe la apoptosis neuronal, así como la sobrecarga de Ca <sup>+</sup>	
Ácido betulínico (terpenoide)  (González-Cofrade et al., 2019)	<i>Betula</i> sp	Disminuye la expresión de las enzimas NADPH oxidasa 2 (NOX2) y la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS)	
Resveratrol  (Fei et al., 2020)	<i>Vitis vinifera</i>	Disminuye la producción de óxido nítrico, aumenta la actividad de la superóxido dismutasa	
Quercetina  (Bavithra et al., 2012; Sachdeva et al., 2015)	Diversas fuentes	Disminuye el estrés oxidativo, toxicidad dopaminérgica, ayuda a mantener los niveles de dopamina, superóxido dismutasa y glutatión	



## 1.5 Características de las Plantas *Oenothera rosea* y *Solanum nigrum* L.

### 1.5.1 *Oenothera rosea*



**Figura 1.** *Oenothera rosea*

*Oenothera rosea* L'Hér. ex Aiton o *Hartmannia rosea* conocida comúnmente en México como hierba del golpe es una planta con origen en Mesoamérica, desde el sureste de Estados Unidos hasta países sudamericanos como Perú y Argentina, actualmente se encuentra en algunos países de Europa, Asia, África y Oceanía. En el territorio mexicano se encuentra en al menos 25 de los 32 estados, con mayor presencia en el centro y sur del país (GBIF Backbone Taxonomy, 2021; Mondragón Pichardo & Vibrans, 2009a). Cuenta con un tamaño de 15 a 50 cm de alto, con un tallo único que cuenta con hojas sinuado-dentadas pinnatífidas que dependiendo su ubicación pueden ir desde los 1.5 a 3 cm de

largo y de 0.6 a 2.5 cm de ancho, sus flores cuentan con pétalos obovados con un tamaño de 5 a 10 mm de largo de color rosa o morado (Mondragón Pichardo & Vibrans, 2009a).

Esta planta ha sido utilizada en la medicina tradicional desde la época de los pueblos Nahuas para tratar enfermedades estomacales, también se ha utilizado para tratar heridas, golpes, inflamación, enfermedades renales, dolor hepático, diarrea e infecciones de la piel (Argueta et al., 1994; Esquivel-García et al., 2018; Heinrich et al., 1998; Yazmín K Márquez-Flores et al., 2009; Meckes et al., 2004; Shawky et al., 2021; Vargas-Ruiz et al., 2020).

Se han observado distintos tipos de actividades farmacológicas en esta planta, entre los que destacan actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antioxidante, anticancerígena, así como efecto antiplaquetario e hipolipemiante.

Se han realizado estudios de la composición fitoquímica de diferentes extractos (etanol-agua, metanol, acetato de etilo, cloroformo y hexano) los cuales mostraron una alta concentración de compuestos fenólicos y flavonoides. El único compuesto aislado de esta planta es el quercetin 3-O- $\beta$ -D-alopiranosido-3'', 6''- diacetato al que se le atribuye actividad antioxidante e hipolipemiante, este es un derivado de la quercetina la cual se ha demostrado que cuenta con distintos tipos de actividades neuroprotectoras (Almora-Pinedo et al., 2017; Chirinos et al., 2013; Espiritu Contreras, 2019; Gomez-Flores, 2012; Kasay et al., 2013; Y. K. Márquez-Flores et al., 2018; Yazmín K Márquez-Flores et al., 2009; Meckes et al., 2004; MOTTA TACO, 2021; Porras et al., 2011; Rashid et al., 2015,

2017; Taco Rodriguez & Salaverry Acedo, 2019; Vargas-Ruiz et al., 2020; Yarlequé, 2016)

### 1.5.2 *Solanum nigrum*



**Figura 2.** *Solanum nigrum*

*Solanum nigrum* L. conocida comúnmente como "hierba mora" es una planta originaria del continente americano, actualmente se encuentra distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile, pasando por la mayoría de los estados mexicanos. Cuenta con un tamaño de hasta 1.5 m de alto con un tallo ramificado, provisto de pelos encorvados, sus hojas se encuentran en pares en forma de lámina lanceolada de hasta 10cm de largo y 7 de ancho, cuenta con 5 lóbulos de 3 a 10 mm de largo de color blanco o morado y cuenta con frutos

globosos de color negro (Mondragón Pichardo & Vibrans, 2009b). Esta planta se ha utilizado en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades dermatológicas y heridas (Andrade-Cetto, 2009). En diversos estudios se ha observado que sus extractos de hojas y frutos poseen actividades como: hepatoprotectora, antimicrobiana, cardioprotectora, anticancerígena, analgésica, antiinflamatoria y antioxidante (Gebarowska et al., 2022; Gutiérrez A et al., 2014; Karmakar et al., 2010; Nitish et al., 2011; Raju et al., 2003).

## 1.6 Antecedentes

En el 2011 Shuwei y colaboradores observaron que el compuesto ginkgolide K (100  $\mu$ M), un diterpeno obtenido de las hojas de la planta *Gingko biloba*, presentó efecto neuroprotector en la línea celular PC12 expuesta a 10 mM de glutamato, al aplicar un pretratamiento con 100  $\mu$ M del compuesto por 24 horas, esto mediante el uso del ensayo de MTT (Ma et al., 2012).

En el 2016 Hosseini y colaboradores observaron que el extracto etanólico de las semillas y cáscaras de los frutos de la planta *Citrus x aurantium* L. presentó efecto neuroprotector en células de la línea PC12 expuestas a 8 mM de glutamato, esto mediante el uso del ensayo de viabilidad celular de MTT (Hosseini et al., 2016).

En el 2017 Chen y colaboradores observaron mediante el ensayo de MTT que la paeoniflorina, la cual es un monoterpeno glicósido aislado de la raíz de la planta *Paeonia lactiflora*, en este estudio se usó la línea PC12 la cual fue expuesta a glutamato (15 mM) por 24 horas. El pretratamiento con 300  $\mu$ M del compuesto se obtuvo como resultado un aumento del 23.9% de la viabilidad (Chen et al., 2017).

En el 2017 Pereira y colaboradores observaron que los extractos de diclorometano, etil acetato, etanol y hexano de las semillas de la planta *Amburana cearensis*, disminuían la muerte neuronal hasta un 30% en un estudio realizado en la línea celular PC12 pretratada con 1 mM de glutamato, esto mediante el uso del ensayo de MTT (Pereira et al., 2017).

En el 2017 Lee y colaboradores observaron mediante el ensayo de MTT que el extracto etanólico de los frutos de *Aronia melanocarpa* presentaron efecto neuroprotector al reducir la muerte de células HT22 al ser expuestas a glutamato, al colocar 100  $\mu$ g/mL del extracto la mortalidad disminuyó en un 35.38% (Lee et al., 2017).

En el 2017 Sadeghnia y colaboradores realizaron un extracto hidroalcohólico de las raíces de la planta *Ferula gummosa Boiss* y observaron mediante el uso del ensayo de MTT que este extracto presentó efecto neuroprotector en un modelo de excitotoxicidad usando la línea PC12 expuesta a glutamato al reducir las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (Sadeghnia et al., 2017).

En el año 2019 Selek y colaboradores evaluaron el efecto del aceite obtenido de semillas de la planta *Oenothera biennis* en ratones a los cuales se les indujo

encefalomielitis autoinmune, observaron que en los grupos a los cuales les administraron el aceite presentaron menos pérdida de mielina, disminución del índice de estrés oxidativo y estatus oxidante total, aumento de estatus antioxidante total y ausencia de depósitos amiloides en comparación con los controles (Selek et al., 2019).

En el año 2019 Campisi y colaboradores evaluaron la capacidad antioxidante del extracto acuoso y metanol-agua de hojas de *Solanum nigrum* por medio del ensayo de DPPH y en astrocitos obtenidos de ratón por medio de la determinación de los niveles de glutatión y especies reactivas de oxígeno, además realizaron un estudio fitoquímico, encontrando la presencia de distintos ácidos fenólicos y flavonas. Observaron que ambos extractos presentaron buena capacidad antioxidante en todos los ensayos (Campisi et al., 2019).

## 1.7 Justificación

Ante el alza en casos de enfermedades neurológicas y debido a que las terapias actuales se centran principalmente en la sintomatología, es necesario complementar estos tratamientos con agentes neuroprotectores, por lo que es importante la búsqueda de nuevos compuestos con capacidad neuroprotectora . Las plantas que serán estudiadas en este proyecto cuentan con propiedades terapéuticas como la actividad antioxidante, por lo que es necesario evaluar su capacidad neuroprotectora

## **1.8 Hipótesis**

Al menos uno de los extractos obtenidos de *Oenothera rosea* y *Solanum nigrum L.* presentan efecto neuroprotector contra la toxicidad producida por glutamato en la línea celular PC12.

## **1.9 Objetivo General**

Evaluar el efecto neuroprotector de los extractos metanólico, hexánico y clorofórmico de *Solanum nigrum L.* y *Oenothera rosea* en la línea celular PC12, mediante el modelo de neurotoxicidad con glutamato.

### **1.9.1 Objetivos Específicos**

1-Realizar un ensayo preliminar de neurotoxicidad de los nueve extractos

2-Evaluar neurotoxicidad de los extractos menos tóxicos en la línea celular PC12 mediante el ensayo de MTT

3-Evaluar la actividad neuroprotectora de los extractos menos tóxicos en la línea celular PC12 mediante el ensayo de MTT en presencia de glutamato

4-Realizar análisis fitoquímico cualitativo de los extractos con mejores propiedades

5-Realizar análisis estadístico de los resultados obtenidos



## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Material y Reactivos**

##### **2.1.1 Material Biológico**

Los ensayos fueron realizados en la línea celular PC-12 (ATCC®, CRL-1721™), la cual es una línea derivada de feocromocitoma de rata, es ampliamente usada en ensayos de neurotoxicidad y neuroprotección. Se conservó congelada 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 Sterilgard (The Baker Company), centrífuga refrigerada Sorvall ST16R (ThermoScientific), congelador horizontal -20°C CH10 (Tororey), esterilizador eléctrico autoclave 25x (All American), estufa de incubación MIDI 40 CO2 Incubator (Thermo-Fisher), frascos de vidrio 1L (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), microplaca de 96 pocillos fondo plano (Costar), pipeta automática 0.5-10 µL (Labnet), pipeta automática 50-200 µL (Gilson), pipeta automática 100-1000 µL (Pearl), pipetas estériles desechables 10 mL (Costar), potenciómetro pHep tester (Hanna instruments), puntillas 0.5-10 µL (Corning), puntillas 50-200 µL (Corning), puntillas 100-1000 µL (Corning), tubos de ensayo de 13 X 100 (Kimax), tubos de ensayo de 16 X 125 (Kimax), tubos Falcon 15 y 50 mL (Corning), ultracongelador horizontal -80°C HERA FREEZE HFC series (Thermo-Fisher).

### 2.1.3 Reactivos

Ácido clorhídrico, ácido sulfúrico (Jalmek) agua destilada, alcohol etílico, alcohol isopropílico, alcohol metílico, bicarbonato de sodio (DEQ), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) M5655 (Sigma-Aldrich), cloroformo (DEQ), cloruro de fierro (DEQ), 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), hexano (DEQ), hidróxido de sodio (DEQ), L-Ácido glutámico G8415 (Sigma-Aldrich), medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) RPP12-10LT (Caisson), penicilina – estreptomicina 1%, reactivo de Dragendorff (Sigma-Aldrich), reactivo de Folin-Ciocalteu (Supelco), Suero fetal bovino (SFB) (Caisson), tripsina (Caisson).

## 2.2 Obtención de Extractos

Ambas plantas fueron recolectadas en estado de madurez e identificadas por el herbario Jorge Arturo Alba Ávila, los números de Boucher son HJAAA\_04\_2022\_0001 para *Solanum nigrum* L. y HJAAA\_04\_2022\_0002 para *Oenothera rosea*. Los extractos fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Juan Manuel Favela Hernández. Se utilizaron 3 solventes de distinta polaridad (hexano, cloroformo y metanol). En el caso del material vegetal utilizado de *Solanum nigrum* L. se usaron hojas y frutos maduros, de *Oenothera rosea* se utilizaron solo las hojas. Estos extractos fueron obtenidos por maceración a 25°C por 48 horas en los solventes antes mencionados, usando primero el de más baja polaridad, después de esto fueron secados en un rotavapor.

Los extractos fueron conservados en un congelador de -20°C del Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica. Para su utilización en los ensayos de neurotoxicidad y neuroprotección fue necesario disolver los extractos en DMSO a una concentración de 10mg/mL para después diluirlos en medio RPMI-1640 con una concentración final de DMSO menor al 1%. En el caso de las pruebas fitoquímicas cada extracto fue disuelto en el solvente correspondiente o usado como extracto seco según la prueba.

### **2.3 Métodos**

Antes de realizar las evaluaciones de la actividad neurotóxica y neuroprotectora se realizó un ensayo preliminar de neurotoxicidad de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de las hojas de *Oenothera rosea* y de las hojas y frutos de *Solanum nigrum*, utilizando la misma metodología del ensayo de evaluación de la neurotoxicidad, después de esto se eligieron los tres extractos que provocaron menor muerte celular en la línea PC12.

El cultivo de la línea celular PC-12 fue llevado a cabo con el medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, se incubó a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas o hasta formación de monocapa.

Para el ensayo de actividad neurotóxica y neuroprotectora se utilizaron las células una vez que alcanzaron del 70 al 90% de confluencia, después se

añadieron 500µL de tripsina al 0.5% para desprender las células y hacer el conteo. Se ajustó la concentración a 10,000 células / 0.1mL y se colocaron en cada uno de los espacios de una placa de 96 pocillos, posteriormente se incubó a 37°C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas o hasta formación de monocapa.

Las pruebas fitoquímicas cualitativas se realizaron siguiendo las metodologías comparando el cambio de color con un control negativo.

### 2.3.1 Ensayo Preliminar de Neurotoxicidad

Una vez formada la monocapa en las placas de 96 pocillos se añadieron los 9 extractos a una concentración de 200 µg/mL. Se incluyeron dos controles, 0.1 mL de glutamato 40 mM como control positivo para neurotoxicidad y sólo células con medio de cultivo como control negativo. Para descartar los posibles efectos del disolvente de los extractos se añadió DMSO al 0.5% a un grupo de células. Después se incubó la placa a 37°C con una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Posteriormente se retiró el medio de la placa, se colocaron 0.1mL de la solución de MTT con medio (0.5mg/mL) y se incubó a 37°C con una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Pasado este tiempo se retiró la solución de MTT y se añadieron 0.1mL de la solución de alcohol isopropílico / ácido clorhídrico al 10%, para dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente se llevó a cabo la lectura de la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 570nm (Mosmann, 1983).

### 2.3.2 Evaluación de la Neurotoxicidad de los Extractos

Para la determinación de la actividad neurotóxica se colocaron 10,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, una vez formada, se añadieron los extractos menos tóxicos (metanólico de *Oenothera rosea*, metanólico de hojas y hexánico de frutos de *Solanum nigrum*) por dilución seriada de 100 a 3.125 µg/mL. Se incluyeron dos controles, 0.1mL de glutamato 40 mM como control positivo para neurotoxicidad y sólo células con medio de cultivo como control negativo. Para descartar los posibles efectos del disolvente de los extractos se añadió DMSO al 0.5% a un grupo de células. Después se incubó la placa a 37°C con una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Posteriormente se realizó el ensayo de MTT con la misma metodología y condiciones antes mencionadas (Hirata et al., 2011; Mosmann, 1983; Wiatrak et al., 2020).

### 2.3.3 Evaluación de la Neuroprotección de los Extractos

Para la determinación de la actividad neuroprotectora se colocaron 10,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, una vez formada la monocapa, se

realizó un pretratamiento con los extractos por dilución seriada de 100 a 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , así como 50  $\mu\text{M}$  de trolox como control positivo de neuroprotección y se incubó a 37°C con una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  por 4 horas. Después se añadieron 0.1mL de glutamato 30 mM, así como DMSO al 0.5% para descartar la posible actividad del disolvente para incubar nuevamente a las condiciones antes mencionadas por 20 horas más. Se usaron células con glutamato 30 mM como control negativo. Posteriormente se realizó el ensayo de MTT con la misma metodología y condiciones antes mencionadas (Hirata et al., 2011; Mosmann, 1983; Shah et al., 2015; J. Wang et al., 2009).

#### 2.3.4 Análisis Fitoquímico Cualitativo

Para la determinación de los grupos de compuestos presentes en los extractos se realizaron las pruebas químicas coloridas de identificación cualitativa (Dominguez, 1973).

Compuestos fenólicos: Se añadieron unas gotas de cloruro de fierro al 12.5 % en agua a 1mL de extracto disuelto en solvente (hexano, cloroformo o metanol dependiendo el caso). La aparición de coloración verde se tomó como positiva a presencia de fenoles o taninos (Emmanuel & Emmanuel, 2018).

Esteroles (Prueba de Salkowski): A 2mL de muestra se le añadieron 2mL de cloroformo y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó y se dejó reposar. La formación de una capa amarilla verdosa se tomó como presencia de esteroles (Marka et al., 2013).

Prueba de las cumarinas: Se disolvió 1-2 mg de muestra en NaOH al 10%, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidificar es positiva (Rajesh et al., 2014).

Terpenos: A 1mL de extracto se le añadieron 2mL de cloroformo y 1.5mL de ácido sulfúrico. La aparición de una interfase color café rojizo indica la presencia de terpenos (Rajesh et al., 2014).

Alcaloides (Prueba de Dragendorff): A 1mL de extracto se le añadió 1mL del reactivo de Dragendorff. Se tomó como resultado positivo la aparición de un precipitado blanco (Marka et al., 2013).

Saponinas: A 1mL de extracto se le añadieron 9mL de agua destilada, después se agitó vigorosamente por 1 minuto. La formación de espuma indica presencia de saponinas (Rajesh et al., 2014).

## **2.4 Análisis de Resultados**

Se realizó un análisis estadístico de ANOVA en los ensayos biológicos, con el fin de establecer si existe diferencia significativa entre los extractos y se hizo una prueba post hoc en la que se compararon contra un control (Dunnet).

## **2.5 Disposición de Residuos**



Los residuos generados se dispusieron conforme a los protocolos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas.

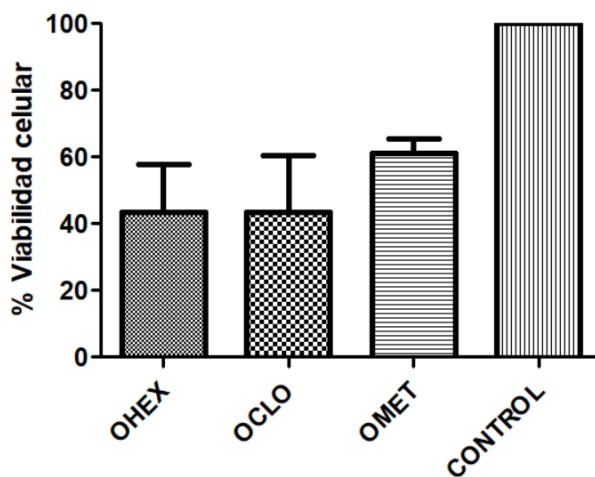
## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Evaluación Neurotóxica Preliminar**

Esta evaluación fue hecha con el fin de elegir los extractos menos tóxicos de cada planta para continuar con los ensayos de neurotoxicidad y neuroprotección, se realizó mediante el ensayo de MTT y los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad celular.

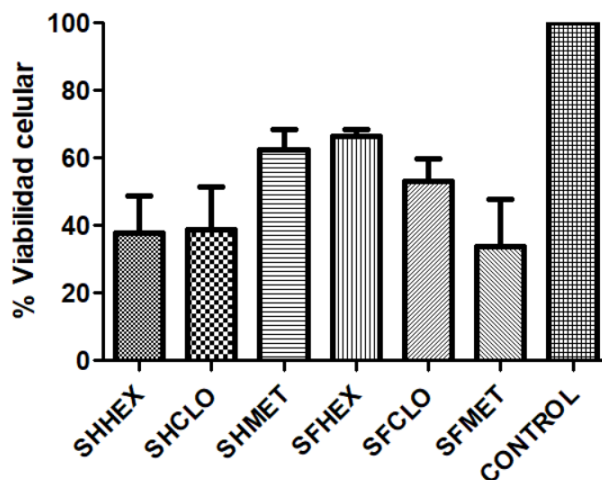
### 3.1.2 *Oenothera rosea*



**Figura 3. Evaluación neurotóxica de los extractos de *O. rosea* a 200 µg/mL (OHEX: extracto hexánico, OCLO: extracto clorofórmico, OMET: extracto metanólico)**

En el caso de la planta *Oenothera rosea* se observó que el extracto metanólico fue el menos neurotóxico ( $61.05 \pm 4.5\%$ ) con respecto a los extractos clorofórmico y hexánico de los cuales se obtuvieron valores de  $43.59 \pm 16.9\%$  y  $43.39 \pm 14.41\%$  respectivamente.

### 3.1.2 *Solanum nigrum*



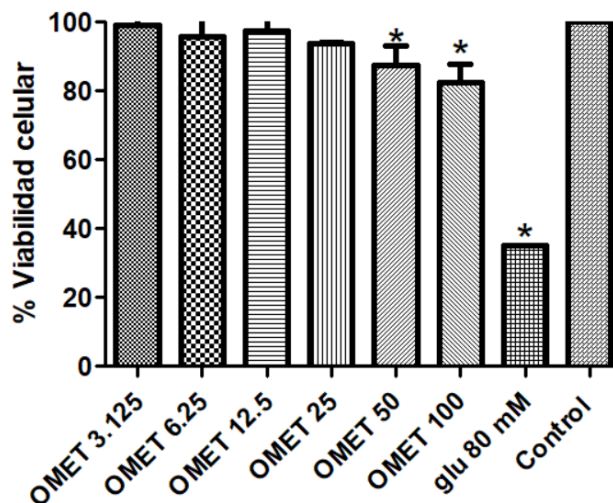
**Figura 4. Evaluación neurotóxica de los extractos de *S. nigrum* a 200 µg/mL** (SHHEX: hexánico de hojas, SHCLO, clorofórmico de hojas, SHMET: metanólico de hojas, SFHEX: hexánico de frutos, SFCLO: clorofórmico de frutos, SFMET: metanólico de frutos)

En la evaluación hecha con los extractos de la planta *Solanum nigrum* se observó que los extractos que presentaron menor neurotoxicidad fueron los extractos de metanol de hojas y de hexano de frutos los cuales obtuvieron un porcentaje de viabilidad celular de  $62.52 \pm 5.83$  y  $66.65 \pm 1.96$  en comparación con los extractos clorofórmico ( $38.67 \pm 12.85\%$ ) y hexánico ( $37.94 \pm 11.03\%$ ) de hojas, y clorofórmico ( $53.10 \pm 6.81\%$ ) y metanólico ( $33.73 \pm 14.24\%$ ) de frutos.

### 3.2 Evaluación de la Actividad Neurotóxica

Una vez realizado el ensayo preliminar de neurotoxicidad, se eligieron los 3 extractos que redujeron menos la viabilidad celular: extracto metanólico de *Oenothera rosea* (OMET), extracto metanólico de hojas de *Solanum nigrum* (SHMET) y extracto hexánico de frutos de *Solanum nigrum* (SFHEX). Se utilizaron concentraciones seriadas 1:1 desde 100 a 3.125  $\mu\text{g/mL}$ , incluyendo un control positivo de muerte (glutamato 80 mM) y un control negativo (células sin tratamiento), se utilizó el ensayo de MTT y los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad celular.

#### 3.2.1 Evaluación Neurotóxica del extracto metanólico de las Hojas de *Oenothera rosea*

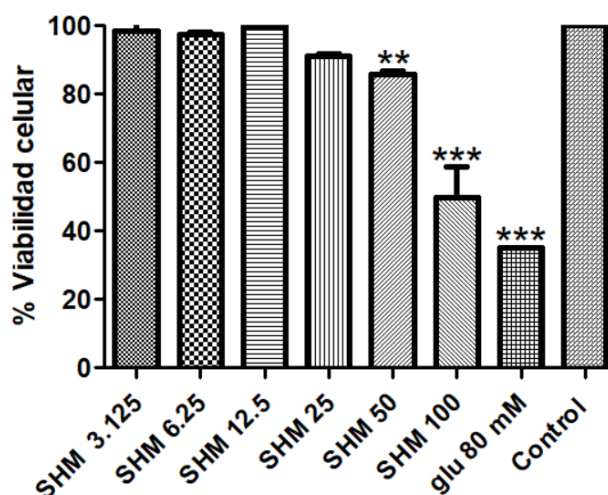


**Figura 5.** Evaluación neurotóxica del extracto metanólico de hojas de *O. rosea* (concentración del extracto en  $\mu\text{g/mL}$ ) (OMET: extracto metanólico) ( $p=0.0059$ )

El primer extracto evaluado fue el metanólico de *Oenothera rosea* (OMET), la concentración más alta (100 µg/mL) presentó un porcentaje de viabilidad de  $82.49 \pm 5.44\%$ , siendo esta la concentración que provocó mayor muerte celular. La concentración de 50 µg/mL presentó un porcentaje de viabilidad de  $87.48 \pm 5.61\%$ , las demás concentraciones de 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL presentaron valores por encima del 93%:  $93.83 \pm 0.47\%$ ,  $97.40 \pm 5.42\%$ ,  $95.92 \pm 5.01\%$ ,  $99.20 \pm 3.49\%$ ; respectivamente.

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) dando como resultado que se observó diferencia significativa entre las concentraciones del extracto ( $p=0.0059$ ), además se realizó la prueba post hoc de Dunnet con la que se compararon las distintas concentraciones, así como el control positivo de muerte (glutamato 30 mM) con el control negativo (células sin tratamiento), se obtuvo que los valores de porcentaje de viabilidad células del control positivo de muerte, y las concentraciones de 50 y 100 µg/mL presentan diferencia significativa con respecto al control negativo ( $p<0.0001$ ).

### 3.2.2 Evaluación Neurotóxica del Extracto metanólico de las Hojas de *Solanum nigrum*



**Figura 6. Evaluación neurotóxica del extracto metanólico de hojas de *S. nigrum***

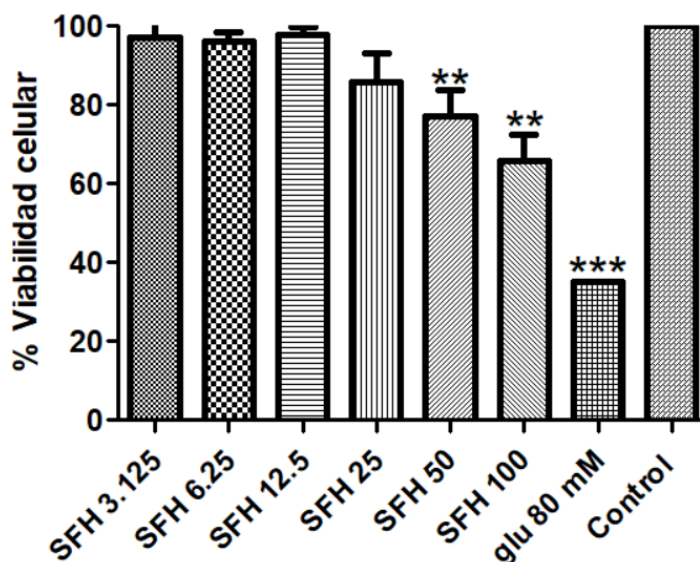
(concentración del extracto en  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0.0001$ ) (SHM: extracto metanólico)

El siguiente extracto evaluado fue el metanólico de las hojas de *Solanum nigrum*, la concentración de  $100 \mu\text{g/mL}$  provocó una muerte celular considerable, presentando un porcentaje de viabilidad celular de  $49.72 \pm 9.24\%$ , la concentración de  $50 \mu\text{g/mL}$  presentó un valor de  $85.85 \pm 1.13\%$ , las concentraciones de 25, 12.5, 6.25 y  $3.125 \mu\text{g/mL}$  presentaron porcentajes de viabilidad de  $91.12 \pm 0.60\%$ ,  $99.89 \pm 7.52\%$ ,  $97.38 \pm 0.75\%$  y  $98.49 \pm 2.54\%$  respectivamente.

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) dando como resultado que se observó diferencia significativa entre las concentraciones del extracto ( $p < 0.0001$ ), además se realizó la prueba post hoc de Dunnett con la que se compararon las distintas concentraciones, así como el control positivo de muerte (glutamato  $30 \text{ mM}$ ) con el control negativo (células sin tratamiento), se obtuvo

que los valores de porcentaje de viabilidad celular del control positivo de muerte y las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , presentan diferencia significativa con respecto al control negativo ( $p < 0.0001$ ).

### 3.2.3 Evaluación Neurotóxica del Extracto Hexánico de los frutos de *Solanum nigrum*



**Figura 7. Evaluación neurotóxica del extracto hexánico de frutos de *S. nigrum***

(concentración del extracto en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $p < 0.0001$ ) (SFH: extracto hexánico)

El siguiente extracto evaluado fue el hexánico de los frutos de *Solanum nigrum*, las concentraciones de 100 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presentaron porcentajes de viabilidad celular de  $65.95 \pm 6.47\%$  y  $77.09 \pm 6.63\%$  respectivamente. Las concentraciones de 25, 12.5, 6.25 y 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presentaron valores de  $85.71 \pm 7.40\%$ ,  $97.05 \pm 1.91\%$ ,  $96.05 \pm 2.39\%$  y  $97.10 \pm 4.81\%$  respectivamente.

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) dando como resultado que se observó diferencia significativa entre las concentraciones del extracto



( $p < 0.0001$ ), además se realizó la prueba post hoc de Dunnet con la que se compararon las distintas concentraciones, así como el control positivo de muerte (glutamato 30 mM) con el control negativo (células sin tratamiento), se obtuvo que los valores de porcentaje de viabilidad células del control positivo de muerte, y las concentraciones de 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$  presentan diferencia significativa con respecto al control negativo ( $p < 0.0001$ ).

### **3.3 Evaluación de la Actividad Neuroprotectora**

Se realizó la evaluación de la capacidad de los extractos de proteger a las neuronas contra una concentración parcialmente tóxica de glutamato la cual fue de 30 mM, se realizó un pretratamiento en el cual se colocaron los extractos desde 100 hasta 3.125  $\mu\text{g/mL}$  por 4 horas para después colocar el glutamato, se incluyó un control de muerte (glutamato 30mM), un control de neuroprotección (trolox 50  $\mu\text{M}$ ) y un control de células sin tratamiento. Se utilizó el ensayo de MTT y los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad celular.

### 3.3.1 Evaluación de la Actividad Neuroprotectora del Extracto Metanólico de las Hojas de *Oenothera rosea*

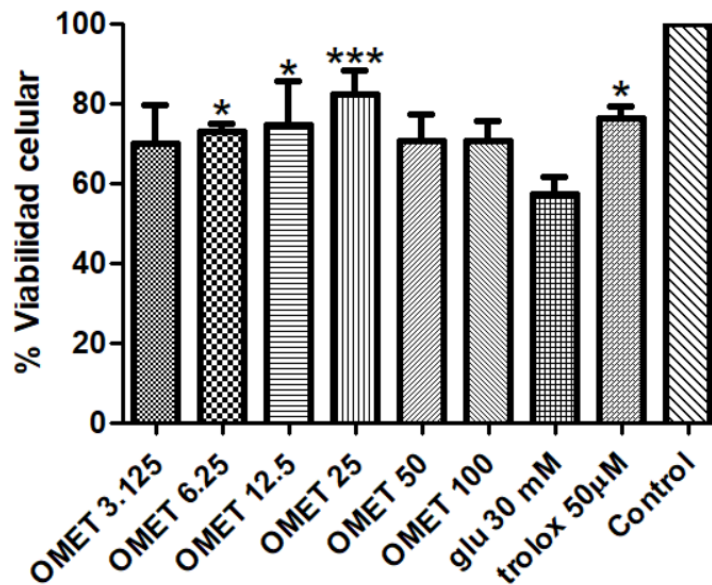


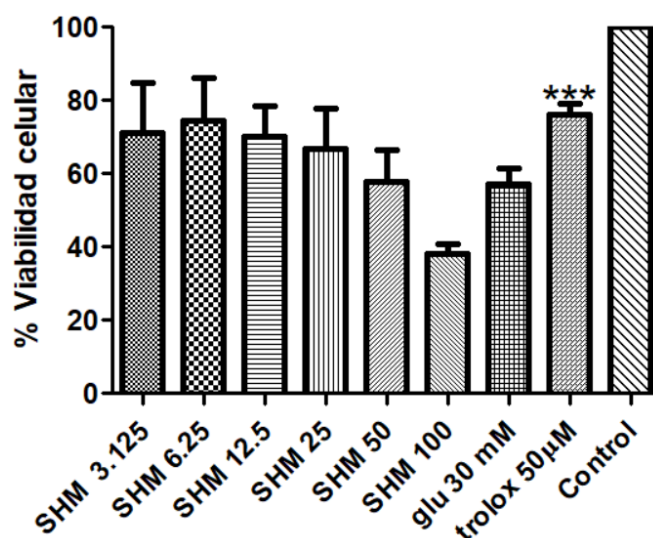
Figura 8. Evaluación de la actividad neuroprotectora del extracto metanólico de hojas de *O. rosea* (concentración del extracto en µg/mL) ( $p < 0.0001$ ) (OMET: extracto metanólico)

Se evaluó el extracto metanólico de las hojas de *Oenothera rosea* en el cual todas las concentraciones aumentaron el porcentaje de viabilidad celular respecto al control de muerte de glutamato 30 mM el cual presentó una viabilidad de  $57.23 \pm 4.31\%$ . El control de neuroprotección de trolox 50 µM presentó un valor de  $76.19 \pm 2.98\%$ , solo la concentración de 25 µg/mL logró superar el valor del trolox con  $82.41 \pm 5.97$ . Las concentraciones de 100, 50, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL presentaron valores de  $10.71 \pm 4.97\%$ ,  $70.55 \pm 6.69\%$ ,  $74.61 \pm 11.14\%$ ,  $72.97 \pm 1.99\%$  y  $70.02 \pm 9.79\%$  respectivamente.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el cual no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ( $p=0.3677$ ). Se

realizó una prueba post hoc de Dunnet en la que se compararon las concentraciones, así como el control positivo de neuroprotección de trolox 50  $\mu$ M con el control de muerte de glutamato 30 mM, se obtuvo que los extractos de 25, 12.5 y 6.25  $\mu$ g/mL presentaron diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ).

### 3.3.2 Evaluación de la Actividad Neuroprotectora del Extracto Metanólico de las Hojas de *Solanum nigrum*



**Figura 9.** Evaluación de la actividad neuroprotectora del extracto metanólico de hojas de *S. nigrum* (concentración del extracto en  $\mu$ g/mL) ( $p < 0.0001$ ) (SHM: extracto metanólico de hojas)

Se evaluó el extracto metanólico de las hojas de *Solanum nigrum* en el cual todas las concentraciones presentaron porcentajes de viabilidad celular menores a 75%, las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125  $\mu$ g/mL presentaron valores de  $38.5 \pm 2.60\%$ ,  $57.75 \pm 8.78\%$ ,  $66.74 \pm 11.21\%$ ,  $70.20 \pm 8.17\%$ ,  $74.42 \pm 11.61\%$  y  $71.08 \pm 13.73\%$  respectivamente. Los controles de trolox 50  $\mu$ M y

glutamato 30 mM mostraron valores de  $76.19 \pm 2.98\%$  y  $57.23 \pm 4.31\%$  respectivamente.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el cual sí se observaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ( $p=0.0078$ ). Se realizó una prueba post hoc de Dunnet en la que se compararon las concentraciones, así como el control positivo de neuroprotección de trolox 50  $\mu\text{M}$  con el control de muerte de glutamato 30 mM, se observó diferencia significativa a las concentraciones de 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g/mL}$  a las concentraciones de ( $p<0.0001$ ).

### 3.3.3 Evaluación de la Actividad Neuroprotectora del Extracto Hexánico de frutos de *Solanum nigrum*

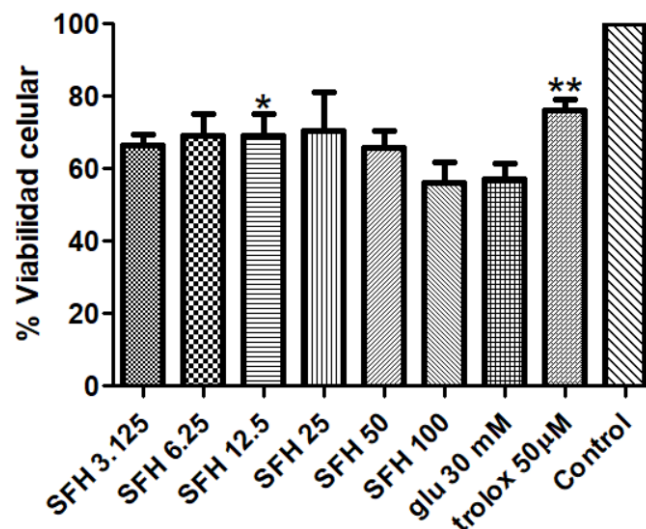


Figura 10. Evaluación de la actividad neuroprotectora del extracto hexánico de frutos de *S. nigrum* (concentración del extracto en  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p<0.0001$ ) (SFH: extracto hexánico de frutos)

Se evaluó el extracto hexánico de los frutos de *Solanum nigrum*, todas las concentraciones evaluadas presentaron valores de viabilidad celular menores al 71%, las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125  $\mu\text{g/mL}$  presentaron valores de  $56.00 \pm 5.69\%$ ,  $65.76 \pm 4.61\%$ ,  $70.60 \pm 10.63\%$ ,  $69.25 \pm 5.77\%$ ,  $69.05 \pm 6.06\%$  y  $66.54 \pm 2.54\%$  respectivamente. Los controles de trolox 50  $\mu\text{M}$  y glutamato 30 mM mostraron valores de  $76.19 \pm 2.98\%$  y  $57.23 \pm 4.31\%$  respectivamente.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el cual no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas ( $p=0.1399$ ). Se realizó una prueba post hoc de Dunnet en la que se compararon las concentraciones, así como el control positivo de neuroprotección de trolox 50  $\mu\text{M}$  con el control de muerte de glutamato 30 mM, se obtuvo que el extracto de 25  $\mu\text{g/mL}$  presentó diferencia significativa ( $p<0.0001$ ).

### 3.4 Análisis Fitoquímico

Se determinó la presencia de los metabolitos en cada uno de los extractos obtenidos en función del cambio de color de las reacciones reportadas en la literatura (ver TABLA 3).

TABLA 3

Resultados de Pruebas Cualitativas

Prueba	O MET	SH MET	SF HEX
<b>Fenoles</b>	+	+	-
<b>Esteroles</b>	+	+	-
<b>Terpenos</b>	+	+	+
<b>Saponinas</b>	+	+	+
<b>Alcaloides</b>	+	+	-
<b>Cumarinas</b>	+	+	-

Los extractos con mayor presencia de tipos de metabolitos fueron los extractos metanólicos, en el extracto de las hojas de *Oenothera rosea* y el de las hojas de *Solanum nigrum* las pruebas positivas correspondieron a fenoles, esteroides, terpenos, saponinas, alcaloides y cumarinas, el extracto metanólico de los frutos de *Solanum nigrum* dio positivo a fenoles, terpenos, saponinas, alcaloides y cumarinas (Tabla 3). Los extractos clorofórmicos solo dieron positivo a un par de pruebas en todos los extractos, en el caso del extracto de *Oenothera rosea* dió positivo a terpenos y saponinas, en el extracto de hojas y en el extracto de frutos de *Solanum nigrum* ambos dieron positivo a esteroides y terpenos. En los extractos hexánicos se observó la menor presencia de tipos de metabolitos, en el de hojas de *Oenothera rosea* y en el de hojas de *Solanum nigrum* se observó sólo la presencia de terpenos, mientras que en el extracto de frutos de *Solanum nigrum* se observó la presencia de terpenos y saponinas.

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En el presente trabajo se determinó la neurotoxicidad de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de hojas de *Oenothera rosea*, de frutos y de hojas de *Solanum nigrum*, colocándolos en células de la línea celular PC-12 para evaluar cambios en la viabilidad celular con el ensayo de MTT. Así mismo se realizó la determinación cualitativa de distintos grupos de metabolitos secundarios de los extractos mencionados. A los extractos con menor actividad neurotóxica, se realizó una evaluación de su capacidad como neuroprotectores en células de la línea celular PC-12 expuestas a glutamato con el ensayo de MTT.

#### **4.1 Neurotoxicidad de los Extractos**

##### **4.1.1 Neurotoxicidad del Extracto Metanólico de Hojas *Oenothera rosea***

En los resultados obtenidos se observó que ninguna de las concentraciones utilizadas en el ensayo disminuyeron la viabilidad celular de forma considerable, ya que incluso a la concentración más alta, la cual fue de 100 µg/mL el porcentaje de viabilidad se mantuvo por arriba del 80%, en la literatura no se ha reportado un estudio de citotoxicidad del extracto metanólico de esta planta, pero en un estudio realizado por Márquez-Flores y colaboradores evaluaron la capacidad antiinflamatoria de este tipo de extracto a una dosis de 500mg/kg, además realizaron un estudio de toxicidad en ratones, en el que administraron de 1 a 8g/kg, no observaron cambios en el comportamiento, daño en el epitelio gastrointestinal, ni mortalidad en ninguna de las dosis utilizadas (Yazmín K Márquez-Flores et al., 2009). Un compuesto aislado de este extracto, la quercetina 3-O-β-dalopiranosido-3'',6'' diacetato, el cual es un compuesto fenólico, cuenta con actividades farmacológicas como antioxidante y antiinflamatorio, ha sido sometido a pruebas de citotoxicidad en fibroblastos de ratón (línea celular 3T3-NIH) mostrando una baja toxicidad con un IC50 <30 µM (Yazmín K Márquez-Flores et al., 2009; Rashid et al., 2015, 2017).

#### 4.1.2 Neurotoxicidad del Extracto Metanólico de Hojas de *Solanum nigrum*

En los resultados obtenidos se observó una muerte celular considerable en la mayor concentración utilizada (100 µg/mL) ya que el porcentaje de viabilidad fue de 49.72 ± 9.24%. En las concentraciones menores se observaron valores por



encima del 85%. En el 2017 Ahmad y colaboradores realizaron un estudio citotóxico del extracto metanólico de las hojas de esta planta, a una concentración de 20 a 100 µg/mL en las líneas celulares HeLa (células de cáncer cérvico-uterino) y Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano) con el método de MTT. La línea celular Vero es considerada una línea celular normal y en esta línea no se observó una disminución significativa en la viabilidad celular (Ahmad et al., 2017).

#### 4.1.3 Neurotoxicidad del Extracto Hexánico de Frutos de *Solanum nigrum*

En el extracto hexánico de los frutos de esta planta se observó que en las dos concentraciones más altas (100 y 50 µg/mL) el porcentaje de viabilidad se mantuvo debajo de 78%, mientras que las concentraciones menores la viabilidad celular se encontró arriba del 85%. No se han hecho evaluaciones de su citotoxicidad en líneas celulares normales. Se ha observado que, dependiendo del estado de madurez de los frutos, estos pueden contener altas concentraciones de solanina, el cual es un glicoalcaloide que se ha asociado con aumentos en el flujo de calcio intracelular que despolariza la membrana mitocondrial y posteriormente causa apoptosis. Se hizo una evaluación del extracto total de toda la planta y se encontró que es seguro su consumo hasta 4g/kg, en cuanto a una fracción de glicoalcaloides se encontró que el LD era de 200 a 400mg/kg. En nuestro caso los frutos eran maduros lo que significa que la

presencia de estos compuestos era escasa (Ji & Gao, 2007; Mukhopadhyay et al., 2018).

## 4.2 Actividad Neuroprotectora de los Extractos

### 4.2.1 Actividad Neuroprotectora del Extracto Metanólico de Hojas de *Oenothera rosea*

Todas las concentraciones utilizadas aumentaron el porcentaje de células vivas tratadas con glutamato, en comparación del grupo con el control de muerte de glutamato 30 mM, las concentraciones con diferencia significativa con este último grupo fueron los de 25, 12.5 y 6.25 µg/mL. Siendo el porcentaje de viabilidad de la concentración de 25 µg/mL incluso mayor que el del control de neuroprotección de trolox 50 µM. En las pruebas fitoquímicas se observaron compuestos fenólicos y terpenos, por lo que su actividad neuroprotectora puede atribuirse a la presencia de este tipo de compuestos ya que algunos de ellos cuentan con capacidad antioxidante como el ácido ursólico (terpeno), ácido gálico (compuesto fenólico) y el derivado de quercetina, quercetin 3-O-β-D-alopiranosido-3'',6''-diacetato los cuales han sido reportados anteriormente en *Oenothera rosea* (Munir et al., 2017). El ácido gálico ha demostrado tener distintos efectos sobre el sistema nervioso central, se ha probado en distintos

modelos de enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, isquemia, depresión y ansiedad en los que ha sido efectivo a través de ciertos mecanismos, en cuanto a su efecto sobre excitotoxicidad este actúa como antioxidante y disminuye los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Shabani et al., 2020). El ácido ursólico ha demostrado de igual forma efectos sobre distintos modelos de enfermedades neurológicas como enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, déficit cognitivo, ansiedad y depresión (Habtemariam, 2019). En la línea celular PC12 estos compuestos han demostrado un buen efecto antioxidante disminuyendo la formación de especies reactivas de oxígeno y aumentando la expresión de enzimas antioxidantes (Tsai & Yin, 2008).

#### 4.2.2 Actividad Neuroprotectora del Extracto Metanólico de Hojas de *Solanum nigrum*

Todas las concentraciones presentaron valores de viabilidad celular menores al 75%, la que obtuvo un valor más alto fue la de 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  al realizar la prueba post hoc se observó diferencia significativa con respecto al control de muerte a las concentraciones de 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por lo que se podría considerar como neuroprotector, aunque no logró igualar ni superar el porcentaje de viabilidad del grupo con trolox 50  $\mu\text{M}$ . Su efecto moderado podría deberse a la presencia de solanina, un glicoalcaloide presente en el género *Solanum*, el cual podría causar excitotoxicidad al aumentar la entrada de calcio, esto podría

corroborarse con el análisis fitoquímico cualitativo, el cual dio positivo a alcaloides y saponinas. Recientemente Bai y colaboradores aislaron 6 compuestos a partir del extracto butanólico de la planta completa sin frutos, y realizaron un ensayo de neuroprotección en el que evaluaron la viabilidad celular con el ensayo de MTT en células de la línea celular SH-SY5Y (células humanas de neuroblastoma) expuestas a peróxido de hidrógeno, observaron que los compuestos solanum lactona A, 11-(2-hidroxi-3,4-dimetil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il)ácido undecanoico y patrinalactona presentaron actividad neuroprotectora moderada a una concentración de 12.5 µg/mL (Bai et al., 2022; Ji & Gao, 2007). Posiblemente estos compuestos estaban presentes en el extracto utilizado pero el estrés al cual esté sometida la planta influye en la cantidad y presencia de sus metabolitos secundarios, entre los tipos de estrés que pudieran alterar la composición fitoquímica se encuentran: la exposición a contaminación, sequía, demasiada luz, demasiada temperatura y plagas (Das & Roychoudhury, 2014).

#### 4.2.3 Actividad Neuroprotectora del Extracto Hexánico de Frutos de *Solanum nigrum*

Todas las concentraciones presentaron porcentajes de viabilidad menores a 72%, sin embargo, se encontró diferencia significativa entre la concentración de 25 µg/mL y el control de muerte de glutamato 30 mM, por lo que se podría considerar que cuenta con baja actividad neuroprotectora comparado con la

actividad que presentó el extracto metanólico de las hojas de *Oenothera rosea*. La información disponible sobre las actividades biológicas es escasa, la única actividad que se ha reportado es su mediana actividad antimicrobiana, esto puede ser debido a la limitada presencia de grupos de metabolitos encontrados (terpenos y saponinas), en la bibliografía solo se ha reportado presencia de glicósidos, esto puede deberse a los factores de estrés ambiental a los que haya estado sometida la planta (Das & Roychoudhury, 2014; Kumar et al., 2016).

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

Los tres extractos que provocaron menor neurotoxicidad en el ensayo preliminar fueron: el extracto metanólico de hojas de *O. rosea*, el extracto metanólico de hojas de *S. nigrum* y el extracto hexánico de frutos de *S. nigrum*, ninguno de ellos provocó una muerte celular considerable a partir de la concentración de 25 a 3.125 µg/mL.

El extracto con mayor actividad neuroprotectora fue el metanólico de hojas de *O. rosea*, provocando incluso una disminución de la muerte celular menor que el control de neuroprotección de trolox, este efecto puede atribuirse al derivado de quercetina el cual podría estar presente en los compuestos fenólicos observados en las pruebas fitoquímicas.

Los extractos de *S. nigrum* de hojas (metanólico) y frutos (hexánico) presentaron una neuroprotección moderada ya que, aunque disminuyeron la muerte celular de manera considerable, estos no lograron igualar ni superar el efecto del control de neuroprotección de trolox, el moderado efecto del extracto de hojas (metanólico) podría deberse a que se encuentren pequeñas cantidades de

solanina, el cual puede provocar neurotoxicidad, el efecto observado del extracto de frutos (hexánico) podría estar relacionado con la baja diversidad de metabolitos observada en las pruebas fitoquímicas.

## CAPÍTULO 6

### REFERENCIAS

- Abushouk, A. I., Negida, A., Ahmed, H., & Abdel-Daim, M. M. (2017). Neuroprotective mechanisms of plant extracts against MPTP induced neurotoxicity: Future applications in Parkinson's disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *85*, 635–645.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.074>
- Ahmad, R., Gupta, A., Fatima, A., Husain, I., & Srivastava, A. N. (2017). The evaluation of biological activity of methanolic extracts of *Solanum nigrum* and molecular docking analysis of selected phytoconstituents against vimentin. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *6*(4), 391–400.  
<https://doi.org/10.5455/jice.20170701065821>
- Almora-Pinedo, Y., Arroyo-Acevedo, J., Herrera-Calderon, O., Chumpitaz-Cerrate, V., Hañari-Quispe, R., Tinco-Jayo, A., Franco-Quino, C., & Figueroa-Salvador, L. (2017). Preventive effect of *oenothera rosea* on N-methyl-N-nitrosourea- (NMU) induced gastric cancer in rats. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, *10*, 327–332.  
<https://doi.org/10.2147/CEG.S142515>
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from



- Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.008>
- Argueta, A., Cano Asseleih, L. M., & Rodarte García, M. E. (1994). *Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*.
- Bai, M., Zhang, Q., Hou, Z. L., Li, C., Zhou, W. Y., Yao, G. D., Huang, X. X., & Song, S. J. (2022). Chemical constituents from *Solanum nigrum* and their neuroprotective activities. *Journal of Asian Natural Products Research*, 24(8), 703–712. <https://doi.org/10.1080/10286020.2021.1978987>
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(April), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
- Bavithra, S., Selvakumar, K., Pratheepa Kumari, R., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., & Arunakaran, J. (2012). Polychlorinated Biphenyl (PCBs)-induced oxidative stress plays a critical role on cerebellar dopaminergic receptor expression: Ameliorative role of quercetin. *Neurotoxicity Research*, 21(2), 149–159. <https://doi.org/10.1007/s12640-011-9253-z>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- Brown, C. A., Lally, C., Kupelian, V., & Dana Flanders, W. (2021). Estimated

Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis and SOD1 and C9orf72 Genetic Variants. *Neuroepidemiology*, 55(5), 342–353.

<https://doi.org/10.1159/000516752>

Campisi, A., Acquaviva, R., Raciti, G., Duro, A., Rizzo, M., & Santagati, N. A. (2019). Antioxidant Activities of *Solanum nigrum* L. Leaf extracts determined in in vitro cellular models. *Foods*, 8(2), 1–12.

<https://doi.org/10.3390/foods8020063>

Chen, A., Wang, H., Zhang, Y., Wang, X., Yu, L., Xu, W., Xu, W., & Lin, Y. (2017). Paeoniflorin exerts neuroprotective effects against glutamate-induced PC12 cellular cytotoxicity by inhibiting apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 825–833.

<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3076>

Chio, A., Logroscino, G., Hardiman, O., Swingler, R., Mitchell, D., Beghi, E., Traynor, B. G., & Consortium, E. (n.d.). *Prognostic factors in ALS: A critical review*. <https://doi.org/10.3109/17482960802566824>

Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47, 145–152.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025>

Cong, L., Cao, C., Cheng, Y., & Qin, X. Y. (2016). Green tea polyphenols attenuated glutamate excitotoxicity via antioxidative and antiapoptotic pathway in the primary cultured cortical neurons. *Oxidative Medicine and*

*Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2050435>

Consejo Nacional para el Desarrollo y la Inclusión de las Personas con Discapacidad. (2018). *La Esclerosis Lateral Amiotrófica ELA*. <https://www.gob.mx/conadis/articulos/la-esclerosis-lateral-amiotrofica-ela?idiom=es>

Costa, L. G., Giordano, G., & Guizzetti, M. (2011). In Vitro Approaches to Developmental Neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology, Tier 2*, 159–166. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10013-X>

Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

De-Paula, V. J., Radanovic, M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. V. (2012). Alzheimer's disease. *Subcellular Biochemistry*, 65, 329–352. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_14)

Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*, 47(6 Suppl 4), 233S-241S. [https://doi.org/10.1212/WNL.47.6\\_Suppl\\_4.233S](https://doi.org/10.1212/WNL.47.6_Suppl_4.233S)

Dominguez, X. A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa.

Dorsey, E. R., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Aduar, J. C., Ansha, M. G., Brayne, C., Choi, J. Y. J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N.,

- Do, H. P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S. M., Foreman, K. J., Gankpe, F. G., Gupta, R., Hankey, G. J., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 17(11), 939–953. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
- Emmanuel, E., & Emmanuel. (2018). Phytochemical and anti-nutritional studies on some commonly consumed fruits in Ilokoja, Kogi state of Nigeria. *General Medicine Open*, 2(3), 1–5. <https://doi.org/10.15761/gmo.1000135>
- Erkkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Espiritu Contreras, C. A. (2019). EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Oenothera rosea* L. (Yawar socco) SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN RATONES. In *Repositorio Institucional - UAP*. Universidad Alas Peruanas.
- Esquivel-García, R., Pérez-Calix, E., Ochoa-Zarzosa, A., & García-Pérez, M. E. (2018). Ethnomedicinal plants used for the treatment of dermatological affections on the Purépecha Plateau, Michoacán, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 2018(125), 95–132. <https://doi.org/10.21829/abm125.2018.1339>
- Fei, F., Su, N., Li, X., & Fei, Z. (2020). Neuroprotection mediated by natural products and their chemical derivatives. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 15, Issue 11, pp. 2008–2015). Wolters Kluwer -- Medknow

Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.282240>

Feigin, V. L., Vos, T., Alahdab, F., Amit, A. M. L., Bärnighausen, T. W., Beghi, E., Beheshti, M., Chavan, P. P., Criqui, M. H., Desai, R., Dhamminda Dharmaratne, S., Dorsey, E. R., Wilder Eagan, A., Elgendy, I. Y., Filip, I., Giampaoli, S., Giussani, G., Hafezi-Nejad, N., Hole, M. K., ... Murray, C. J. L. (2021). Burden of Neurological Disorders across the US from 1990-2017: A Global Burden of Disease Study. *JAMA Neurology*, 78(2), 165–176. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.4152>

GBIF Backbone Taxonomy. (2021). *Oenothera rosea Aiton in GBIF Secretariat*. <https://www.gbif.org/species/3188875>

Gębarowska, E., Łyczko, J., Rdzanek, M., Wiatrak, B., Plaskowska, E., Gołębiowska, H., Kuźniarski, A., & Gębarowski, T. (2022). Evaluation of Antimicrobial and Chemopreventive Properties and Phytochemical Analysis of *Solanum nigrum* L. Aerial Parts and Root Extracts. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/app12146845>

Gleichmann, M., & Mattson, M. P. (2011). Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(7), 1261–1273. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3386>

Gomez-Flores, R. (2012). Antibacterial Activity of *Oenothera rosea* (L 'Hér) Leaf Extracts. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 2(3), 396–404. <https://doi.org/10.9734/bjmmr/2012/1480>

González-Cofrade, L., De Las Heras, B., Apaza Ticona, L., & Palomino, O. M.

- (2019). Molecular Targets Involved in the Neuroprotection Mediated by Terpenoids. *Planta Medica*, 85(17), 1304–1315. <https://doi.org/10.1055/a-0953-6738>
- Green, J. L., dos Santos, W. F., & Fontana, A. C. K. (2021). Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: Opportunities for novel therapeutics development. *Biochemical Pharmacology*, 193(September). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114786>
- Gutiérrez A, D. M., Bah, M., Garduño R, M. L., Mendoza D, S. O., & Serrano C, V. (2014). Anti-inflammatory and antioxidant activities of methanol extracts and alkaloid fractions of four Mexican medicinal plants of Solanaceae. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*, 11(3), 259–267. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i3.36>
- Habtemariam, S. (2019). Antioxidant and Anti-inflammatory Mechanisms of Neuroprotection by Ursolic Acid: Addressing brain injury, cerebral ischemia, cognition deficit, anxiety, and depression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8512048>
- Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., & Sticher, O. (1998). Medicinal plants in Mexico: Healers' consensus and cultural importance. *Social Science and Medicine*, 47(11), 1859–1871. [https://doi.org/10.1016/S0277-9536\(98\)00181-6](https://doi.org/10.1016/S0277-9536(98)00181-6)
- Hirata, Y., Yamamoto, H., Atta, M. S. M., Mahmoud, S., Oh-Hashi, K., & Kiuchi, K. (2011). Chloroquine inhibits glutamate-induced death of a neuronal cell

line by reducing reactive oxygen species through sigma-1 receptor. *Journal of Neurochemistry*, 119(4), 839–847. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07464.x>

Hosseini, A., Sadeghnia, H. R., & Rajabian, A. (2016). Protective effects of peel and seed extracts of *Citrus aurantium* on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cell line. *Folia Neuropathologica*, 54(3), 265–272. <https://doi.org/10.5114/fn.2016.62536>

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. (2017). *Enfermedad de Huntington*. <http://www.innn.salud.gob.mx/interna/medica/padecimientos/huntington.htm>

Ji, Y. Bin, & Gao, S. Y. (2007). The effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG2 cells and  $[Ca^{2+}]_i$  in cells. *2007 IEEE/ICME International Conference on Complex Medical Engineering, CME 2007*, 12(21), 1030–1037. <https://doi.org/10.1109/ICCME.2007.4381897>

Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)

Karmakar, U. K., Tarafder, U. K., Sadhu, S. K., Biswas, N. N., & Shill, M. C. (2010). Biological Investigations of Dried Fruit of *Solanum nigrum* Linn. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 38–45. <https://doi.org/10.3329/sjps.v3i1.6796>

Kasay, M. ., Huaman, J., & Woolcott, J. (2013). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y

ANTIMICROBIANA DE LOS TANINOS DE OENOTHERA ROSEA L

'HÉR. EXAIT ON. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 16(1), 61–65.

Khateb, M., Bosak, N., & Herskovitz, M. (2021). The Effect of Anti-seizure Medications on the Propagation of Epileptic Activity: A Review. *Frontiers in Neurology*, 12, 683. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.674182>

Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J. R., & Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 377(9769), 942–955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61156-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61156-7)

Kornhuber, J., Weller, M., Schoppmeyer, K., & Riederer, P. (1994). Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, 43, 91–104.

Kouli, A., Torsney, K. M., & Kuan, W.-L. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* (pp. 3–26). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch1>

Kritis, A. A., Stamoula, E. G., Paniskaki, K. A., & Vavilis, T. D. (2015). Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(March), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00091>

Kumar, J., Kumar, P., Kumar, R., & Dubey, R. C. (2016). Studies on



- phytochemical constituents and antimicrobial activities of leaves, fruits and stems of *Solanum nigrum* L. *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, 6(4), 57–68. [www.pelagiaresearchlibrary.com](http://www.pelagiaresearchlibrary.com)
- Lau, A., & Tymianski, M. (2010). 13.30 Excitotoxicity. In *Comprehensive Toxicology* (Vol. 13, pp. 515–535).
- Lee, H. Y., Weon, J. B., Ryu, G., Yang, W. S., Kim, N. Y., Kim, M. K., & Ma, C. J. (2017). Neuroprotective effect of *Aronia melanocarpa* extract against glutamate-induced oxidative stress in HT22 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1716-1>
- Li, Y., Sattler, R., Yang, E. J., Nunes, A., Ayukawa, Y., Akhtar, S., Ji, G., Zhang, P. W., & Rothstein, J. D. (2011). Harmine, a natural beta-carboline alkaloid, upregulates astroglial glutamate transporter expression. *Neuropharmacology*, 60(7–8), 1168–1175. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.016>
- Lv, C., Hong, T., Yang, Z., Zhang, Y., Wang, L., Dong, M., Zhao, J., Mu, J., & Meng, Y. (2012). Effect of quercetin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine- induced mouse model of Parkinson's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/928643>
- Lynch, C. (2020). World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia, a global survey. *Alzheimer's & Dementia*, 16(S10), e038255. <https://doi.org/10.1002/alz.038255>

- Ma, S., Liu, H., Jiao, H., Wang, L., Chen, L., Liang, J., Zhao, M., & Zhang, X. (2012). Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells via inhibition of ROS generation and Ca<sup>2+</sup> influx. *NeuroToxicology*, 33(1), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.11.003>
- Marka, R., Talari, S., Penchala, S., Rudroju, S., & Swamy Nanna, R. (2013). Preliminary phytochemical analysis of leaf, stem, root and seed extracts of *Arachis Hypogaea* L. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 20(1), 134–139.
- Márquez-Flores, Y. K., Meléndez-Camargo, M. E., García-Mateos, N. J., Huerta-Anaya, M. C., Pablo-Pérez, S. S., & Silva-Torres, R. (2018). Phytochemical composition and pharmacological evaluation of different extracts of *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait (Onagraceae) aerial part. *South African Journal of Botany*, 116, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.008>
- Márquez-Flores, Yazmín K, Montellano-Rosales, H., Campos Aldrete, M. E., & Meléndez-Camargo, M. E. (2009). Anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait in the rat. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 40(3), 11–16. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912963003>
- Meckes, M., David-Rivera, A. D., Nava-Aguilar, V., & Jimenez, A. (2004). Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*, 11(5), 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.06.002>
- Mohamed, Z. A., Eliaser, E. M., Mazzon, E., Rollin, P., Lian Ee, G. C., & Abdull

Razis, A. F. (2019). Neuroprotective Potential of Secondary Metabolites from *Melicope lunu-ankenda* (Rutaceae). *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 3109, 24(17), 3109. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24173109>

Mondragón Pichardo, J., & Vibrans, H. (2009a). *Malezas de México, Ficha- Oenothera rosea*. CONABIO.  
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/oenothera-rosea/fichas/ficha.htm>

Mondragón Pichardo, J., & Vibrans, H. (2009b). *Malezas de México, Ficha- Solanum nigrescens*. CONABIO.  
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/solanum-nigrescens/fichas/ficha.htm>

Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(83), 55–63.

MOTTA TACO, F. V. (2021). *EFEECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Oenothera rosea (CHUPASANGRE) Staphylococcus aureus ATCC25923 Escherichiacoli ATCC 25922* [UNIVERSIDAD PRIVADA AUTÓNOMA DEL SUR FACULTAD].  
<http://repositorio.upads.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/UPADS/150/CARBAL PACHAPUMA YANET - bah..pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mukhopadhyay, G., Sarkar, S., Kundu, S., Kundu, S., Sarkar, P., Sarkar, S., Sengupta, R., Kumar, C., Mitra, S., Jain, D., Sodani, A., Manna, D., & Author, C. (2018). Ethno-Pharmacological activity of *Solanum nigrum*. *The*

*Pharma Innovation Journey*, 7(10), 692–698.

Munir, R., Semmar, N., Farman, M., & Ahmad, N. S. (2017). An updated review on pharmacological activities and phytochemical constituents of evening primrose (genus *Oenothera*). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(11), 1046–1054. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.004>

Nishimura, Y., Kanda, Y., Sone, H., & Aoyama, H. (2021). Oxidative Stress as a Common Key Event in Developmental Neurotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6685204>

Nitish, B., Pratim, M. P., Abhinit, K., Atul, T., Tasneem, A., & Uzzaman, K. M. (2011). Evaluation of cardio protective activity of methanolic extract of *solanum nigrum* Linn. in rats. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(3), 139–147.

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913–922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>

Pál, B. (2018). Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(16), 2917–2949. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2837-5>

Pereira, E. P. L., Braga-De-Souza, S., Santos, C. C., Santos, L. O., Cerqueira, M. D., Ribeiro, P. R., Fernandez, L. G., Silva, V. D. A., & Costa, S. L. (2017). *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against

toxicity induced by glutamate. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(2), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.010>

Pérez-Hernández, J., Zaldívar-Machorro, V. J., Villanueva-Porras, D., Vega-Ávila, E., & Chavarría, A. (2016). A Potential Alternative against Neurodegenerative Diseases: Phytodrugs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8378613>

Plotegher, N., Filadi, R., Pizzo, P., & Duchon, M. R. (2021). Excitotoxicity Revisited: Mitochondria on the Verge of a Nervous Breakdown. *Trends in Neurosciences*, 44(5), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.01.001>

Porras, D., Vanessa, H., Ruitón, F., Whu, W., Teixeira, J., Alcarraz, R., Acevedo, A., Antiagregante, E., Fibrinolítico, Y., Vanessa, H., Porras, D., Ruitón, C. F., & Whu, D. W. (2011). EFECTO ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO in vivo Y FIBRINOLÍTICO in vitro DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 77(3), 225–234.

Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B. M., Hoh, B., Jauch, E. C., Kidwell, C. S., Leslie-Mazwi, T. M., Ovbiagele, B., Scott, P. A., Sheth, K. N., Southerland, A. M., Summers, D. V., & Tirschwell, D. L. (2019). Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 50(12), E344–E418.

<https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000211>

- Rajesh, K. D., Vasantha, S., Rajesh, N. V., & Panneerselvam, A. (2014). Qualitative and quantitative phytochemical analysis in four pteridophytes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 27(2), 408–412.
- Raju, K., Anbuganapathi, G., Gokulakrishnan, V., Raj Kapoor, B., Jayakar, B., & Manian, S. (2003). Effect of dried fruits of *Solanum nigrum* Linn against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(11), 1618–1619. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1618>
- Rashid, R., Hameed, R., Choudhary, M., Mukhtar, F., & Khan, A. (2015). Anti-adipogenic and Cytotoxic Effects of a New Compound from *Hartmannia rosea* G. Don. *Current Pharmaceutical Analysis*, 11(4), 300–307. <https://doi.org/10.2174/1573412911666150305001347>
- Rashid, R., Kalsoom Khan, A., Ul Haq, I., Mir, S., Mehmood, S., Lu, Y., & Murtaza, G. (2017). In vitro biological screening of *hartmannia rosea* extracts. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8968604>
- Sachdeva, S., Pant, S. C., Kushwaha, P., Bhargava, R., & Flora, S. J. S. (2015). Sodium tungstate induced neurological alterations in rat brain regions and their response to antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.003>
- Sadeghnia, H. R., Rajabian, A., Ghorbani, A., Moradzadeh, M., & Hosseini, A.

(2017). *Effects of standardized extract of Ferula gummosa root on glutamate-induced neurotoxicity* (pp. 340–346).

Schapira, A. H. V. (2010). Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Blue Books of Neurology*, 34, 301–320. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6641-5.00018-0>

Selek, S., Esrefoglu, M., Meral, I., Bulut, H., Caglar, H. G., Sonuc, G., Yildiz, C., Teloglu, E. S., Dogan, N., Yuce, B., Tiftik, E., & Bayindir, N. (2019). Effects of *Oenothera biennis* L. and *Hypericum perforatum* L. extracts on some central nervous system myelin proteins, brain histopathology and oxidative stress in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biotechnic and Histochemistry*, 94(2), 75–83.

<https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1482001>

Shabani, S., Rabiei, Z., & Amini-Khoei, H. (2020). Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: a review. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 736–752.

<https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1753769>

Shah, S. A., Yoon, G. H., Kim, H. O., & Kim, M. O. (2015). Vitamin C Neuroprotection Against Dose-Dependent Glutamate-Induced Neurodegeneration in the Postnatal Brain. *Neurochemical Research*, 40(5), 875–884. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1540-2>

Shawky, E. M., Elgindi, M. R., Ibrahim, H. A., & Baky, M. H. (2021). The potential and outgoing trends in traditional, phytochemical, economical, and ethnopharmacological importance of family Onagraceae: A comprehensive

review. *Journal of Ethnopharmacology*, 281(July), 114450.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114450>

Spencer, P. S., & Lein, P. J. (2014). Neurotoxicity. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (Vol. 3, pp. 489–500).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00169-X>

Taco Rodriguez, R. C., & Salaverry Acedo, S. E. (2019). *EFEECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE Oenothera rosea A. (CHUPASANGRE) EN RATAS ALBINAS (Holtzman)* [UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA].

<http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/344>

Tsai, S. J., & Yin, M. C. (2008). Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *Journal of Food Science*, 73(7), 174–178. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00864.x>

Valdés-Galván, R. E., González-Calderón, G., & Castro-Martínez, E. (2019). Acute seizure epidemiology in a neurological emergency department. *Revista de Neurología*, 68(8), 321–325.

<https://doi.org/10.33588/rn.6808.2018218>

Vargas-Ruiz, R., Montiel-Ruiz, R. M., Herrera-Ruiz, M., González-Cortazar, M., Ble-González, E. A., Jiménez-Aparicio, A. R., Jiménez-Ferrer, E., & Zamilpa, A. (2020). Effect of phenolic compounds from *Oenothera rosea* on the kaolin-carrageenan induced arthritis model in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 253(February), 112711.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112711>



- Wang, C. C., Ho, Y. H., Hung, C. F., Kuo, J. R., & Wang, S. J. (2020). Xanthohumol, an active constituent from hop, affords protection against kainic acid-induced excitotoxicity in rats. *Neurochemistry International*, 133(510), 104629. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104629>
- Wang, J., Du, X. X., Jiang, H., & Xie, J. X. (2009). Curcumin attenuates 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by anti-oxidation and nuclear factor-kappaB modulation in MES23.5 cells. *Biochemical Pharmacology*, 78(2), 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.031>
- Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., & Barg, E. (2020). PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040958>
- World Health Organization. (2022). *Epilepsy*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Wu, Q. J., & Tymianski, M. (2018). Targeting NMDA receptors in stroke: New hope in neuroprotection. In *Molecular Brain* (Vol. 11, Issue 1, pp. 1–14). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0357-8>
- Yang, L., Yang, Q., Zhang, K., Li, Y. J., Wu, Y. M., Liu, S. B., Zheng, L. H., & Zhao, M. G. (2014). Neuroprotective effects of daphnetin against NMDA receptor-mediated excitotoxicity. *Molecules*, 19(9), 14542–14555. <https://doi.org/10.3390/molecules190914542>
- Yarlequé, M. (2016). Aislamiento y caracterización bioquímica de compuestos fenólicos con actividad anticoagulante del extracto alcohólico de las hojas

de *Oenothera rosea* Aiton “chupasangre.” *Repositorio de Tesis - UNMSM*,  
108. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/handle/cybertesis/4990>

Yero, T., & Rey, J. A. (2008). *Tetrabenazine ( Xenazine ), An FDA-Approved Treatment Option For Huntington ' s Disease – Related Chorea*. 33(12), 690–694.

Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission*, 121(8), 799.  
<https://doi.org/10.1007/S00702-014-1180-8>