

# EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *TILIA PLATYPHYLLOS* SCOPOLI “TILO DE HOJA ANCHA” EN ISQUEMIA-REPERFUSIÓN CEREBRAL EXPERIMENTAL EN RATAS

Autores: Luis Emilio Carranza-Quispe<sup>1</sup> - Orlando Enrique Pretel-Sevillano<sup>2</sup>

Recibido: 04/05/2015

Aprobado: 12/06/2015

Pág.151-156

---

## RESUMEN

Los accidentes cerebrovasculares con sus complicaciones neurológicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En la actualidad se busca alternativas para tratar o disminuir el daño haciendo uso de propiedades de plantas medicinales. El presente trabajo evaluó el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Tilia platyphyllos Scopoli* “tilo de hoja ancha” en isquemia-reperfusión (I/R) cerebral experimental en ratas. Materiales y métodos: Se evaluó el efecto neuroprotector de DE50 (300 mg/kg) y DE100 (600 mg/kg) de la planta frente a la lesión producida por la I/R en el cerebro de ratas, mediante la evaluación de radicales libres y ceruloplasmina. Las dosis de DE50 y DE100 mostraron su capacidad antioxidante contra la I/R. El mayor efecto neuroprotector ocurrió en la dosis más alta. Sugerimos que la planta *T. platyphyllos Scopoli* posee efecto antioxidante contra la lesión hipóxica tisular inducida producida por la I/R en ratas.

**Palabras clave:** accidentes cerebrovasculares, ceruloplasmina, isquemia-reperfusión, neuroprotector, radicales libres, *Tilia platyphyllos Scopoli*.

---

<sup>1</sup> Docente-Investigador de la Catedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

<sup>2</sup> Docente-Investigador de la Catedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular (ECV) es la tercera causa principal de muerte y discapacidad en el mundo, siendo el más común el accidente cerebrovascular isquémico, que afecta a un 50% de la población mayor de 60 años. La mortalidad por ECV va incrementándose exponencialmente con la edad, duplicándose cada 5 años ya sea por hemorragia o por isquemia (Lo, 2010), lo que conlleva a que las personas deben adquirir estilos de vida saludables, que incluyan dietas ricas en antioxidantes, para llegar a un envejecimiento saludable (Khalid, 2007).

Las "especies reactivas" y los RL son moléculas con electrones desapareados, que son constantemente producidos en el cerebro in vivo; derivan principalmente de oxígeno, nitrógeno y azufre. Estos son: 1. Las especies reactivas del oxígeno (ROS): El anión superóxido ( $O_2^-$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^-$ ); entre ellos, el  $O_2^-$  se cree que es directamente tóxico para las neuronas, ya que inicia una reacción en cadena causando lesiones adicionales del sistema nervioso central (CNS) (Kondo, 1997). 2. RNS se derivan de NO a través de la reacción con  $O_2^-$  para formar  $ONOO^-$  y 3. RSS se forman fácilmente de tioles por reacción con ROS (Devasagayam, 2004; Khalid, 2007).

En el cerebro las especies reactivas se producen en la microglía activada y en las células endoteliales durante el metabo-

lismo mitocondrial (Muir, 2000; Streit, 2004), y tienen papeles importantes en la señalización celular, la apoptosis, la expresión génica y el transporte de iones (Streit, 2004). En condiciones homeostáticas son mantenidos por las defensas antioxidantes endógenas que incluyen enzimas desintoxicantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (Tamara, 2009). Pero la alta demanda de oxígeno molecular, los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de membrana neural, y el alto contenido de hierro (Halliwell, 2006) pueden producir cantidades excesivas de ROS (Gilgun-Sherki, 2002) y de mediadores inflamatorios (Biron, 2010), que pueden tener efectos perjudiciales sobre muchas moléculas que incluyen proteínas, lípidos de membrana, ARN y ADN (Streit, 2004; Tamara, 2009), llevando al daño oxidativo subsecuente, muerte celular (Pong, 2003), mutagénesis, carcinogénesis (Devasagayam 2004) y neurodegeneración.

La estrategia del tratamiento de la isquemia cerebral, en su fase aguda, tiene dos objetivos principales: restauración del flujo sanguíneo cerebral (reperfusión) y la limitación del daño neuronal (neuroprotección). Por lo tanto, la orientación terapéutica más importante en los pacientes con infarto cerebral se dirigirá a mejorar el flujo sanguíneo cerebral y reducir o bloquear las consecuencias metabólicas a nivel celular y subcelular (Rodríguez, 2002), entre los más usados están los antioxidantes que pueden disminuir el daño oxidativo directa-

mente a través de la reacción con radicales libres, indirectamente mediante la inhibición de la actividad, expresión de enzimas generadoras de radicales libres, la mejora de la actividad o expresión de enzimas antioxidantes intracelulares. (Jian-Ming, 2010)

Los efectos beneficiosos de las plantas para la salud se deben a una amplia variedad de compuestos antioxidantes, tales como compuestos fenólicos (fenol y polifenoles), flavonoides, carotenoides, esteroides y compuestos de tiol (Lotito, 2006). Estos antioxidantes pueden ayudar a proteger los daños celulares contra el estrés oxidativo y también reducir el riesgo de enfermedades crónicas. Por ejemplo, el ginseng contiene compuestos similares a los esteroides, los ginsenosidos, que muestran actividades antioxidantes contra los RL sobre el endotelio vascular (Lü J-M, 2009). Ginkgo se ha informado que tienen actividades antioxidantes fuertes debido a los glucósidos de flavona que eliminan los radicales libres (DeFeudis, 2003). Los flavonoides como la catequina y epicatequina en extractos de semillas de té y uvas verdes podrían ser responsables por sus actividades antioxidantes potentes (Lotito, 2006; Williamson, 2005).

Los efectos se basan en las similitudes entre los sistemas nerviosos de los seres humanos, herbívoros, plantas, en particular insectos. En este caso, los fitoquímicos cuya síntesis han sido retenidos por un proceso de selección natural y tienen la capacidad de interactuar con el sistema nervioso central de los in-

sectos herbívoros o simbióticos también, con el sistema del SNC humano a través de los mismos mecanismos. (David, 2011)

La lesión por reperfusión está asociada con un desequilibrio de estrés oxidativo y mediadores proinflamatorios. Teóricamente sería posible limitar este daño oxidativo y mejorar la progresión de la enfermedad con técnicas como el preacondicionamiento isquémico (Zhe-Min, 2012), el suministro de fármacos y plantas con efecto neuroprotector en I/R inducida por la lesión cerebral (Shaheen, 1996; Seif-El-Nasr, 1999), fluoxetina (Londoño, 2011), nimodipino (Seok, 2011) y plantas como la *Medicago sativa* (Singh-Bora 2011). *Ledebouria divaricata*, *Scutellaria baicalensis*, *Angelica pubescens*, *Morus alba*, *Salvia miltiorrhiza*, *Uncaria rhynchophylla* y *Ligusticum chuanxiong* (Gong 1999) entre otras (G. Phani 2012, Gong 1999).

El hierro es un metal que está implicado en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson, Alzheimer (Benarroch, 2009) por aumento el estrés oxidativo en los procesos de isquemia y su regulación y transporte esta dada principalmente por la ceruloplasmina, transferrina, ferritinas y en menor cantidad por la albúmina (Wayne, 2012). La ceruloplasmina (Cp) es una proteína sintetizada por el hígado (Shukla, 2006), por los macrófagos (Bakhautdin, 2013) y por los astrocitos perivasculares en el sistema nervioso central, presenta actividad ferroxidasa que inhibe hierro asociada a la peroxi-

dación de lípidos y la formación de radicales hidroxilo; por lo tanto, la falta de ceruloplasmina causa el estrés oxidativo directa en astrocitos (Oide, 2006; Wayne, 2012). La Cp tiene un efecto protector contra la inflamación y lesión del tejido (Bakhautdin, 2013), a través de sus propiedades antioxidantes (Akiyo 2011, Wayne, 2012) y la inhibición de la mieloperoxidasa (Anna, 2013). Además, cuando esta proteína está expuesta a ROS, su capacidad para unirse al cobre se reduce, aumentando el cobre libre perjudicando así su función protectora normal (Shukla, 2006).

*Tilia* es un género de unas 30 especies de árboles nativos en la mayor parte templada del hemisferio norte, en el que se encuentra *Tilia platyphyllos* Scopoli. Las especies de este género tradicionalmente se utilizan para calmar los nervios y para el tratamiento de condiciones asociadas con el estrés, incluyendo la ansiedad, el insomnio y la histeria. Las propiedades medicinales se le han atribuido a sus componentes como flavonoides, aceite volátil y mucílago. Además, contienen ácido p-cumárico, kaempferol, terpenoides, los constituyentes de la quercetina y aceites volátiles, incluyendo citral, citronelal, citronelol, eugenol, y limoneno (Newall, 1996). Los compuestos fenólicos como ácido protocatecuico, catequina, naringenina, quercetina, p-cumárico, clorogénico, ferúlico y ácido cafeico (Demiray, 2009). Por estas razones el presente trabajo estudió el efecto neuroprotector del extracto hidroalcohólico de *Tilia platyphyllos* Scopoli “tilo de hoja

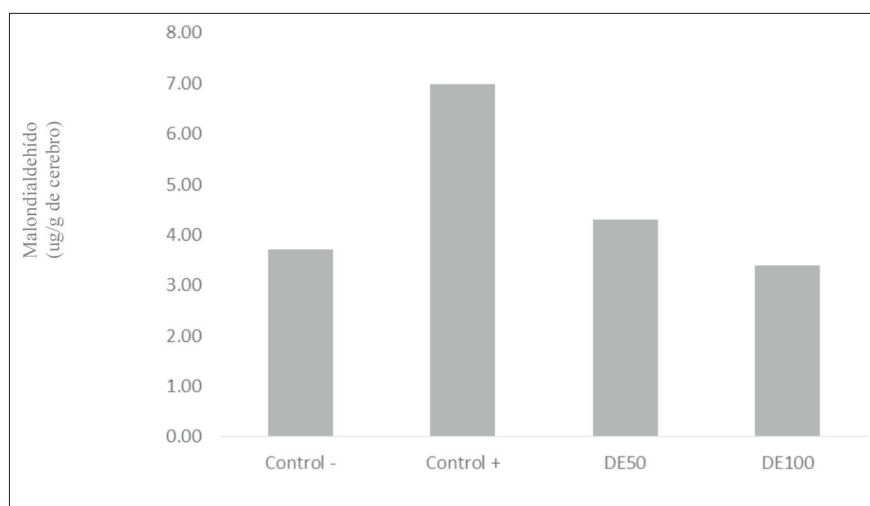
ancha” en isquemia-reperfusión cerebral experimental en ratas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron, hojas de *Tilia platyphyllos* Scopoli y 24 especímenes de *Rattus rattus* var. Lo primero fue la obtención del extracto hidroalcohólico de *Tilia platyphyllos* Scopoli, para lo cual se realizó un extracto hidroalcohólico de las hojas. Los animales fueron separados en cuatro grupos, un control positivo (con isquemia y SSF), control negativo (sin isquemia y SSF), DE50 (con isquemia y dosis efectiva al 50% del extracto 300 mg/kg) y DE100 (con isquemia y dosis efectiva al 100% del extracto 600 mg/kg), el tratamiento fue dado por 14 días, luego de los cuales se procedió a realizar isquemia bilateral por 5 minutos, 24 horas después se le extrajo sangre y se midió ceruloplasmina con la técnica de Sunderman (1970) y radicales libres por la técnica del TBARS.

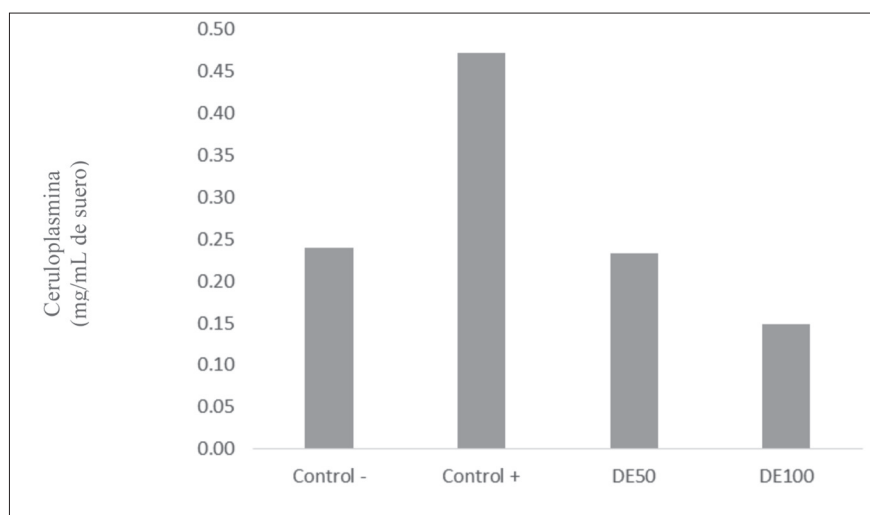
## RESULTADOS

Los datos obtenidos muestran la capacidad neuroprotectora de *Tilia platyphyllos* Scopoli “tilo de hoja ancha” en el proceso de isquemia-reperfusión I/R en rata. En la que la oclusión de cinco minutos de la carótida común bilateral se observa que el grupo DE100 produjo menor cantidad de radicales libres (Fig. 1) y ceruloplasmina (Fig. 2) con una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto al control positivo.



P>0.05

**Figura 1. Concentración malondialdehído ug/g de cerebro presente en el grupo control positivo, control negativo, DE50 y DE100 con isquemia-reperfusión en rata.**



P>0.05

**Figura 2. Concentración de ceruloplasmina (mg/mL de suero) presente en el grupo control positivo, control negativo, DE50 y DE100 con isquemia-reperfusión en rata.**

## DISCUSIÓN

El cerebro es el órgano más susceptible al daño por estrés oxidativo debido a que las neuronas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, y los niveles bajos de antioxidantes endógenos, como las enzimas (supe-

róxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GP) y vitaminas (C y E) (Gupta, 2003; Sugawara, 2003). Por lo tanto, el estrés oxidativo ataca proteínas clave, lípidos y ADN, alterando las vías de transducción de señales, destruyendo las membranas y orgánulos subcelu-

lares, y posteriormente dar lugar a la apoptosis y la muerte celular, principalmente en la I/R ya que en este periodo se predispone al cerebro a la formación de ROS (McCord, 1985).

En el mecanismo de la isquemia / reperfusión (IR), las especies reactivas de oxígeno (ROS) son uno de los factores más importantes que inducen la muerte neuronal en IR. Es más, se cree que la IR está acompañada por la excesiva generación de ROS, que son los que dañan directamente a la célula o causan vías de señalización celular o la regulación de genes para inducir la apoptosis (Sugawara, 2003). Debido al mecanismo de oxidación que causan la muerte celular inducida por la isquemia y la lesión, hay un creciente interés en centrarse en los agentes neuroprotectores que pueden aminorar el daño de ROS (Zhang, 2009). En la Fig. 1 se observa la capacidad antioxidante de la *Tilia platyphyllos* Scopoli en los grupos DE50 y DE100 al presentar una diferencia significativa entre la producción de radicales libres el grupo control positivo, y los grupos experimentales con una p>0.05, siendo los RL más bajos con la DE100 semejándose a los del grupo control negativo.

Así mismo, la ceruloplasmina como metabolito antioxidante endógeno (Justo, 2002), se observa que aumentan los niveles a medida que aumenta la producción de radicales libres (Fig. 2), con una diferencia significativa entre grupo control positivo, y los grupos experimentales DE50 y DE100 (p>0.05), esto para poder controlar la producción de

ROS, mostrándose que a menor producción de radicales libres menor son los niveles de ceruloplasmina, posiblemente debido a la capacidad antioxidante de la *Tilia platyphyllos* Scopoli.

## CONCLUSIONES

Los resultados muestran el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Tilia platyphyllos* Scopoli “tilo de hoja ancha” en isquemia-reperusión cerebral experimental en ratas, en pre-tratamiento por 14 días.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anna L. P. Chapman, Tessa J. Mocatta, and Anthony J. Kettle. (2013). Ceruloplasmin is an endogenous inhibitor of myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 288(9): 6465–6477.
- Bakhautdin B, Febbraio M, Goksoy E, de la Motte CA, Gulen MF, Childers EP, Hazen SL, Li X and Fox PL. (2013). Protective role of macrophage-derived ceruloplasmin in inflammatory bowel disease. *62(2):* 209–219.
- Benarroch EE. (2009 ). Brain iron homeostasis and neurodegenerative disease. *Neurology.* 72: 1436–1440.
- Biron CA. (2010). More things in heaven and earth: Defining innate and adaptive immunity. *Nature Immunology.* 11: 1080–1082.
- David O. Kennedy and Emma L. Wightman. (2011). Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *Adv Nutr.* 2 (1): 32-50.
- DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. (2003). Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundam Clin Pharmacol.* 17: 405–17.
- Demiray S, Pintado ME, Castro MEL. (2009). Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 3: 270-275.
- Devasagayam TP1, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghasakadbi SS, Lele RD. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 52: 794-804.
- G. Phani Kumar and Farhath Khanum. (2012). Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacogn Rev.* 6(12): 81–90.
- Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. (2002). Antioxidant therapy in acute central nervous injury: current state. *Pharmacological Reviews.* 54: 271–284.
- Gong X, Sucher NJ. (1999). Stroke therapy in traditional Chinese medicine (TCM): Prospects for drug discovery and development. *Trends Pharmacol Sci.* 20: 191–196.
- Halliwell B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of biochemistry and biophysics.* 476: 107–112.
- Jian-Ming Lu, un Peter H. Lin, Qizhi Yao, and Changyi Chen. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 14(4): 840–860.
- Justo R. Venereo Gutiérrez. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil v.31 n.2 Ciudad de La Habana abr.-jun.*
- Khalid Rahman. (Jun 2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging.* 2(2): 219–236.
- Kondo T, Reaume AG, Huang TT, et al. (1997). Reduction of Zn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and oedema formation after transient focal cerebral ischemia. *The Journal of Neuroscience.* 17: 4180–4189.
- Lo EH. (2010). Degeneration and repair in central nervous system disease. *Nat Med.* . 16: 1205–1209.
- Londoño AC, Arango-Dávila CA, (2011). Efecto neuroprotector de la fluoxetina en un modelo experimental de isquemia cerebral en ratones.

- Rev Medica Sanitas.* 14 (4): 30-38.
- Lotito SB, Frei B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med.* 41: 1727–1746.
  - Lü J-M, Yao Q, Chen C. (2009). Ginseng Compounds: An Update on Their Molecular Mechanisms and Medical Applications. *Current Vascular Pharmacology.* 7: 292–302.
  - McCord JM. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine.* 312(3): 159–163.
  - Muir K. (2000). Free radicals in stroke therapy: basic, preclinical and clinical directions. *Brain.* 123: 193–195.
  - Newall CA, Anderson LA, Philpson JD. (1996). *Herbal Medicine: A Guide for Healthcare Professionals.* The Pharmaceutical Press; London:
  - Oide T, Yoshida K, Kaneko K, Ohta M, Arima K. (2006). Iron overload and antioxidative role of perivascular astrocytes in aceruloplasminemia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 32(2): 170-176.
  - Pong K. (2003). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opin Biol Ther.* 3(1): 127-39.
  - Rodríguez ML, Galvizu SR, Alvarez GE. (2002). Neuro-modulación farmacológica en la enfermedad cerebrovascular. Temas actualizados. *Rev. Cubana Med.* 41(2).
  - Seif-El-Nasr M, Mahran LG, El-Abhar HS, Khalifa AE, El-Denshary ESM. (1999). Possible neuroprotective effects of melatonin against ischaemia/reperfusion insult in rat brain. *Medical Science Research.* 27(9): 605–608.
  - Seok Keun C, Gi-Ja L., Sam-jin C, Youn J, Hun-Kuk P., and Bong J. (2011). Neuroprotective effects by nimodipine treatment in the experimental global ischemic rat model: real time estimation of glutamate. *J Korean Neurosurg Soc.* 49(1): 1–7.
  - Shaheen AA, Abd-El-Fattah AA, Seif-El-Nasr M. (1996). Influence of verapamil on the efficacy of vitamin E in preventing the ischaemia-reperfusion biochemical dearrangement in cerebral cortex of rats. *Arzneimittel-Forsch.* 46: 7670–7673.
  - Shukla N, Maher J, Masters J, Angelini GD, Jeremy JY. (2006). Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor?. *Atherosclerosis.* 187(2): 238-50.
  - Singh-Bora K and Sharma A. (2011). Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011: 792167.
  - Streit WJ, Mrak RE and Griffin WS. (2004). Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation.* 1, 14.
  - Sunderman FW and Nomoto S. (1970). Measurement of Human Serum Ceruloplasmin by Its p-Phenylenediamine Oxidase Activity. *Clinical Chemistry.* 16(11): 903-910.
  - Tamara R. Golden and Manisha Patel. (2009). Catalytic Antioxidants and Neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal.* 11(3): 555–569.
  - Wayne Briner. (2012). The Role of Metal Regulatory Proteins in Brain Oxidative Stress: A Tutorial. *Oxid Med Cell Longev.* 2012: 981561.
  - Williamson G, Manach C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 81: 243S–255S.
  - Zhang YB, Kan MY, Yanga ZH, Ding WL, Yid J, Chena HZ, et al. (2009). Neuroprotective effects of N-stearoyltyrosine on transient global cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res.* 1287: 55–64.
  - Zhe-Min D, Bing W, Wei-Qiao Z, Xiao-Jie L, Yu-Chang L, Yong-Jian G, and Yi-Feng M. (2012). Neuroprotective Effects of Ischemic Preconditioning and Postconditioning on Global Brain Ischemia in Rats through the Same Effect on Inhibition of Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 13(5): 6089–6101.