



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

**Efecto de la suspensión de semilla *Helianthus annuus*
L. (girasol) frente a la neurotoxicidad inducida por
etanol en ratones**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Nutrición

AUTOR

John Henry PINTO GONZA

ASESOR

Oscar Gustavo HUAMÁN GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Pinto J. Efecto de la suspensión de semilla *Helianthus annuus* L. (girasol) frente a la neurotoxicidad inducida por etanol en ratones [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Nutrición; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	John Henry Pinto Gonza
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70913728
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10454580
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6224-9165
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Henry Guija Guerra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09398610
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Mauro Antonio Ruiz Tavares
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09955294
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Marco Antonio Núñez Fonseca

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09446990
Datos de investigación	
Línea de investigación	Bases moleculares de enfermedades multifactoriales y emergentes
Grupo de investigación	BIOQUIMICA Y GENOMICA MOLECULAR APLICADA
Agencia de financiamiento	Autofinanciado
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.057827 Longitud: -77.023030
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2020
URL de disciplinas OCDE	https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00



Firmado digitalmente por
FERNANDEZ GIUSTI VDA DE PELLA
Alicia Jesus FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 16.05.2022 11:21:35 -05:00



Firmado digitalmente por DEXTRE
JAUREGUI Maria Luisa FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 13.05.2022 17:21:26 -05:00

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

“Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional”

ACTA Nº 0016-2022

SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN NUTRICIÓN

Autorizado por RR-01242-R-20

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN : 11 de mayo del 2022.

HORA INICIO : 2:00 pm.

HORA TÉRMINO : 3:00 pm.

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: Dr. Henry Guija Guerra

MIEMBRO: Mg. Mauro Antonio Ruiz Tavares

MIEMBRO: Blgo. Marco Antonio Núñez Fonseca

Asesor: Dr. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

3. DATOS DEL TESISISTA

APELLIDOS Y NOMBRES : John Henry Pinto Gonza

CÓDIGO : 16010103

TÍTULO DE LA TESIS: “Efecto de la suspensión de la semilla *Helianthus annuus L.* (girasol) frente a la neurotoxicidad inducida por etanol en ratones “(Aprobado R.D. Nº 0295-2020-D-FM/UNMSM).



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

“Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional”

4. RECOMENDACIONES:

5. NOTA OBTENIDA : 18 (dieciocho)

6. PÚBLICO ASISTENTE

Nº	Nombre y Apellidos	DNI
1	Jimena Vargas Gonzales	71216794
2	Melina Melissa Fernández Saire	40527211
3	Bresly Ambar Pacheco López	70085889
4	Lorena Vilchez Jorge	77388225
5	Aaron Eduardo Tirado Nieto	70616306
6	Jesus Isaias Marx Carhuancho Bejarano	73675465
7	Paolo Leon Espinoza Alvarez	76589431
8	Lorena Margot Flores Castro	75204496
9	Luis Fernando Aliaga	70091026
10	Jesús Jaime José Huamaní Reyes	72856248
11	Luis Enrique Zevallos Cruz	46533443
12	Xiomerle Camila Garcia Salinas	72976480
13	Kevin Alonso Yovera Solano	74762299

Datos de la plataforma virtual:

<https://www.google.com/url?q=https://us02web.zoom.us/j/86323951855?pwd%3DMFhHRHJ1Q2VzOWx0RXVCZS90RC8xZz09&sa=D&source=calendar&ust=1652633567353275&usg=AOvVaw2a8uyyMgWfMab1Z8X0btv>

ID de reunión: 863 2395 1855

Código de acceso: 968911

Grabación archivada en Grabaciones de Sustentación



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

“Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional”

FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

Estando de acuerdo con la presente acta, el Jurado de Sustentación firma en señal de conformidad:

Dr. Henry Guija Guerra
Docente Auxiliar
Presidente

Mg. Mauro Antonio Ruiz Tavares
Docente Asociado
Miembro

Bigo. Marco Antonio Núñez Fonseca
Docente Asociado
Miembro

Dr. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez
Docente Principal
Asesor

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Rosa y Adolfo, por los consejos y el apoyo incondicional sumado a la motivación que me brindaron para verme emprender profesionalmente, agradezco el esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

A mi mentor el Dr. Oscar Huamán, por sus enseñanzas, apoyo, confianza, paciencia y dedicación durante la elaboración de la tesis.

Al Facultad de Medicina San Fernando de la UNMSM y al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón”, por brindarme los espacios adecuados para la ejecución de mi tesis.

A la escuela profesional de Nutrición por permitirme estudiar en sus aulas ya los docentes por haberme formado e inculcado valores.

A mis hermanos David y Luz quienes me ayudaron y motivaron durante todo este proceso de aprendizaje.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo en la aplicación de la tesis y compartir muchos momentos gratos.

A mis amigos de clase, con los que he compartido experiencias y anécdotas inolvidables, por haberme motivado a seguir adelante profesionalmente.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Introducción	1
I.2. Planteamiento del problema	2
I.2.1. Determinación del problema.....	2
I.2.2. Formulación del problema	3
I.3. Objetivos	3
I.3.1. Objetivo general.....	3
I.3.2. Objetivos específicos	3
I.4. Importancia y alcance de la investigación	4
I.5. Limitación de la investigación	4
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
II.1. Antecedentes del estudio	5
II.2. Bases teóricas.....	6
II.3. Definición de términos	10
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES	11
III.1. Hipótesis	11
III.2. Variables.....	11
III.3. Definición operacional de variables	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
IV.1. Tipo de estudio	13
IV.2. Materiales.....	13
IV.2.1. Materiales biológicos	13
IV.2.2. Reactivos químicos	13
IV.3. Equipos e instrumentos	13
IV.4. Muestra	13
IV.4.1. Unidad de análisis	13
IV.4.2. Tamaño de muestra	13
IV.5. Criterios de inclusión y exclusión	14
IV.6. Adquisición y preparación de la suspensión de semilla	14
IV.7. Acondicionamiento y aclimatación de los animales	14
IV.8. Inducción a la Neurotoxicidad	15
IV.9. Procesamiento de los indicadores	16
IV.9.1. Determinación de indicadores bioquímicos	16
IV.9.1.1. Determinación del nivel de lipoperoxidación (TBARS) en tejido cerebral	16

IV.9.1.2. Determinación del nivel de GSH y GSH total en tejido cerebral	16
IV.9.1.3. Determinación del nivel de grupo sulfhídrido proteico en tejido cerebral	17
IV.9.2. Determinación de indicadores morfológicos índice cerebro y cerebelo	17
IV.9.3. Procedimiento del estudio histológico	17
IV.10. Análisis estadístico	18
IV.11. Aspectos éticos	18
V. RESULTADOS	19
V.1. Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral	19
V.2. Perfil de glutatión en tejido cerebral	20
V.3. Niveles de grupos sulfhídrido proteicos en tejido cerebral	21
V.4. Índice de tejido de cerebro y cerebelo	22
V.5. Descripción histológica del tejido nervioso	23
VI. DISCUSIÓN	27
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. RECOMENDACIONES	36
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37
X. ANEXOS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de ratones según grupo de tratamiento	15
Tabla 2: Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral de ratones, según grupo de tratamiento	19
Tabla 3: Perfil de glutatión en tejido cerebral de ratones, según grupo de tratamiento	20
Tabla 4: Niveles de grupos sulfhídricos proteicos en tejido cerebral de ratones, según grupo de tratamiento	21
Tabla 5: Índice de tejido de cerebro y cerebelo de ratones, según grupo de tratamiento	22
Tabla 6: Descripción histológica de tejido cerebral y cerebeloso de ratones, según grupo de tratamiento	23

ÍNDICE DE MICROTOFOGRAFÍAS

Análisis histológico

Microfotografía óptica 1. Grupo I: muestra de cerebro (sin tratamiento).....	25
Microfotografía óptica 2. Grupo I: muestra de cerebelo (sin tratamiento).....	25
Microfotografía óptica 3. Grupo II: muestra de cerebro (agua + etanol por 15 días)	25
Microfotografía óptica 4. Grupo II: muestra de cerebelo (agua + etanol por 15 días)	25
Microfotografía óptica 5. Grupo III: muestra de cerebro (vitamina E 20 UI + etanol por 15 días)	25
Microfotografía óptica 6. Grupo III: muestra de cerebelo (vitamina E 20 UI + etanol por 15 días)	25
Microfotografía óptica 7. Grupo IV: muestra de cerebro (suspensión de semilla 200 mg/kg + etanol por 15 días).....	26
Microfotografía óptica 8. Grupo IV: muestra de cerebelo (suspensión de semilla 200 mg/kg + etanol por 15 días)	26
Microfotografía óptica 9. Grupo V: muestra de cerebro (suspensión de semilla 600 mg/kg + etanol por 15 días).....	26
Microfotografía óptica 10. Grupo V: muestra de cerebelo (suspensión de semilla 600 mg/kg + etanol por 15 días)	26

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Semilla de <i>Helianthus annuus</i> (girasol).....	46
ANEXO 2: Clasificación Taxonómica de la semilla <i>Helianthus annuus L.</i>	47
ANEXO 3: Jaula de ratones	48
ANEXO 4: Flujograma del diseño experimental	49
ANEXO 5: Administración de la suspensión de semilla <i>Helianthus annuus L.</i>	50
ANEXO 6: Guillotina para ratones	51
ANEXO 7: Disección del tejido cerebral y cerebeloso.....	52
ANEXO 8: Evaluación histológica del tejido cerebral y cerebeloso	53
ANEXO 9: Acta de aprobación del comité de ética en investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos	57

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades neurodegenerativas en los últimos años elevó su prevalencia, afectando en su mayoría a los adultos mayores, siendo una de las causas el estrés oxidativo. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la suspensión de semilla de *Helianthus annuus L.* frente a neurotoxicidad inducida por etanol en ratones. **Materiales y métodos:** Se utilizó la suspensión de semilla de girasol (SSG) y 35 ratones macho. Se formaron cinco grupos los cuales recibieron los siguientes tratamientos por 15 días, vía peroral: grupos I-II (agua 10mL/kg), grupo III (vitamina E 20UI/kg), grupo IV (SSG 200mg/kg) y grupo V (SSG 600mg/kg). Treinta minutos después del tratamiento se administró etanol al 40% (1,8g/kg) vía intraperitoneal, excepto al grupo I. Posteriormente se retiró el cerebro y cerebelo para efectuar los análisis bioquímicos e histológicos. **Resultados:** Respecto al grupo V se apreció menores valores de lipoperoxidación, mayores valores de GSH, relación GSH/GSSG y grupos sulfhidrilos proteicos, a nivel del tejido cerebral, siendo significativo, frente al grupo II. A nivel histológico los grupos tratados con SSG mostraron protección del tejido cerebral y cerebeloso. **Conclusión:** La ingesta de suspensión de semilla de *Helianthus annuus L.* (girasol) presenta efecto neuroprotector frente a la toxicidad inducida por etanol en ratones.

Palabras claves: *Helianthus annuus L.*, antioxidante, etanol, neuroprotección.

ABSTRACT

Introduction: Neurodegenerative diseases in recent years have increased their prevalence, affecting mostly older adults, one of the causes being oxidative stress. **Objective:** To evaluate the effect of *Helianthus annuus L.* seed suspension against ethanol-induced neurotoxicity in mice. **Materials and methods:** Sunflower seed suspension (SSG) and 35 male mice were used. Five groups were formed which received the following treatments for 15 days, perorally: groups I-II (water 10mL/kg), group III (vitamin E 20IU/kg), group IV (SSG 200mg/kg) and group V (SSG 600mg/kg). Thirty minutes after treatment, 40% ethanol (1.8g/kg) was administered intraperitoneally, except for group I. Subsequently, the brain and cerebellum were removed for biochemical and histological analysis. **Results:** Regarding group V, a lower level of lipid peroxidation, higher levels of GSH, GSH/GSSG ratio and protein sulfhydryl groups were observed, at the level of brain tissue, being significant, compared to group II. At the histological level, the administration of SSG showed protection of the brain and cerebellar tissue. **Conclusion:** Ingestion of *Helianthus annuus L.* (sunflower) seed suspension has a neuroprotective effect against ethanol-induced toxicity in mice.

Keywords: *Helianthus annuus L.*, antioxidant, ethanol, neuroprotection.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas a nivel mundial son una de las causas más comunes y crecientes de morbilidad y mortalidad, afectando particularmente a los adultos mayores.¹ Así mismo se menciona que las enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer y el Parkinson, tienen una conexión significativa con el estrés oxidativo causado por un excesivo aumento en las especies reactivas de oxígeno.²

Un estudio realizado por Dávila en el 2015 reportó, los efectos neuroprotectores de la semilla de almendra mediante parámetros bioquímicos e histológicos, asignando esta propiedad a ciertos componentes que posee la semilla como la vitamina E, flavonoides y ácidos fenólicos.³

En nuestro estudio se observó que los grupos tratados con semilla de *Helianthus annuus* L. (girasol) presentaron mayores niveles en el perfil de glutatión y grupos sulfhidrilos, y menores niveles de lipoperoxidación e índices de cerebro y cerebelo. A nivel histológico en tejido cerebral se observó una menor presencia de linfocitos, edemas y vasos congestivos; a nivel del cerebelo se observó la presencia de edema en algunas células de Purkinje y algunas células presentaron retracciones citoplasmáticas en la capa molecular, todo ello en comparación con el grupo control.

Los resultados antes mencionados pueden estar relacionados con ciertos componentes que posee la semilla de *Helianthus annuus* (girasol) como la vitamina E, selenio, flavonoides y ácidos grasos poliinsaturados.⁴ Así mismo se menciona que estos compuestos cumplen función antioxidante a nivel del tejido cerebral, reduciendo el daño causado por estrés oxidativo.^{5,6}

I.2. Planteamiento del problema

I.2.1. Determinación del problema

En la actualidad las enfermedades neurodegenerativas, tal sea el caso del Alzheimer o Parkinson, son considerados un problema de salud a nivel mundial,⁷ evidenciándose que el grupo etario más afectado por este tipo de enfermedades son los adultos mayores.⁸

En el Perú la situación actual según el informe técnico presentado por el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) en el 2021, se presenta un aumento del porcentaje de la población adulta mayor de 5,7% en el año 1950 a 13% en el 2021.⁹ El adulto mayor pasa por un proceso universal e irreversible denominado envejecimiento el cual se caracteriza por cambios biológicos que conducen al deterioro morfológico-funcional del organismo, evidenciándose senescencia y muerte celular, lo que expone a esta población a contraer las enfermedades neurodegenerativas.¹⁰ Evidencia del daño producido en la etapa del envejecimiento está relacionado al estrés oxidativo a causa de las especies reactivas de oxígeno las cuales producen modificaciones a nivel celular viéndose así alterada su estructura y función.¹¹

Algunos factores como la ingesta de alcohol, baja ingesta de antioxidantes (vegetales o frutas), asimismo un bajo nivel de actividad física, se encuentran relacionados al estrés oxidativo, el cual se debe a un exceso de radicales libres o una deficiencia de los sistemas antioxidantes.¹² Existe evidencia de que el aumento en la producción de los radicales libres está asociado a daño en las membranas lipídicas de las estructuras cerebrales ocasionándose así las enfermedades neurodegenerativas.¹³

En el Perú no se han realizado muchos estudios *in-vivo* sobre las propiedades que presenta la semilla de girasol en su estado natural, algunos estudios reportan efectos beneficiosos frente a infarto de miocardio en el cual se trabajó con el aceite de la semilla de girasol brindando esta propiedad a sus componentes fitoquímicos (flavonoides y taninos).¹⁴

I.2.2. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto de la suspensión de semilla *Helianthus annuus L.* (girasol) frente a neurotoxicidad inducida por etanol en ratones?

I.3. Objetivos

I.3.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de la suspensión de semilla de *Helianthus annuus L.* (girasol) frente a neurotoxicidad inducida por etanol en ratones.

I.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la suspensión de semilla *Helianthus annuus L.* (girasol) sobre los indicadores bioquímicos del estrés oxidativo del daño inducido por etanol en ratones.
- Determinar el efecto de la suspensión de semilla *Helianthus annuus L.* (girasol) sobre la morfología del cerebro y cerebelo frente a la toxicidad inducida por etanol en ratones.

I.4. Importancia y alcance de la investigación

Tomando en consideración las evidencias e incidencias de enfermedades neurodegenerativas, encontradas en la población adulta, entre ellas el Alzheimer y Parkinson, los cuales presentan como un factor de causa al estrés oxidativo producido por el exceso de especies reactivas de oxígeno, el cual está asociado con un estilo de vida poco saludable (bajo nivel de actividad física y/o mala alimentación).

Los resultados de este estudio permitirán conocer los beneficios atribuidos a la semilla *Helianthus annuus L.* (girasol), sobre su efecto a nivel de tejido cerebral, brindando de esta manera bases científicas para futuras investigaciones respecto a una propiedad funcional y de esta manera ofrecer y promocionar una alternativa de bajo costo, accesible y seguro para la prevenir el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas en la población.

Teniendo en cuenta que han sido pocos los estudios realizados sobre los efectos benéficos de la semilla de girasol, sin embargo, ésta es consumida por la población en diversas preparaciones de la gastronomía peruana como acompañantes de ensaladas o preparaciones más elaboradas, por lo tanto, los resultados de nuestro estudio sobre la semilla permitirán reducir el vacío de conocimientos sobre los beneficios en el tejido nervioso.

I.5. Limitación de la investigación

Muerte imprevista del recurso biológico (ratones).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1. Antecedentes del estudio

En el 2005 Kuskosky y colaboradores realizaron un estudio en Brasil, en el cual correlacionan diversos compuestos bioactivos, entre los que destacan los antioxidantes como la vitamina E, polifenoles, carotenoides y terpenoides, mencionando que el hecho de poseer estos antioxidantes está directamente relacionado con llevar una mayor capacidad antioxidante, el cual se puede ver afectado por factores fisiológicos de estrés.¹⁵

Estudios realizados en semilla de girasol demostraron que posee alfa-tocoferol en más de un 90% del contenido de tocoferoles totales, al cual se le infirió un efecto antioxidante significativo ante la acción de los radicales libres.¹⁶ Por otro lado, otra investigación realizada en Perú por Dávila Cordová (2015), en tejido cerebral de ratones, explica cómo se reduce los niveles de lipoperoxidación, además de encontrar a su vez una menor lesión en los parámetros histológicos, atribuyendo esta acción al alfa-tocoferol y compuestos fenólicos entre ellos flavonoides, flavonas, antocianinas y ácidos fenólicos componentes que poseen capacidad antioxidante.³

En otro estudio realizado en Perú en el 2019 por Palomino respecto al efecto neuroprotector de la hojuela de quinua, ha reportado que un bajo nivel de lipoperoxidación y la presencia leve de edemas en el tejido cerebral, está asociado a ciertos compuestos fitoquímicos que contiene la quinua, entre los cuales menciona a los flavonoides (Kaempferol y Quercetina), ácidos fenólicos, fitoesteroles, carotenoides, antocianinas y la Vit c, atribuyéndoles la propiedad de antioxidantes por consiguiente una actividad neuroprotectora.¹⁷

II.2. Bases teóricas

La demencia es una enfermedad que lleva como consecuencia la pérdida de la memoria, deterioro del intelecto y la capacidad de realizar las diversas labores diarias. Se calcula que entre un 5% y 8% de la población general de adultos mayores de 60 años, en algún determinado momento llega a sufrir demencia. La enfermedad del Alzheimer es la forma más común en que se presenta la demencia, la cual acapara un 60% a 70% de los casos. Siendo esta enfermedad una de las causas primordiales de discapacidad y dependencia de los adultos mayores en todo el mundo.¹⁸

En la población de América Latina la demencia presenta una prevalencia de 8,5% en adultos mayores de 60 años, sin presentarse valores significativos en la diferenciación entre varones y mujeres.¹⁹

El Perú reportó en el 2017, 3,665 personas que fueron diagnosticadas de Alzheimer y otras demencias, del cual 3,490 fueron adultos mayores (>60 años), ello evidenciado en el “Registro de atenciones realizadas a nivel nacional”.²⁰

El sistema nervioso se encuentra dividido en dos; Sistema nervioso Central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El sistema nervioso central está constituido por el encéfalo y la médula espinal, mientras que el sistema nervioso periférico se conforma de nervios craneales y raquídeos los cuales permiten la comunicación entre el SNC y las diferentes regiones del organismo.²¹

La unidad funcional del sistema nervioso es la neurona, la cual cumple la función de recepción y transmisión del impulso nervioso, mientras que los astrocitos son células que brindan a las neuronas el apoyo estructural y metabólico necesario.²² Por otro lado, la microglía cumple un papel importante de respuesta inmunológica ante posibles agentes dañinos para las neuronas, esta una vez activada produce una serie de compuestos citotóxicos entre ellos: las especies reactivas de oxígeno (EROs), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y óxido nítrico (NO), generando lesión y apoptosis celular.²³

La corteza cerebral es la capa más externa del encéfalo, el cual contiene sustancia gris que está conformado por somas neuronales, axones, dendritas

y células gliales siendo la corteza cerebral el lugar principal de la sinapsis.²² Por otro lado, la corteza cerebelosa está constituido de tres capas las cuales son: la capa molecular, la capa de células de Purkinje y laca celular granular.²⁴

El estrés oxidativo es definido como la exposición que presenta la materia viva a diversos factores que producen un desequilibrio entre los mecanismos antioxidantes y las sustancias prooxidantes, ya se deba este por un déficit en los mecanismos antioxidantes o por un exagerado incremento de las especies reactivas de oxígeno.²⁵ Siendo el radical libre una especie química, la cual posee uno o más electrones no apareados en su estructura, altamente muy reactiva y clave en una formación en cadena de otros radicales libres.²⁶

El SNC está constituido en su mayor parte por ácidos grasos poliinsaturados y hierro (Fe^{+3}), de los cuales este último sumado al elevado metabolismo propio del SNC y a la reducida capacidad antioxidante, conduce a un estado de estrés oxidativo y posteriormente lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs).^{13,27} Los cuales cumplen un papel muy importante en la fisiopatología ya que una acumulación de estas produce la degeneración estructural y deterioro funcional de las células neuronales, generando así daño al tejido cerebral.²⁵

El proceso total por el cual las EROs causan daño hacia tejido cerebral es incierto, pero reportan que las EROs desencadenan cascadas moleculares que aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica viéndose alterada la morfología del tejido cerebral, ocasionándose así una neuroinflamación y posteriormente la muerte celular.²⁸

Otro proceso por el cual se estima la acción de las EROs, es que al haber un aumento de estos, la neuronas presinápticas secretan glutamato el cual es un neurotransmisor excitatorio, que es captado por los receptores NMDA (ácido N-metil-D-áspartico) de las neuronas posinápticas, este ingreso de glutamato sumado a la elevada concentración de EROs, llevan a un incremento en los niveles de calcio intracelular (Ca^{+2}) lo que produce la activación de proteasas, fosfolipasas, endonucleasas y la óxido nítrico sintasa, los cuales son los detonantes para el daño y la muerte celular.^{29,30}

El etanol es considerado por su consumo excesivo o crónico una sustancia psicoactiva, la cual puede atravesar la barrera hematoencefálica en un 90%,

ocasionando numerosas enfermedades inflamatorias y degenerativas, afectando principalmente al sistema nervioso central causando una atrofia en la corteza cerebral y cambios en la conducta.^{31,32}

El etanol en el organismo llega a ser metabolizado a acetaldehído produciendo intoxicación y con ello una serie de cambios en el organismo, mencionando así que la producción de acetaldehídos actúa a nivel de neurotransmisores para producir tetraquinolinas interfiriendo en el funcionamiento neuronal, por otra parte, el consumo el alcohol actúa inhibiendo la liberación de oxitocina y vasopresina alterando el comportamiento en animales o humanos.³²

Para contrarrestar el efecto dañino de las de las EROs, el organismo presenta defensas antioxidantes, los que incluyen a enzimas y moléculas no enzimáticas. Siendo las enzimas la primera línea de defensa ante los radicales libres, seguido de las moléculas antioxidantes no enzimáticas.³³ Los antioxidantes también se pueden clasificar en: endógenos que son sintetizados en el organismo y exógenos aquellos que se obtienen por la alimentación.³⁴

Se considera que un mayor aporte de antioxidantes se logra mediante el consumo de frutas y verduras, ya que estas previenen los efectos adversos que pueden llegar a presentar las EROs en el organismo.²⁶ Algunas moléculas no enzimáticas encontrados en las frutas y verduras son: vitamina E, vitamina C, polifenoles, betacaroteno entre otros, los cuales presentan una gran capacidad antioxidante, previniendo enfermedades de tipo crónico degenerativas.³⁵

La vitamina E (tocoferol) presenta una estructura química compuesta por un anillo de cromanol unido a un fitilo saturado denominado tocoferol, este varia en cuanto al número de grupos metilo presenten en el anillo cromanol; presentándose las variaciones en alfa, beta y delta tocoferoles, siendo el alfa-tocoferol el más distribuido y activo en el organismo.³⁶

Esta vitamina liposoluble se caracteriza por presentar un potente efecto antioxidante en el plasma de los humanos,³⁷ la cual actúa aumentando la resistencia de las lipoproteínas LDL ante la oxidación, evitando así el efecto aterogénico que podrían presentar,³⁶ de esa manera queda comprobada el potencial antioxidante que presenta la vitamina E, frente a los procesos de oxidación de lípidos en sistemas biológicos.³⁸

El selenio es un elemento esencial para el organismo el cual es producido de manera endógena, fluctuando sus niveles séricos en diversas poblaciones, pero puede también adquirirse de manera exógena, por medio del consumo de vegetales y semillas,³⁹ estas son metabolizadas en el organismo para después cumplir labores biológicas, teniendo como principal función la de regular la síntesis de selenoproteínas, entre ellas glutatión peroxidasa, yodotironina desiodinasas, y la tiorredoxina reductasa, las cuales cumplen a nivel intracelular la función de antioxidantes evitando lesiones oxidativas.⁴⁰ Evidencias demuestran que el selenio cumple un papel muy importante dentro de la fisiología del cerebro, ya que se encontró deficiencia de este, en pacientes con trastornos cognitivos o con funciones cognitivas deterioradas.⁴¹

El girasol (*Helianthus annuus* L.), nombre que proviene del griego Helios (sol) y anthos (flor). Linneo la denominó “annuus” que significa anual, debido a que en esas épocas solo se sabía de una especie anual de *Helianthus*.⁴²

Clasificación taxonómica de la *Helianthus annuus* L. (girasol)

Division: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Magnoliidae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Helianthus*

Especie: *Helianthus annuus* L.

El girasol es una planta cultivada de manera ornamental la cual es muy llamativa por su florescencia, presentando una semilla característica, la cual presenta ácidos grasos polinsaturados, vitamina E, selenio, tiamina y niacina.⁴³ En la actualidad las semillas de girasol son aprovechadas por su característica oleaginosa en la elaboración de aceites, pero también son consumidas de manera directa.⁴⁴

Las semillas poseen diversos compuestos bioactivos entre los que destacan los antioxidantes, como la vitamina E, los polifenoles, carotenoides y terpenoides. El hecho de poseer antioxidantes está relacionado a su capacidad antioxidante, el cual se puede ver afectado por factores fisiológicos.⁴⁵

Las semillas de girasol en su forma natural poseen alfa-tocoferol en más de un 90%, del contenido de tocoferoles totales, al cual se le infiere un efecto antioxidante significativo ante la acción de los radicales libres.¹⁶

II.3 Definición de términos

Lipoperoxidación: Es un proceso ocasionado por la gran afinidad que presentan los ácidos grasos poliinsaturados hacia los radicales libres (radical hidroxilo), donde estos últimos quitan un átomo de hidrogeno del grupo metilo de los ácidos grasos, generándose así el radical lipídico.⁴⁶

Glutación: Es un tripéptido constituido por: glicina, cisteína y ácido glutámico, este se encuentra en tejidos corporales cumpliendo un papel muy importante en la reducción del estrés oxidativo y así mantener el equilibrio redox.⁴⁷

Radicales libres: Son una especie química que posee uno o más electrones no apareados (se encuentra solo en su orbital).⁴⁸

Antioxidantes: Sustancia que previene o retrasa la oxidación de sustratos oxidables a pesar de estar en concentraciones menores a las del sustrato.⁴⁹

Malondialdehído: Producto secundario de la peroxidación de lípidos.⁵⁰

Edema citotóxico: “Acumulación de agua en células intactas”.⁵¹

Estrés oxidativo: Es un desequilibrio entre antioxidantes y oxidantes, siendo favorable hacia los oxidantes, conduciendo a una interrupción sobre la señalización y control redox y/o daño celular.⁵²

Enfermedades neurodegenerativas: Son trastornos, caracterizados por pérdida gradual de la estructura y función neuronal, que eventualmente pueden conducir a la muerte.⁵³

Microglia: Es una célula fagocitaria, perteneciente al sistema inmunitario innato del sistema nervioso central.⁵⁴

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

III.1. Hipótesis

La administración de la suspensión de semilla de *Helianthus annuus L.* (girasol) presenta efecto neuroprotector frente a toxicidad inducida por etanol en ratones.

III.2. Variables

Variable independiente: **Suspensión de semilla *Helianthus annuus L.* (girasol)**; es un sistema de heterogéneo,⁵⁵ el cual se obtiene de la trituración de semilla *Helianthus annuus L.* (girasol) con la ayuda de un mortero.

Variable dependiente: **Neuroprotección**: Es la consecuencia de una intervención, que previene o retrasa la neurodegeneración, evitando la muerte neuronal e interfiriendo en diversos eventos como son el aumento de estrés oxidativo y la producción de productos tóxicos que producen muerte celular.^{56,41}

III.3. Operacionalización de las variables

Variables	Definición operacional	Dimensión	Indicadores	Puntos de corte	Tipo Escala de medición
Variable independiente: Suspensión de semilla <i>Helianthus annuus L.</i> (girasol) Es un sistema de heterogéneo, ⁵⁵ el cual se obtiene de la trituration de semilla <i>Helianthus annus L.</i> (girasol) con la ayuda de un mortero.	Es la administración del sistema de suspensión de la semilla, que se obtuvo por medio de la trituration.	-	Administración de la suspensión de semilla <i>Helianthus annus L.</i> (girasol).	Dosis: 200 mg/kg. Dosis: 600 mg/kg.	Cualitativa/ ordinal
Variable dependiente: Efecto sobre tejido cerebral (Neuroprotección). Es la consecuencia de una intervención, que previene o retrasa la neurodegeneración, evitando la muerte neuronal e interfiriendo en diversos eventos como son el aumento de estrés oxidativo y la producción de productos tóxicos que producen muerte celular. ^{56,41}	Es el efecto beneficioso de la administración de la suspensión de semilla <i>Helianthus annus L.</i> (girasol), sobre los marcadores bioquímicos del estrés oxidativo y morfológicos del cerebro y cerebelo.	Bioquímico del estrés oxidativo	Nivel de lipoperoxidación	-	Cuantitativa continua/ Razón
			Nivel de GSH		
			Nivel de la relación GSH/GSSG		
			Nivel de grupo sulfhídricos proteico.		
		Morfológico	Nivel de índice de tejido cerebral	-	Cuantitativa /razón
			Nivel de índice de tejido cerebeloso	-	Cuantitativa /razón
Morfológico	Descripción histológica de cerebral	-	Cualitativa nominal		
	Descripción histológica cerebeloso	-	Cualitativa nominal		

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Tipo de estudio

Según Hernández Sampieri es de enfoque cuantitativo, experimental puro, con grupo control y posprueba únicamente.⁵⁷

IV.2. Materiales

IV.2.1 Materiales biológicos

- Semilla de *Helianthus annuus* L. (Girasol).
- Ratones macho Albinos *Mus musculus* cepa BALB/c.

IV.2.2. Reactivos químicos

- Etanol (SPECTRUM®)
- Vitesol E 400®, cápsula en gel de vitamina E (D-alfatocoferol acetato equivalente a vitamina E 400 UI) (PROCAPS®)
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Sigma®)
- 5,5' -ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (SIGMA®)
- Reactivo de Folin-Ciocalteus (MERCK®)
- Acido ascórbico (LOBA-CHEMIE®)
- Acido glioxílico (MERCK®)
- Buffer fosfato 0,01 M pH 7,4 (Riedel-de Haen®)
- Formol 40% (SPECTRUM®)

IV.3. Equipos e instrumentos

- Guillotina (Kent Scientific)
- Homogenizador Tissue Tearor (A. BIOSPEC PRODUCTS, INC).
- Espectrofotómetro (Genesys 10s)
- Baño maría (BOECO Germany)
- Centrifuga Refrigerada (DALB®)
- Centrifuga Clínica (FARLAB®)

IV.4. Muestra

IV.4.1. Unidad de análisis: Ratones macho albinos BALB/c (*Mus musculus*), con un peso aproximado de $31,8 \pm 3.9$ g y con una edad de tres meses.

IV.4.2. Tamaño de muestra: Se utilizaron 35 ratones macho divididos aleatoriamente en cinco grupos (n=7).

IV.5. Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- Ratones albinos machos BALB/c (*Mus musculus*).
- Peso aproximado de 30 - 35 g con tres meses de edad.

Exclusión:

- Los animales no deben haber sido manipulados anteriormente.
- No deben presentar algún tipo de enfermedad.
- No deben tener ninguna amputación en sus extremidades.

IV.6. Adquisición y preparación de la suspensión de semilla

Las semillas de *Helianthus annuus* L. “girasol”, fueron adquiridas en un centro de ventas de productos naturales, con marca registrada Nutrimix® el cual expende las semillas peladas y adecuadas para el consumo (ver Anexo 1).

Las semillas de girasol se conservaron en un ambiente seco hasta el momento de utilización. Una muestra de las semillas fue utilizada para la clasificación taxonómica por un biólogo especializado en botánica (ver Anexo 2).

La suspensión fue preparada diariamente antes de cada administración para evitar su deterioro biológico, este procedimiento se llevó a cabo con un mortero de porcelana y agua, para obtener las dosis 200 mg/kg y 600 mg/kg.

IV.7. Acondicionamiento y aclimatación de los animales

Se emplearon ratones macho, adquiridos en el Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud, y llevados a un tiempo de aclimatación de cinco días en jaulas acondicionadas de 24 cm ancho x 45 cm largo y 20 cm alto (ver Anexo 3), a una temperatura de 20 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, una densidad animal de 5 ratones por jaula y libertad de acceso a una dieta balanceada el cual fue adquirido en el Centro de Producción de la Universidad Nacional Agraria La Molina y una disponibilidad de agua *ad libitum*. Estas condiciones están en base al cuidado y manejo del Instituto Nacional de Salud.⁵⁸

IV.8. Inducción a la Neurotoxicidad

La inducción a la neurotoxicidad se realizó empleando el método propuesto por Witte and Bada (1983),⁵⁹ el cual consiste en la administración vía intraperitoneal, de etanol al 40%, a una dosis de 1,8 g/kg durante 15 días. (ver Anexo 4)

Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en cinco grupos (n=7), los cuales recibieron el siguiente tratamiento, vía orogástrica (ver Anexo 5) por 15 días:

Tabla N°1: Distribución de ratones según grupo de tratamiento

Grupos	Tratamiento por canulación (por 15 días)
I	Agua 10 mL/kg de peso
II	Agua 10 mL/kg de peso
III	Vitamina E 20 UI/kg de peso
IV	200 mg/kg de <i>Helianthus annuus</i> L. (girasol)
V	600 mg/kg de <i>Helianthus annuus</i> L. (girasol)

El alcohol fue administrado del grupo II al grupo V, junto con el tratamiento a las dosis de 1,8 g/kg de peso (solución de etanol al 40%) vía intraperitoneal, el grupo I recibió NaCl 0,9 %.

Terminado el tratamiento, los animales tuvieron un periodo de ayuno de 12 horas, posteriormente fueron trasladados a un ambiente adecuado para el sacrificio, siendo manipulados de manera cuidadosa para evitar su estrés. La técnica utilizada para el sacrificio fue la decapitación, para la cual se utilizó una guillotina específica para ratones (ver Anexo 6), provocando así una pérdida rápida de la conciencia sin dolor.⁶⁰

Los tejidos de cerebro y cerebelo fueron extraídos de la cavidad craneana y seguidamente lavados en NaCl 0,9 %, toda la manipulación se realizó sobre placas de hielo (4°C), posteriormente se procedió al pesado de los tejidos haciendo uso de una balanza analítica. (ver Anexo 7)

El hemisferio derecho fue empleado para la preparación del homogenizado; el hemisferio izquierdo y el cerebelo fueron conservados en formol al 10 % en buffer fosfato pH 7,4 a 0,075 mol/L.

IV.9. Procesamiento de los indicadores

IV.9.1 Determinación de los indicadores bioquímicos

Preparación del homogenizado y obtención del sobrenadante: Se utilizó 150 mg de tejido cerebral de ratón (hemisferio derecho), el cual se procedió a homogenizar en buffer fosfato pH 7,4 a 0,01 mol/L hasta obtener el volumen final de 1,5 mL (10% en tejido) para su posterior centrifugación a 2500 rpm por un tiempo de 5 minutos y separar los detritus de tejido.

IV.9.1.1. Determinación del nivel de lipoperoxidación en tejido cerebral

La lipoperoxidación fue determinada por el método Buege y Aust (1978).⁶¹

Fundamento: El malondialdehído es producto de la lipoperoxidación de ácidos grasos, que en su mayoría proceden de las membranas celulares. Este dialdehído interacciona con dos moles de ácido 2-tiobarbitúrico dando paso a la formación de un cromógeno de color rosado, presentando una absorbancia máxima a 535 nm.⁶¹

IV.9.1.2. Determinación del nivel de GSH y GSH total en tejido cerebral

Para la determinación de los niveles de GSH y GSH total se usó la metodología propuesta por Boyne y Ellman (1972).⁶²

Fundamento: Se basa en la oxidación de grupos sulfhídricos del glutatión por la acción del ácido 5,5' -ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), formando un mol de ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), presentado una absorbancia máxima a 412 nm. Para la determinación del GSH total se empleó una solución buffer que contenía 20 mg de ácido ascórbico y 10 mg de ácido glioxílico por cada 20 mL de buffer.⁶²

IV.9.1.3. Determinación del nivel de grupo sulfhídrico proteico en tejido cerebral

Se empleó la metodología propuesta por Boyne y Ellman (1972),⁶² condicionado a la muestra.

Protocolo: el sobrenadante del homogenizado fue diluido 1/10 con buffer fosfato pH 7,4 a 0,01 mol/L, se tomó 0,3 mL del diluido y añadió 1 mL de buffer fosfato pH 6,8 a 0,5 mol/L, posteriormente fue incubado a 37°C, en baño maría, por un tiempo de 5 minutos. Concluido el periodo de incubación se añadió DNTB 1,5 mg/mL y luego de 5 minutos se procedió a dar lectura en el espectrofotómetro a 412 nm.⁶²

IV.9.2. Determinación de indicadores morfológicos índice cerebro y cerebelo.

El tejido de cerebro o cerebelo una vez lavado con NaCl 0,9%, se procedió a secarlo, para así eliminar residuos de NaCl 0,9% del tejido, finalmente haciendo uso de una balanza analítica se procedió al pesado del tejido. El índice cerebro y cerebelo se definió haciendo uso de la formula:

$$IC = \frac{WC}{WA} \times 100$$

IC: índice de cerebro o cerebelo

WC: peso en gramos del tejido de cerebro o cerebelo

WA: peso en gramos del animal

IV.9.3. Procedimiento del estudio histológico

Para el procesamiento histológico se consideró la sección del hemisferio izquierdo y el cerebelo, los cuales se mantuvieron conservados con formol al 10% en buffer fosfato pH 7,4 a 0,075 mol/L. La tinción utilizada fue Hematoxilina-Eosina. Las láminas histológicas fueron evaluadas por un Médico Patólogo (ver Anexo 8), considerando los siguientes criterios:

Cerebro: Conservación de la corteza cerebral, densidad de células neuronales, presencias de edemas en el tejido.

Cerebelo: Conteo y estado morfológico de células de Purkinje.

IV.10. Análisis estadístico

Culminada la ejecución del diseño experimental, se ordenó y analizó los datos encontrados, para el cual se utilizó MS- Excel 2016 y el programa estadístico SPSS 25.0 en el cual se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Los indicadores con distribución simétrica ($p > 0,05$) se evaluaron con la prueba estadística de ANOVA y posteriormente la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. Para aquellos indicadores con varianzas homogéneas se aplicó la prueba post hoc de Tukey y aquellos que presentaron varianzas diferentes se evaluaron por medio del post hoc Games - Howell.

Los datos que presentaron distribución asimétrica ($p < 0,05$) fueron evaluados mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis, vía de corrección de Dunn-Bonferroni.

Se utilizó un $p < 0,05$ para considerar una diferencia estadísticamente significativa.

IV.11. Aspectos éticos

La investigación experimental biomédica efectuada con el uso de animales experimentales consideró lo expuesto en la Ley de protección y Bienestar Animal, Perú N° 30407, art.19 del cap. V, “Tenencia, protección y manejo de animales”.⁶³ Los procedimientos y/o técnicas utilizadas consideraron ocasionar la menor sensación de dolor posible en los animales, tanto en la inducción de etanol como al momento del sacrificio, para ello el estudio tomo en consideración los principios de Reducir y Refinar de la experimentación humanizada con animales.⁶⁴ Además, se consideraron los criterios expuestos en la guía del manejo y cuidado de animales experimentales de laboratorio: Ratón, del Instituto Nacional de Salud, considerando un espacio adecuado para su condicionamiento libre de ruidos y olores fuertes, temperatura (20°C), 12 horas de luz/oscuridad, densidad animal, entre otros, procurando así el confort de los animales evitando en mayor medida su estrés.⁵⁸

Así mismo nuestro estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética en investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad nacional Mayor de San Marcos. (ver Anexo 9)

V. RESULTADOS

Se aplicó la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk), determinándose así a los indicadores paramétricos, los cuales fueron los siguientes: niveles de GSH, GSH total, relación GSH/GSSG, grupos sulfhídricos proteicos (-SH) ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) e índice de cerebro y cerebelo; los indicadores no paramétricos fueron lipoperoxidación y grupos proteicos sulfhídricos (-SH) ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína).

V.1. Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral: El tratamiento con etanol en el grupo II (1,8 g/kg de peso) presentó valores mayores de lipoperoxidación comparación al grupo I, sin llegar a presentarse diferencia significativa.

El grupo tratado con vitamina E (20 UI/kg de peso) más etanol por vip, mostró valores bajos en comparación al grupo II, sin llegar a evidenciarse significancia.

Tabla N°2: Niveles de lipoperoxidación en tejido cerebral de ratones, según tratamiento

Grupo - tratamiento	Lipoperoxidación* (nmol/g de tejido) Mediana \pm RIC	Inhibición (%)
Grupo I: Agua 10 mL/kg + NaCl 0,9%	155 \pm 26	---
Grupo II: Agua 10 mL/kg + Etanol 40%	160 \pm 61	---
Grupo III: Vit. E (20 UI/kg) + Etanol 40%	128 \pm 18	20
Grupo IV: SSG 200 mg/kg + Etanol 40%	124 \pm 20	23
Grupo V: SSG 600 mg/kg + Etanol 40%	108 \pm 17 ^(a)	33

*Shapiro - wilk ($p < 0,05$) – Kruskal-Wallis

(a) $p < 0,01$; comparado con el grupo II

Los grupos tratados con la semilla de girasol a diferentes dosis (grupos IV y V) más etanol por vip, mostraron niveles más bajos de lipoperoxidación dependiente de la dosis respecto al grupo II, presentando diferencia significativa solo en el grupo V, con una inhibición del 33%.

V.2. Perfil de glutatión en tejido cerebral: El tratamiento con etanol en el grupo II (1,8 g/kg de peso) por vip, presentó menores valores de perfil de glutatión en el tejido, en comparación con el grupo I, viéndose solo diferencia significativa en la relación GSH/GSSG.

El grupo tratado con vitamina E (20 UI/kg de peso) más etanol por vip, mostró valores más elevados en la prueba de GSH total, sin embargo, se evidenció niveles bajos en las pruebas de GSH y GSH/GSSG, en comparación al grupo II, sin evidenciarse diferencia significativa.

Tabla N°3: Perfil de glutatión en tejido cerebral de ratones, según tratamiento*

Grupo - tratamiento	GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) ** Media \pm DE	GSH Total ($\mu\text{mol/g}$ de tejido) *** Media \pm DE	GSH/GSSG*** Media \pm DE	Incremento (%)
Grupo I: Agua 10 mL/kg + NaCl 0,9%	3,46 \pm 0,53	14,9 \pm 2,17	0,31 \pm 0,04 ^(c)	---
Grupo II: Agua 10 mL/kg + Etanol 40%	2,65 \pm 0,29	14,4 \pm 0,94	0,23 \pm 0,03	---
Grupo III: Vit. E (20 UI/kg) + Etanol 40%	2,62 \pm 1,18	16,0 \pm 4,21	0,19 \pm 0,05	-17
Grupo IV: SSG 200 mg/kg + Etanol 40%	2,67 \pm 0,62	15,0 \pm 1,96	0,23 \pm 0,08	0
Grupo V: SSG 600 mg/kg + Etanol 40%	4,00 \pm 1,01 ^(c,d)	16,8 \pm 4,08	0,31 \pm 0,04 ^(a,b)	35

*Shapiro - Wilk ($p > 0,05$) - ANOVA – Levene

**Post Hoc prueba de Tukey

***Post Hoc prueba de Games - Howell

(a) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,01$ comparado con el grupo III

(c) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(d) $p < 0,05$ comparado con el grupo III

Los grupos que recibieron la semilla de girasol a las diferentes dosis (grupos IV y V) más etanol por vip, se observó que los perfiles de glutatión en los dos grupos fueron mayores, respecto al grupo II, presentando solo diferencia significativa en el grupo V.

El grupo que fue tratado con la menor dosis de semilla de girasol (grupo IV) más etanol vip, presentó niveles elevados en los indicadores de GSH y GSH/GSSG, respecto al grupo III, sin evidenciarse diferencia significativa.

El grupo tratado con la mayor dosis de suspensión de semilla de girasol (grupo V) más etanol vip, presentó un perfil de glutatión mayor en comparación con el grupo III, presentando diferencia significativa solo en los indicadores de GSH y GSH/GSSG, del cual para este último indicador se observó un incremento del 35%.

V.3. Niveles de grupos sulfhídrido proteicos en tejido cerebral: Posterior a la administración de etanol (1,8 g/kg de peso) por vip, los niveles de grupos -SH proteicos se reducen, respecto al grupo I, sin llegar a presentarse diferencia significativa.

El grupo tratado con vitamina E (20 UI/kg de peso) más etanol por vip, mostró niveles elevados de grupos -SH proteicos en comparación al grupo II, sin evidenciarse diferencia significativa.

Tabla N°4: Niveles de grupos sulfhídrido proteicos en tejido cerebral de ratones, según tratamiento

Grupo - tratamiento	Grupos -SH proteicos*	Grupos -SH proteicos**	Incremento (%)
	($\mu\text{mol/g}$ de tejido) Media \pm DE	($\mu\text{mol/mg}$ de proteína) Mediana \pm RIC	
Grupo I: Agua 10 mL/kg + NaCl 0,9%	204 \pm 17	1,68 \pm 0,12	---
Grupo II: Agua 10 mL/kg + Etanol 40%	183 \pm 28	1,63 \pm 0,28	---
Grupo III: Vit. E (20 UI/kg) + Etanol 40%	199 \pm 13	1,75 \pm 0,16	7
Grupo IV: SSG 200 mg/kg + Etanol 40%	186 \pm 13	1,71 \pm 0,18	5
Grupo V: SSG 600 mg/kg + Etanol 40%	206 \pm 11	1,81 \pm 0,02 ^(a)	11

*Shapiro Wilk ($p > 0,05$) - ANOVA - Levene - post hoc Tukey

**Shapiro Wilk ($p < 0,05$) - Kruskal Wallis

(a) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

Los grupos tratados con semilla de girasol a las diferentes dosis (grupos IV y V) más etanol por vip, presentaron niveles de grupos -SH proteicos mayores, respecto al grupo II, presentando diferencia significativa solo el grupo V, con un incremento del 11%, para el indicador grupo -SH proteico específico ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína).

El grupo que recibió la mayor dosis de suspensión de semilla de girasol (grupo V) más etanol vip, presento niveles de grupos sulfhídrido mayores respecto al grupo III, sin llegar a presentar diferencias significativas.

V.4. Índice de tejido de cerebro y cerebelo: El tratamiento con etanol en el grupo II (1,8 g/kg de peso) por vip, evidencio un índice de cerebro menor respecto al grupo I, sin llegar a presentar diferencia significativa.

El grupo tratado con vitamina E (20 UI/kg de peso) más etanol por vip, mostró índices más bajos de cerebelo, en comparación con el grupo II, sin ser significativo.

Tabla N°5: Índice de tejido de cerebro y cerebelo de ratones, según tratamiento*

Grupo - tratamiento	Índice de cerebro	Índice de cerebelo
	(%) Media ± DE	(%) Media ± DE
Grupo I: Agua 10 mL/kg + NaCl 0,9%	0,85 ± 0,12	0,24 ± 0,02
Grupo II: Agua 10 mL/kg + Etanol 40%	0,98 ± 0,05	0,24 ± 0,02
Grupo III: Vit. E (20 UI/kg) + Etanol 40%	0,99 ± 0,10	0,21 ± 0,03
Grupo IV: SSG 200 mg/kg + Etanol 40%	0,98 ± 0,06	0,23 ± 0,04
Grupo V: SSG 600 mg/kg + Etanol 40%	0,91 ± 0,07	0,20 ± 0,02

*Shapiro - Wilk ($p > 0,05$) – ANOVA ($p > 0,05$) – Levene - post hoc Tukey

Los grupos tratados con semilla de girasol a las diferentes dosis (grupos IV y V) más etanol por vip, presentaron índices de cerebelo menores dependiente de la dosis, frente al grupo II, sin llegar a presentar significancia.

El grupo IV (semilla de girasol 200 mg/kg de peso más etanol por vip) presentó niveles más bajos para el índice de cerebro, en comparación al grupo III, sin llegar a evidenciarse diferencia significativa. Por otro lado, el grupo V (semilla de girasol 600 mg/kg de peso más etanol por vip) se presentó niveles bajos de índice de cerebro y cerebelo en comparación con el grupo III, sin llegar a presentar diferencia significativa.

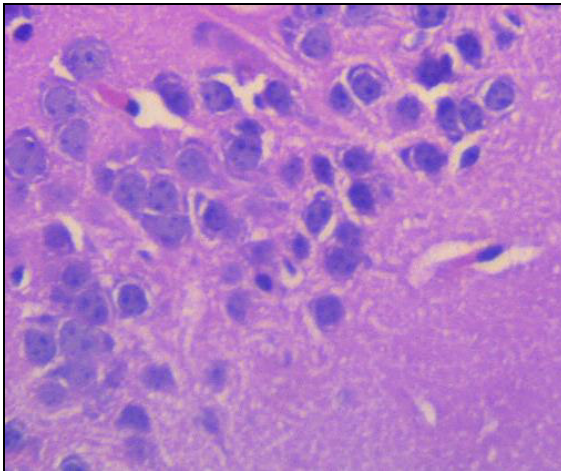
V.5. Descripción histológica del tejido nervioso

La descripción histológica a nivel de los tejidos de cerebro y cerebelo en ratones inducidos a daño por etanol es la siguiente:

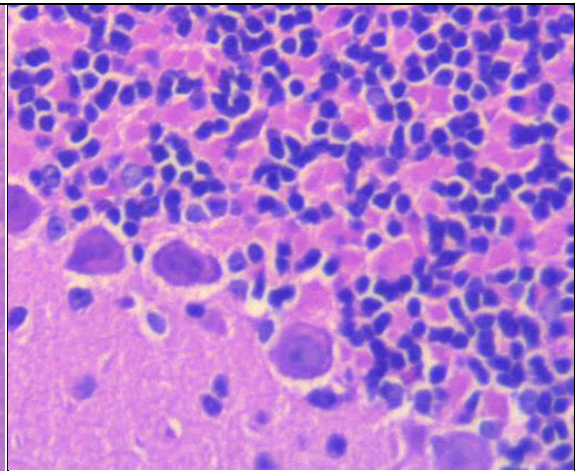
Tabla N° 6: Descripción histológica de tejido cerebral y cerebeloso de ratones, según tratamiento

	CEREBRO	CEREBELO
Grupo I	Se observó un espacio subaracnoideo bien distribuido rodeado de un epitelio plano y presencia de endotelio sin alteraciones. Células piramidales presentes, algunas con nucléolo, el resto sin alteraciones histológicas. Ausencia de infiltraciones linfocitarias en todas las capas. Presencia de células gliales bien distribuidas.	Se apreció un espacio subaracnoideo bien distribuido y rodeado de epitelio plano. Se observó vasos sanguíneos en todas las capas. Las neuronas cerebelosas presentaron aspecto normal (sin edema), no se observó polimorfonucleares ni linfocitos. En la capa molecular las células redondas fueron escasas, bien distribuidas con cromatina firme. Las células de Purkinje presentaron citoplasma bien diferenciado con presencia de núcleo, algunos muestran axones. A nivel de la capa granulosa se observa la presencia de grupo de células uniformes y bien distribuidas.
Grupo II	Se observó un espacio subaracnoideo ligeramente aumentado y con escasas células intravasculares. A nivel intraparenquimal de la capa cortical se observó vasos congestivos. Se observó una escasa presencia de linfocitos. Se aprecia focos necróticos con marcado edema en todas las capas. Las neuronas presentaron edemas, focos con núcleo picnótico y escaso citoplasma a nivel de la corteza. Se observó algunas células gliales con retracción citoplasmática.	Se apreció el espacio subaracnoideo bien conservado, rodeado de epitelio simple plano y con presencia de linfocitos bien distribuidos. En todas las capas del cerebelo y médula se apreció edemas. Respecto a la capa molecular se encontró bien distribuida y con presencia de algunas retracciones citoplasmáticas. También se hallaron vasos congestivos en todas las capas. En las células de Purkinje se observó alteraciones a nivel citoplasmático, marcada eosinofilia y núcleos hiper cromáticos; la capa granular presentó agrupaciones celulares con retracción citoplasmática.
Grupo III	El espacio subaracnoideo presentó vasos congestivos, escasa presencia de linfocitos y glóbulos rojos, además, se presencié edemas en las capas superficiales de la corteza. También se halló escasos componentes inflamatorios a nivel perivascular y en la capa externa se encontraron células piramidales con alteraciones en el citoplasma, marcada eosinofilia, edemas y picnosis nuclear. Las células gliales se encontraban bien distribuidas y sin alteraciones.	En el espacio subaracnoideo se encontró ligeramente dilatado y aumentado, con presencia escasa de linfocitos. Se apreció vasos congestivos en todos los cortes estudiados. Se hallaron células neuronales con marcado edema en las capas superficiales. Respecto al componente inflamatorio fue escaso y solo en el espacio subaracnoideo. La capa molecular se encontró bien distribuida con presencia de algunas células con edema. Las células de Purkinje se observaron con borramiento de estructuras citoplasmáticas, picnosis nuclear y reforzamiento de la membrana citoplasmática. En la capa granular se encontraron grupos celulares que forman focos bien distribuidos y que presentaban retracción unicelular.

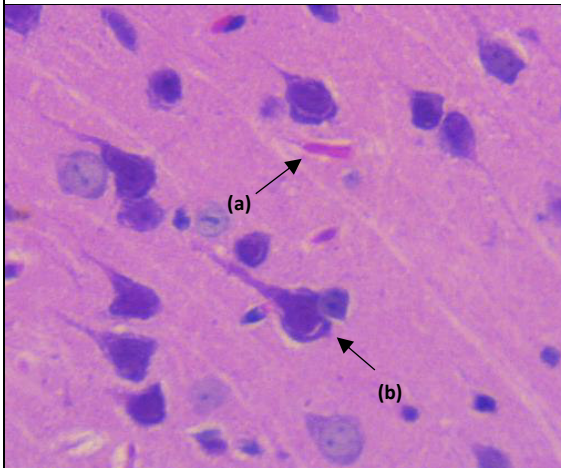
Grupo IV	<p>Se observó un espacio subaracnoideo conservado con infiltración inflamatoria. Se apreció tejido endotelial conservado y presencia de vasos ligeramente congestivos. A nivel perivascular se encontró linfocitos reactivos, bien distribuidos. En las capas celulares se observó edemas moderados. En la capa neuronal se observó retracción citoplasmática y alteración del núcleo en capas corticales, algunas a nivel de la medula; en las células gliales no se presentó ninguna alteración.</p>	<p>Se apreció un espacio subaracnoideo bien conservado revestido de epitelio plano. En la capa molecular se observó células bien conservadas y con núcleo acromático conservado, presentando también congestión vascular y edemas. En la capa de células de Purkinje se apreció edemas, alteraciones en la membrana citoplasmática, algunas células presentaron borramiento de estructuras y retracción de la membrana citoplasmática. En la capa granular se encontró grupos celulares, algunas de ellas con retracción citoplasmáticas y otras sin alteraciones.</p>
Grupo V	<p>Se observó un espacio subaracnoideo normal, con componente vascular conservado. Se apreció a nivel de los capilares una ligera congestión. Se encontró algunas células conservadas (sin alteraciones) y otras con edema multifocal en las capas corticales. A nivel perivascular se apreció algunos linfocitos y polimorfonucleares. A nivel de las capas corticales algunas neuronas se encontraron bien conservadas y otras presentaron alteraciones en el citoplasma con marcada eosinofilia. Algunas células gliales se encuentran conservadas y otras con retracción citoplasmática.</p>	<p>El espacio subaracnoideo se encontró bien conservado revestido de epitelio plano. La capa molecular presentó células bien conservadas y con núcleo acromático conservado, edemas y congestión vascular. En la capa de celular de Purkinje se halló la presencia de edemas, alteraciones en la membrana citoplasmática, en algunas células se observó retracción de la membrana citoplasmática y borramiento estructural. En la capa granular se encontraron agrupaciones celulares, algunas con retracción citoplasmáticas y otras sin alteraciones.</p>



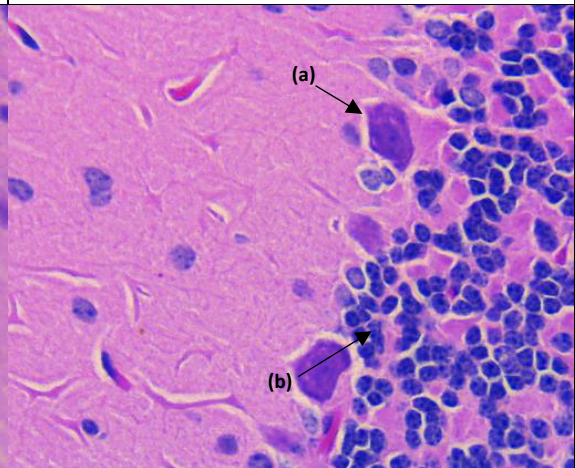
Micrografía óptica 1. Grupo I: Cerebro. Se observó la corteza cerebral sin alteraciones morfológicas. HE (40x).



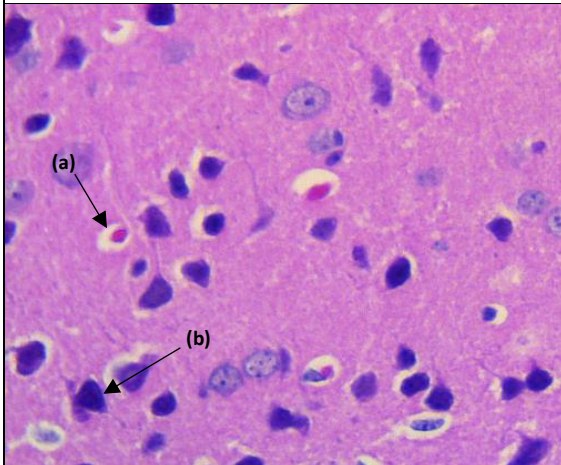
Micrografía óptica 2. Grupo I: Cerebelo. Se observa el tejido cerebeloso sin alteración morfológica en todas las capas. HE (40x).



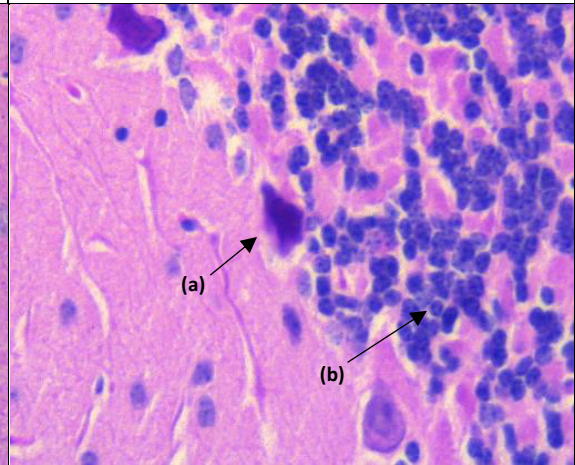
Micrografía óptica 3. Grupo II: Cerebro. Se observa la corteza del cerebro (a) vasos congestionados (b) neurona con edema y eosinofilia. HE (40x).



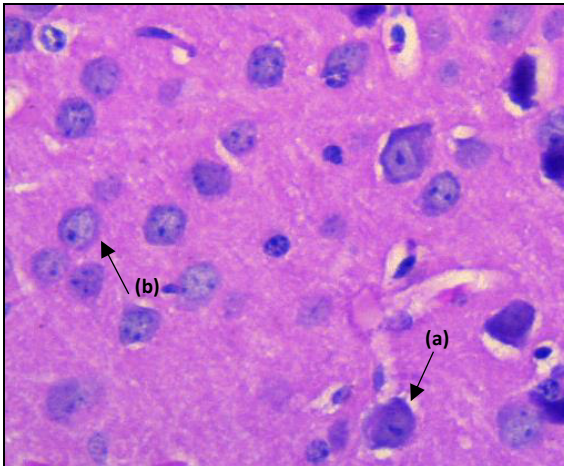
Micrografía óptica 4. Grupo II: Cerebelo. (a) Célula de Purkinje con edema y eosinofilia. (b) Capa granular con retracción citoplasmática. HE (40x).



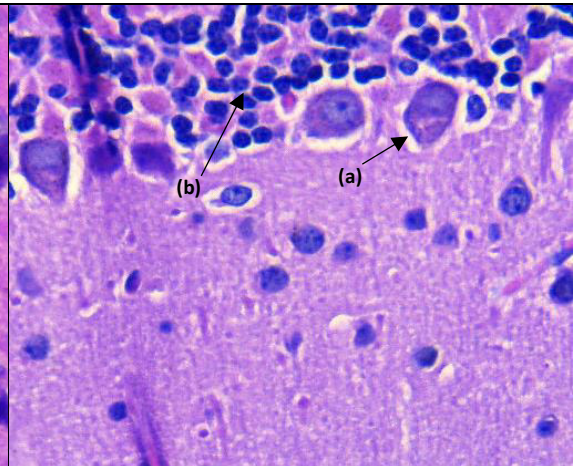
Micrografía óptica 5. Grupo III: Cerebro. Se observa (a) Célula linfocítica (b) Célula piramidal con eosinofilia y picnosis nuclear. HE (40x).



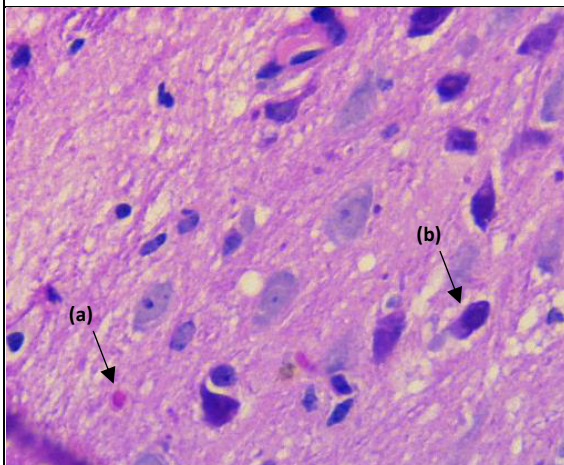
Micrografía óptica 6. Grupo III: Cerebelo. Se observa (a) Células de Purkinje con eosinofilia y picnosis nuclear (b) Capa granular bien distribuida. HE (40x).



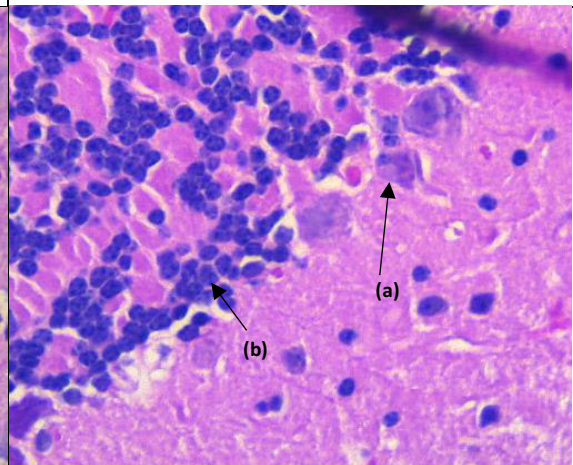
Micrografía óptica 7. Grupo IV: Cerebro. Se observa. **(a)** Neurona con retracción citoplasmática y alteración del núcleo **(b)**. Células gliales bien conservadas **HE (40x)**.



Micrografía óptica 8. Grupo IV: Cerebelo. Se observa. **(a)** Células de Purkinje con edema y retracción citoplasmática. **(b)** Capa granular sin alteraciones. **HE (40x)**.



Micrografía óptica 9. Grupo V: Cerebro. Se observó **(a)** eosinófilos y **(b)** neuronas con eosinofilia y daño citoplasmático. **HE (40x)**



Micrografía óptica 10. Grupo V: Cerebelo. **(a)** células de Purkinje con borramiento nuclear. **(b)** Capa granulosa con hiper cromatismo nuclear. **HE (40x)**.

VI. DISCUSIÓN

El envejecimiento es uno de los procesos biológicos que todo ser vivo afronta, el cual es caracterizado por cambios morfológicos y fisiológicos en diversos tejidos, dentro de ellos el tejido nervioso central, evidenciándose un aumento en el estrés oxidativo que va a originar un daño en el desempeño cognitivo de las personas.⁶⁵ Para reducir los efectos del envejecimiento, asociado al estrés oxidativo, se aprovecha de la ingesta de antioxidantes que los encontramos en frutas, verduras y semillas.²⁶

En el presente estudio encontramos en el grupo II (etanol 1,8 g/kg de peso, al 40%) presentó niveles mayores en lipoperoxidación e índice de cerebro, como también, una disminución del perfil de GSH y grupo -SH proteico. Sin embargo, el índice de cerebelo no mostró diferencias significativas con el grupo I. A nivel histológico el tejido cerebral presentó linfocitos, edema, vasos congestivos, focos necróticos, retracción citoplasmática y eosinofilia; en el tejido cerebeloso se observó retracción citoplasmática, eosinofilia, hipercromatismo y edema.

Los resultados antes citados del grupo II están relacionados con el metabolismo del etanol. Este alcohol atraviesa en un 90 % la barrera hematoencefálica causando daño a nivel del tejido nervioso central.³¹ El etanol es metabolizado, principalmente por acción de la catalasa y el citocromo P450 (CYP2E1) mitocondrial, y en menor grado por el alcohol deshidrogenasa (ADH),⁶⁶ dando paso a la formación de acetaldehído, que por acción del aldehído deshidrogenasa (ALDH) se convierte a acetato, esta especie puede provenir también del metabolismo hepático.⁶⁷

Tanto la ADH y la ALDH utilizan como cofactor NAD^+ , produciendo NADH^+ , elevando la relación $\text{NADH}^+/\text{NAD}^+$ y como consecuencia altera el estado redox. También se ha observado que el metabolismo del etanol a nivel del tejido nervioso está asociado al estrés nitrosativo por inducción del NADPH^+ /xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa inducible y la reacción de Fenton-Weiss-Haber, produciendo EROs y óxido nítrico (NO).^{68,69} Todos estos eventos descritos se asocian al estrés oxidativo que es un desencadenante de la lipoperoxidación,⁷⁰ disminuyendo los niveles de glutatión (GSH).⁶⁸ Esto podría explicar los resultados observados en lipoperoxidación y perfil GSH en el grupo II.

Las EROs pueden producir disminución a nivel mitocondrial tanto en su potencial como en su permeabilidad de membrana, la cual puede producir una retroalimentación positiva (EROs inducida por EROs), extendiéndose así las señales de estrés oxidativo exacerbando el daño celular.⁷¹ El tejido nervioso es muy susceptible al ataque de radicales libres debido a la gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados (PUFAS) presente en los fosfolípidos a nivel de la membrana.⁷² Este proceso de peroxidación lipídica produce una especie denominada lípido peroxílico el cual luego se transforma en aldehídos tóxicos (4-hidroxi nonenal) que induce a la apoptosis celular.⁷² Esto puede estar relacionado a los focos necróticos (cerebro), edema (cerebro y cerebelo), núcleos picnóticos el cual está asociado a la necrosis o apoptosis celular (cerebro) encontrados en grupo II.

Debido al daño producido por EROs y el NO, proveniente del metabolismo del etanol, aumenta la liberación de glutamato por la neurona presináptica, activando los receptores N-metil D- aspartato (NMDA) de la neurona posináptica²⁹ que sumado al daño en la membrana, mencionado en el párrafo anterior, alteran la homeostasis del Ca^{2+} , produciendo un incremento de Ca^{+2} intracelular, la cual influye en la activación de enzimas dependientes de calcio como las endonucleasas, fosfolipasa A2 (FLA2) y la óxido nítrico sintasa (nNOS) los cuales participan en la formación del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y óxido nítrico.⁷³ La entrada de Ca^{+2} de manera exacerbada deforma el poro de transición interno de la membrana mitocondrial llevando a un colapso electroquímico de protones, ocasionándose así una reducción en los niveles de ATP lo que impide el funcionamiento de las bombas dependientes de ATP como es la bomba Na^+/K^+ permitiendo la entrada masiva de Na^+ y agua, formándose así edemas celulares, posteriormente la pérdida de función y muerte celular por necrosis,²⁹ que podría estar relacionado a los núcleos picnóticos en el cerebro, edemas en cerebro y cerebelo y focos necróticos en el cerebro observados en el grupo II.

En las enfermedades neurodegenerativas se observa una disminución en los niveles de GSH el cual está asociado al estrés oxidativo, anteriormente descrito, haciendo que el tejido cerebral quede vulnerable a dicho proceso.⁷⁴ Este acontecimiento se produce cuando se supera la capacidad celular de reducir GSSG a GSH por acción de la GSH reductasa, conllevando a una disminución de la relación GSH/GSSG.⁷⁵ Por otro lado, una de las funciones del GSH es mantener el estado reducido de los grupos sulfhídrido de las proteínas, viéndose esta función afectada por las variaciones

en la concentración de GSH,⁷⁶ lo antes mencionado podría justificar la disminución del perfil de GSH y los grupos sulfhídricos proteicos encontrados en el grupo II.

Por otro lado, el GSH en condiciones de estrés oxidativo forma disulfuros mixtos con los grupos sulfhídrico de las proteínas, por el proceso denominado S-glutathionilación, el cual es considerada de suma importancia para mantener la homeostasis en la relación GSH/GSSG ante el estrés oxidativo, viéndose así que estas proteínas S-glutathioniladas aumentan con relación al estrés oxidativo.⁷⁷ Los grupos sulfhídricos de las proteínas son sensible a la oxidación, afectando a la función de las proteínas. Esto se debe a que el anión tiolato, de los residuos de cisteína, son sensibles a este proceso oxidativo, formando ácido sulfónico de manera irreversible,⁷⁸ estos eventos dan lugar a una posible explicación a la disminución en los niveles de grupos sulfhídrico proteicos encontrados en el grupo II de nuestro estudio.

A nivel histológico, debido a la acción de las EROs, se activa la microglia, la cual va a secretar citocinas proinflamatorias (IL-1, IL6 y TNF- α), inducir la producción de EROs y RNS, las cuales por acción propia pueden ocasionar una mayor activación microglial que conllevaría a un incremento del estrés oxidativo, generándose un caso de neuroinflamación y consecuentemente neurotoxicidad,⁷⁹ llevando así a la presencia de edemas cerebrales citotóxicos.⁸⁰ Por otro lado, a nivel del cerebelo producto de la exposición a etanol se presenta daño en células granulares y también una pérdida y deformación en las células de Purkinje.³¹ Estos eventos pueden ser relacionados con los niveles altos de índices de cerebro, presencia de edemas en cerebro y cerebelo, núcleos hiper cromáticos en células de Purkinje y retracción citoplasmática en la capa granular del cerebelo mostrados en el grupo II.

El endotelio vascular es sensible al estrés oxidativo, producto de la interacción del anión superóxido (O_2^-) con el óxido nítrico (NO), dando paso a la formación de peroxinitrito, reduciéndose la disponibilidad del NO para cumplir su función de relajación en el músculo liso, esto daría paso a la vasoconstricción de venas y arterias reduciendo el flujo sanguíneo y dando paso a la formación de ictus cerebral.^{81,82} Estos eventos pueden estar relacionados a los vasos congestivos encontrados en el grupo II.

Según Ikran 2019, en su estudio con etanol (5 g/kg de peso) en ratones, vía intraperitoneal, durante un lapso de seis semanas, observó niveles altos de lipoperoxidación y muerte neuronal apoptótica en cortes histológicos de tinción Nissl/fluoro-jade b.⁸³ Otro estudio realizado en ratas, con etanol a 5 g/kg de peso durante un periodo de 60 días, administrado por sonda de estómago, se observó niveles elevados de malondialdehído, siendo este es un indicador de lipoperoxidación en membranas sinaptosomales de corteza cerebral,⁸⁴ esto se asemeja a los resultados encontrados en el grupo II de nuestro estudio, donde se observó niveles elevados de lipoperoxidación e histológicamente daño a nivel de la corteza cerebral.

El estudio realizado por Oyenihi, 2016 evaluó los efectos del etanol de manera aguda en una sola dosis de 4,8 g/kg de peso (50% v/v) en ratas, vía intragástrica, reportando un nivel mayor nivel de lipoperoxidación, evaluado por la concentración de malondialdehído; y por otro lado se observó niveles bajos en la concentración de GSH en comparación con el control.⁸⁵ Mientras otro estudio realizado en ratones, utilizando etanol (1,8 g/kg de peso) durante 14 días, administrado por vía intraperitoneal, se encontró a nivel del hipocampo y corteza cerebral daño celular por la baja densidad de neuronas, comparados con el control.⁸⁶ Lo descrito anteriormente es similar a lo reportado en nuestro estudio sobre el grupo II, donde se encontró un nivel bajo en el indicador de GSH y daño a nivel histológico por necrosis celular.

Un estudio realizado en ratones con etanol de manera crónica a concentraciones de 5% v/v durante seis semanas, se observó en el tejido cerebral (homogenizado de hipocampo) un aumento en la concentración de malondialdehído y un nivel bajo en los indicadores de GSH y GSH/GSSG comparados con el control.⁸⁷ Ozelturkcu 2010, utilizando etanol (2 g/kg/día) por vía intraperitoneal en ratas, por un periodo de 14 días, encontró concentraciones elevadas de malondialdehído en tejido cerebral,⁸⁸ siendo estos resultados semejantes al grupo II de nuestro estudio.

El grupo tratado con vitamina E y etanol (grupo III), presentó niveles menores en lipoperoxidación, perfil de glutatión e índice de cerebelo, y un mayor nivel de grupo -SH proteico. Sin embargo, el índice de cerebro no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo II. A nivel histológico el tejido cerebral presentó linfocitos, vasos congestivos, edemas, picnosis nuclear y alteraciones en el citoplasma; respecto al tejido cerebeloso se observó edema, linfocitos, vasos congestivos y retracción unicelular, en las células de Purkinje se observó borramiento

de estructura citoplasmática, picnosis nuclear y reforzamiento de la membrana citoplasmática.

La vitamina E es un antioxidante dietético que reduce el daño producido por las ROS o RNS, convirtiéndolos en compuestos menos reactivos, protegiendo así a los demás componentes celulares.⁸⁹ Siendo así esta vitamina considerada, a nivel de membrana, el antioxidante más efectivo, con la capacidad de atenuar la peroxidación lipídica.⁹⁰ En presencia de la vitamina E los radicales peroxilo reaccionan con el α -tocoferol en lugar del hidroperóxido lipídico, deteniéndose así la reacción en cadena de la producción de radicales peroxilo, evitándose una mayor oxidación de los PUFAs de membrana.⁹¹ Producto de la reacción antes mencionada, se forman los radicales tocoferoxilo, los cuales pueden volver a su especie reducida mediante la utilización del GSH y ácido ascórbico, pudiendo así seguir ejerciendo su función.⁹² Estos eventos podrían estar relacionados con los menores valores de lipoperoxidación a expensas del GSH y GSH/GSSG encontrados en el grupo III de nuestro estudio.

Los edemas citotóxicos se encuentran relacionados a la excesiva presencia de radicales libres,⁸⁰ que en presencia de la vitamina E se ven reducidos, explicado en el anterior párrafo. Por otro lado, una de las propiedades de esta vitamina es la respuesta inmunitaria, aumentando la producción de Interleucina 2 (IL- 2), la actividad de células asesinas naturales (NK) y la producción de linfocitos,^{91,93} también se le otorga la función de suprimir la oxidación de las proteínas.⁹⁴ Estos eventos podrían tener relación con lo observado en los niveles de grupos sulfhídricos proteicos y a nivel histológico con la presencia de linfocitos del grupo III.

En el estudio de Palomino 2019, que realizó la administración de vitamina E (15 UI/kg de peso) contra la toxicidad inducida por etanol a 1,8 g/kg de peso en ratones, durante un lapso de 14 días. Reportó que la administración de dicho nutriente produjo efectos protectores frente a la toxicidad, evidenciado en los indicadores de lipoperoxidación, GSH e indicadores histológicos como edemas leves en el tejido cerebral y retracción en citoplasma con células de Purkinje en tejido cerebeloso,¹⁷ siendo semejante a lo encontrado en nuestro estudio, sin embargo, difiere con lo encontrado en los niveles de GSH del grupo III.

Otro estudio realizado por Puelles 2020, donde trabajó con vitamina E (40 UI/kg de peso) frente a la neurotoxicidad inducida con mercurio en ratones durante un periodo de siete días, se encontró niveles elevados de lipoperoxidación, relación de GSH/GSSG e índice de cerebelo, sin embargo, obtuvo niveles de índice de cerebro bajo; histológicamente reportó en el cerebro presencia de eosinofilia, edemas, vasos congestivos y linfocitos; en el cerebelo eosinofilia edemas y congestión leve.⁹⁵ Los resultados a nivel bioquímico difieren con lo encontrado en el presente estudio, pero los resultados a nivel histológico son semejantes con nuestro grupo III.

Otro estudio elaborado por Beytut en el 2018, determinó el efecto de la vitamina E en tejido cerebral de ratas, induciendo a estrés por medio de altas dosis de glucocorticoides, durante un periodo de 30 días, observándose niveles bajos de lipoperoxidación, haciendo referencia al papel importante que cumple la vitamina E a nivel neurológico, sin embargo, los niveles de GSH fue menor.⁹⁶ Estos resultados descritos anteriormente son similares a los encontrados en grupo III.

En relación con los grupos tratados con la suspensión de semilla de *Helianthus annuus* L. (girasol), a las diferentes dosis (grupo IV y V), se apreció menores valores de lipoperoxidación e índices de cerebro y cerebelo, y mayores niveles de grupos sulfhídricos proteicos (-SH) y del perfil de GSH. A nivel de la histoarquitectura del tejido cerebral en el grupo IV, se encontró presencia de vasos ligeramente congestivos, linfocitos, edema moderado y retracción citoplasmática. En el tejido cerebeloso se encontró retracción citoplasmática, congestión vascular y edemas en células de Purkinje. Mientras en el grupo V, a nivel de tejido cerebral, se encontró la presencia de algunos linfocitos, retracciones citoplasmáticas y eosinofilia. Respecto al tejido cerebeloso se encontró algunas células de Purkinje con edema y retracción citoplasmática, y en la capa molecular presencia de algunas células con retracciones citoplasmáticas.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio podrían estar relacionados con los componentes fitoquímicos que presenta la semilla de girasol tales como los flavonoides (quercetina, kaempferol, luteolina, heliannonina y la apigenina), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico, ácido ferúlico y cumarico), y también presenta vitamina E y selenio, siendo considerada esta semilla como una buena fuente de antioxidantes,⁴ también se determinó en esta semilla contiene de ácidos grasos poliinsaturados como son el omega 6 y omega 3.⁹⁷

Los bajos valores de lipoperoxidación observados en los grupos tratados con la suspensión de semilla de girasol, pueden estar relacionados a la acción de la vitamina E, detallado en líneas anteriores, pero también se le otorga esta función al selenio, ya que esta actúa conformando parte de la enzima dependiente (glutatión peroxidasa), la cual cumple la función de reducción de las ROS y RNS, evitando así el daño nivel de la membrana celular y la peroxidación de los ácidos grasos insaturados.^{98,99} Esto podría justificar los valores bajos de lipoperoxidación encontrados en los grupos IV y V de nuestro estudio.

Los flavonoides actúan como antioxidantes exógenos, poseen un anillo β el cual es determinante para cumplir la función de captar ROS y RNS, ya que dona un electrón a los radicales hidroxilos, peroxilos y peroxinitritos, dando paso a especies menos reactivas.¹⁰⁰ Siendo los flavonoides compuestos que previenen las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, como el Alzheimer.¹⁰¹

Por otro lado, los polifenoles son reconocidos por sus propiedades antiinflamatorias controlando la neuroinflamación y muerte neuronal, tal es el caso de la quercetina, la cual se evidencio que puede inhibir ciertas citocinas proinflamatorias (interleucina 6, interleucina 1 β y el TNF- α).¹⁰² Esto se podría tener relación con los niveles bajos de índice de cerebro, índice de cerebelo e histológicamente con la presencia leve de edema observado en los grupos experimentales de nuestro estudio.

También se evidencio que la quercetina y el kaempferol combaten el daño por estrés oxidativo, en tejido neuronal, mediante la activación de la vía Nrf2-ARE la cual cumple la función de regulación frente al estrés oxidativo. Esta vía se activa cuando el factor nuclear derivado del eritroide 2 (Nrf2) se disocia de la proteína Keap1, producto de la reacción con EROS, a su vez la traslocación del Nrf2 al núcleo celular donde se liga a proteínas Maf, que posteriormente se unen a elementos de respuesta antioxidante (ARE), promoviendo la transcripción de genes como el glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, catalasa y tioredoxina.^{103,104}

Laxmi 2017, evaluó los efectos neuroprotectores de la quercetina con donepezilo sobre daño inducido por escopolamida en ratas, encontrando menores niveles de malondialdehído y mayores niveles de GSH, en homogeneizado de cerebro, tanto en el grupo tratado con solo quercetina y el grupo tratado con quercetina y donepezilo, atribuyendo dicha acción al potencial antioxidante de la quercetina.¹⁰⁵

El estudio de Dávila en el 2015 evaluó el efecto de la semilla de almendra como agente neuroprotector en ratones por medio de la desorientación motora, encontrando gran efecto neuroprotector, evidenciado bioquímicamente en los menores valores de lipoperoxidación e histológicamente con presencia de edemas de grado leve a nivel del tejido cerebral, y a nivel de cerebelo presentó células de Purkinje pálidas y una leve presencia de edema, sin embargo, en el grupo control las alteraciones fueron mayores y significativas. Según el autor esto es debido a la presencia de la vitamina E, selenio y quercetina como agentes antioxidantes presentes en la semilla.³ Lo mencionado se puede ver reflejado en los resultados de nuestro estudio, de los grupos tratados con las diferentes dosis.

La semilla de girasol presentan ω -6, ω -3 y Zinc en cantidades aproximadas de 21.4 g, 0.12 g y 5.1 mg por cada 100 g de parte comestible, respectivamente.⁴³ Un estudio realizado por Mbiydzennyuy en el 2018, en ratas, sobre la suplementación de zinc y ácido linoleico (omega 6) frente a parkinsonismo inducido por rotenona, inhibidor específico del complejo I de la cadena respiratoria, produciendo una neuropatología mediada por estrés oxidativo, en sus resultados reportó efectos neuroprotectores sobre lipoperoxidación, niveles de GSH, actividad del glutatión peroxidasa, SOD y CAT; y a nivel histológico no se presentaron muertes celulares respecto al control, el autor menciona que estos resultados pueden estar relacionados al zinc ya que este aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa, además está presente en la metalotioneína el cual es fuerte captador de radicales libres. Los ω -6 por su parte, podría tener su nivel de acción reparando las capas lipídicas dañadas, suprimiendo así la exudación de electrones libres de la mitocondria, el cual es requisito previo para generar radicales libre.⁶ Esto respalda a lo encontrado en los grupos IV y V, tratados con semilla de girasol respecto a la lipoperoxidación, GSH y una mejor conservación a nivel histológico.

La reducción de la lipoperoxidación y una mejor conservación histológica en los grupos tratados con semilla de girasol en nuestro estudio pueden estar relacionado por su contenido de ácido graso ω -6 entre ellos el ácido araquidónico. En un estudio realizado por Qu y en el 2017, sobre los efectos de la suplementación de ácido araquidónico (ω -6) del daño cerebral en un modelo de isquemia/reperfusión cerebral en ratas, reporto menores parámetros de inflamación, evidenciado en los niveles de TNF-alfa e IL-6; a nivel de los parámetro de estrés oxidativo se reportó un aumento en los niveles de SOD, GSH-Px y una reducción en los niveles de malondialdehído (lipoperoxidación); a nivel histológico se presentó leve edema intercelular; además

se analizaron la prueba de laberinto de Morris Water en la cual se reportó un mejor rendimiento en los ensayos, ello comparado con el grupo control. El autor concluye haciendo énfasis en la acción protectora del tejido cerebral pueden estar relacionados a efectos antioxidantes y antiinflamatorios del ácido araquidónico.¹⁰⁶

Por otra parte, el omega 3 por medio de desaturasas y elongasas se transforma a ácidos eicosapentaenoico (EPA) y posteriormente a docosahexaenoico (DHA).¹⁰⁷ El DHA es metabolizado por la isoforma 15-lipooxigenasa que es abundante en el sistema nervioso central, formando así el 10,17 s-docosatrieno (NPD1), también denominado neuroprotectina,¹⁰⁸ la cual actúa como señalizador homeostático frente a desequilibrios celulares, mediante señalización neurotrófica, antiapoptótica y antiinflamatoria, sin embargo, la capacidad de sintetizar DHA a partir de ácido α -linolénico en las células neuronales es muy baja.¹⁰⁹ Lo antes mencionado se puede sumar a lo reportado en un estudio realizado por Lukiw, sobre cultivos celulares (neuronas y glías), donde relaciona al NPD1 con una reducción en las apoptosis celulares.¹¹⁰ Lo mencionado puede estar relacionado con lo encontrado a nivel histológico en los grupos IV y V tratados con semilla de girasol.

VII. CONCLUSIONES

- La ingesta de suspensión de semilla de *Helianthus annuus L.* (girasol) en las dosis de experimentación produjo una disminución significativa en los niveles de lipoperoxidación y un aumento del perfil de glutatión y grupos sulfhídricos proteicos, expresando mejores resultados en el grupo V.
- La ingesta de suspensión de semilla de *Helianthus annuus L.* (girasol) presenta un menor índice de cerebro y cerebelo, y a nivel histológico se observa una reducción del daño en ambos tejidos.
- La ingesta de suspensión de semilla de *Helianthus annuus L.* (girasol) presenta efecto neuroprotector frente a la toxicidad inducida por etanol en ratones.

VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar los componentes fitoquímicos de la *semilla Helianthus annuus L. (girasol)*.
- En base a los resultados obtenidos, se recomienda realizar estudios que evalúen el consumo de la semilla *Helianthus annuus L.* como método de prevención o complementario en personas con riesgo a desarrollar enfermedades neurodegenerativas.
- Evaluar el efecto neuroprotector de los componentes fitoquímicos más resaltantes (polifenoles, carotenoides, terpenos) de la *semilla Helianthus annuus L. (girasol)*.

IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Erkinen M., Kim M, Geschwind M. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10(4): 1-33.
2. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. Molecules. 2019; 24(8): 1-13.
3. Dávila Córdova. Efecto neuroprotector de la semilla de *Prunus dulcis* “almendra” sobre el tejido nervioso en ratones inducidos a estrés por desorientación motora. (tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.2015.
4. Guo S, Ge Y, Na Jom K. A review of the phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of common sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed and sprouts. Chem Cent J. 2017; 11 (1): 1-8.
5. Lee KH, Cha M, Lee BH. Neuroprotective Effect of Antioxidants in the Brain. Int J Mol Sci. 2020;21(19): 3-29.
6. Mbydzenyuy NE, Ninsiima HI, Valladares MB, Pieme CA. Zinc and linoleic acid pre-treatment attenuates biochemical and histological changes in the midbrain of rats with rotenone-induced Parkinsonism. BMC Neurosci. 2018; 19(1): 1-10.
7. Garcés, M, Crespo C, Finkel L, Arroyo M. Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social; Alianza española de enfermedades neurodegenerativas.2016; 1: 13-17.
8. Varela L, Chavéz H, Galvéz M, Méndez F. Características del deterioro cognitivo en el adulto mayor hospitalizado a nivel nacional. Rev Soc Peru Med Interna. 2004; 17(2): 37-42.
9. Instituto Nacional de Estadística e Informática, Situación de la población adulta mayor Trimestre julio-agosto-septiembre. Informe Técnico N°04-Diciembre; 2021. Disponible en <https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/04-informe-tecnico-poblacion-adulta-mayor-iii-trim-2021.pdf>
10. Kritsilis M., Rizou S., Koutsoudaki P., Evangelou K., Gorgoulis V., Papadopoulos D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. Int J Mol Sci. 2018;19(10): 1-17.
11. León M, Cedeño R, Rivero R, Rivero J, García D, Bordón L. La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. MediSur.2018; 16(5): 699-710.

12. Delgado L., Betanzos G., Sumaya T. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia* 18.50 (2010):10-15.
13. Martínez J., Boll-Woehrlen C., Hernández A., Rubio M., Sanchez A. "Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas" *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXIV, 2010, 43-59.
14. Guardia E, Herrera G, Garrido S, Cárdenas D, Martínez C, Hernández P. Efecto protector de *Helianthus annuus* (girasol) sobre el infarto de miocardio en conejos Nueva Zelanda. *Rev. Peru. Med. Exp. salud pública*. 2015; 32 (1): 80-86.
15. Kuskosky, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 2005; 25(4), 726-732.
16. Moral Navarrete, L. D. Estudio genético y molecular del contenido en tocoferoles en semillas de girasol. [tesis doctoral] España, 2016: 15-16.
17. Palomino L. Efecto neuroprotector del cocimiento de hojuelas de *Chenopodium quinoa* (quinua) variedad negra en ratones sometidos a daño por etanol. (tesis) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 2019.
18. Organización mundial de la salud. Reporte y Notas descriptivas sobre Demencia. 2019. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
19. Organización mundial de la salud y Organización Panamericana de la Salud: Demencia una prioridad de salud pública. Washington, D.C. 2013: 11-15.
20. Ministerio de salud. Nota de prensa “Minsa recomienda ejercicio mental y estilos de vida saludables en el Día Mundial del Alzheimer” 2018. Disponible en <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/19206-minsa-recomienda-jercicio-mental-y-estilos-de-vida-saludables-en-el-dia-mundial-del-alzheimer>.
21. Chú Lee A., Cuenca Buele Sylvana, S., López Bravo M. "Anatomía y fisiología del sistema nervioso." 2015; 1(1): 59-60.
22. Gartner P. L., Hiatt L. J. Atlas de Histología. 4ta ed. Mexico; 2017; 1(1): 186-187.
23. Oxilia M. R. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista Del Instituto de Medicina Tropical*, 2010. 5(2), 23-27.
24. Wojciech P. Tejido Nervioso. En: Ross H. M. *Histología: Texto y Atlas Correlación con Biología Molecular y Celular*. 7ma ed. España: Wolters kluwer. 2016; 1(1): 385-570.
25. Venereo G. R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med*. 2002; 31(2): 126-133.

26. Coronado M., Vega y León S., Gutiérrez R., Vázquez M., Radilla C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición.* 2015; 42(2): 206-212.
27. Shucla V, Mishra S, Pant H. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci.* 2011; 2011: 1-7.
28. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017; 360(1): 201-205.
29. Dorado C., Rugerio C., Rivas A. "Estrés oxidativo y neurodegeneración." *Revista de la Facultad de Medicina.* 2003; 46(6): 229-235.
30. Liu Z., Zhou T., Ziegler A., Dimitrion P., Zuo L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017; 1-11.
31. Schlesinger P. A., Pescador V. B., Roa C. A. Neurotoxicidad alcohólica. *Revista médica de Colombia.* 2017; 25(1): 89-98
32. Arias D. R. Reacciones fisiológicas y neuroquímicas del alcoholismo. *Universidad Santo tomas.* (2005); 1(2): 138-147.
33. Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez, N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Médica Sur,* 2013; 20(3): 161-168.
34. Hidalgo G. M. “Estrés oxidativo y antioxidantes”. *Universidad Nacional Autónoma de Mexico.* 2018; 22(1): 29-46.
35. Luna-Guevara M. L., Delgado-Alvarado A. Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). *Revista de investigación y difusión científica.* 2014; 18(1).
36. Elejalde G. J. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de medicina interna.* 2001;18(6): 50-59.
37. Grilo E. C., Costa, P. N., Gurgel C. S., Beserra A. L., Almeida F. S., Dimenstein R. Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Science and Technology.* 2014; 34(2): 379-385.
38. Burton G. W., Traber M. G. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annu.Rev.Nutr.* 1990; 10: 357-382.
39. Wrobel J. K., Power R., Toborek M. Biological activity of selenium: Revisited. *IUBMB Life.* 2016; 68(2): 97-105
40. Wang N., Tan H. Y., Li S., Xu Y., Guo W., Feng Y. Supplementation of Micronutrient Selenium in Metabolic Diseases: Its Role as an Antioxidant. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017(6): 1-13.

41. Mandel S., Grubblatt E., Riderer p., Levitas Y., Youdim M. Neuroprotective Strategies in Parkinson's Disease. *CNS Drugs*. 2003; 17(10): 729-762.
42. Schilling EE *Helianthus*. En: Flora of North America Editorial Committee (Eds.). Mexico. 2006; 21: 141-169.
43. Moreiras y col. Tablas de composición de Alimentos: Pipas de girasol. Tablas de composición de los alimentos. 2013: 303-304.
44. Fernández J. M., Muñoz R. J., Gómez A. J. Performance of Near-Isogenic high and low oleic acid hybrids of sunflower. *Crop Sci*. 1993 33(6): 1158-1163.
45. Kuskosky E. M., Asuero A. G., Troncoso A. M., Mancini-Filho J., Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*. 2005; 25(4): 726-732.
46. Aguilar A., Castillo G., Días R., Nieto A., Méndez D. "Antioxidantes e inhibición de radicales libres: lipoperoxidación y carbonilación." *Mexican journal of biotechnology*. 2018; 3(1): 60-72.
47. Minich D. M., Brown B. I. A Review of Dietary (Phyto) Nutrients for Glutathione Support. *Nutrients*. 2019; 11(9): 1-12.
48. Carvajal C. C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*. 2019; 36(1): 91-97.
49. Mariaca J., Zapata M., Uribe P. Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2016; 24(3): 162-173.
50. Morales M, Munné-Bosch S. Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiol*. 2019;180(3): 1246-1250.
51. Kitchen P., Salman M., Halsey M., Clarke-Bland C., MacDonald A., Ishida H., Vogel J., Almutiri S., Logan A., Kreida S., Al-Jubair T., Winkel J., Gourdon P., Törnroth S., Conner T., Ahmed Z., Conner C., Bill M. Targeting Aquaporin-4 Subcellular Localization to Treat Central Nervous System Edema. *Cell*. 2020; 181(4):784-799.
52. Sies H. Estrés oxidativo: un concepto en biología y medicina redox. *Redox Biol*. 2015(4): 180-182.
53. Aufschnaiter A, Kohler V, Diessl J, Peselj C, Carmona-Gutierrez D, Keller W, Büttner S. Mitochondrial lipids in neurodegeneration. *Cell Tissue Res*. 2017; 367(1):125-140.
54. Madore C, Yin Z, Leibowitz J, Butovsky O. Microglia, lifestyle stress, and neurodegeneration. *Immunity*. 2020; 52(2): 222.

55. Chang R, Chang R, Escutia PDI, de la Rosa Gómez I, D'orneville E. Fundamentos de química. México: McGraw-Hill/Interamericana Editores. 2011; 11; 548.
56. Estrada F, Morales J, Tabla E, Solis B, Navarro H, Martínez M. Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico. Revista de la Facultad de Medicina UNAM. 2012; 55(4): 17.
57. Hernández S. R, Fernández C. C, Baptista L. P. "Metodología de la Investigación." Mc. Graw Hill. 6ta edición. 2014.
58. Paredes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía del manejo y cuidado de los animales de laboratorio: Ratón. Instituto Nacional de Salud. 2008.
59. Witte P. D., Bada M. F. Self-stimulation and alcohol administered orally or intraperitoneally. Exp.Neurol; 1983, 82: 675-682. DOI: 10.1016/0014-4886(83)90089-4.
60. Underwood, Wendy; Antonio, Raymond. Directrices AVMA para la eutanasia de animales: 2020; 2013(30): 44-45.
61. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymology. 1978; 52: 302-306.
62. Boyne A. F., Ellman G. L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. 1972; 46(2): 639-653.
63. Vega S., Watanabe R. Análisis de la Ley N° 30407. Ley de Protección y Bienestar Animal. 2016; 27(2): 388-396.
64. WMS Rusell, R L Burch. The Principles of humane experimental technique.1959.
65. Salech M., Jara L., Michea A. Cambios fisiológicos asociados al envejecimiento. REV. Med. Clin. CONDES, 2012; 23(1): 19-29.
66. Deehan G. J., Hauser S. R., Wilden J. A., Truitt W. A., Rodd Z. A. Elucidating the biological basis for the reinforcing actions of alcohol in the mesolimbic dopamine system: the role of active metabolites of alcohol. Front Behav Neurosci. 2013; 7:1-13.
67. Hernández J. A., López C., Rendón A. Lipids and Oxidative Stress Associated with Ethanol-Induced Neurological Damage. Oxid Med Cell Longev. 2016.2016;1-15.
68. Manzo A. S., Saavedra M. A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. Int J Environ Res Public Health. 2010; 7(12): 4281-304

69. Haorah J., Ramirez H., Floreani N., Gorantla S., Morse B., Persidsky Y. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(11): 1542-1550.
70. Shichiri M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem Nutr.* 2014; 54 (3): 151-60.
71. Wilkins H. M., Kirchof D., Manning E., Joseph J. W., Linseman D. A. Mitochondrial glutathione transport is a key determinant of neuronal susceptibility to oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem.* 2013; 288(7): 5091-5101.
72. Gaschler M. M., Stockwell B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 482(3): 419-425.
73. Almaguer G. D., Almaguer M. L. Estrés oxidativo y muerte neuronal. Una visión biomolecular." *Rev Mex Neuroci.* 2006; 7(4): 330-337.
74. Ballatori N., Krance M., Notenboom S., Shi S., Tieu K., Hammond L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009; 390: 191-214.
75. Lu S. C. Síntesis de glutatión. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830 (5): 3143-53.
76. Díaz-Hung M., González M., Blanco L. El sistema antioxidante del glutatión en la etiopatología de la disfunción nigro-estriatal. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 2015; 34(2): 168-186.
77. Ulrich K, Jakob U. The role of tiholes in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med.* 2019; 140: 14-27.
78. Dalle-Donne I., Renieri D, Roberto A. S-glutathioylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2007; 46(6): 883-898.
79. Cobb C., Cole M. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2015; 84: 4-21.
80. Panikar K., Anderson R. Effect of polyphenols on oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neuronal death and brain edema in cerebral ischemia. *Revista internacional de ciencias moleculares.* 2011; 12(11): 8181-8207.
81. Wiggers G. A., Peçanha F. M., Briones A. M., Pérez-Girón J. V., Miguel M., Vassallo D., Cachofeiro V., Alonso M., Salaices M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(3): 1033-1043.
82. Fernández S., Zeledón N., Rojas A. Rol del óxido nítrico en la fisiopatología del ictus cerebral. 2020; 5 (1): 2-9.

83. Ikram M, Saeed K, Khan A, Muhammad T, Khan MS, Jo MG, Rehman SU, Kim MO. Natural Dietary Supplementation of Curcumin Protects Mice Brains against Ethanol-Induced Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration and Memory Impairment via Nrf2/TLR4/RAGE Signaling / RAGE. *Nutrients*. 2019; 11(5): 1-15.
84. Reddy V., Padmavathi P., Bulle S., Hebbani A., Marthadu S., Venugopalacharyulu N., Maturu P., Varadacharyulu N. Association between alcohol-induced oxidative stress and membrane properties in synaptosomes: A protective role of vitamin E. *Neurotoxicol Teratol*. 2017; 63: 1-5.
85. Oyenihi O., Afolabi B., Oyenihi A., Ogunmokun O., Oguntibeju O. Hepato- and neuro-protective effects of watermelon juice on acute ethanol-induced oxidative stress in rats. *Toxicol Rep*. 2016;3: 3-11.
86. Phachonpai W., Wattanathorn J., Wannanon P., Thipkaew C., Sripanidkulchai B., Muchimapura S. *Coscisium Fenestratum* Protects Against Ethanol-Induced Neurodegeneration in Adult Rat Brain. 2012; 7(3):81-88.
87. Almansa F. I. “Efecto del consumo crónico de etanol sobre el cerebro de rata. Tratamiento con naltrexona” (Tesis Doctoral). Universidad Cardenal Herrera. España, 2011.
88. Turkcü U., Bilgihan A., Biberoglu G., Mertoglu O. Carnosine supplementation protects rat brain tissue against ethanol-induced oxidative stress. *Molecular and cellular biochemistry*. 2010; 339: 55-61.
89. La Fata G, Weber P, Mohajeri M. Effects of vitamin E on cognitive performance during ageing and in Alzheimer's disease. *Nutrients*. 2014; 6(12): 5453-5466.
90. López L., Fernando C., Zelmira Lazarova Z., Sánchez R., Sergio H. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM* 2012; 6 (1): 48-53.
91. Lee G. Y., Han S. N. The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*. 2018; 10(11): 1-14.
92. Königsberg F. M. Radicales libres y estrés oxidativo, Aplicaciones médicas. Martínez Moreno M, editor. 2008: 39-259.
93. Lloret A., Esteve D., Monllor P., Cervera-Ferri A., Lloret A. The Effectiveness of Vitamin E Treatment in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(4): 2-11.
94. Ibtissem A., Soudani A., Troudi A., Mounir K., Boudawara T., Zghal N. Selenium and vitamin E, natural antioxidants, protect rat cerebral cortex against dimethoate-induced neurotoxicity. 2011; 101(3): 165-174.

95. Puelles O. Efecto del zumo de fruta *Solanum quitoense* (lulo) sobre el daño cerebral inducido por cloruro de mercurio y función cognitiva en ratones. (Tesis) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú, 2020.
96. Beytut E., Yilmaz S., Aksakal M., Polat S. The possible protective effects of vitamin E and selenium administration in oxidative stress caused by high doses of glucocorticoid administration in the brain of rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2018; 45: 131-134.
97. Kiczorowska B., Samolińska W., Andrejko D., Kiczorowski P., Antoszkiewicz Z., Zając M., Winiarska-Mieczan A., Bąkowski M. Comparative analysis of selected bioactive components (fatty acids, tocopherols, xanthophyll, lycopene, phenols) and basic nutrients in raw and thermally processed camelina, sunflower, and flax seeds (*Camelina sativa* L. Crantz, *Helianthus* L., and *Linum* L.). *J Food Sci Technol*. 2019; 56(9): 4296-4310.
98. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*. 2008; 13(2): 102-108.
99. Hernández-Mendoza H., Rios-Lugo M. Rol biológico del selenio en el humano. 2009; 8(2): 64-79.
100. Kumar S., Pandey A. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*. 2013: 1-16.
101. Ullah A., Munir S., Badshah S., Khan N., Ghani L., Poulson B., Emwas A., Jaremko M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*. 2020; 25(22): 2-25.
102. Bhullar K., Rupasinghe H. Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 1-10.
103. Costa L., Garrick J., Roquè P., Pellacani C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:1-6.
104. Gan L., Johnson J. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica. Acta*. 2014; 1842(8): 1208–1218.
105. Pattanashetti L., Taranalli A., Parvatrao V., Malabade R., Kumar D. Evaluation of neuroprotective effect of quercetin with donepezil in scopolamine-induced amnesia in rats. 2017; 49(1): 60-64.
106. Qu Y, Zhang H. L., Zhang X. P., Jiang H. L. Arachidonic acid attenuates brain damage in a rat model of ischemia/reperfusion by inhibiting inflammatory response and oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*. 2017; 37(2): 135-141.

107. Valenzuela B Rodrigo, Tapia O Gladys, González E Marcela, Valenzuela B Alfonso. Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Rev. chil. nutr.* 2011; 38(3): 356-367.
108. Czapski G., Czubowicz K., Strosznajder J., Strosznajder R. The Lipoxygenases: Their Regulation and Implication in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res.* 2016; 41(2): 8-10.
109. Cardoso C., Afonso C., Bandarra N. Dietary DHA and health: cognitive function ageing. *Nutr Res Rev.* 2016; 29(2): 8-9.
110. Lukiw W., Cui J., Marcheselli V., Bodker M., Botkjaer A., Gotlinger K., Serhan C., Bazan N. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2005; 115(10): 2774-2781.

X. ANEXOS

Anexo 1. Semilla de *Helianthus annuus L.* (girasol)



Anexo 2. Clasificación taxonómica de la semilla *Helianthus annuus* L. (girasol)

CONSTANCIA

Yo, Leonardo Humberto Mendoza Carbajal, biólogo especialista en botánica, he recibido la muestra vegetal (semillas) por parte de John Henry Pinto Gonza, identificada con DNI 70913728, procediendo a identificar a la especie como: *Helianthus annuus* L., con la siguiente clasificación taxonómica:

CATEGORÍA TAXONÓMICA	NOMBRE
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUB CLASE	Mangoliidae
ORDEN	Asterales
FAMILIA	Asteraceae
GÉNERO	<i>Helianthus</i>
ESPECIE	<i>Helianthus annuus</i> L.

Nombre vulgar: “Girasol”

Fueron dos los sistemas de clasificación que se consideraron, para las jerarquías de división y clase se siguió la clasificación de Cronquist (1981), y para los órdenes y familias la clasificación del APG propuesta por el Angiosperm Phylogeny Group (APG) III (Hanson et al. 2009) y las actualizaciones del APG IV (Chase et al. 2016). Para la clasificación de géneros y especies se consideraron los criterios de Tropicos (2020), y se confirmó la nomenclatura de cada especie según IPNI (2020).

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que estime conveniente.

Lima, 01 de octubre del 2020



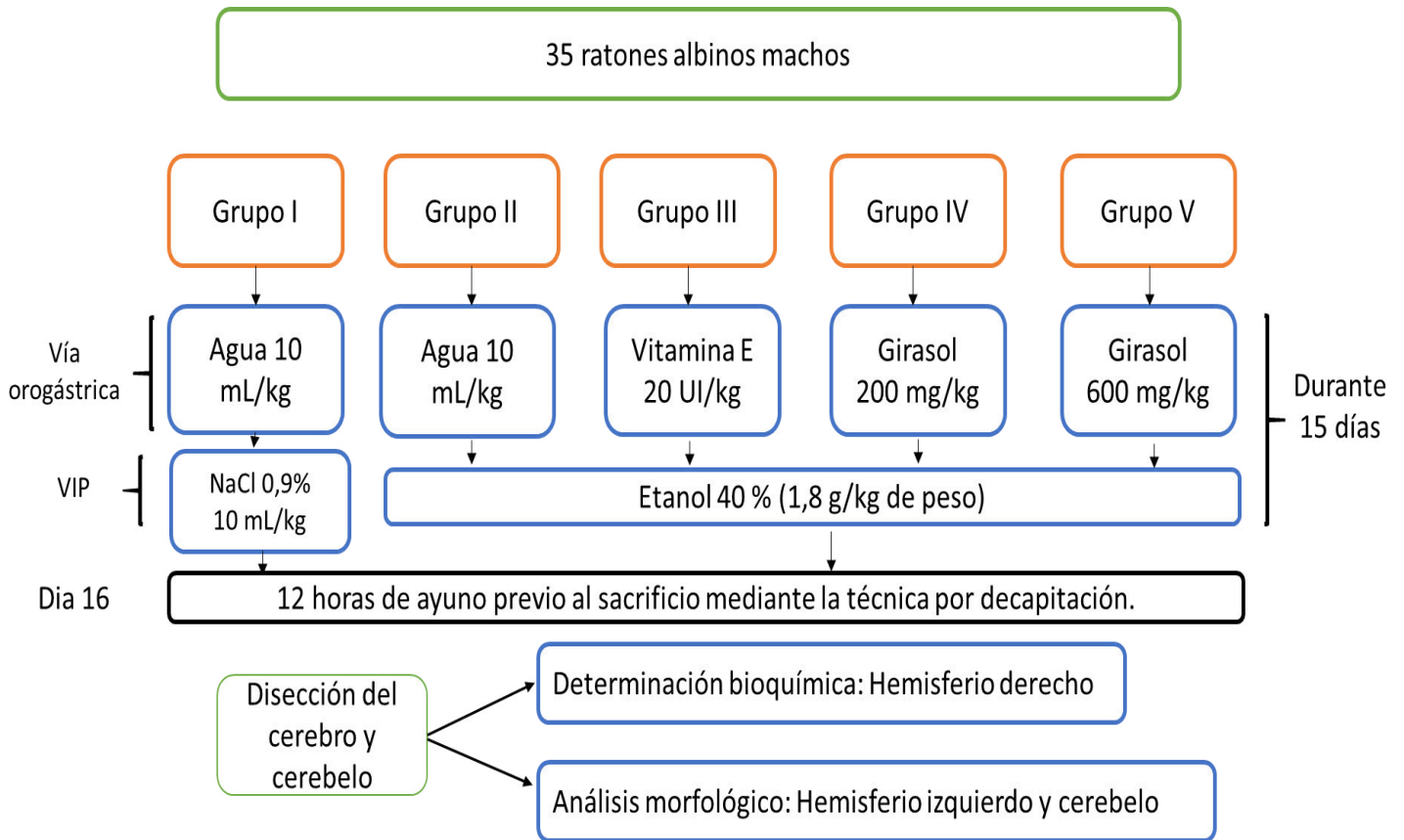
Leonardo Humberto Mendoza Carbajal
Biólogo
CBP. 12991

Mg. Leonardo Humberto Mendoza Carbajal
CBP 12991

Anexo 3. Jaula de ratones



Anexo 4. Flujograma del diseño experimental



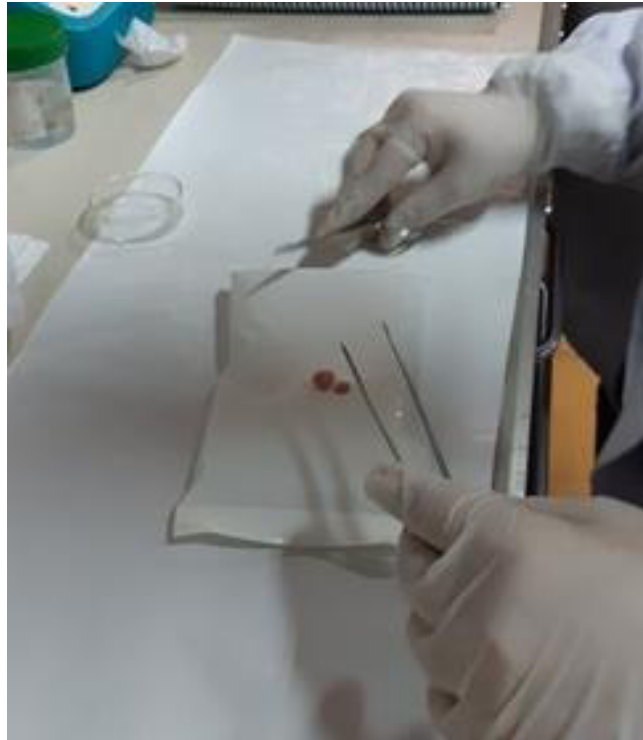
Anexo 5. Administración de la suspensión de semilla *Helianthus annuus L.* (girasol)



Anexo 6. Guillotina para ratones



Anexo 7. Disección del tejido cerebral y cerebeloso



Anexo 8. Evaluación histológica de tejido cerebral y cerebeloso

LABORATORIO

DR. HUGO CASTRO PIZARRO

CANCERLAB

CMP 24195 RNE 13560

PATOLOGO

HALLAZGOS HISTOLOGICOS TEJIDO CEREBRAL Y CEREBELO CON SEMILLA DE GIRASOL

METODOLOGIA:

Se procesaron tejidos del Sistema Nervioso Central fijados en formol al 10% y se aplicó coloraciones de rutina Hematoxilina - Eosina, se revisan las láminas de tejidos cerebro y cerebelo; se revisa la bibliografía actualizada de investigaciones recientes sobre daño de alcohol etílico administrado por vía peritoneal la producción de alteraciones en tejido cerebral y el impacto de las sustancias de semillas de girasol en concentraciones de 200 y 600 mg por kg. aplicadas para encontrar la respuesta.



HALLAZGOS DE REPORTES CIENTIFICOS DE INVESTIGACION:

Las primeras investigaciones sobre daño del alcohol en tejido cerebral y las implicancias de este en los diferentes tejidos, fundamentalmente en el Sistema Nervioso Central incluyendo cerebro y cerebelo, los daños clínicos depende de la concentración de alcohol en sangre, está en relación con las manifestaciones clínicas según “The TEMP Effects of Alcohol on the Central Nervous System in Humans”, publicado por Henri Blegeter y colaboradores en la Revista Biología y alcoholismo.

El daño del alcohol etílico se expresa mediante las diferentes moléculas como las interleucinas en tejido cerebral e incluyendo al cerebelo, en correlatos con expresiones de cambios morfológicos a nivel de las células neuronales alteraciones como: inflamación, autofagia, apoptosis, necrosis y micro vesiculación, en una publicación del presente año por Donna Gruol, en la Revista “Cellular and Molecular Neurobiology”, bajo el título “Alcohol alters IL-6 Signal Transduction in the CNS of Transgenic Mice with Increased Astrocyte Expression of IL-6”.

Shiyun Jin y Yunxiang Zhou refiere la alteración de los astrocitos las células más abundantes del cerebro, tiene las funciones de reparación, neurogénesis, sinaptogénesis, angiogénesis dentro del rol neuro protector, como parte de las respuestas de la injuria de alcohol en tejido cerebral, dicha

30 AÑOS A SU SERVICIO LABORATORIO CANCERLAB cancerlab@gmail.com

LABORATORIO

DR. HUGO CASTRO PIZARRO

CANCERLAB

CMP 24195 RNE 13560

PATOLOGO

publicación en “Nature Metabolism” el presente año en 22 de marzo del 2021 y “Cell Communication and Signaling”, el 15 de abril del 2020 respectivamente.

HALLAZGOS NEURONALES POR EFECTO DEL ALCOHOL

Los hallazgos de control positivo en tejidos cerebral y cerebelo en las células neuronales encontramos los siguientes hallazgos: edema celular, células inflamatorias, esclerosis, vascularidad, autofagia, disminución de la masa gris, reacción de las células gliales llegando a la gliosis; principalmente en diferente grado de acuerdo a las capas y diferentes células neuronales, como se reporta en diferentes reportes científicos como “Acute ethanol exposure rapidly alters cerebellar and cortical microglial physiology” por Rianne Stowel publicado el 17 de febrero 2020 en “European Journal of Neuroscience”.

Referente a los diferentes tratamientos en daño celular por el alcohol en tejido cerebral son las vitaminas y sus beneficios al sin número de lesiones morfológicas ocasionadas en las células neuronales como se reporta en la siguiente investigación publicada por Lewis Michael en marzo del 2020 en la revista “Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care”, también se reporta los mismo beneficios en la siguiente publicación “Comparative histomorphological assessment of Vitamin E and green tea (*Camellia sinensis*) extract-mediated amelioration of Lead-induced hepatopathy in experimental Wistar rats” en 16 de enero del 2020 por Dayo Rotimi Omotoso en la revista American Journal Of Physiology, Biochemistry And Pharmacology”.

Por lo que encontramos los siguientes hallazgos histomorfológicos en las muestras analizadas correspondientes a las láminas de tejido cerebral y cerebeloso: para correlacionar las respuestas de cambios celulares y morfológicos con coloración de Hematoxilina y Eosina; con las sustancias como Semillas de Girasol en diferentes concentraciones desde 200 y 600 mg/kg, teniendo como una variable constante al alcohol en una concentración de 40% por vía intraperitoneal para todos los casos.

En los casos de control positivo reportamos los siguientes hallazgos: áreas focales de necrosis en tejido cerebral, presencia de componente inflamatorio por células de tipo linfocitario, cambios

30 AÑOS A SU SERVICIO LABORATORIO CANCERLAB cancerlab@gmail.com

LABORATORIO

DR. HUGO CASTRO PIZARRO

CANCERLAB

CMP 24195 RNE 13560

PATOLOGO

citoplasmáticos en las células neuronales de la corteza cerebral, cambios en las células gliales en su membrana citoplasmática en tejido cerebral. Así mismo en tejido cerebeloso reportamos los siguientes cambios estructurales: infiltrado de células inflamatorias en el espacio subaracnoideo, en células de Purkinje cambios en la membrana citoplasmática como retracción y eosinofilia, alteraciones a nivel del núcleo como picnosis; según esos cambios encontrados analizaremos los resultados en los tejidos de acuerdo con cada variable aplicada en tejidos cerebral y cerebeloso.

Con la aplicación de Semillas de Girasol en una concentración de 200 mg/Kg en comparación con la concentración de 600 mg/Kg la persistencia de infiltrado de células inflamatorias tipo linfocitario en ambas concentraciones; teniendo en cuenta que con la dosis mayor se reporta además células inflamatorias tipo polimorfonuclear en tejido cerebral. Mientras en tejido cerebeloso a dosis 200mgr/Kg escasas células linfocitarios a nivel perivascular y ausencia de células inflamatorias a dosis de 600 mg/Kg.

Referente a alteraciones de las células neuronales la respuesta a nivel de la membrana citoplasmática del tejido cerebral con la administración de semillas de Girasol a dosis de 200 mg/Kg existe edema en todas sus capas; a 600 mg/Kg persiste el edema, pero en forma multifocal. En tejido cerebeloso no existe cambios en ambas dosis el edema es similar.

CONCLUSIONES:

1. Las alteraciones celulares encontradas en los tejidos cerebral y cerebeloso son las siguientes: infiltrado de células inflamatorias tipo linfocitarias y polimorfonuclear como una respuesta a la noxa empleada alcohol por vía intraperitoneal, así mismo de alteraciones de la membrana citoplasmática como edema y eosinofilia. Las otras alteraciones reportan según los estudios tiempos prolongados de exposición como gliosis que son reparativas del daño ocasionado.
2. Las semillas de Girasol en dosis de 600 mg/Kg en tejido cerebeloso, se reporta células neuronales conservadas en su morfología sin alteraciones histológicas y ausencia de infiltrado de células inflamatorias. Las concentraciones de 200 y 600 mg/Kg en tejido

30 AÑOS A SU SERVICIO LABORATORIO CANCERLAB cancerlab@gmail.com

LABORATORIO

DR. HUGO CASTRO PIZARRO

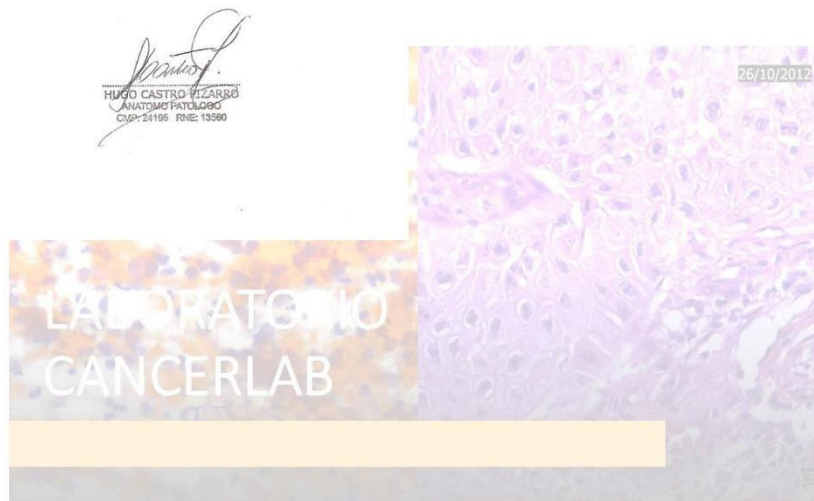
CANCERLAB

CMP 24195 RNE 13560

PATOLOGO

cerebral las células inflamatorias se encuentran presentes sin diferencia entre ambas sustancias.

3. La detección de alteraciones de células gliales para su identificación se necesita un marcador de inmunohistoquímica para visualizar sus alteraciones; la detección de molecular como las interleucinas también se pueden identificar por marcadores moleculares.



30 AÑOS A SU SERVICIO LABORATORIO CANCERLAB cancerlab@gmail.com

Anexo 9. Acta de aprobación del comité de ética en investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina
Comité de Ética en Investigación



ACTA DE EVALUACIÓN ÉTICA DE ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN (AEE-CEI)

CÓDIGO DE ESTUDIO N°: 0002 - 2022

En Lima, el día uno del mes de febrero de 2022, en Sesión del COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN, previa evaluación de la Tesis titulada: “Efecto de la suspensión de semilla *Helianthus annuus* L. (girasol) frente a la neurotoxicidad inducida por etanol en ratones” y presentado por el Señor John Henry Pinto Gonza con Código de Matrícula N°: 16010103 de la Escuela Profesional de Nutrición de la Facultad de Medicina.

ACUERDA:

Dar por **APROBADO** dicha Tesis, considerando que se ha cumplido satisfactoriamente con las recomendaciones Metodológicas y Éticas para la investigación en seres humanos y/o en animales de laboratorio.

Lima, 02 de febrero de 2022

Dr. Henry/Guija Guerra
PRESIDENTE DEL CEI