

**ACTIVIDAD NEUPROTECTORA DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES  
EXTRAÍDOS A PARTIR DE MORERA (*Morus spp.* L) EN UN MODELO  
CELULAR**

**AUGUSTO ZULUAGA VÉLEZ  
CÓDIGO 4.519.136**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA  
PEREIRA  
2015**

**ACTIVIDAD NEUPROTECTORA DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES  
EXTRAÍDOS A PARTIR DE MORERA (*Morus spp.* L) EN UN MODELO  
CELULAR**

**AUGUSTO ZULUAGA VÉLEZ  
CÓDIGO 4.519.136**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de  
Magister en Biología Molecular y Biotecnología**

**Director  
Duverney Gaviria Arias  
Docente**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA  
PEREIRA  
2015**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

---

**Jurado**

---

**Jurado**

**Pereira, 09 de Septiembre de 2015**

## **DEDICATORIA**

Para Anita, mis papás y hermanos, con amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los integrantes de CENBIOTEP, en especial a la Dra. Lucero y el profesor Enrique por proporcionarme los medios para el proyecto.

A mi director de tesis Duverney Gaviria por brindarme su apoyo y asesoría durante mi formación y proyecto de grado.

A los profesores Oscar Mosquera, Jaime Niño y las investigadoras Juliana y Lina del grupo Biotecnología – Productos Naturales (GB-PN) de la escuela de Tecnología Química, por facilitarme el equipo Multiskan™ FC Microplate Photometer y brindarme un apoyo incondicional en este trabajo.

A mis compañeras, en especial a las Julis, Andre, Lyda y Anita por colaborar conmigo con los ensayos.

Al profesor Fernando Cardozo de la Universidad de Montana por su asesoría y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto.

Al profesor José William por sus aportes en los análisis estadísticos.

A todos los profesores de la Maestría por sus conocimientos, en especial a los profesores Ignacio, Jorge, Adalucy, Mauricio y el Dr. Alegría.

Al laboratorio de Fisiología Celular e Inmunología de la Universidad Tecnológica de Pereira por facilitarme el equipo JASCO FP-6500.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pag.</b>
RESUMEN .....	19
ABSTRACT .....	20
INTRODUCCIÓN .....	21
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA y JUSTIFICACIÓN .....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
3. MARCO TEÓRICO .....	26
3.1. DAÑO OXIDATIVO EN PROTEÍNAS .....	31
3.2. DAÑO EN ADN .....	32
3.3. DAÑO EN LÍPIDOS.....	34
4. METODOLOGÍA .....	35
4.1. TOMA DE MUESTRAS .....	35
4.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS .....	35
4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH.....	35
4.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES	36
4.5. MARCHA FITOQUÍMICA .....	37
4.6. DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE LA LINEA CELULAR SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™).....	37
4.7. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA LD <sub>50</sub> DE ROTENONA	38
4.8. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS .....	39
4.9. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y, al ser aplicados ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DEL DAÑO POR ROTENONA. ....	39
4.9.1. Efecto sobre la viabilidad celular.....	40
4.9.2. Carbonilación de proteínas .....	41
4.9.3. Peroxidación lipídica.....	42
4.9.4. Daño en ADN .....	44
4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	46
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47

5.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE MORERA.....	47
5.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH.....	48
5.3. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	51
5.4. MARCHA FITOQUÍMICA .....	54
5.5. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA.....	55
5.6. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ENTRE LA INDUCCIÓN DEL DAÑO Y LA EXPOSICIÓN A LOS EXTRACTOS.....	56
5.7. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE MORERA.....	59
5.8. EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y	62
5.8.1. Efecto sobre la viabilidad.....	62
5.8.2. Efecto sobre las proteínas celulares .....	67
5.8.3. Efecto sobre lípidos .....	70
5.8.4. Efecto sobre el ADN .....	73
5.9. EVALUACIÓN DE LA NEUROPROTECCIÓN .....	77
5.10. RESUMEN DE RESULTADOS.....	78
6. CONCLUSIONES .....	81
7. RECOMENDACIONES.....	82
8. BIBLIOGRAFÍA.....	83
9. ANEXOS.....	91

## TABLA DE FIGURAS

Figura 3-1. Estructuras químicas de los principales grupos antioxidantes y fitoquímicos antioxidantes .....	26
Figura 3-2. Reacción del ensayo de carbonilación de proteínas. ....	32
Figura 3-3. Reacción del ensayo TBARS .....	34
Figura 4-1. Método para la evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH•.....	36
Figura 5-1. Masa total de extracto según el método de extracción.....	47
Figura 5-2. Actividad antioxidante según el método de extracción .....	48
Figura 5-3. Actividad antioxidante para los extractos de las 15 variedades de morera obtenidos por los métodos Acetona-Agua/Sonicación y Acetona-Agua/Microondas .....	49
Figura 5-4. Actividad antioxidante para los extractos de las 15 variedades de morera obtenidos por los métodos Metanol-Agua/Sonicación y Metanol-Agua/Microondas .....	50
Figura 5-5. Concentración de fenoles totales según el método de extracción .....	51
Figura 5-6. Concentración de fenoles para los extractos de las 15 variedades de morera obtenidos por los métodos Acetona-Agua/Sonicación y Acetona-Agua/Microondas .....	52
Figura 5-7. Concentración de fenoles para los extractos de las 15 variedades de morera obtenidos por los métodos Metanol-Agua/Sonicación y Metanol-Agua/Microondas .....	52
Figura 5-8. Relación entre la capacidad antioxidante y la concentración de fenoles totales para las variedades promisorias. ....	54
Figura 5-9. Dendrogramas de los extractos promisorios .....	55
Figura 5-10. Determinación de la LD <sub>50</sub> de rotenona .....	55
Figura 5-11. Viabilidad de la línea celular SH-SY5Y luego de varios tiempos de exposición a rotenona. ....	57
Figura 5-12. Carbonilación de proteínas de la línea celular SH-SY5Y en distintos tiempos de exposición a rotenona. ....	57
Figura 5-13. Peroxidación lipídica de la línea celular SH-SY5Y en distintos tiempos de exposición a rotenona. ....	58
Figura 5-14. Porcentaje de 8-oxoGuanina en la línea celular SH-SY5Y en distintos tiempos de exposición a rotenona. ....	58
Figura 5-15. Toxicidad del extracto de AA-2 a las 28 horas .....	59
Figura 5-16. Toxicidad del extracto de Cristiana a las 28 horas .....	59
Figura 5-17. Toxicidad del extracto de Ichinose a las 28 horas .....	60
Figura 5-18. Toxicidad del extracto de Subong Pong a las 28 horas .....	60
Figura 5-19. Toxicidad del extracto de Nacional a las 28 horas .....	61
Figura 5-20. Viabilidad celular según el tipo de ensayo.....	62
Figura 5-21. Efecto del extracto de la variedad Nacional sobre la viabilidad celular según el tipo de ensayo. ....	63
Figura 5-22. Viabilidad celular con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Subong Pong; Cristiana) y al tipo de ensayo .....	64

Figura 5-23. Viabilidad celular con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Ichinose; AA-2) y al tipo de ensayo.....	65
Figura 5-24. Imágenes del cultivo celular: ensayo tipo “Al tiempo” para extractos promisorios. ....	66
Figura 5-25. Imágenes del cultivo celular: ensayo tipo “Extracto” para extractos promisorios. ....	67
Figura 5-26. Carbonilación de proteínas en la línea celular SH-SY5Y según el tipo de ensayo .....	68
Figura 5-27. Carbonilación de proteínas de la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Subong Pong; Cristiana) y al tipo de ensayo.....	69
Figura 5-28. Carbonilación de proteínas de la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Ichinose; AA-2) y al tipo de ensayo .....	70
Figura 5-29. Concentración de malondialdehído en la línea celular SH-SY5Y con respecto a los tipos de ensayos planteados.....	71
Figura 5-30. Concentración de malondialdehído de la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Subong Pong; Cristiana) y al tipo de ensayo .....	72
Figura 5-31. Concentración de malondialdehído en la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Ichinose ; AA-2) y al tipo de ensayo.....	72
Figura 5-32. Determinación del porcentaje de cola en extractos de la variedad Subong Pong por medio de los ensayos de cometa .....	73
Figura 5-33. Determinación del porcentaje de cola en extractos de la variedad Ichinose por medio de los ensayos de cometa.....	74
Figura 5-34. Determinación del porcentaje de cola en extractos de la variedad Cristiana por medio de los ensayos de cometa.....	74
Figura 5-35. Determinación del porcentaje de cola en extractos de la variedad AA-2 por medio de los ensayos de cometa .....	75
Figura 5-36. Porcentaje del aducto 8-oxoGuanina en la línea celular SH-SY5Y con respecto a los tipos de ensayos planteados.....	76
Figura 5-37. Porcentaje en cola del aducto 8-oxoG en la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Subong Pong; Cristiana) y al tipo de ensayo .....	76
Figura 5-38. Porcentaje en cola del aducto 8-oxoG en la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Ichinose; AA-2) y al tipo de ensayo.....	77
Figura 5-39. Biplot del análisis de componentes principales relacionando los ensayos de viabilidad, carbonilación de proteínas, peroxidación lipídica y porcentaje en cola de 8-oxoG, para todos los extractos estudiados.....	80
Figura 8-1. Imágenes del ensayo cometa sin enzima Fpg, experimento tipo “Al tiempo” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios. ....	95

Figura 8-2. Imágenes del ensayo cometa con enzima Fpg, experimento tipo “Al tiempo” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios .....	96
Figura 8-3. Imágenes del ensayo cometa sin enzima Fpg, experimento tipo “Extracto” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios .....	97
Figura 8-4. Imágenes del ensayo cometa con enzima Fpg, experimento tipo “Extracto” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios .....	98
Figura 8-5. Imágenes del ensayo cometa sin enzima Fpg, experimento tipo “Rotenona” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios .....	98
Figura 8-6. Imágenes del ensayo cometa con enzima Fpg, experimento tipo “Rotenona” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios .....	99

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 3-1. Reacción química en el método DPPH.....	29
Ecuación 4-1. Determinación de actividad antioxidante de los extractos.....	36
Ecuación 4-2. Estimación de células totales. ....	38
Ecuación 4-3 Ley de Beer-Lambert.....	42

## LISTA TABLAS

Tabla 4-1. Patrones y reveladores empleados en la marcha fitoquímica.....	37
Tabla 4-2. Construcción de la curva de calibración del ensayo TBARS .....	43

## TABLA DE ANEXOS

Anexo A. Curva de calibración para determinar la concentración de fenoles totales en términos de ácido gálico.....	91
Anexo B. Tabla de resultados de la marcha fitoquímica.....	91
Anexo C. Efecto del extracto de las variedades Ichinose, Subong Pong, Cristiana y AA-2 sobre la viabilidad celular según el tipo de ensayo .....	92
Anexo D. Curva de calibración de BSA leída a 280 nm para determinar la concentración de proteínas.....	94
Anexo E. Curva de calibración para determinar la concentración de malondialdehído (MDA) a partir de las medidas de fluorescencia. ....	94
Anexo F. Registro fotográfico del ensayo cometa .....	95

## RESUMEN

Una de las principales evidencias en la Enfermedad de Parkinson es el estrés oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del sistema estriado. Debido a que en la actualidad no se ha podido controlar de forma satisfactoria este fenómeno, continuamente se desarrollan modelos animales y celulares con neurotoxinas cuyo objetivo es encontrar sustancias capaces de revertir, mitigar o prevenir las reacciones de oxidación en macromoléculas celulares.

Es por esto, que se planteó en este estudio construir un modelo de la enfermedad de Parkinson empleando la línea celular SH-SY5Y y rotenona, el cual sirvió para evaluar el efecto de los compuestos antioxidantes extraídos a partir de variedades de morera (*Morus spp L*), en términos de reversión, mitigación y prevención del daño oxidativo.

En este estudio se partió de 15 variedades del género *Morus* de la familia Moraceae. Para cada muestra vegetal colectada se obtuvieron los extractos de metanol-agua y acetona-agua con los sistemas microondas y sonicación, a los cuales se les determinó la actividad antioxidante y la concentración de fenoles totales. Posteriormente, se seleccionaron algunos extractos para evaluar su efecto protector a nivel de ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y viabilidad en línea celular SH-SY5Y.

Los resultados mostraron que los extractos obtenidos por el método sonicación/acetona-agua tuvieron un efecto antioxidante capaz de inhibir y prevenir el deterioro oxidativo generado en la línea celular SH-SY5Y, cuando esta fue expuesta a concentraciones de rotenona 50  $\mu\text{M}$ . Además, se evidenció una actividad protectora similar al resveratrol con extractos de las variedades Subong Pong, Ichinose y AA-2.

**Palabras clave:** *Morus*, estrés oxidativo, neuroprotector, rotenona.

## ABSTRACT

An important evidence in Parkinson's disease is oxidative stress, caused by reactive oxygen and nitrogen species in dopaminergic neurons of the substantia nigra in striatal system. Because, today is hasn't been able to control this phenomenon, continuously they are developed animal and cell models aimed at finding substances able to reverse, alleviate or prevent the oxidation reactions that take place in cellular macromolecules.

Therefore, it was raised in this research, to build a model of Parkinson's disease using the cell line SH-SY5Y and rotenone, which served to assess the effect of antioxidant compounds extracted from varieties of mulberry (*Morus* spp L) in terms of reversal, mitigation and prevention of oxidative damage.

In this study we started from 15 varieties of the genus *Morus* of the family Moraceae. Each vegetal collected sample, it was extracted with different methods (sonication/methanol-water; sonication/acetone-water, microwave/methanol-water, microwave/methanol-water), and it's determined the antioxidant activity and the concentration of total phenols. Subsequently, some extracts were selected to evaluate its effect at nucleic acids, lipids, proteins and the cell line SH-SY5Y's viability.

The results showed that the acetone extracts had an antioxidant effect capable of inhibiting and preventing oxidative deterioration generated in the cell line SH-SY5Y, when it was exposed to concentrations of 50 mM rotenone. In addition, extracts to the varieties Subong Pong, Ichinose and AA-2 displayed similar activity to resveratrol.

**Keywords:** *Morus*, oxidative stress, neuroprotector, rotenone.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (PD) es un trastorno progresivo y neurodegenerativo, asociado con una pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y la degeneración de las fibras nerviosas en el cuerpo estriado [1]. Debido a que actualmente no hay ninguna terapia que retrase el proceso neurodegenerativo, la modificación del curso de la enfermedad es una importante necesidad clínica aún insatisfecha. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos celulares por los cuales se afectan las neuronas ha sido objeto de intensa investigación [2].

Las evidencias sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en esta enfermedad, ya que la gran cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que no se logran controlar, provocan modificaciones en las macromoléculas intracelulares que alteran las funciones y supervivencia celular [3].

PD es ampliamente aceptada como un trastorno multifactorial, con influencia de componentes genéticos y ambientales. Se estima que alrededor del 10% de los casos de PD tienen una causa monogénica mientras que los demás tienen un origen desconocido [4]. A la PD se han asociado diversos factores de riesgo ambientales que pueden aumentar o disminuir la susceptibilidad a este trastorno; dentro de los cuales se encuentran el tabaquismo [1], el consumo de agua, el ejercicio, traumas cerebrales, exposición a agentes infecciosos, a metales [5] y a plaguicidas (fumigantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas y rodenticidas) [6].

Se conocen varios pesticidas comerciales que imitan las características clínicas y patológicas de la PD. Entre estos se destaca la rotenona, una toxina que tiene como mecanismo de acción la generación de especies reactivas de oxígeno debido a la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria de electrones en la mitocondria [7]. Por lo anterior, esta toxina ha sido empleada en modelos *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de conocer los fenómenos involucrados en la pérdida de neuronas dopaminérgicas y evaluar sustancias con potencial para el tratamiento de este trastorno [8-11].

Diversos hallazgos sugieren que la ingesta de antioxidantes en la dieta diaria podría mitigar el estrés oxidativo y reducir el riesgo de neurodegeneración [12]. Aunque, se han descrito efectos secundarios asociados a la terapia con antioxidantes sintéticos tales como daño hepático, carcinogénesis, etc. Por lo tanto, la investigación en este campo se ha dirigido hacia la búsqueda de antioxidantes naturales como una estrategia terapéutica para combatir enfermedades degenerativas como el Parkinson [13].

La morera es una planta perteneciente al género *Morus* (familia Moraceae) ampliamente cultivada en todo el mundo. En la medicina tradicional oriental, se ha utilizado para tratar el estreñimiento, la inflamación, el cansancio físico y la

diabetes, además, se ha asociado con un aumento en la calidad de vida y la longevidad [14]. Pese a que se ha demostrado en ensayos *in vitro*, que las hojas de morera poseen la habilidad de captar radicales libres y un gran potencial antioxidante, existen pocos estudios donde se verifique su efecto neuroprotector en enfermedades como el Parkinson [15].

En el presente trabajo se utilizó la línea celular SH-SY5Y para generar un modelo de la enfermedad de Parkinson; el cuál fue inducido mediante rotenona; este modelo toxicológico se empleó para evaluar los efectos de los metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes presentes en los extractos de ciertas variedades del género *Morus*. Además, se determinó si los extractos mitigan, previenen o contrarrestan el daño oxidativo en las células.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Entre las enfermedades neurológicas más comunes en el mundo, se encuentran los trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD) y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). De acuerdo a un informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2008, estos desordenes fueron la vigésimo quinta causa de muerte en el mundo y se estima que para el año 2030 asciendan a la décimo séptima posición representando un 1.2% de los fallecimientos. Así mismo, este documento señala que Colombia no es ajeno a esta problemática ya que estas enfermedades responden por el 1.4% de las muertes en el país [16].

En el caso del Parkinson, debido a que la esperanza de vida de la población va en aumento, se tiene un mayor riesgo de sufrir este desorden. Además, el panorama no es muy alentador, pues no se conoce a fondo su etiopatogenia y no existen tratamientos que alteren significativamente su progreso [17, 18]. Es por esto, que la comunidad científica se encuentra en una búsqueda continua de sustancias que mitiguen, curen o eviten esta enfermedad.

Gracias al descubrimiento de que los factores ambientales que causan el estrés oxidativo pueden estar asociados con la enfermedad de Parkinson y de que este desorden está relacionado con una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del sistema estriado [19], se han logrado crear múltiples modelos para estudiar la pérdida de neuronas dopaminérgicas y evaluar el daño en macromoléculas celulares [20]. Estos modelos pueden ser animales (ratón, rata) o líneas celulares (SH-SY5Y, PC12) a las cuales se les induce un daño con toxinas como la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) [21], 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) [22], rotenona [23] y el paraquat [24]

El daño oxidativo causado por rotenona en células neuronales, afecta a proteínas, lípidos y ADN debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como el radical hidroxilo, para el cual las células no poseen defensas antioxidantes que lo eliminen [25]. Además, factores como la elevada tasa metabólica, la presencia de metales de transición [26] y ácidos grasos poliinsaturados [27] favorecen su mecanismo de acción.

Una rama de la investigación básica relacionada con el Parkinson se ha centrado en la búsqueda de moléculas biológicas que compitan con sustratos oxidables por las ROS, buscando inhibir o revertir el proceso de oxidación en moléculas fundamentales [25]. Dentro de este grupo de sustancias se encuentran los antioxidantes, tales como la vitamina C (15), vitamina E (83) y los polifenoles [28]. Estos últimos, provienen del metabolismo secundario de las plantas y han cobrado interés por su acción en la industria de alimentos al bloquear las reacciones de pardeamiento en frutas [29] y en la industria farmacéutica al aportar efectos

neuroprotectores y de prevención del envejecimiento [30-33], aunque aún se desconoce en muchos casos el modo de acción de éstas moléculas.

Una fuente comprobada de sustancias antioxidantes con las características mencionadas, específicamente polifenoles, es la morera (*Morus spp* L.) [29, 34], una planta de la que se han evaluado y descrito propiedades terapéuticas [35].

En Colombia, se ha promovido el desarrollo de la industria de la sericultura en varias regiones como una alternativa de trabajo para los agricultores. Debido a este proceso la granja experimental “El Pílamó” a cargo de la Universidad Tecnológica de Pereira, posee un banco de germoplasma con 31 accesiones del género *Morus*, a las cuales les fue evaluada la diversidad genética y los tipos de relaciones entre ellas, mediante el uso de marcadores moleculares AFLPs; estableciendo de esta manera una línea base para iniciar los estudios tendientes a aumentar el conocimiento de este importante recurso vegetal y aprovechar al máximo sus características [36]. Esto, conforme al documento CONPES 3697 [37] se encuentra en el campo de la bioprospección, ya que con esta investigación se desea realizar una exploración sistemática de la morera para obtener compuestos fitoquímicos que tengan potencial de ser aprovechados comercialmente como antioxidantes [38].

Acorde a lo expuesto, en esta investigación se pretende identificar extractos con capacidad antioxidante y potencial para disminuir, mitigar o contrarrestar el estrés oxidativo causado por la rotenona. Esto con el fin de buscar un uso farmacológico de la morera, bien sea en la etapa preventiva o en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson. Es por esto, que se pretende responder la pregunta ¿Cuál es el efecto de los compuestos antioxidantes extraídos a partir de morera (*Morus spp* L.) sobre un modelo de la enfermedad de Parkinson?

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el efecto de los compuestos antioxidantes extraídos a partir de morera (*Morus spp* L.) sobre un modelo de la enfermedad de Parkinson.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

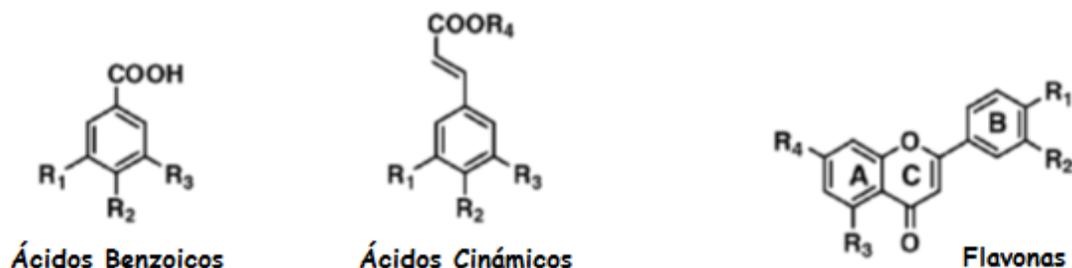
- Determinar la actividad antioxidante y la concentración de fenoles totales de los extractos de las 15 variedades de morera.
- Evaluar la toxicidad de los extractos de morera sobre la línea celular SH-SY5Y.
- Establecer la línea celular SH-SY5Y como un modelo *in vitro* para el estudio de la enfermedad de Parkinson.
- Determinar el efecto de los extractos de morera sobre las macromoléculas y la viabilidad de la línea celular SH-SY5Y expuesta a rotenona.

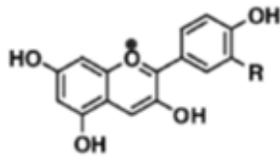
### 3. MARCO TEÓRICO

El género *Morus* es uno de grupos taxonómicos más interesantes por su gran variabilidad genética y su importancia comercial [39]. La familia Moraceae se subdivide en 4 subfamilias, 55 géneros y cerca de 950 especies, cada una con miles de variedades [40, 41]. La morera se distribuye ampliamente en el mundo, desde regiones tropicales hasta regiones subárticas [42, 43]. Sus hojas son utilizadas en bebidas y sus frutos son consumidos frescos o en forma de jugos o conservas [44]. Adicionalmente la morera se siembra para prevenir la erosión en suelos que están sometidos a la acción del agua o del viento y es utilizada como forraje para diversas especies de ganado por su alto valor nutritivo, expresado en sus elevados niveles de proteína [39].

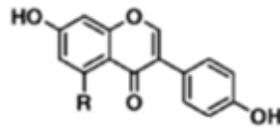
Recientemente, se ha prestado mucha atención al uso de productos naturales con propiedades cosmeceúticas y la familia Moraceae es una de las más interesantes en este sentido, gracias a su alto contenido de metabolitos [25]. Estos compuestos, son una serie de sustancias no nutritivas llamadas sustancias bioactivas o fitoquímicas que intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales: sustancias colorantes (pigmentos), aromáticas, reguladores del crecimiento, protectores naturales frente a parásitos y otros, que no tienen una función nutricional clásicamente definida, o no son considerados esenciales para la salud humana, pero que pueden tener un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad. Los compuestos fenólicos o polifenoles son un grupo de estas sustancias. Químicamente son compuestos que tienen al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo. Existen más de 5000 polifenoles identificados, incluyendo 2000 flavonoides [45]. Los polifenoles varían en su estructura: los ácidos hidroxibenzoico y el hidroxicianámico poseen un anillo sencillo. Mientras que los flavonoides normalmente consisten en dos anillos de bencenos unidos a un heterociclo que contiene un oxígeno. Estos se clasifican en antocianinas, flavon-3-ols, flavonas, flavanonas y flavonoles, también, son consideradas las chalconas, a pesar de no poseen un anillo heterocíclico. A continuación se muestran algunas estructuras generales de los compuestos polifenólicos.

**Figura 3-1. Estructuras químicas de los principales grupos antioxidantes y fitoquímicos antioxidantes**

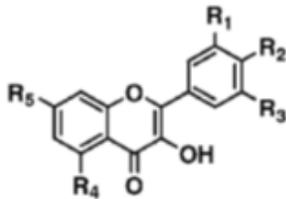
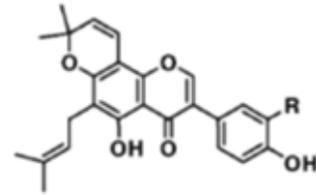




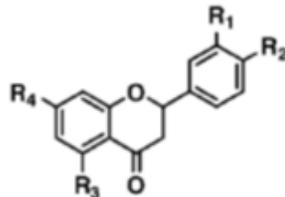
**Antocianinas**



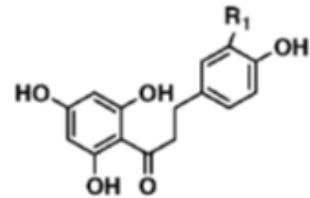
**Isoflavonas**



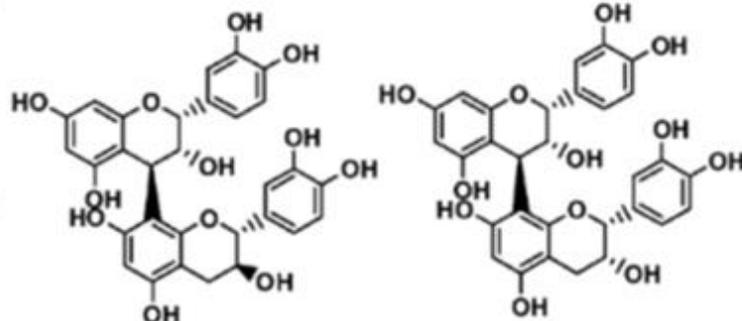
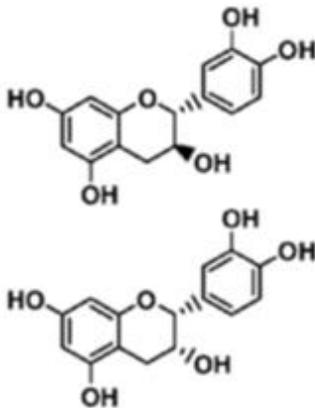
**Flavonoles**



**Flavanonas**



**Chalconas**



**Flavanoles y Procianidinas**

Tomada de [45].

Los polifenoles son antioxidantes muy importantes, a causa de su alto potencial redox, lo que les permite actuar como agentes reductores (donantes de hidrógeno) [46] y quelantes de metales [47]. La actividad antioxidante de los polifenoles de la dieta se considera que es mucho mayor que la de las vitaminas esenciales, por lo tanto, contribuyen significativamente a beneficios en la salud [45], sin embargo, aún no es claro si estas moléculas ayudan a contrarrestar daños celulares característicos de enfermedades neurodegenerativas.

Debido a que los polifenoles se encuentran inmersos en plantas y alimentos, es necesario, utilizar métodos para lograr su extracción y para cuantificar su concentración. La extracción de estos compuestos bioactivos es el primer paso en la utilización de los fitoquímicos en la preparación de suplementos dietéticos o

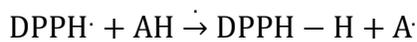
nutracéuticos, ingredientes alimentarios, farmacéuticos y productos cosméticos. La extracción con solventes es uno de los procedimientos más comúnmente utilizados debido a su facilidad de uso, eficiencia y amplia aplicabilidad [48]. Específicamente para el género *Morus*, se ha logrado extraer metabolitos secundarios como flavonoles glicosilados (rutina, isoquercetina) [49], vitaminas (niacina) [50], flavonoides [51], antocianinas [52], entre otros grupos de moléculas de interés.

Es generalmente conocido que el rendimiento de la extracción química depende del tipo de solventes con diferentes polaridades, tiempo de extracción, temperatura, proporción de muestra a solvente, así como de la composición química y las características físicas de las muestras [53]. La solubilidad de los compuestos bioactivos se rige por la naturaleza química de la muestra de la planta, así como la polaridad de los solventes utilizados. Tomando en cuenta todo lo anterior, no existe un procedimiento de extracción universal aplicable a todos los compuestos vegetales, por lo que se hace necesario realizar estudios para cada especie y variedad de planta.

Los solventes, como metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y sus combinaciones se han utilizado para la extracción de compuestos bioactivos a partir de materiales de plantas, a menudo con diferentes proporciones de agua; al igual que métodos de extracción como sonicación [54], microondas [55] y fluidos supercríticos [56].

Existen varias formas de evaluar la operación de extracción, como la medición de la concentración total de fenoles, el rendimiento en masa del extracto y la capacidad antioxidante del mismo. Para medir la concentración total de fenoles se usa el método FOLIN CIOCALTEU [57]. Este, emplea el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual, contiene una mezcla de ácido fosfo-túngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y el ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que se reduce por oxidación de los fenoles, originando óxidos de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), de color azul. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto, y posee una absorción máxima a 765 nm. El procedimiento emplea el ácido gálico como compuesto de referencia para elaborar la curva de calibración.

Para evaluar la actividad antioxidante de compuestos bioactivos existen varios métodos probados que dotan de información al respecto, entre ellos, se destaca el uso del método de capacidad antioxidante con DPPH. Éste, se evalúa en función del grado barrido de los radicales libre 1,1-difenil-2-picrihidrazill (DPPH) [58] en una solución de metanol. Cuando hay producción de DPPH $\cdot$ , si existe actividad antioxidante, ocurre una disminución de su absorbancia a una longitud de onda característica durante la reacción. En su forma más radical, DPPH $\cdot$  absorbe a 515 nm, pero con la reducción del antioxidante (AH), la adsorción desaparece. La reacción barrido de radicales libres que ocurre se muestra en la ecuación 3-1.



***Ecuación 3-1. Reacción química en el método DPPH.***

La búsqueda de compuestos antioxidantes en especies vegetales ha cobrado gran importancia ya que existen moléculas llamadas radicales libres, las cuales son especies químicas con uno o más electrones no apareados, que se producen en el metabolismo celular normal o patológico en diferentes circunstancias y que son causantes del estrés oxidativo. Este estrés consiste en una falta de equilibrio entre las defensas antioxidantes endógenas de la célula y las moléculas oxidantes, conduciendo al envejecimiento y a otros trastornos humanos como la enfermedad de Parkinson (PD) [59]. Aunque los humanos y otros organismos tienen defensas antioxidantes (enzimas, como la superóxido dismutasa, catalasa, o glutatión peroxidasa) y los sistemas de reparación, que los protegen contra el daño oxidativo, estos sistemas son insuficientes para evitar totalmente los daños [60].

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa progresiva de aparición tardía, que es caracterizada por la degeneración relativamente selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del cuerpo estriado y el desarrollo de inclusiones citoplásmicas fibrilares que contienen  $\alpha$ -sinucleína [61], llamadas cuerpos de Lewis. Como síntomas en la enfermedad de Parkinson se encuentran el temblor en reposo, la lentitud de movimientos voluntarios, la rigidez, la inestabilidad, además de trastornos del sueño, déficits olfativos, estreñimiento, disfunción eréctil masculina, entre otros.

Muchos factores ambientales han sido implicados en PD [62], factores que pueden aumentar o decrecer la susceptibilidad a la enfermedad, tales como fumar [63], consumo de agua, ejercicio [64], agentes infecciosos, traumas cerebrales y exposición a metales como el manganeso [65]. Una de las principales clases de agentes ambientales asociados con PD son los pesticidas que incluyen fumigantes, fungicidas, herbicidas e insecticidas [66, 67]. Varios de estos pesticidas son conocidos por inhibir el complejo I de la cadena respiratoria de electrones en la mitocondria, lo cual tienen un importante rol en PD.

El uso de animales o líneas celulares como la SH-SY5Y, a los cuales se les induce un daño con neurotoxinas ha generado una serie de modelos que han sido cruciales para la clarificación de la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson (PD) y para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a tratar los síntomas mencionados. Por otra parte, se están empleando estos modelos para conocer los mecanismos patogénicos implicados en la PD, con el objetivo de desarrollar neuroprotectores que detengan la progresión o eviten la enfermedad [68, 69].

Una de las características de la PD que todos los modelos inducidos por toxinas imitan, es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Cada modelo, sin embargo, tiene sus propias particularidades dependiendo de las especies

involucradas y la toxina utilizada. En otras palabras, la muerte de células dopaminérgicas es la piedra angular de estos modelos, pero el mecanismo de acción y las alteraciones del comportamiento inducidos difieren entre ellos. PD se puede modelar a niveles histológicos, moleculares y de comportamiento, y finalmente, la validación del modelo se basa en la posibilidad de traducir los resultados obtenidos en una aplicación clínica para el tratamiento de pacientes con PD [70].

La rotenona como modelo de PD fue desarrollado en un esfuerzo por encontrar un modelo *in vivo* de degeneración dopaminérgica en el sistema estriado, la formación de los cuerpos de Lewis, defectos sistémicos en el complejo I de la cadena respiratoria de electrones y para mostrar la relevancia de la exposición de pesticidas en PD [71]. La rotenona, es un pesticida, miembro de los rotenoides, derivado de algunas hojas y ramas de ciertas especies de plantas. Esta toxina muestra un modo de acción similar a la toxina MPTP, la cual es un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria de electrones [72]. Posee la ventaja de que es capaz de atravesar con facilidad las membranas biológicas, incluyendo la barrera hematoencefálica debido a su naturaleza hidrofóbica, teniendo gran acceso a todos los órganos rápidamente. A diferencia del MPTP, la rotenona no requiere de transportadores específicos para acceder en la célula.

La rotenona fue inicialmente usado en modelos de PD por inyección en altas dosis directamente en el cerebro y demostrando una masiva muerte de neuronas dopaminérgicas [73]. En estudios posteriores, cuando se ha utilizado la rotenona en dosis específicas, se ha demostrado la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas del sistema negro estriado por la inhibición del complejo I mitocondrial, además de inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína similares a los cuerpos de Lewis y otras características anatómicas, neuroquímicas y neuropatológicas [74].

La rotenona al ser un inhibidor de la respiración mitocondrial, puede provocar un decrecimiento de la síntesis de ATP provocando una crisis bioenergética, aunque es claro que la principal vía de daño es el estrés oxidativo [75, 76]. La rotenona se une específicamente al complejo I con una afinidad de 10-20 nM, reduciendo entonces el flujo de electrones de la ubiquinona [77]. Posterior a la unión de la rotenona, queda un sitio disponible para un electrón en el complejo I, traduciéndose en más electrones libres para reaccionar con el oxígeno molecular y producir el anión radical superóxido [78]. La formación de estos radicales libres puede dañar en sí el complejo I u otros complejos de la cadena respiratoria de electrones, especialmente los que contienen grupos hierro-azufre. Las ROS también pueden dañar otras proteínas en la mitocondria, así como otras macromoléculas, por lo cual, el principal mecanismo de acción de la rotenona es la acumulación del daño oxidativo [71].

El daño oxidativo es generado porque los mecanismos de defensa enzimáticos que posee la célula no son capaces de controlar el poder oxidante de especies

reactivas y esto, tiene un efecto adverso en las macromoléculas celulares. En proteínas, se evidencia pérdida en la funcionalidad y en la eficiencia de la catálisis, en agregación de distintas cadenas peptídicas y en la inhibición del proteasoma. En la hélice del ADN, las especies reactivas interactúan con las bases nitrogenadas, introduciendo grupos hidroxilo, generando mutaciones y malos apareamientos entre las bases. Y finalmente, en lípidos, se produce una reacción en cadena por radicales libres, donde el resultado es un peróxido lipídico que provoca alteraciones en las membranas celulares [25].

### **3.1. DAÑO OXIDATIVO EN PROTEÍNAS**

Modificaciones oxidativas a las proteínas puede dar lugar a alteración de sus funciones y estructura, además del aumento en su hidrofobicidad lo que aumenta su potencial de agregación. Curiosamente, esto conduce a que las proteínas se sometán a la proteólisis, basada principalmente en el proteasoma [79].

El proteasoma 26S es un complejo compuesto por una unidad catalítica (20S) y una unidad reguladora (19S) [80]. El núcleo 20S del proteasoma, llamado así por su constante de sedimentación, es la partícula principal del sistema proteasomal, una estructura celular muy compleja implicada en la degradación proteolítica de proteínas oxidadas, regulación proteica, control de calidad de proteínas, regulación del ciclo celular, expresión génica, respuestas inmunitarias, carcinogénesis, reparación del ADN y, probablemente, muchas otras funciones celulares [81]. Si en las proteínas, los aminoácidos distintos de los que contienen azufre (cisteína o metionina) se oxidan, entonces, la reparación de la proteína no es posible, y la proteína dañada ha de ser degradado por este importante complejo [82].

Dado que las proteínas proporcionan el mayor grupo de moléculas celulares, la probabilidad de la oxidación de proteínas está aumentada en las células sometidas a estrés oxidativo y por lo tanto la cantidad de proteínas disfuncionales en la célula se aumenta [83]. Cuando esto ocurre pueden distinguirse tres etapas diferentes que dependen de la cantidad de oxidación [84]. La primera etapa es cuando la proteína está sólo ligeramente modificada, pero la estructura principal sigue intacta, lo que resulta quizás en una moderada reducción de la actividad. En la siguiente etapa la cantidad de daño infligido es suficiente para causar una desnaturalización parcial de la proteína, mientras que las secuencias hidrófobas que generalmente están cubiertos dentro de proteínas solubles globulares están expuestas en la superficie. Y la tercera etapa ocurre si la proteína dañada no es reconocida y degradada por el proteasoma, así, se forma un agregado de proteínas altamente oxidadas que contiene uniones covalentes de residuos de otras proteínas (30-70%), lípidos (20-50%) y azúcares llamados lipofuscina [85-87]. En esta etapa, las proteínas no son lo suficientemente largas como para entrar en el proteasoma, o el proteasoma se encuentra bloqueado. Debido a que es una etapa final de oxidación, la lipofuscina no es el resultado inmediato del

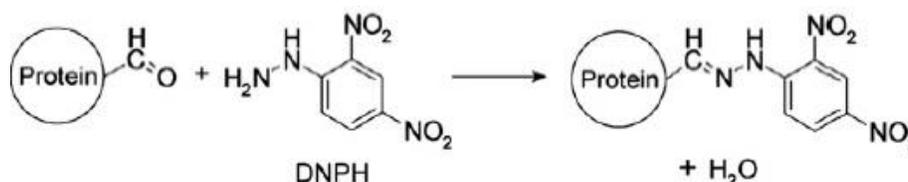
estrés oxidativo, sino más bien un efecto a largo plazo de dosis bajas de estrés crónico (no letal).

El principal efecto que tiene lipofuscina es la inhibición del proteasoma [82]. Aunque los mecanismos no están del todo dilucidados, el hecho de que el proteasoma reconozca estructuras hidrofóbicas como sustrato sugieren que la superficie glicolípídica de la lipofuscina es reconocida también como sustrato. Así, la actividad proteasomal cae en intentos inútiles de degradación de la lipofuscina, resultando en un aumento en la cantidad de proteínas oxidadas en el citosol que no se degradan.

Existen muchos marcadores para determinar daño oxidativo en proteínas, entre los que se destaca el daño dirigido a las cadenas laterales particulares, como la lisina, tirosina, histidina. También existen marcadores mucho más generales del daño oxidativo, como son la cantidad de carbonilos presentes en las proteínas, los cuales se generan por varios radicales, incluyendo el anión radical superóxido. Los carbonilos se pueden formar en la mayoría de los aminoácidos, aunque algunos son más propensos a la formación de carbonilos que otros; por ejemplo, los residuos de Arg, Pro y Lys [88]. Esto es, sin embargo, un fenómeno universal, por lo cual la identificación de estos productos puede correlacionarse con el nivel de oxidación en proteínas [89].

La concentración de grupos carbonilos en las proteínas se puede evaluar a través de su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para dar la hidrazona correspondiente (figura 3-2). Este producto (amarillo) se puede cuantificar espectrofotométricamente a 370 nm [90].

**Figura 3-2. Reacción del ensayo de carbonilación de proteínas.**



Tomada de [89]

### 3.2. DAÑO EN ADN

Como ya se ha descrito con anterioridad, toxinas como la rotenona producen especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden interactuar con el ADN, dando lugar a modificaciones y consecuencias potencialmente graves para la célula [91].

De las especies reactivas de oxígeno, el radical hidroxilo (-OH) reacciona con el ADN, adicionándose en los átomos de carbono que están formando dobles

enlaces en las bases nitrogenadas y disociando un hidrógeno del grupo metilo de la timina así como de cada uno de los enlaces carbono hidrógeno del azúcar (2'-deoxirribosa) [92]. Una de las bases más propensas al daño oxidativo es la guanina. Más de 20 productos de oxidación de la base guanina han sido identificados y entre ellos el más abundante y bien estudiado es 8-oxo-guanina (8-oxoG) [83], la cual, cuando no se repara es mutagénico, ya que se aparea con la adenina (A) en lugar de citosina (C), lo que da lugar a transversiones [80] en el material genético.

Para protegerse contra este daño todas las células tienen diferentes vías de reparación del ADN [93]. Las tres vías principales para la reparación de daños en bases son la reparación por escisión de nucleótidos (NER) [94], la reparación por escisión de base (BER) [95] y reparación de malos apareamientos (MMR) [96]. NER elimina las lesiones que distorsionan la hélice del ADN, BER realiza reparaciones a una base específica y MMR corrige los desajustes en el apareamiento normal de las bases. Las deficiencias en las vías de reparación del ADN pueden resultar en una reducción de la estabilidad de los cromosomas celulares que a su vez pueden conducir a mutagénesis y disfunción celular [97].

Las rupturas de cadena simple y la formación de sitios lábiles en el ADN han sido parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad y han sido demostradas sus implicaciones en enfermedades degenerativas [98] como el Parkinson. En 1988, Singh desarrolló la variante alcalina de la electroforesis de células individuales, el ensayo Cometa, proporcionando por primera vez datos a nivel de célula individual [99]. Este ensayo consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel, luego, someter las células a lisis para eliminar todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalinas [100]. Al someter al ADN desenrollado a una electroforesis, los fragmentos de ADN cargados negativamente o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo para formar una especie de cometa. Las células con un aumento de su ADN dañado muestran un incremento de la migración microsomal del ADN siendo las rupturas de doble cadena las causantes de mayor frecuencia de migración del material genético. Para detectar y cuantificar el daño al ADN, este puede ser teñido con diferentes agentes como DAPI [99] o Vista Green DNA Dye [101] y deben ser leídas las muestras en microscopios de fluorescencia con las longitudes de onda de emisión y excitación adecuadas para cada colorante fluorescente. Una variante de este método consiste en utilizar luego de la etapa de lisis, a la enzima Fpg (ADN-formamidopirimidina glicosilasa) derivada de *E. coli*, la cual es una DNA-glicosilasa que solo reconoce el aducto 8-oxoG con lo cual se puede identificar un daño específico, y no solo las rupturas, que están asociadas además de una oxidación fuerte, a los mecanismos de reparación en el ADN mencionados con antelación [102-104].

### 3.3. DAÑO EN LÍPIDOS

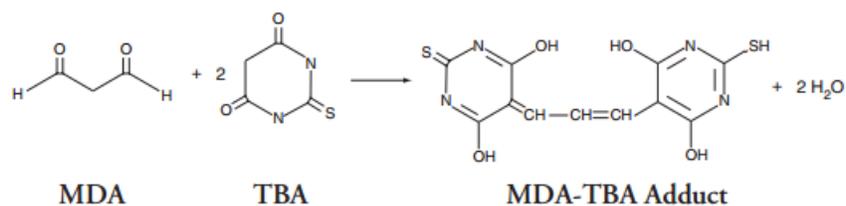
Las membranas celulares que proporcionan la integridad estructural de las células están compuestas de una variedad de fosfolípidos, ésteres de colesterol, colesterol, ácidos grasos y una variedad de proteínas que tienen funciones clave en la célula [105]. Además, los fosfolípidos que contienen ácidos grasos como el ácido araquidónico (AraC) y ácido docosahexaenoico (DHA) pueden servir como una molécula señal en la activación celular [106].

Radicales como el hidroxilo y el peroxilo que se forman a partir del anión radical superóxido, pueden abstraer un átomo de hidrógeno del grupo metileno de ácidos grasos poliinsaturados, generando radicales libres de carbono. Así, la reacción inicial de radical hidroxilo con ácidos grasos produce un radical lipídico que, cuando reacciona con el oxígeno, produce el radical lípido peroxilo, que aún puede reaccionar con los ácidos grasos para producir hidroperóxido de lípido [107]. Esta reacción en cadena llamada peroxidación lipídica, altera significativamente la estructura de las membranas y otros lípidos, lo que resulta en los procesos de alteración de la fluidez, permeabilidad, transporte y viabilidad celular [108].

Debido a que el cerebro es el órgano que tiene la mayor concentración de lípidos, a excepción del tejido adiposo en cuerpos de los mamíferos [109], eventos que afectan este tipo de moléculas, ejemplo el estrés oxidativo, desencadenan serias consecuencias como los trastornos neurodegenerativos [110].

Moléculas como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidrononenal (4-HNE) son productos que se forman en la peroxidación lipídica. Por tanto, los métodos para verificar daño en este tipo de biocompuestos se basan en reacción entre los aldehídos con otras sustancias. Este es el caso del método llamado TBARS (método del reactivo de ácido tiobarbitúrico), el cual, consisten en la detección del producto estable formado entre malondialdehído y el ácido tiobarbitúrico (TBA) en fase acuosa, llamado aducto MDA-TBA (figura 3-3). El ensayo es leído colorimétricamente a 530-540 nm o fluorescentemente en una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm; todo esto después de un periodo de inoculación de 1 hora a 100°C [111]. Dado que los resultados del ensayo son expresados en concentración de MDA, se debe construir una curva de calibración, por medio de un estándar.

**Figura 3-3. Reacción del ensayo TBARS**



## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. TOMA DE MUESTRAS

Se tomaron las hojas de 15 variedades de morera disponibles en el Centro de Biología Molecular y Biotecnología (CENBIOTEP) de la Universidad Tecnológica de Pereira provenientes del banco de germoplasma de la granja experimental “El Pílamó”. Las variedades evaluadas fueron: AA-2, Calabresa, Cristiana, Ichinose, Italiana, IS-26, Kaeriang Pong, Luiz Paulery, Nacional, S-3, S-9, S-13, S-18, Subong Pong, Taisong. Las muestras vegetales se secaron en un ambiente exento de humedad a una temperatura de 20°C, durante dos meses. Posteriormente, las hojas se maceraron hasta obtener un polvo fino y se almacenaron en frascos estériles a 4°C [112].

### 4.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

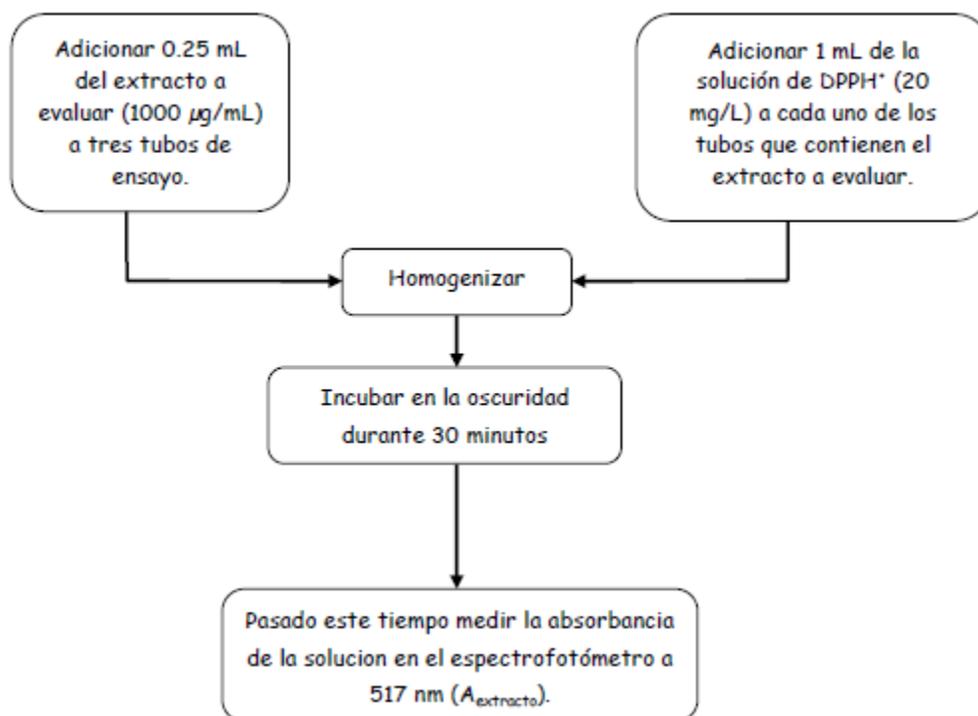
La obtención de los extractos se llevó a cabo mediante dos técnicas: microondas y ultrasonido. Estos fueron escogidos por su eficiencia en la extracción de compuestos bioactivos y por el menor tiempo requerido para ello [113]. Además, se emplearon dos sistemas de solventes, metanol-agua (70%-30%) y acetona-agua (70%-30%), seleccionados por su polaridad, sus características extractoras, y por su afinidad por los compuestos antioxidantes [45, 114].

Para la extracción tanto por microondas como por sonicación se utilizaron 0,5 g del material vegetal y 25 mL de cada uno de los sistemas de solventes seleccionados. La radiación del microondas se aplicó por 20 s con una frecuencia de 125 MHz hasta completar 5 min, controlando la temperatura de forma que no excediera los 50°C en la muestra, ya que existen compuestos termosensibles. Para la extracción por sonicación se aplicaron 7 pulsos de ultrasonido a la potencia estándar del equipo, durante 1 minuto cada uno. Todas las fracciones obtenidas se concentraron en un rotaevaporador a 50°C, después de lo cual, se pesaron y almacenaron a 4°C en frascos ámbar hasta su evaluación.

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Se preparó la solución del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•) a una concentración de 20 mg/L en metanol grado analítico. La determinación de la actividad antioxidante de los diferentes extractos vegetales se llevó a cabo de acuerdo con el método de Brand–Williams [115] con algunas modificaciones, como se describe en la figura 4 [112]. Como controles negativos ( $A_{\text{Control (-)}}$ ) se utilizaron los solventes correspondientes a cada caso. El blanco de los extractos se preparó con 0,25 mL del extracto en análisis y 1 mL de metanol. Cada ensayo se realizó por triplicado.

**Figura 4-1. Método para la evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH•.**



A partir de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 517 nm, se determinó el porcentaje de actividad antioxidante utilizando la ecuación 4-1 [112].

$$\% \text{Actividad Antioxidante} = \left[ \frac{A_{\text{control}(-)} - (A_{\text{extracto}} - A_{\text{blanco extracto}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

**Ecuación 4-1. Determinación de actividad antioxidante de los extractos.**

Donde:

$A_{\text{Extracto}}$ : Absorbancia de los extractos.

$A_{\text{Blanco extracto}}$ : Absorbancia del blanco de los extractos.

$A_{\text{Control}(-)}$ : Absorbancia del control negativo.

#### **4.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES**

Los fenoles totales fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (GAE). De acuerdo con protocolos reportados [29, 116-118], se mezclaron 2 mL del extracto con 3 mL de HCl al 0,3%. Se tomó una alícuota de 100 µl de la solución anterior y se le adicionaron 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%, se agitó y se mezcló con un volumen igual de del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua en una proporción

1:1. Después de 30 minutos de incubación a 25° C, se midió la absorbancia a 750 nm y se comparó con una curva de calibración de ácido gálico construida previamente.

A partir de los datos de capacidad antioxidante y concentración de fenoles de todas las variedades sometidas a los diferentes sistemas de extracción, se realizaron análisis estadísticos con el fin de definir los extractos más adecuados para su evaluación en los cultivos celulares.

#### 4.5. MARCHA FITOQUÍMICA

Los extractos seleccionados fueron caracterizados a través de una marcha fitoquímica mediante cromatografía de capa delgada (CCD) de acuerdo a la metodología descrita por Wagner y colaboradores [119]. Los patrones y reveladores utilizados se presentan en la tabla

**Tabla 4-1. Patrones y reveladores empleados en la marcha fitoquímica.**

Núcleo Fitoquímico	Revelador	Patrón
Alcaloides	Dragendorff	Quinina
Quinonas	Bortrager	1,2 Benzoquinona
Cumarinas	KOH al 10% en MeOH	Cumarina
Saponinas	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10% en EtOH	Diosgenina
Flavonoides	AlCl <sub>3</sub> al 1% en EtOH	Kaempferol
Fenoles	FeCl <sub>3</sub> al 5% en HCL 0,5 N	Catecol
Amidas	Cloruro de hidroxilamina	Formamida

#### 4.6. DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE LA LINEA CELULAR SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™)

Se empleó la línea celular SH-SY5Y debido a que presenta actividad de la dopamina-β-hidroxilasa y puede convertir el glutamato en el neurotransmisor GABA. Esta es una sublínea de una biopsia de médula ósea derivada de la línea SK-N-SH y ha sido ampliamente empleada en estudios *in vitro* de la enfermedad de Parkinson. Para su cultivo se requiere una temperatura de 37°C y una atmósfera húmeda con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

El procedimiento de descongelación se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la ATCC [120]. Se tomó el vial de células almacenadas en la fase vapor del tanque de nitrógeno líquido y se descongeló mediante agitación suave en un baño de agua a 37°C. Para reducir la posibilidad de contaminación, se mantuvo la tapa fuera del agua. Se retiró el vial del baño inmediatamente después de observar que el contenido se encontraba en fase líquida (aproximadamente 2 minutos) y se

desinfectó por aspersión con etanol al 70%. Todas las operaciones de este punto se ejecutaron bajo estrictas condiciones de asepsia. La suspensión celular fue transferida a un tubo de centrífuga que contenía 9 mL de medio de cultivo completo y se centrifugó a 1700 rpm durante 7 minutos. El sedimento celular obtenido se re-suspendió en el medio completo. Este medio consistió en DMEM como medio base, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2.5mM de L-glutamina, 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) y 0,1% de antimicótico (anfotericina B) [22]

Las células fueron cultivadas como una mezcla de células adherentes y flotantes a 37°C en una incubadora con una atmosfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Los recambios del medio se realizaron cada 4 días hasta obtener un máximo de confluencia celular del 90%. En el cultivo, se observó la formación de racimos cortos y finos de células neuroblásticas (neuritas).

Para la preparación de los ensayos, los cultivos que presentaron un 90% de confluencia se desprendieron mediante la adición de 1 mL (para frasco T-25) o 2 mL (para frasco T-75) de solución de tripsina al 0,25% e incubación durante máximo 2 minutos. Como solución neutralizante de la tripsina se utilizó el doble de volumen de medio DMEM.

#### **4.7. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA LD<sub>50</sub> DE ROTENONA**

Se evaluó la viabilidad de las células SH-SY5Y luego de 4, 6, 12, 18 y 24 horas de ser expuestas a diferentes concentraciones de rotenona [121] (0 µM, 1 µM, 5 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM y 200 µM). Antes del tratamiento, las células se cultivaron a una densidad apropiada (5x10<sup>4</sup> células) en una placa de 24 pozos y se incubaron durante 24 horas bajo las condiciones definidas en la sección anterior. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Se realizó el recuento en cámara de Neubauer y mediante la ecuación 4-2 se calculó el número de células a sembrar en cada pozo.

$$\text{Número de células presentes} = \frac{\text{Número de células leídas}}{\text{Número de cuadrantes leídos}} * 10.000 * \text{Factor de Dilución}$$

##### ***Ecuación 4-2. Estimación de células totales.***

El daño celular fue inducido aplicando las concentraciones de rotenona descritas. Transcurridos los tiempos estipulados para la medición, las células fueron desprendidas añadiendo 250 µl de tripsina al 0,025% en cada pozo, incubando por 2 minutos y para detener la reacción, se adicionaron 600 µl de solución neutralizante (medio DMEM). La suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo, se centrifugó a 1.500 rpm por 7 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón de células se re-suspendió en 200 µl de PBS. Se realizó el recuento de

células vivas y muertas a través del ensayo con azul de tripano [122]. El azul de tripano es un colorante azoico que permiten diferenciar células vivas, pues estas al tener la membrana celular intacta no permiten la entrada del colorante. Por el contrario, las células muertas tienen la membrana celular alterada, y por ende el colorante si las permea, adoptando el mismo color.

Para el ensayo de azul de tripano, se mezclaron 20  $\mu$ l de la suspensión celular con 20  $\mu$ l del colorante azul de tripano al 0,4%. Esta suspensión se transfirió inmediatamente al hemocitómetro (cámara de Neubauer) para el conteo de células vivas y muertas mediante el uso de un microscopio óptico. El recuento se realizó en tres cuadrantes de la cámara y con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de viabilidad relativo al control negativo (células sin tratamiento de rotenona).

Se realizaron mediciones para cada concentración de rotenona a las 4, 6, 12, 18 y 24 horas de haber aplicado la toxina a las células. Se construyó una gráfica y estadísticamente se determinó la LD<sub>50</sub>. Además este ensayo fue el punto de partida para definir el tiempo en el cual las células comenzaban a exhibir un daño, pues esta información fue necesaria para los ensayos posteriores.

#### **4.8. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS**

Se utilizaron los extractos seleccionados a partir de los análisis estadísticos desarrollados en las secciones 4.3 y 4.4. El objetivo de este ensayo fue seleccionar los porcentajes de actividad antioxidante de los extractos que no generaran cambios significativos en la viabilidad celular respecto al control negativo (células con medio DMEM). Para esto, se evaluó la viabilidad de las células SH-SY5Y luego de ser expuestas durante 28 horas (tiempo máximo de exposición de las células a los tratamientos) a diferentes porcentajes de actividad antioxidante de los extractos (0%, 1%, 4%, 9%, 16%, 27% y 50%). Con el fin de que las células se adaptaran al nuevo entorno, antes del tratamiento se sembraron a una densidad apropiada ( $5 \times 10^4$  células) en una placa de 24 pozos y se incubaron durante 24 horas a las condiciones definidas en la sección 4.6. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Transcurrido el tiempo de ensayo, se determinó la viabilidad mediante el procedimiento antes descrito (sección 4.7) y se establecieron los porcentajes de actividad antioxidante a emplear en los ensayos posteriores.

#### **4.9. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y, AL SER APLICADOS ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DEL DAÑO POR ROTENONA.**

Se emplearon los porcentajes de actividad antioxidante determinados por el ensayo anterior. Para evaluar el efecto de los extractos sobre la viabilidad celular,

el ADN, las proteínas y los lípidos en la línea celular SH-SY5Y, se realizaron tres tipos de ensayo referidos como:

- **Extracto:** Exposición de las células al extracto durante 4 horas (tiempo definido a partir de los resultados de la sección 5.6) - aplicación de la LD<sub>50</sub> de rotenona – incubación durante 24 horas adicionales.
- **Al tiempo:** Exposición de las células al extracto y LD<sub>50</sub> de rotenona al mismo tiempo - incubación durante 24 horas.
- **Rotenona:** Exposición de las células a la LD<sub>50</sub> de rotenona durante 4 horas (tiempo definido a partir de los resultados de la sección 5.6) - aplicación de los extractos – incubación durante 20 horas adicionales.

Lo anterior con el fin de identificar si los extractos poseen la capacidad para mitigar, combatir o contrarrestar los efectos tóxicos de la rotenona cuando las células se exponen a esta toxina durante un periodo de 24 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se tuvieron en cuenta los siguientes controles para cada experimento:

- **Control negativo:** tratamiento sin adición de rotenona ni extracto.
- **Control sustrato:** tratamiento con extracto al máximo % de actividad antioxidante permisible (definido según la sección 4.8).
- **Control positivo 1:** tratamiento con LD<sub>50</sub> de rotenona.
- **Control positivo 2:** Tratamiento con sulfato ferroso 10 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM durante 45 minutos para provocar una reacción de Fenton similar a la empleada por el grupo del Dr. Guo [123].
- **Control de referencia:** tratamiento con Resveratrol 5 µM (reportada y evaluada por el grupo del Dr. Park [124]).

#### 4.9.1. Efecto sobre la viabilidad celular

Con este ensayo se determinó si los extractos seleccionados tenían alguna inferencia sobre la viabilidad de las células expuestas a la LD<sub>50</sub> de rotenona. Las células fueron sembradas a una densidad de 5x10<sup>4</sup> células/pozo en placas de 24 pozos e incubadas durante 24 horas a las condiciones definidas en la sección 4.6. Posteriormente, fueron sometidas a los tratamientos planteados y transcurrido el tiempo de duración del ensayo, se lavaron y se desprendieron con tripsina (0,025 %) de la forma descrita en la sección 4.7. Se determinó la viabilidad celular mediante la prueba de azul de tripano [122].

Se realizaron análisis estadísticos para identificar el efecto de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular SH-SY5Y y para seleccionar aquellos que mostraran un efecto protector sobre las células, con el fin de emplearlos en los ensayos posteriores de evaluación del daño en macromoléculas celulares. Se excluyeron aquellos extractos que no presentaran el efecto deseado.

#### 4.9.2. Carbonilación de proteínas

El daño sobre las proteínas celulares se cuantificó mediante la evaluación de la carbonilación de las proteínas totales [89]. Para esto, las células se cultivaron durante 24 horas a una densidad de  $10 \times 10^4$  células/pozo en una placa de 6 pozos a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se aplicaron los tres tratamientos (Extracto, Al tiempo y Rotenona) durante los tiempos estipulados. Las células fueron desprendidas con tripsina al 0,025%, centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos y los botones obtenidos fueron re-suspendidos en 525  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. Esta suspensión celular fue sometida a un proceso de lisado por sonicación para ser empleada en el protocolo dispuesto para la determinación de los grupos carbonilo en las proteínas [89, 125].

Las soluciones stock que se utilizaron para el protocolo fueron:

- HCl 2,5 M. Para 100 mL de solución se añadieron lentamente 24,5 mL de HCl fumante (37%) a aproximadamente 60 mL de agua en un matraz. Una vez que la solución se enfrió a temperatura ambiente, se completó hasta 100 mL con agua y se almacenó a temperatura ambiente.
- 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM en HCl 2,5M. Se disolvieron 0,2 g de DNPH en 100 mL de HCl 2,5 M. Esta solución se almacenó en la oscuridad durante máximo un mes.
- Solución 50% (w/v) de ácido tricloroacético (TCA). Se preparó diluyendo 50 g de TCA en 100 mL de agua. Se almacenó a temperatura ambiente.
- Solución de etanol:acetato de etilo (1:1). Se mezcló etanol absoluto y acetato de etilo grado espectrofotométrico en una relación de 1:1. Esta solución se almacenó a  $4^\circ\text{C}$ , ya que se requiere a esta temperatura para el ensayo.
- Guanidina-HCl 6 M. Se diluyeron 57,32 g de guanidina - HCl en 100 mL de agua y se almacenó a temperatura ambiente.

Se transfirieron 250  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular lisada a dos tubos de centrifuga de 1,5 mL. En el primer tubo (con la etiqueta "+DNPH"), se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de la solución DNPH-HCl. En el segundo tubo (con la etiqueta "-DNPH") se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de HCl 2,5 M. Se agitaron mediante vórtex y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min, agitando cada 5 minutos. Se añadieron 125  $\mu\text{L}$  de TCA al 50% (w/v) a cada tubo (concentración final = 10 % w/v), se agitaron y se incubaron a  $-20^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Se centrifugaron a 12.000 rpm por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .

Se descartaron los sobrenadantes y los botones obtenidos fueron lavados tres veces con la mezcla etanol:acetato de etilo. Entre los lavados, los tubos fueron centrifugados a 12.000 rpm por 2 minutos, descartando cada vez los

sobrenadantes. Los botones de proteína fueron re-suspendidos en 150 µl de guanidina-HCl 6 M y se midió la absorbancia de estas suspensiones a una longitud de onda de 370 nm en el caso de las muestras "+DNPH" (determinación de la concentración de grupos carbonilo) y a 280 nm para las muestras "-DNPH" (determinación de la concentración de proteína). El blanco fotométrico fue guanidina-HCl 6 M.

La concentración de grupos carbonilo en nmol/l fue calculada a partir de la ecuación

$$A = \epsilon Cl$$

***Ecuación 4-3 Ley de Beer-Lambert.***

Donde: A es la absorbancia medida,  $\epsilon$  coeficiente de extinción molar y l es la longitud de la trayectoria. El coeficiente de extinción molar del DNPH a 370 nm es  $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , la longitud de la trayectoria 3 mm y las medidas de absorbancia a 370 nm fueron tomadas en un lector de placas Multiskan™ FC Microplate Photometer de Thermo Scientific, perteneciente al grupo de investigación de Biotecnología-Productos Naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Las concentraciones de proteína fueron obtenidas a partir de la lectura de absorbancias de las soluciones "-DNPH" a 280 nm en el mismo lector. Estas fueron transformadas en mg/mL de proteína a partir de una curva patrón construida con estándares de BSA a las siguientes concentraciones: 0 mg/mL; 0,21 mg/mL; 0,64 mg/mL; 1,00 mg/mL y 1,92 mg/mL.

A partir de estos datos se calculó la concentración de grupos carbonilo expresada como nmol de grupos carbonilo por cada mg proteína.

### **4.9.3. Peroxidación lipídica**

El daño sobre los lípidos celulares se midió mediante el ensayo TBARS de la casa comercial *Cayman Chemical Company* (TBARS assay Kit), el cual permite determinar peroxidación lipídica [126, 127] a través de la cuantificación del malondialdehído (producto final de la reacción de peroxidación de lípidos). Para ello, las células fueron cultivadas, tratadas y procesadas mediante el protocolo propuesto en el numeral anterior (4.9.2). Al culminar los tratamientos (Extracto, Al tiempo y Rotenona) las células fueron desprendidas con tripsina al 0,025%, centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos y los botones obtenidos fueron re-suspendidos en 250 µl de PBS 1X. Se realizó un proceso de lisis por sonicación y las suspensiones obtenidas fueron empleadas para el ensayo TBARS y para la cuantificación de proteínas.

Los reactivos requeridos para llevar a cabo la prueba de peroxidación lipídica fueron:

- Solución estándar de malondialdehído: solución de malondialdehído bis dietil acetal 500  $\mu\text{M}$  utilizada para realiza la curva de calibración.
- Solución de ácido acético: Se agregaron 40 mL de ácido acético glacial a 160 mL de agua grado HPLC (“High Performance Liquid Chromatography” por sus siglas en inglés).
- Solución de hidróxido de sodio: Se mezclaron 20 mL de hidróxido de sodio 10 mM con 180 mL de agua grado HPLC.
- Solución de dodecilsulfato sódico (SDS): suministrada en el kit, lista para su uso.
- Agente de tinción: Se mezclaron 530 mg de TBA, 50 mL de la solución de ácido acético y 50 mL de la solución de hidróxido de sodio. Estas cantidades permitían evaluar 24 muestras.

Se depositaron 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra (suspensiones celulares lisadas por sonicación) en tubos cónicos para centrifuga debidamente rotulados. Como control negativo se utilizó PBS 1X. Se adicionó a cada tubo un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de la solución SDS y se mezcló varias veces con vórtex, se añadieron 4 mL del agente de tinción, mezclando varias veces. Los tubos fueron sumergidos en un baño con agua en ebullición durante 1 hora, después de lo cual fueron trasladados a un baño con hielo durante 10 minutos para detener la reacción. Se centrifugaron a 1.600 x g a 4°C y se transfirieron 150  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a cada pozo de una placa oscura de 96 pozos.

Se utilizó el equipo JASCO FP-6500 perteneciente al Laboratorio de Fisiología Celular e Inmunología de la Universidad Tecnológica de Pereira para medir la fluorescencia de cada una de las muestras a una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 550 nm. La medida de fluorescencia se expresó como unidades relativas respecto al control negativo. Para convertir la fluorescencia relativa a concentración de MDA ( $\mu\text{M}$ ) se construyó una curva fluorométrica estándar. Para ello, se mezclaron 25  $\mu\text{l}$  de la solución estándar de malondialdehído con 975  $\mu\text{l}$  de agua obteniendo una solución stock 12,5  $\mu\text{M}$ . A partir de esta, se realizaron diluciones (por triplicado) con el fin de obtener diferentes concentraciones de malondialdehído en cada tubo (Tabla 4-4).

**Tabla 4-2. Construcción de la curva de calibración del ensayo TBARS**

Tubo	MDA ( $\mu\text{l}$ )	Agua ( $\mu\text{l}$ )	Concentración MDA ( $\mu\text{M}$ )
A	0	1000	0
B	5	995	0,0625
C	10	990	0,1250
D	20	980	0,2500
E	40	960	0,5000

F	80	920	1,0000
G	200	800	2,5000
H	400	600	5,0000

Las soluciones estándar obtenidas (A-H) fueron sometidas al mismo procedimiento realizado a las muestras (etapas del ensayo TBARS).

Posteriormente se midió la concentración de proteína de la forma descrita en la sección anterior, adicionando 100 µl de PBS a la suspensión celular inicial. Esto con el fin de expresar los resultados del ensayo de peroxidación de lípidos en unidades de nmol de MDA/mg de proteína total.

#### 4.9.4. Daño en ADN

Se utilizó el ensayo cometa (también llamado electroforesis en gel de célula única) para cuantificar el daño en el ADN de células individuales [102-104]. El ensayo permitió detectar rupturas de cadena sencilla o doble mediante la medición de la migración del ADN de los núcleos individuales tras someter las células a un tratamiento alcalino. La migración del ADN fuera del núcleo es directamente proporcional al número de rupturas presentes en el ADN. Para tener una mayor claridad sobre el tipo de daño generado en las células, se utilizó la enzima Fpg, una DNA-glicosilasa de *E. coli* que reconoce específicamente el aducto 8-oxoGuanina, principal base mutagénica presente cuando existe daño oxidativo.

Las células fueron cultivadas y tratadas bajo las condiciones descritas en la sección 4.9.1. Se utilizó la suspensión obtenida luego del proceso de lisis para determinar mediante el ensayo cometa, si los extractos de morera tienen un efecto protector sobre el ADN. Lo anterior empleando el *OxiSelect™ Comet Assay Kit* (3-Well Slides, Cell Biolabs, Inc).

Las soluciones requeridas para la ejecución del ensayo fueron:

- Vista Green™ DNA Dye 1X: Se preparó diluyendo la solución *stock* en una proporción 1:10.000 en buffer TE (10 mM Tris; pH 7,5; 1 Mm EDTA). Se almacenó a 4°C, en la oscuridad por un tiempo máximo de 3 semanas.
- Buffer Lisis: Para preparar 100 mL del buffer lisis 1X se mezclaron 14,6 g NaCl, 20 mL de solución EDTA (suministrada en el kit), 10 mL de la solución de lisis 10X (suministrada en el kit) y se ajustó a 90 mL con agua destilada. Posteriormente, se ajustó el pH a 10,0 con una solución de NaOH 10N, se completó hasta un volumen de 100 mL con agua destilada y se almacenó a 4°C.

- Solución Alcalina: Para 100 mL se mezclaron 1,2 g NaOH, 0,2 mL del EDTA suministrado por el kit, se ajustó el volumen a 100 mL con agua destilada y se almacenó a 4°C.
- Buffer TBE: para 1 litro se mezclaron 10,8 g de Tris Base, 5,5 g de ácido bórico, 0,93 g de EDTA, se ajustó el volumen a un litro con agua destilada y se almacenó a 4°C hasta su uso.
- Buffer Enzima Fpg 1X: Para preparar 12,5 mL se mezcló 1,25 mL de Buffer NEBuffer 1, 125 µl de BSA (10 mg/mL) y 11,125 mL de agua destilada-desionizada.
- Solución de enzima Fpg: 4,95 mL de Buffer Enzima Fpg 1X y 10µl de Fpg.
- Agarosa de bajo punto de fusión. Suministrada en el estuche comercial lista para su uso.

A continuación se describen las etapas del protocolo realizado para el ensayo cometa:

*Preparación del portaobjetos:* los portaobjetos se limpiaron con etanol al 70% y se secaron a temperatura ambiente, a pesar de estos ya venían pre-tratados para ser más adherentes a la agarosa.

*Preparación de las células:* Las células SH-SY5Y se trataron con tripsina para desprenderlas de la placa que las contenía empleando el procedimiento definido en el numeral 4.9.1. Luego de la centrifugación se retiró el sobrenadante.

*Calentamiento de Agarosa de bajo punto de fusión:* La agarosa fue sumergida en un baño de agua a 90°C durante 20 minutos. Cuando se encontraba completamente líquida fue transferida a 37°C durante el tiempo que se requería para el ensayo.

*Incorporación de las células SH-SY5Y en agarosa:* el botón de células obtenido en el paso de preparación de las células fue re-suspendido en 300 µl de PBS. Se transfirieron 10 µl de la suspensión anterior a dos tubos y se les adicionó agarosa de bajo punto de fusión en una relación 1:10. Se homogenizaron y se sirvieron 70 µl de cada una de las suspensiones en dos portaobjetos rotulados como “+Fpg” y “-Fpg”. Una vez solidificada la agarosa, se protegió cada muestra con un cubreobjetos y las láminas se enfriaron a 4°C durante 15 minutos.

*Lisis:* Se retiraron los cubreobjetos de las muestras y se transfirieron los portaobjetos a un recipiente que contenía el buffer lisis (aproximadamente 25 mL/portaobjetos), asegurándose de sumergir completamente el portaobjetos en la solución. Este procedimiento se efectuó por 45 minutos a 4°C en la oscuridad.

*Tratamiento con la enzima Fpg:* Para esta parte del ensayo solo se utilizaron los portaobjetos marcados como “+Fpg”. Las muestras depositadas sobre los

portaobjetos fueron lavadas 3 veces con 50  $\mu$ l de buffer de la enzima Fpg 1X durante 5 minutos cada lavado.

Posteriormente, se le adicionó a cada muestra (“+Fpg”) 50  $\mu$ l de la solución de la enzima y se cubrieron con una lámina cubreobjetos de 22 x 22 mm. Estos portaobjetos se introdujeron en una atmósfera húmeda y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

*Tratamiento alcalino:* Se retiraron los cubreobjetos de todas las placas (“+Fpg” y “-Fpg”) y se colocaron en una cubeta adicionando 25 mL/portaobjeto de la solución alcalina e incubando durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad.

*Pre-tratamiento para la electroforesis:* Los portaobjetos se sumergieron durante 10 minutos en el buffer TBE pre-enfriado a 4°C.

*Electroforesis:* Los portaobjetos fueron transferidos a una cámara de electroforesis con buffer TBE y se aplicó un voltaje constante de 1 V/cm durante 15 minutos.

*Lavados:* Se retiraron los portaobjetos de la cámara de electroforesis y se lavaron en un recipiente con 25 mL/portaobjeto de agua destilada 2 veces durante 5 minutos cada lavado. Posteriormente, se rociaron todos los portaobjetos con etanol al 70% y se dejaron secar a temperatura ambiente.

*Tinción:* Una vez secos, se realizó la tinción mediante la adición de 100  $\mu$ l de la solución Vista Green DNA Dye 1X a cada muestra de la lámina. Luego se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos.

*Lectura de Cometas:* Los resultados fueron visualizados en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i con filtro FITC. Se tomaron por ensayo, imágenes de 50 cometas distintos con el fin de evaluar los porcentajes en cola, mediante el software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) desarrollado por el NIH (Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos).

#### **4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

El análisis de los datos se llevó a cabo en los paquetes estadísticos GraphPad Prism 5.0 e InfoStat estudiantil. Se realizaron ANOVA de una y dos vías seguidos por pruebas pos-hoc. Además, de pruebas como regresión lineal, análisis de conglomerados y de componentes principales; con niveles de significancia del 95%.

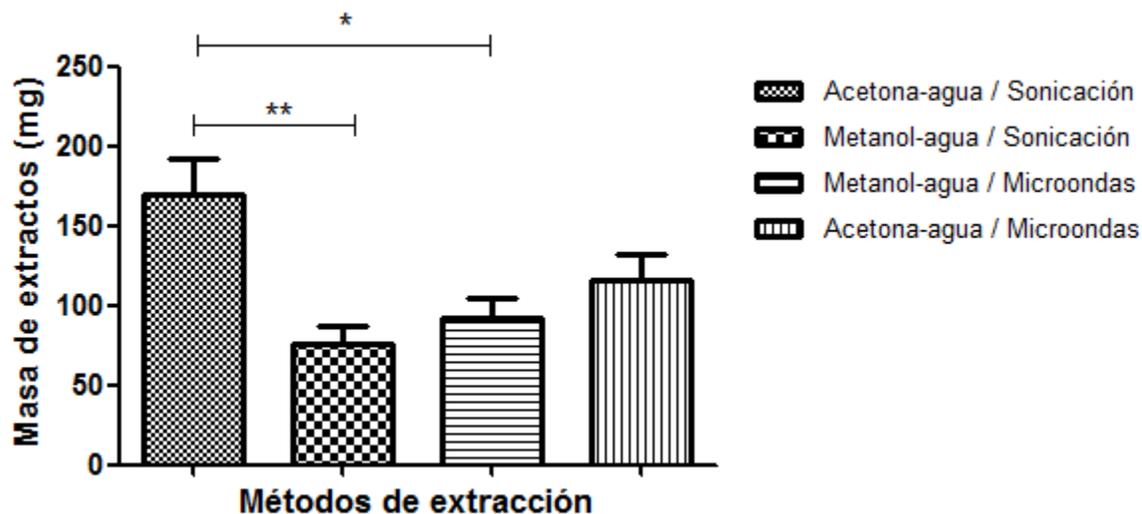
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE MORERA

Los extractos de morera fueron obtenidos de acuerdo a la metodología planteada. Para evaluar la capacidad de extracción de los métodos solvente-sistema de extracción, se determinó la masa total de extracto obtenida para cada ensayo. Se procedió a realizar una prueba estadística entre los grupos de trabajo para todas las variedades agrupando los métodos de extracción (sonicación y microondas) con los solventes (acetona/agua y metanol/agua).

Utilizando el software GraphPad Prism 5, se desarrollaron los test de D'Agostino para normalidad y Bartlett para verificar la homocedasticidad. Debido a que no se cumplen los parámetros necesarios para realizar un ANOVA, se procedió a realizar el test Kruskal-Wallis seguido por la prueba post-hoc Dunns, encontrándose que la mejor metodología para extraer compuestos de las variedades de morera fue acetona-agua/sonicación. En la figura 5-1 se evidencia que los resultados alcanzados con este método presentaron una diferencia significativa respecto a los conseguidos con el método metanol-agua/ microondas (\*,  $P < 0,05$ ) y muy significativa con relación a la masa de extractos obtenida con el procedimiento acetona-agua/microondas (\*\*,  $P < 0,01$ ).

**Figura 5-1. Masa total de extracto según el método de extracción**



Donde: la abscisa corresponde a los métodos de extracción: Acetona-agua/Sonicación, Metanol-agua/Sonicación, Metanol-agua/Microonda y Acetona-agua/Microondas. Y la ordenada son los valores promedio del peso seco obtenido a partir de las 15 variedades en cada uno de los protocolos de extracción.

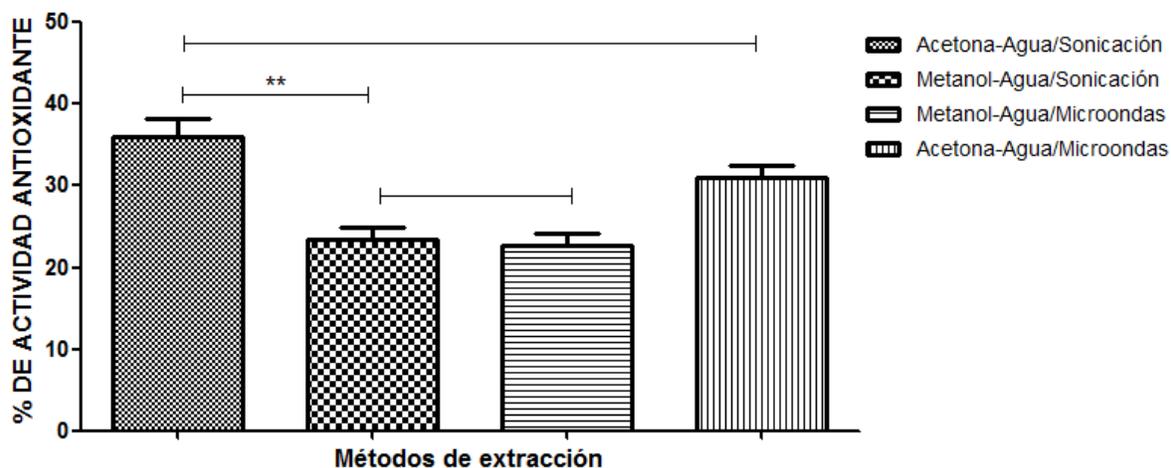
De la anterior gráfica, podemos también inferir que el método microondas, presentó un bajo rendimiento de extracción y esto pudo deberse a la alta temperatura que podría alcanzarse mediante esta técnica, lo cual podría generar un sobrecalentamiento y consecuente degradación de los componentes de la muestra, como ya ha sido reportado por otros investigadores [128].

## 5.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH.

Se cuantificó mediante la metodología propuesta en la sección 4.3, la actividad antioxidante de cada uno de los extractos obtenidos con los 4 métodos propuestos, a partir de las 15 variedades de morera.

Se realizó el mismo tipo de análisis empleado en el numeral anterior para identificar la metodología que permite obtener el mayor % de actividad antioxidante. En la figura 5-2 se muestra que el método de sonicación junto a la mezcla de solvente acetona-agua, exhibió la mayor capacidad antioxidante entre los grupos evaluados. Sin embargo, no presentó diferencias significativas respecto al sistema microondas/acetona-agua, lo que permitió inferir que el solvente jugó un papel preponderante sobre la extracción de compuestos con capacidad antioxidante y que, estos conservaron su actividad a pesar de aplicar el tratamiento con microondas. Lo anterior pudo deberse a que estos compuestos no eran tan lábiles o que al ser un procedimiento más invasivo, el microondas permitió alterar las membranas en las cuales se encontraban encapsuladas estas moléculas, compensando de esta manera las concentraciones.

**Figura 5-2. Actividad antioxidante según el método de extracción**



En el eje de las abscisas se representan los 4 métodos de extracción empleados para las 15 variedades de morera: Acetona-agua/Sonicación, Metanol-agua/Sonicación, Metanol-agua/Microondas, Acetona-agua/Microondas. Y el eje de la ordenada corresponde al promedio de

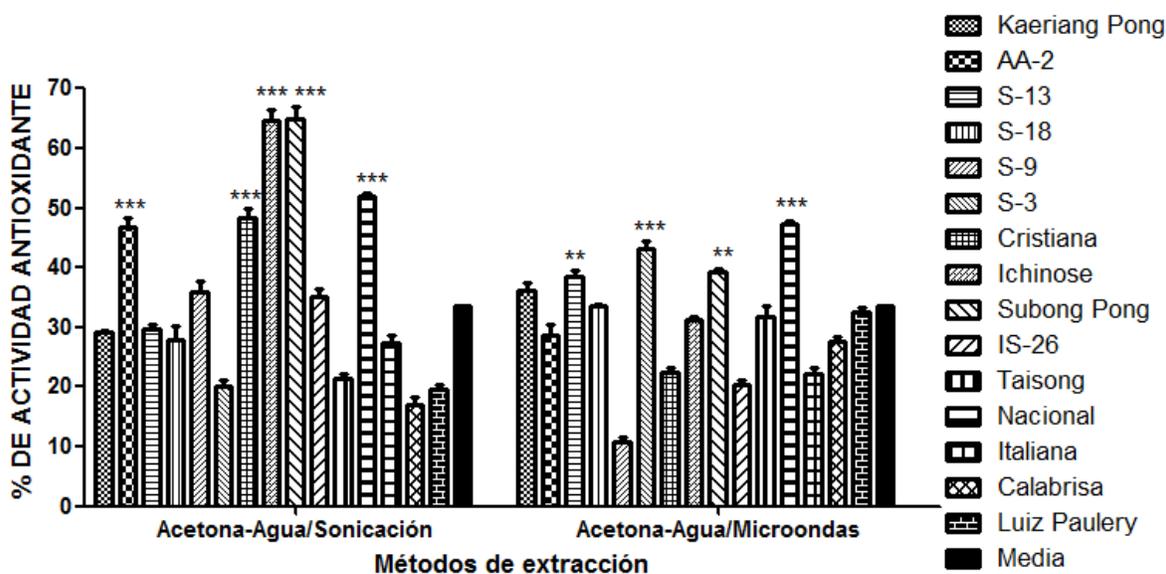
los valores de actividad antioxidante en todas las variedades manteniendo el mismo tipo de solvente.

Debido a que todas las variedades se comportaron de manera muy distinta, para cada uno de los métodos fue necesario efectuar un análisis que permitiera identificar los extractos que mostraran mejores resultados de actividad antioxidante, esto con el fin de emplear sólo los más promisorios en los ensayos con la línea celular SH-SY5Y.

Para ello se realizó un ANOVA de dos vías, tomando como variable dependiente la actividad antioxidante y como variables independientes la variedad de morera (15 variedades) y el método de extracción utilizado (4 métodos; Acetona-agua/Sonicación; Metanol-agua/Sonicación; Metanol-agua/Microondas; Acetona-agua/Microondas). Se realizó la prueba pos-hoc de Bonferroni para comparar las actividades antioxidantes de cada uno de los extractos con respecto a la media de todas las medidas de actividad antioxidante obtenidas. Finalmente, se seleccionaron los extractos que de acuerdo al método presentaron valores de actividad significativamente superiores respecto a la media mencionada.

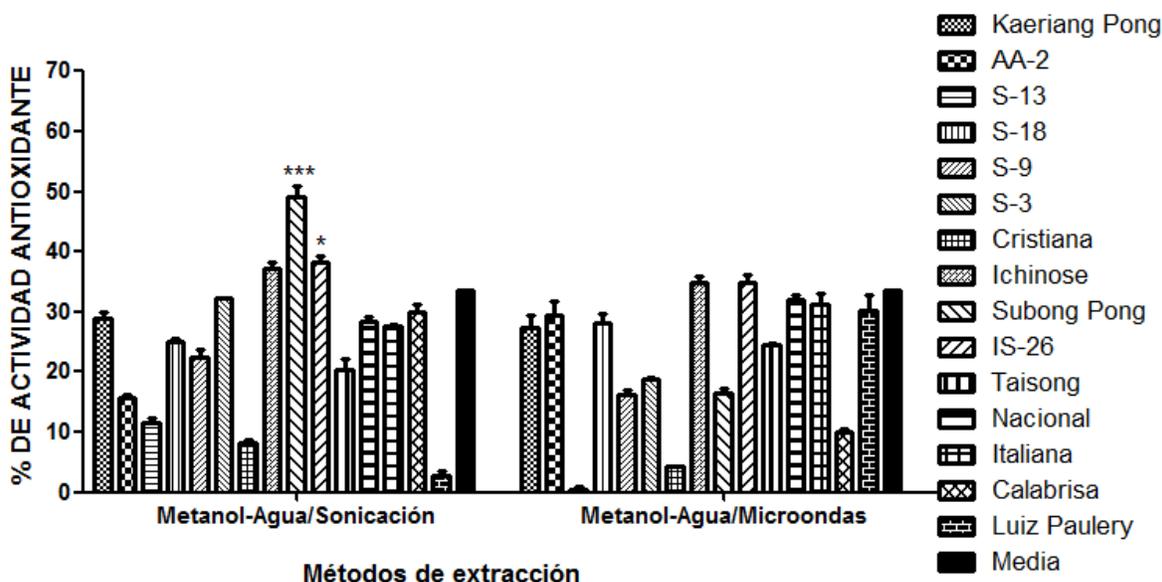
Para favorecer la visualización de los resultados, debido al gran número de información (variables), se muestran los datos en las figuras 5-3 y 5-4. Sin embargo cabe aclarar que el análisis estadístico fue realizado con todos los datos obtenidos.

**Figura 5-3. Actividad antioxidante para los extractos de las 15 variedades de morera obtenidos por los métodos Acetona-Agua/Sonicación y Acetona-Agua/Microondas**



Donde: Kaeriang Pong, AA-2, S-13, S-18, S-9, S-3 Cristiana, Ichinose, Subong Pong, IS-26, Taisong, Nacional, italiana, Calabrisa, Luiz Paulery corresponden a las variedades a partir de las cuales fueron obtenidos los extractos con los métodos Acetona-Agua/Sonicación y Acetona-Agua/Microondas.

**Figura 5-4. Actividad antioxidante para los extractos de las 15 variedades de morera obtenidos por los métodos Metanol-Agua/Sonicación y Metanol-Agua/Microondas**



Donde: Kaeriang Pong, AA-2, S-13, S-18, S-9, S-3 Cristiana, Ichinose, Subong Pong, IS-26, Taisong, Nacional, italiana, Calabrisa, Luiz Paulery corresponden a las variedades a partir de las cuales fueron obtenidos los extractos con los métodos Metanol-Agua/ Sonicación y Metanol-Agua/Microondas.

Los análisis realizados permitieron establecer que los extractos con mayor capacidad antioxidante respecto a la media fueron:

- Los extractos de AA-2 ( $P < 0,001$ ), Cristiana ( $P < 0,001$ ), Ichinose ( $P < 0,001$ ), Subong Pong ( $P < 0,001$ ) y Nacional ( $P < 0,001$ ) para el método Acetona-Agua/Sonicación.
- Los extractos de S-13 ( $P < 0,01$ ), S-3 ( $P < 0,001$ ), Subong Pong ( $P < 0,01$ ) y Nacional ( $P < 0,001$ ) para el método Acetona-Agua/Microondas.
- Los extractos de Subong Pong ( $P < 0,001$ ) y IS-26 ( $P < 0,05$ ) para el método Metanol-Agua/Sonicación:

Estos resultados demuestran que no fue posible identificar un método universal para la extracción de compuestos antioxidantes a partir de las 15 variedades de morera, pues como ya se ha reportado, las plantas poseen diferencias en cuanto a

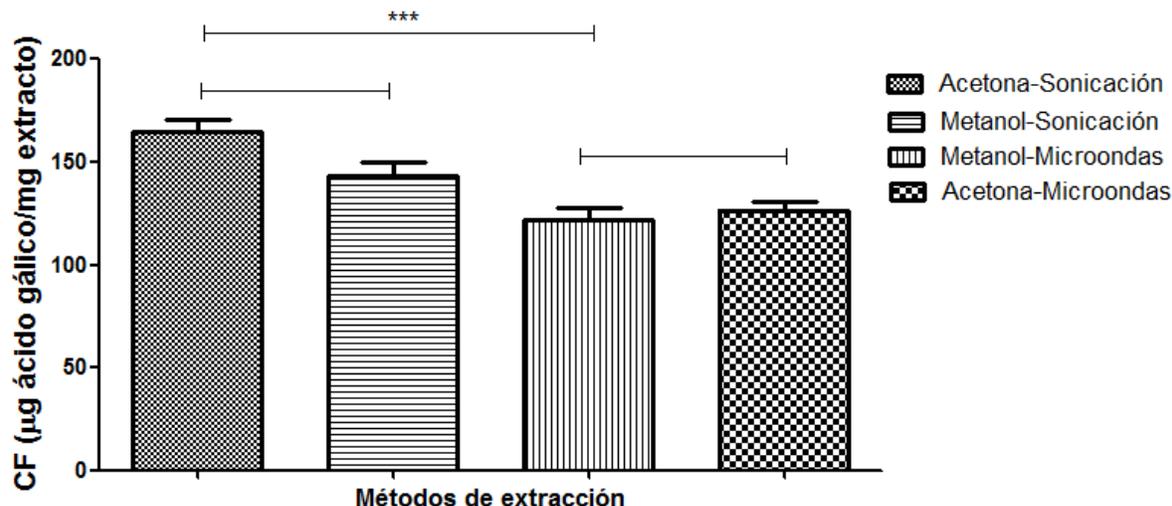
la estructura y composición de sus membranas, concentración y características fisicoquímicas de los metabolitos presentes en ellas [129].

### 5.3. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Se determinó la concentración de fenoles totales en términos de la concentración de ácido gálico para cada uno de los extractos obtenidos a partir de las 15 variedades empleando los 4 métodos de extracción propuestos. Lo anterior con base en una curva de calibración (Anexo A), tal como se ha reportado en estudios anteriores [130]. Este ensayo permitió conocer uno de los tipos de metabolitos presentes en las variedades, evaluar los métodos de extracción y fortalecer el tamizaje de las variedades a emplear en los ensayos con la línea celular SH-SY5Y. Para desarrollar los análisis estadísticos posteriores, a todos los datos se les realizaron pruebas de normalidad (D'Agostino) y de homocedasticidad (Bartlett).

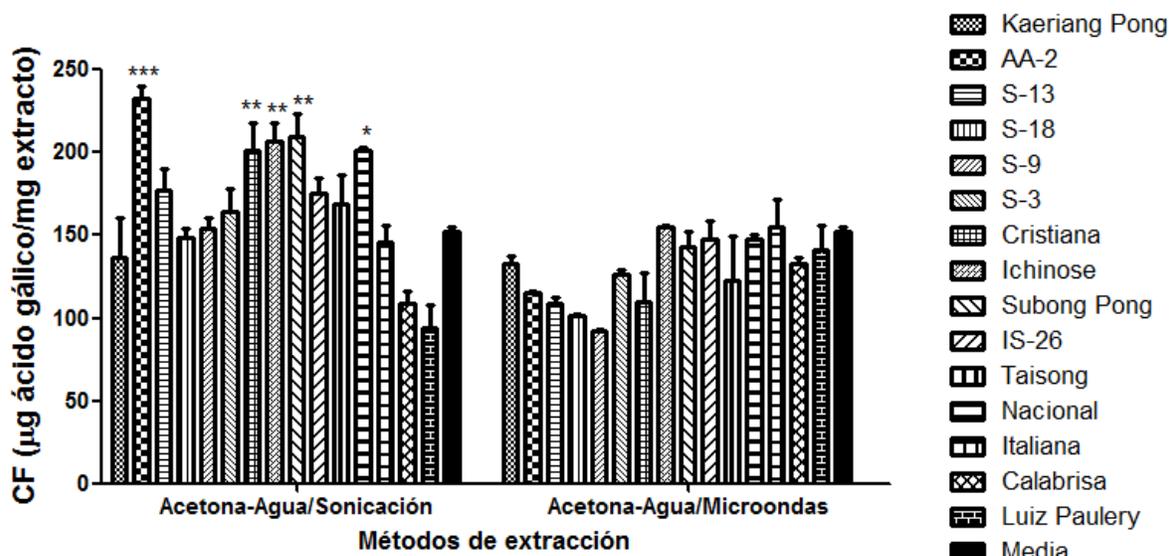
Al realizar un ANOVA de una vía seguido por la prueba de Newman-Keuls para comparar la concentración de fenoles totales conseguida mediante los 4 métodos de extracción, se pudo determinar que la técnica de sonicación, con diferencias muy significativas respecto a microondas ( $P < 0,001, ***$ ), permitió obtener los extractos con mayor concentración de este metabolito (figura 5-5). Además se observó que entre los resultados obtenidos para la extracción de fenoles con los sistemas de solvente acetona-agua y metanol-agua, no hubo diferencias significativas. Esto tal vez debido a que la polaridad de ambos sistemas (momento dipolar 1,69 D para el metanol y 2.91 D para la acetona) [131] hace que tengan una afinidad similar por los compuestos fenólicos, generando diferencias solo por la técnica de extracción y no por el solvente empleado.

**Figura 5-5. Concentración de fenoles totales según el método de extracción**



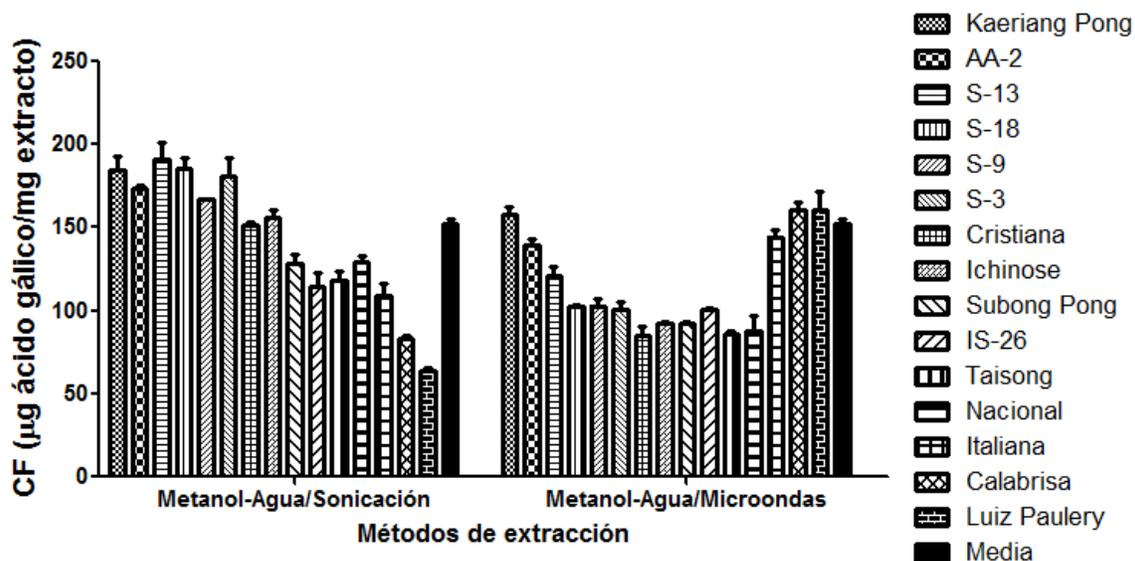
Donde: CF corresponde a concentración de fenoles totales expresada como  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/mg de extracto. Acetona-agua/Sonicación, Metanol-agua/Sonicación, Metanol-agua/Microondas y Acetona-agua/Microondas corresponden a los métodos empleados para obtener los extractos a partir de las 15 variedades de morera.

**Figura 5-6. Concentración de fenoles para los extractos de las 15 variedades de morera obtenidos por los métodos Acetona-Agua/Sonicación y Acetona-Agua/Microondas**



Donde: CF corresponde a concentración de fenoles totales expresada como  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/mg de extracto. Kaeriang Pong, AA-2, S-13, S-18, S-9, S-3 Cristiana, Ichinose, Subong Pong, IS-26, Taisong, Nacional, italiana, Calabrisa, Luiz Paulery corresponden a las variedades a partir de las cuales fueron obtenidos los extractos con los métodos Acetona-Agua/Sonicación y Acetona-Agua/Microondas.

**Figura 5-7. Concentración de fenoles para los extractos de las 15 variedades de morera obtenidos por los métodos Metanol-Agua/Sonicación y Metanol-Agua/Microondas**



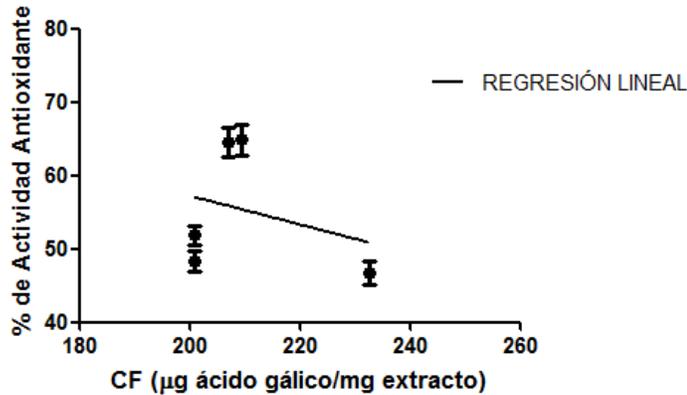
Donde: CF corresponde a concentración de fenoles totales expresada como  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/mg de extracto. Kaeriang Pong, AA-2, S-13, S-18, S-9, S-3 Cristiana, Ichinose, Subong Pong, IS-26, Taisong, Nacional, italiana, Calabrisa, Luiz Paulery corresponden a las variedades a partir de las cuales fueron obtenidos los extractos con los métodos Metanol-Agua/ Sonicación y Metanol-Agua/ Microondas.

Al igual que para el ensayo de capacidad antioxidante (numeral 5.2), se realizó un ANOVA de dos vías, tomando como variables independientes los extractos de las 15 variedades y los 4 métodos de extracción, con el fin de conocer de qué manera estas influyen sobre la concentración de fenoles obtenida. Se realizó la prueba pos-hoc de Bonferroni para comparar la concentración de fenoles de cada uno de los extractos con la media de los datos de concentración de fenoles totales ( $\mu\text{g}$  ácido gálico/mg de extracto).

Los datos fueron representados en dos figuras (5-6 y 5-7), aunque el análisis se hizo tomando la matriz completa. En estas se distinguen los extractos para los cuales se observaron diferencias significativas en la concentración de fenoles respecto a la media. Los mejores resultados se observaron para los extractos provenientes de las variedades: AA-2 ( $P < 0,001, ***$ ); Cristiana ( $P < 0,01, **$ ); Ichinose ( $P < 0,01, **$ ); Subong Pong ( $P < 0,01, **$ ); Nacional ( $P < 0,05, *$ ), utilizando el método Acetona-Agua/Sonicación.

A partir de los resultados de capacidad antioxidante por DPPH y fenoles totales, se pudo determinar que hubo una relación entre estos dos parámetros, ya que los extractos que presentaron mayor concentración de fenoles también se encontraron en el grupo de los que mostraron mayor capacidad antioxidante. Los extractos que cumplieron con estas dos características fueron señalados como promisorios y se seleccionaron para ser evaluados en los ensayos con la línea celular SH-SY5Y. Por lo tanto, los extractos tenidos en cuenta para los ensayos posteriores fueron los obtenidos a partir de las variedades AA-2, Cristiana, Ichinose, Subong Pong y Nacional, por el método Acetona-Agua/Sonicación.

**Figura 5-8. Relación entre la capacidad antioxidante y la concentración de fenoles totales para las variedades promisorias.**



Donde: CF se refiere a la concentración de fenoles expresados como en unidades de  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/mg de extracto.

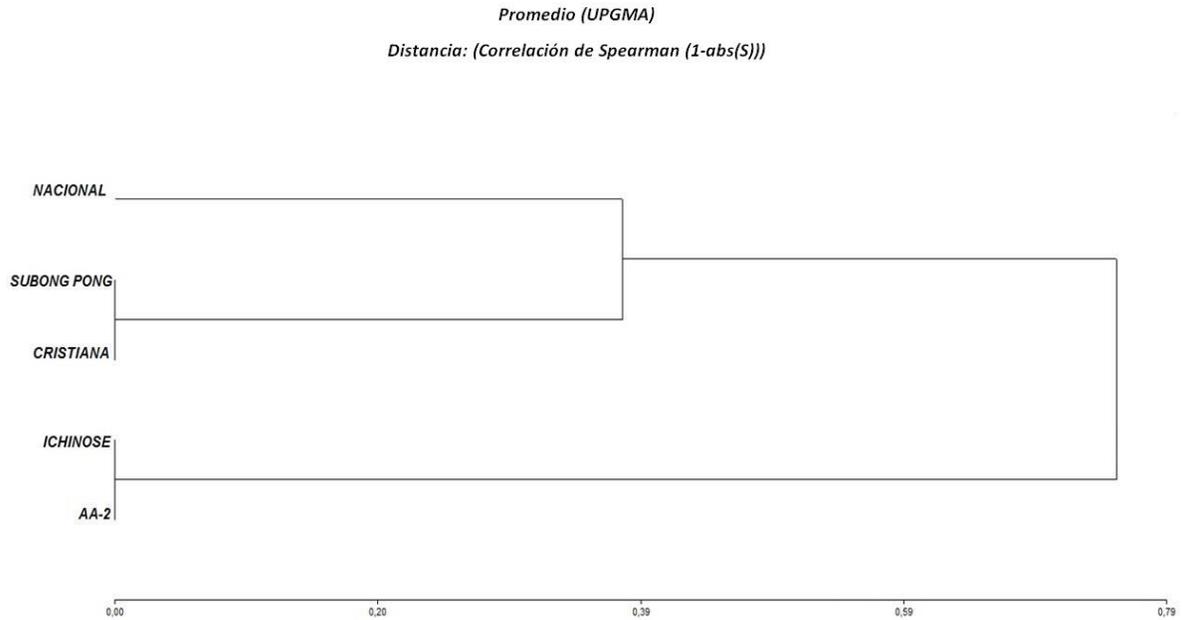
Al realizar un análisis de regresión lineal entre estos dos parámetros (concentración de fenoles totales y porcentajes de capacidad antioxidante), solo para los extractos marcados como promisorios, se encontró una relación bastante débil entre las variables en términos de linealidad (figura 5-8), pues el coeficiente de Pearson fue de 0,08. Lo anterior, pudo deberse a que la capacidad antioxidante es un parámetro mucho más amplio que puede abarcar otra serie de metabolitos secundarios [132], tales como aminas [133], tioles [134], compuestos con selenio [135], carotenoides [136], etc.

#### 5.4. MARCHA FITOQUÍMICA

Los extractos evaluados en la marcha fitoquímica fueron los señalados como promisorios en la sección anterior. La matriz resultante de este procedimiento (Anexo B) demostró la presencia de una gran cantidad de núcleos fitoquímicos importantes, evidenciando la diversidad de metabolitos presentes en las distintas variedades de morera. Para evaluar esta matriz, se realizó un análisis de encadenamiento promedio (UPGMA, Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) [137], con el fin de determinar las relaciones existentes entre los cinco extractos seleccionados, en términos del tipo de núcleos fitoquímicos encontrados.

Los resultados de los agrupamientos jerárquicos se muestran en la figura 5-9. En este dendrograma se pudieron observar las uniones y divisiones alcanzadas en cada nivel del proceso de construcción de los conglomerados. A partir de este análisis se determinó que los extractos no son idénticos y se distribuyen en dos grupos: (I) Nacional, Subong Pong y Cristiana. (II) Ichinose y AA-2. Lo anterior soportado en la correlación cofenética de 0,985.

**Figura 5-9. Dendrogramas de los extractos promisorios**



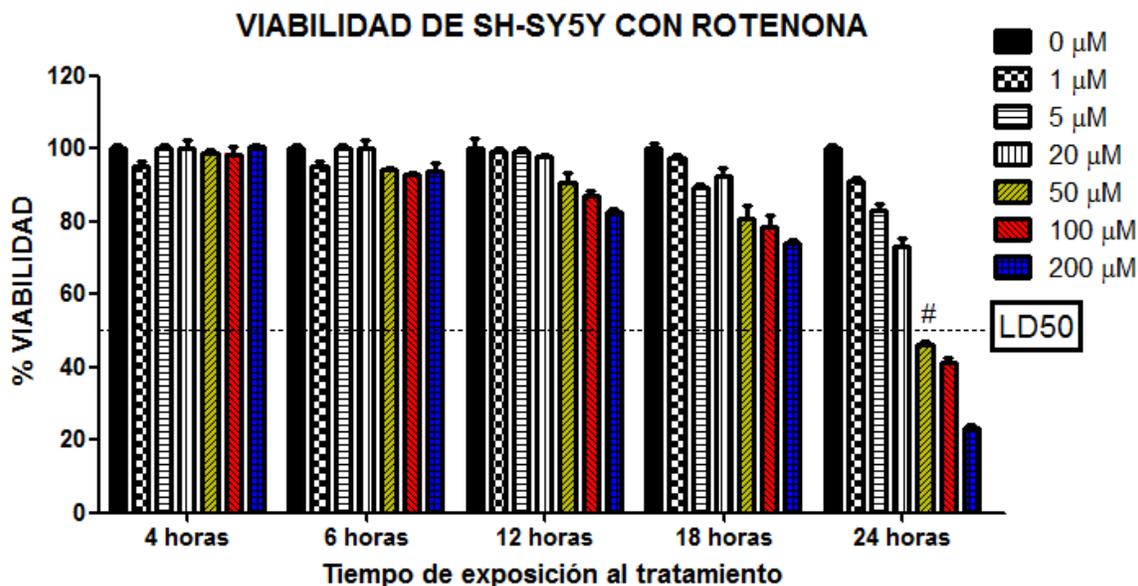
Donde: Nacional, Subong Pong, Cristiana, Ichinose, AA-2 corresponden a los extractos de estas variedades obtenidos por el método sonicación/acetona-agua.

## 5.5. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA

Se realizó de acuerdo a la metodología propuesta en la sección 4.7 de este documento. Se calculó la viabilidad en la línea celular SH-SY5Y luego de ser sometida a distintas dosis de rotenona por diferentes periodos de tiempo, como lo proponen otros autores [138, 139]. Es importante mencionar que los resultados de este análisis fueron muy importantes para la realización de los ensayos posteriores, ya que la concentración definida como  $LD_{50}$  se convirtió en el punto de partida para verificar si los extractos exhibían alguna acción protectora sobre la línea celular SH-SY5Y.

Los tiempos de exposición evaluados fueron 4, 6, 12, 18 y 24 h; encontrándose que los cambios más significativos en la viabilidad celular a las distintas concentraciones evaluadas, se lograron a las 24 h de exposición a la toxina (figura 5-10). Además se pudo observar cómo el deterioro en las células fue progresivo y dependía tanto del tiempo como de la concentración de rotenona.

**Figura 5-10. Determinación de la  $LD_{50}$  de rotenona**



Donde: 0 µM, 1 µM, 5 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM corresponden a las concentraciones de rotenona aplicadas en el medio de cultivo.

Para identificar la concentración que logró disminuir la viabilidad celular en un 50%, se realizó un ANOVA de dos vías. En este análisis, se tomaron como variables independientes, la concentración de rotenona en el medio de cultivo y el tiempo de exposición a la misma. Se realizó un test pos-hoc de Bonferroni, comparando cada uno de los resultados con la viabilidad teórica de la LD<sub>50</sub> (50%), pudiendo establecerse que luego de 24 horas de exposición, la concentración 50 µM de rotenona no presentó diferencias significativas respecto al control mencionado (marcado como #), Por tal motivo esta concentración se identificó como la dosis letal media.

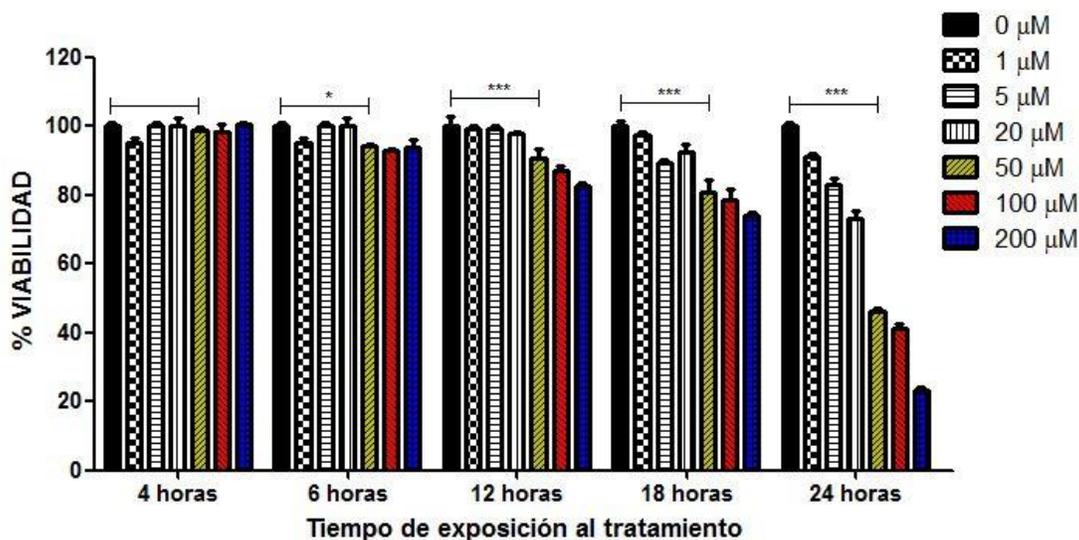
## 5.6. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ENTRE LA INDUCCIÓN DEL DAÑO Y LA EXPOSICIÓN A LOS EXTRACTOS

Uno de los objetivos de la investigación fue determinar si los extractos eran capaces de revertir el efecto de la rotenona sobre la línea celular SH-SY5Y tras un periodo de exposición a esta toxina. El cual se definió como el tiempo en el que la concentración LD<sub>50</sub> comenzó a afectar las células.

Por tanto, se realizó un análisis de Bonferroni, para comprar los datos de viabilidad del control negativo con los correspondientes a la concentración 50 µM de rotenona en cada tiempo evaluado. Los resultados que se ilustran en la figura 5-11, reflejaron que a las 6 horas (marcado como \*) ya se presentaban diferencias significativas entre los grupos evaluados. Sin embargo, el hecho de que a las 4 horas no hubiera una diferencia entre el control negativo y la viabilidad de las

células expuestas a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de rotenona, no significa que estas se encontraran libres de daño oxidativo [140].

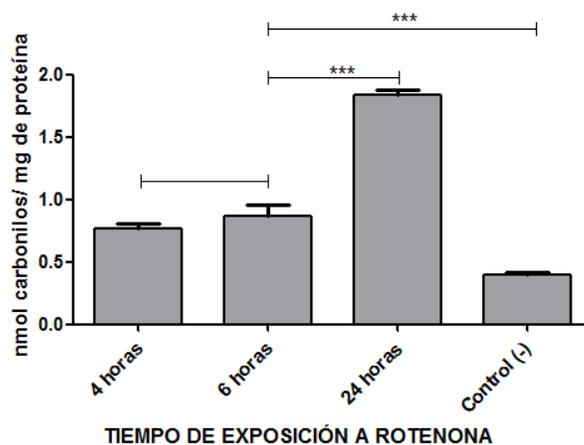
**Figura 5-11. Viabilidad de la línea celular SH-SY5Y luego de varios tiempos de exposición a rotenona.**



Donde: 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  corresponden a concentraciones de rotenona empleadas en el medio de cultivo.

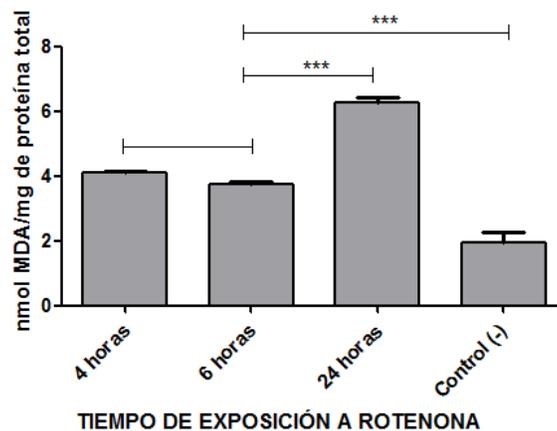
Debido a esto, se evaluó carbonilación de proteínas, peroxidación lipídica y daño en ADN luego de 4, 6 y 24 horas de exposición de las células a la concentración 50  $\mu\text{M}$  de rotenona. Estos ensayos fueron realizados de acuerdo a la metodología propuesta en las secciones 4.9.2 a 4.9.4. Los resultados se muestran en las figuras 5-12, 5-13 y 5-14. Todos los datos fueron analizados mediante ANOVA, empleando la prueba pos-hoc Newman-Keuls.

**Figura 5-12. Carbonilación de proteínas de la línea celular SH-SY5Y en distintos tiempos de exposición a rotenona.**

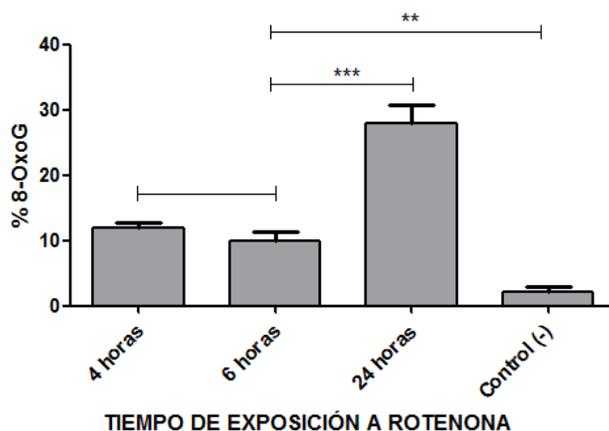


Estos análisis, permitieron establecer que no existían diferencias significativas entre los resultados de las pruebas de daño en macromoléculas a los tiempos de exposición 4 y 6 horas. Lo anterior indicó que el tiempo de 4 horas era adecuado para realizar los ensayos posteriores, pues fue un tiempo en el cual las células aún no tenían una marcada pérdida de viabilidad pero ya se encontraban afectadas, a nivel de sus macromoléculas, por los radicales libres generados por la rotenona.

**Figura 5-13. Peroxidación lipídica de la línea celular SH-SY5Y en distintos tiempos de exposición a rotenona.**



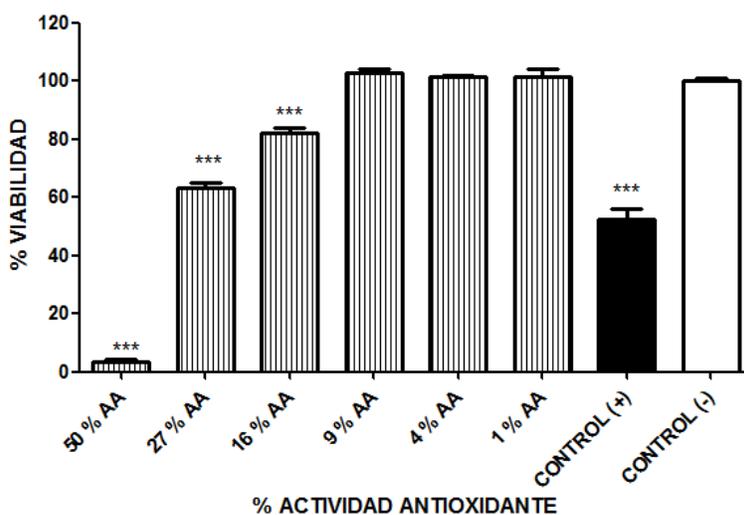
**Figura 5-14. Porcentaje de 8-oxoGuanina en la línea celular SH-SY5Y en distintos tiempos de exposición a rotenona.**



## 5.7. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE MORERA

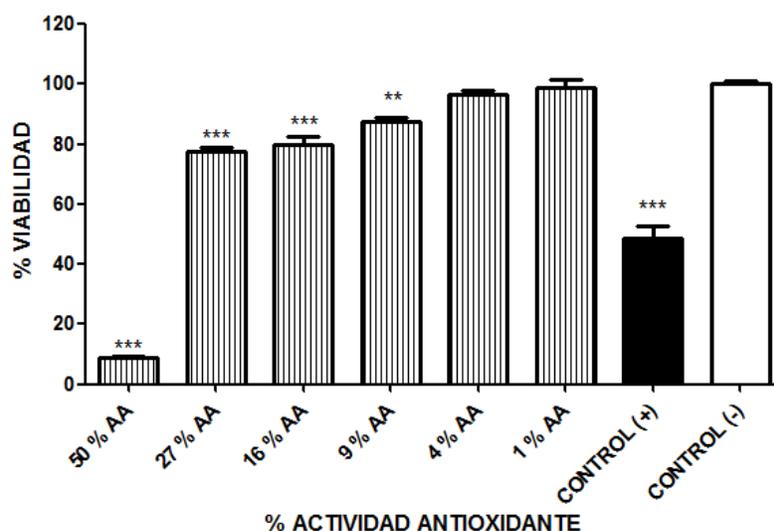
La evaluación de la toxicidad se realizó tal como lo describe el numeral 4.8, utilizando los extractos seleccionados como promisorios en la sección 5.3. Para esto, se midió la viabilidad luego de 28 horas de exposición de la línea celular a cada uno de los extractos (figuras 5-15 a 5-19). Cabe mencionar que para estandarizar los resultados, se calcularon por el método DPPH, las concentraciones de extracto en términos de porcentajes de actividad antioxidante, empleando como solvente PBS.

**Figura 5-15. Toxicidad del extracto de AA-2 a las 28 horas**



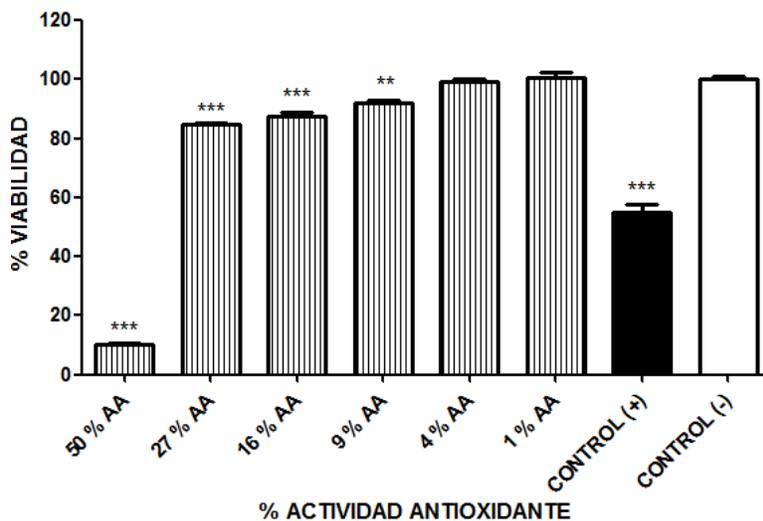
Donde AA: porcentaje de actividad antioxidante hallado por DPPH para los extractos de la variedad AA-2, obtenidos por el método sonicación/acetona-agua; CONTROL (+): viabilidad con la exposición a la LD<sub>50</sub> de rotenona y CONTROL (-): viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin rotenona ni extracto.

**Figura 5-16. Toxicidad del extracto de Cristiana a las 28 horas**



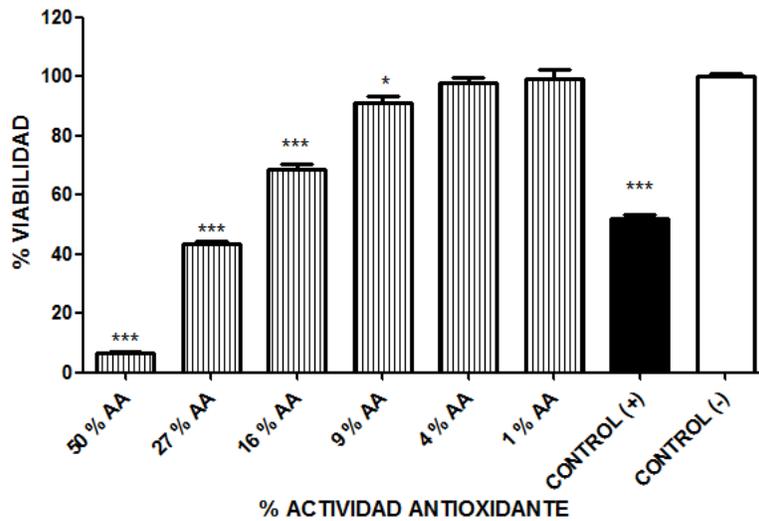
Donde AA: porcentaje de actividad antioxidante hallado por DPPH para los extractos de la variedad Cristiana, obtenidos por el método sonicación/acetona-agua; CONTROL (+): viabilidad con la exposición a la LD<sub>50</sub> de rotenona y CONTROL (-): viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin rotenona ni extracto.

**Figura 5-17. Toxicidad del extracto de Ichinose a las 28 horas**



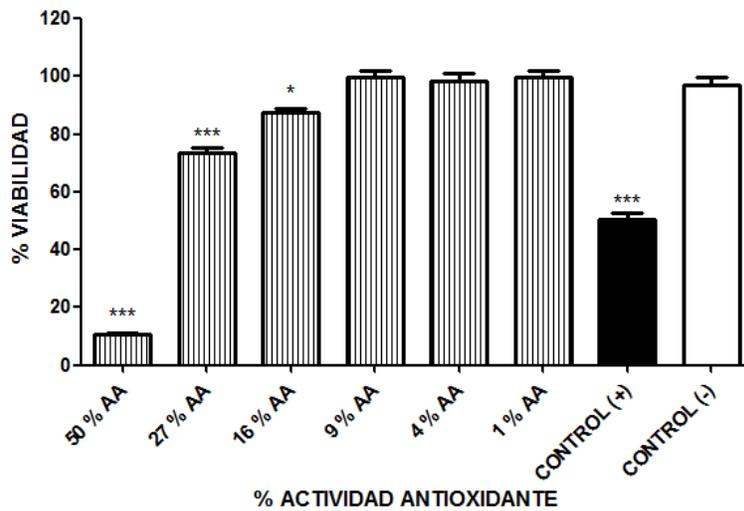
Donde AA: porcentaje de actividad antioxidante hallado por DPPH para los extractos de la variedad Ichinose, obtenidos por el método sonicación/acetona-agua; CONTROL (+): viabilidad con la exposición a la LD<sub>50</sub> de rotenona y CONTROL (-): viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin rotenona ni extracto.

**Figura 5-18. Toxicidad del extracto de Subong Pong a las 28 horas**



Donde AA: porcentaje de actividad antioxidante hallado por DPPH para los extractos de la variedad Subong Pong, obtenidos por el método sonicación/acetona-agua; CONTROL (+): viabilidad con la exposición a la LD<sub>50</sub> de rotenona y CONTROL (-): viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin rotenona ni extracto.

**Figura 5-19. Toxicidad del extracto de Nacional a las 28 horas**



Donde AA: porcentaje de actividad antioxidante hallado por DPPH para los extractos de la variedad Nacional, obtenidos por el método sonicación/acetona-agua; CONTROL (+): viabilidad con la exposición a la LD<sub>50</sub> de rotenona y CONTROL (-): viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin rotenona ni extracto.

Con el fin de hallar los porcentajes de actividad antioxidante que no afectaran la viabilidad celular (sin toxicidad), se realizó un ANOVA de una vía con la prueba pos-hoc Dunnett, tomando como referencia los datos de viabilidad del control negativo. Este análisis se hizo luego de comprobar, que los datos se comportaron

de manera normal y no presentaron diferencias significativas entre las varianzas de los distintos grupos.

De acuerdo a las figuras 5-15 a 5-19, las células soportaron bajos porcentajes de actividad antioxidante de los extractos, lo cual implica la necesidad de utilizar una metodología de separación para obtener un fraccionamiento de los extractos, y de esta manera descartar posibles sustancias tóxicas presentes en las variedades de morera [141]. Los extractos de AA-2 y Nacional fueron los menos tóxicos ya que al exponer la línea celular SH-SY5Y a un 9% de actividad antioxidante no se afectó de manera significativa la viabilidad.

Sin embargo, para todos los extractos, las células lograron soportar hasta un 4% de actividad antioxidante sin verse afectada de manera significativa su viabilidad, por lo que se definió como rango de trabajo para los siguientes ensayos, porcentajes de actividad antioxidante de los extractos entre 1 y 4%.

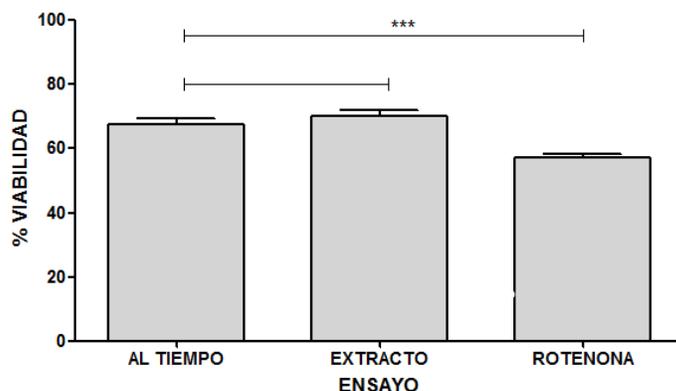
Como se mencionó, la alta toxicidad de los extractos, refleja la presencia de posibles sustancias que podrían ser interesantes para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Posiblemente, a causa de esto, se han descrito propiedades antitumorales y antiproliferativas asociadas a la morera [142-144].

## 5.8. EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y

### 5.8.1. Efecto sobre la viabilidad

Debido a que existe evidencia contradictoria sobre el modo de acción de los compuestos antioxidantes [145], se buscó conocer la manera en la cual los extractos de morera protegían a la línea celular SH-SY5Y, determinando si estos eran capaces de mitigar, contrarrestar o prevenir un daño oxidativo inducido por rotenona.

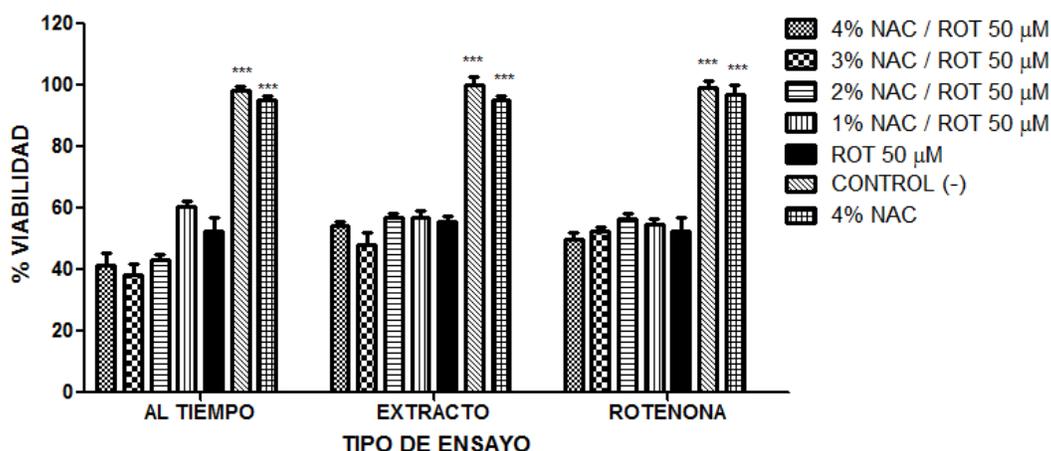
**Figura 5-20. Viabilidad celular según el tipo de ensayo**



Para cumplir este objetivo, se desarrollaron los tres tipos de experimentos planteados en la metodología (Al tiempo, Extracto y Rotenona) con los extractos identificados como promisorios (AA-2; Cristiana; Ichinose; Subong Pong; Nacional) a porcentajes de actividad antioxidante de 4%; 3%; 2%; 1%.

Al agrupar todos los resultados de las cinco variedades en los tres grupos mencionados y realizar un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de comparación múltiple Dunn, se pudo determinar que el grupo Rotenona, presentó una menor tasa de viabilidad celular, mostrando diferencias muy significativas ( $P < 0,001$ ) respecto a los otros dos grupos (figura 5-20). Esto permitió inferir que en general, los compuestos presentes en los extractos no fueron capaces de revertir el daño ya ocasionado por el agente oxidante. Este hallazgo concuerda con los resultados reportados por algunos investigadores [146], pues se ha visto que los compuestos antioxidantes no tienen un impacto importante sobre células que se encuentran en un proceso degenerativo, sino más bien se emplean como terapias preventivas.

**Figura 5-21. Efecto del extracto de la variedad Nacional sobre la viabilidad celular según el tipo de ensayo.**



Donde: la sigla NAC corresponde al extracto de la variedad Nacional obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; ROT 50 μM corresponde a los resultados de viabilidad con la exposición a la LD<sub>50</sub> de rotenona (control positivo 1). CONTROL (-) se refiere a la viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin agente rotenona ni extracto (control negativo). 4% NAC corresponde a la viabilidad de las células expuestas a 4 % de actividad antioxidante del extracto de Nacional obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua (control sustrato).

Se realizó un ANOVA de dos vías, para cada uno de los extractos (figuras 5-21 y figuras presentadas en el Anexo C), tomando como variables independientes el tipo de ensayo y los porcentajes de actividad antioxidante. Se utilizó la prueba pos-hoc Bonferroni para comparar los resultados de viabilidad celular luego de los tratamientos con los datos de viabilidad obtenidos para la LD<sub>50</sub> (control positivo 1). Se encontró que el extracto de la variedad Nacional no presentó diferencias

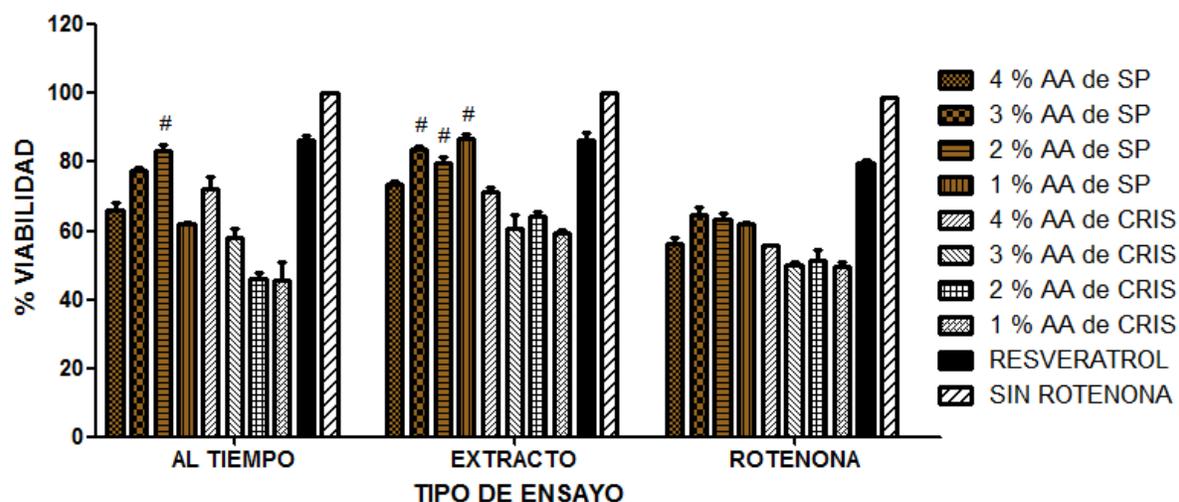
significativas respecto al grupo control mencionado (figura 5-21), por lo que este extracto no se consideró para los ensayos de determinación de daño en macromoléculas celulares.

Por el contrario, los extractos de las variedades Ichinose, Subong Pong, AA-2 y Cristiana si mostraron diferencias respecto al control positivo 1, tal como se muestra en el anexo C, por lo que los extractos de estas variedades fueron empleadas en los ensayos posteriores ya que se les puede atribuir algún grado de protección sobre la línea celular SH-SY5Y expuesta a rotenona.

Posteriormente se desarrolló un análisis estadístico con el fin de identificar los extractos y las concentraciones que lograron resultados superiores o al menos similares a los obtenidos con resveratrol (control de referencia). El análisis estadístico que se realizó fue un ANOVA de dos vías, donde las variables independientes fueron los porcentajes de actividad antioxidante de cada uno de los extractos y el tipo de ensayo (al tiempo, extracto y rotenona). La prueba pos-hoc empleada fue Bonferroni, con comparaciones múltiples respecto a los resultados del control de referencia (resveratrol) de cada tipo de ensayo.

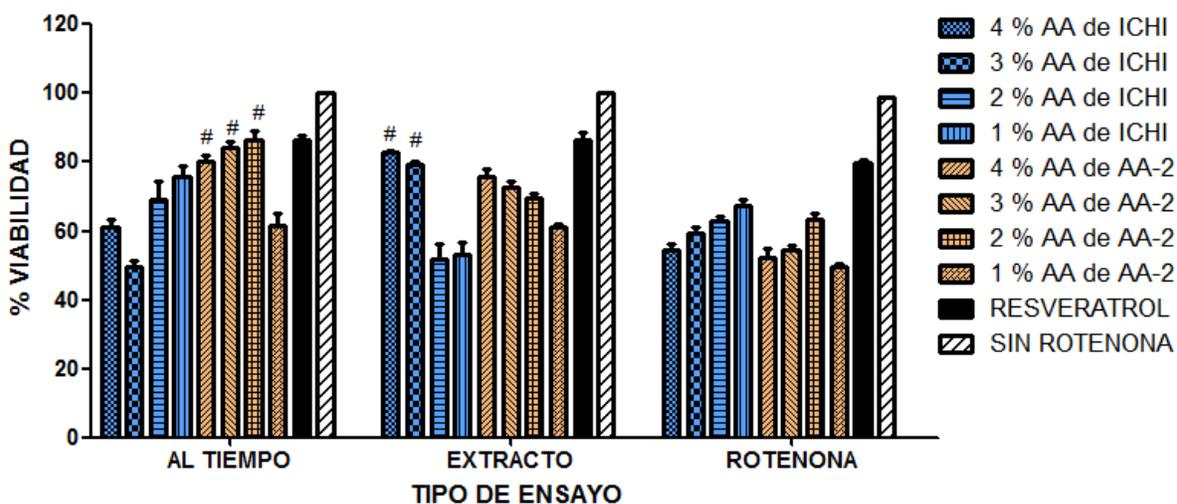
Para garantizar una buena visualización de los resultados, los datos fueron representados en dos figuras (figuras 5-22 y 5-23).

**Figura 5-22. Viabilidad celular con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Subong Pong; Cristiana) y al tipo de ensayo**



Donde: la sigla AA corresponde a actividad antioxidante determinada por DPPH; la sigla SP al extracto de la variedad Subong Pong obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; La sigla CRIS al extracto de la variedad Cristiana obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; RESVERATROL al control referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M); SIN ROTENONA se refiere al control negativo en los ensayos.

**Figura 5-23. Viabilidad celular con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Ichinose; AA-2) y al tipo de ensayo**



Donde: la sigla AA corresponde a actividad antioxidante determinada por DPPH; la sigla ICHI al extracto de la variedad Ichinose obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; La sigla AA-2 al extracto de la variedad AA-2 obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; RESVERATROL al control referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M); SIN ROTENONA se refiere al control negativo en los ensayos.

Los resultados obtenidos mostraron que el control de referencia (resveratrol 5  $\mu$ M) es un punto difícil de superar, pues ninguno de los extractos fue estadísticamente mejor que él. Sin embargo, varios de los porcentajes de actividad antioxidante evaluados para los diferentes extractos, no tuvieron diferencias significativas respecto al resveratrol en términos de viabilidad celular. Los porcentajes que lograron este objetivo fueron marcados con el signo “#”, mostrando que los resultados más importantes se lograron en los tipos de ensayo llamados “al tiempo” y “extracto”, para los extractos de las variedades AA-2, Subong Pong y en menor proporción Ichinose.

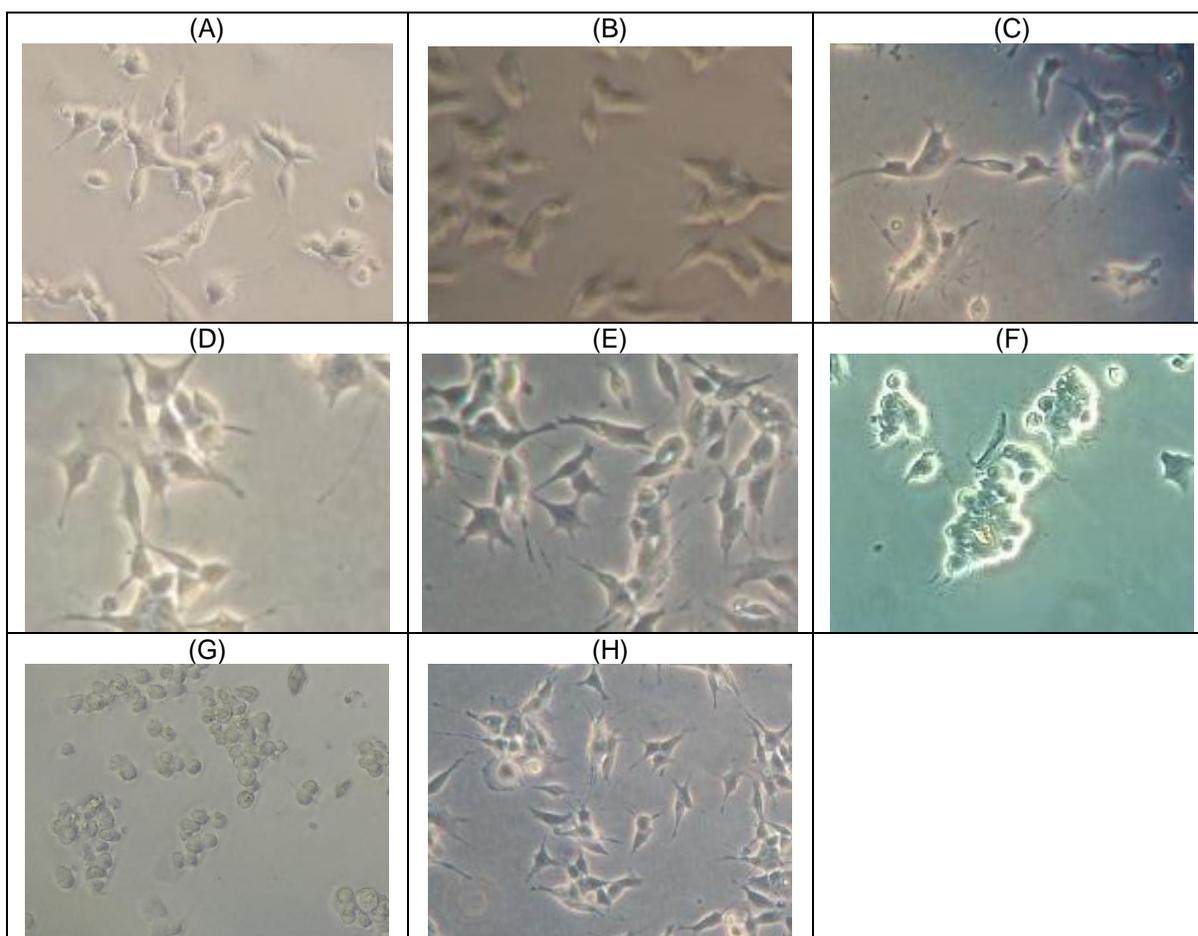
Es importante mencionar que las concentraciones más altas de extractos (porcentajes de actividad antioxidante mayores) no implicaron siempre los mejores resultados, pues posiblemente el medio se saturó y las células dejaron de captar sustancias externas. También se pudo evidenciar que el resveratrol funcionó mucho mejor que los extractos de morera, quizás debido a que por estar en un mayor grado de pureza, el compuesto activo atravesó las membranas y redujo más eficientemente los radicales libres formados [147]. Además, la presencia de excipientes de características desconocidas en los extractos de morera pudo jugar un papel importante en su actividad neuroprotectora.

Otro aspecto evaluado fue la morfología celular, observada a través de un microscopio invertido. Las imágenes que se muestran en las figuras 5-24 y 5-25

corresponden a las células expuestas a los extractos promisorios identificados en las figuras 5-22 y 5-23.

Con estas gráficas se determinó que el nivel de protección de los extractos frente al estrés oxidativo causado por la rotenona fue bueno, pues los cambios morfológicos que se perciben son pocos comparados con los controles positivos (células expuestas a LD<sub>50</sub> de rotenona y células expuestas a Fe<sup>+2</sup>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Figura 5-24. Imágenes del cultivo celular: ensayo tipo “Al tiempo” para extractos promisorios.**

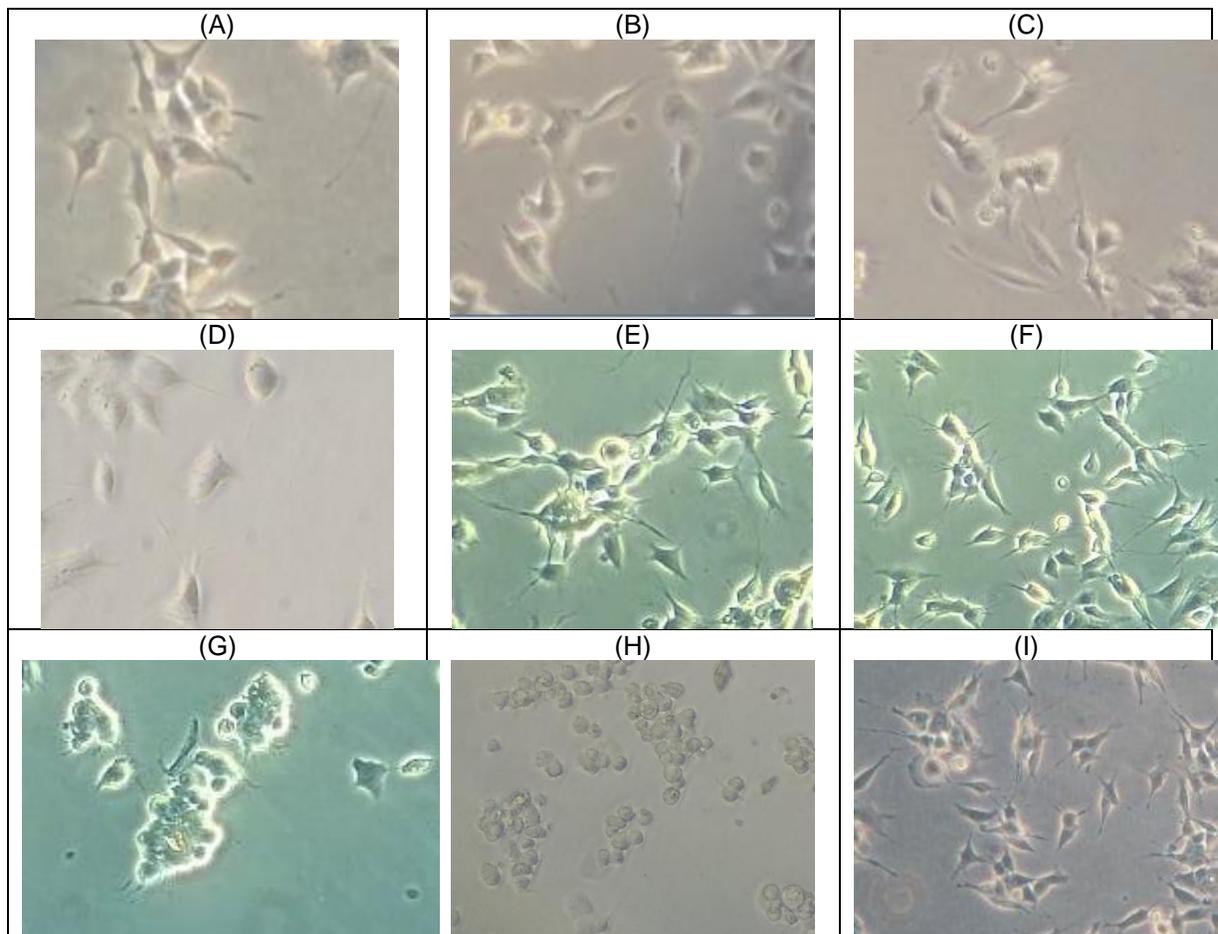


Donde: (A) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Subong Pong al 2%. (B) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto AA-2 al 4%. (C) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto AA-2 al 3%. (D) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto AA-2 al 2%. (E) Células + LD<sub>50</sub> + 5 µM Resveratrol. (F) Células + LD<sub>50</sub> de rotenona. (G) Células + Fe<sup>+2</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (H) Células + DMEM sin modificaciones.

En general, los resultados mostraron la necesidad de evaluar otros aspectos además de la viabilidad y la morfología celular, ya que es importante conocer en las células el estado de las macromoléculas, pues esto tiene un importante

impacto sobre la estabilidad genómica, el estado de las membranas y las funciones celulares [2].

**Figura 5-25. Imágenes del cultivo celular: ensayo tipo “Extracto” para extractos promisorios.**



Donde: (A) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Subong Pong al 3%. (B) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Subong Pong al 2%. (C) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Subong Pong al 1%. (D) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Ichinose al 4%. (E) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Ichinose al 3%. (F) Células +  $LD_{50}$  + 5  $\mu$ M Resveratrol. (G) Células +  $LD_{50}$  de rotenona. (H) Células +  $Fe^{+2}$ - $H_2O_2$ . (I) Células + DMEM sin modificaciones.

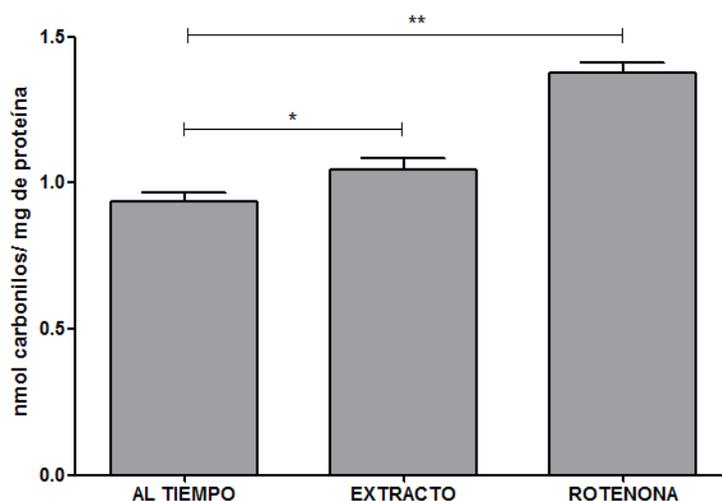
### 5.8.2. Efecto sobre las proteínas celulares

Con el ánimo de conocer a que nivel se da la protección en las células, se propuso determinar el grado de carbonilación de proteínas en la línea celular SH-SY5Y. Para esto, se emplearon los ensayos de acuerdo a la metodología propuesta (sección 4.9.2).

Todos los resultados fueron expresados en nmol de carbonilos/mg de proteína total. Por tal motivo se realizó una curva de calibración con BSA para hallar la concentración total de proteína. Esta gráfica se muestra en el Anexo D.

El análisis realizado a los datos agrupados por tipo de experimento (figura 5-26), mostró que hubo diferencias estadísticas entre los tres grupos de experimentos (al tiempo, extracto, rotenona). El análisis estadístico propuesto fue Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de comparación múltiple Dunn.

**Figura 5-26. Carbonilación de proteínas en la línea celular SH-SY5Y según el tipo de ensayo**



Con este ensayo se pudo determinar que en general, la exposición de las células a la rotenona y al mismo tiempo al agente reductor (extracto), mitiga la oxidación en las proteínas. Esto bajo el supuesto de que la rotenona fue reducida por el extracto antes de introducirse en la mitocondria y por ende la producción de radicales libres en la cadena respiratoria de electrones fue menor.

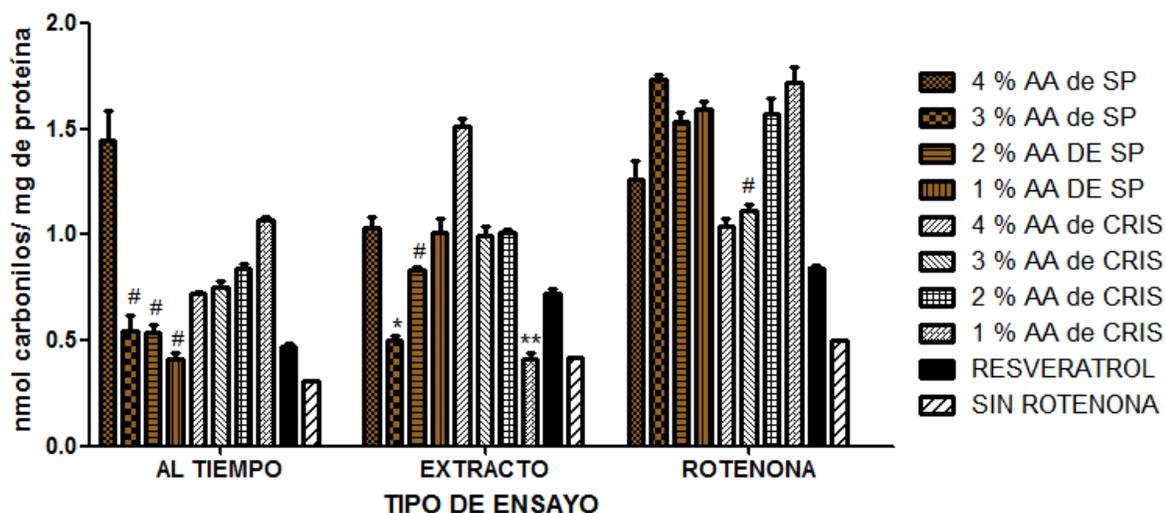
Otro aspecto importante es que el nivel protector de los extractos en términos de la prevención del daño oxidativo (ensayo tipo extracto), no fue tan efectivo como se esperaba, esto tal vez debido a que la estabilidad de los compuestos antioxidantes se vio afectada por algunos parámetros como variaciones en el pH, ocasionadas quizás por cambios en el metabolismo celular [148].

Posteriormente se desarrolló un ANOVA de dos vías para identificar los extractos y las concentraciones de los mismos que lograron resultados similares al control de referencia (resveratrol 5µM), al ser una sustancia con resultados satisfactorios [149, 150].

Al igual que en los análisis de viabilidad, las variables independientes fueron los porcentajes de actividad antioxidante de cada uno de los extractos y el tipo de

ensayo (al tiempo, extracto y rotenona). La prueba pos-hoc empleada fue Bonferroni, con comparaciones múltiples respecto a los resultados del resveratrol.

**Figura 5-27. Carbonilación de proteínas de la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Subong Pong; Cristiana) y al tipo de ensayo.**



Donde: la sigla AA corresponde a actividad antioxidante determinada por DPPH; la sigla SP al extracto de la variedad Subong Pong obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; La sigla CRIS al extracto de la variedad Cristiana obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; RESVERATROL al control referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M); SIN ROTENONA se refiere al control negativo en los ensayos.

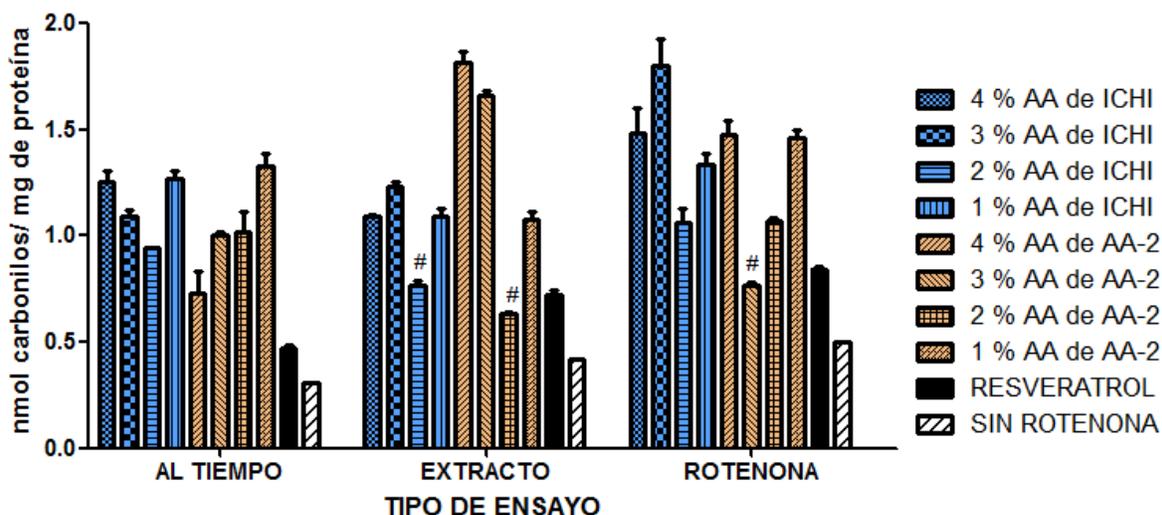
Los resultados pueden visualizarse en las figuras 5-27 y 5-28. Donde se evidenció que los extractos de Subong Pong y Cristiana presentaron buena protección sobre las proteínas celulares. Al igual que en los resultados de viabilidad celular, superar los valores de resveratrol se hizo difícil. Sin embargo, algunos porcentajes de capacidad antioxidante exhibieron resultados interesantes, pues mostraron diferencias significativas favorables (resultados superiores al control de referencia (\*;  $P < 0,05$ ); (\*\*;  $P < 0,01$ )), o resultados similares al control de referencia (marcados como #).

Es de destacar que la protección a la carbonilación de proteínas arrojó resultados prometedores, pues gran parte de los extractos cumplieron con el objetivo final. Lo cual, puede estar asociado a una reducción de la disfunción mitocondrial [151], inhibición proteasomal [152] y el plegamiento inadecuado de proteínas [153].

Las concentraciones o porcentajes de actividad antioxidante que favorecieron en mayor grado la protección de las proteínas, fueron los valores tomados como intermedios, esto debido a que la concentración más alta posiblemente inhibió la captación de nutrientes o compuestos protectores por parte de las células. Y en el

caso de la concentración más baja, la concentración de sustancias que reducían los radicales libres pudo ser insuficiente.

**Figura 5-28. Carbonilación de proteínas de la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Ichinose; AA-2) y al tipo de ensayo**



Donde: la sigla AA corresponde a actividad antioxidante determinada por DPPH; la sigla ICHI al extracto de la variedad Ichinose obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; La sigla AA-2 al extracto de la variedad AA-2 obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; RESVERATROL al control referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M); SIN ROTENONA se refiere al control negativo en los ensayos.

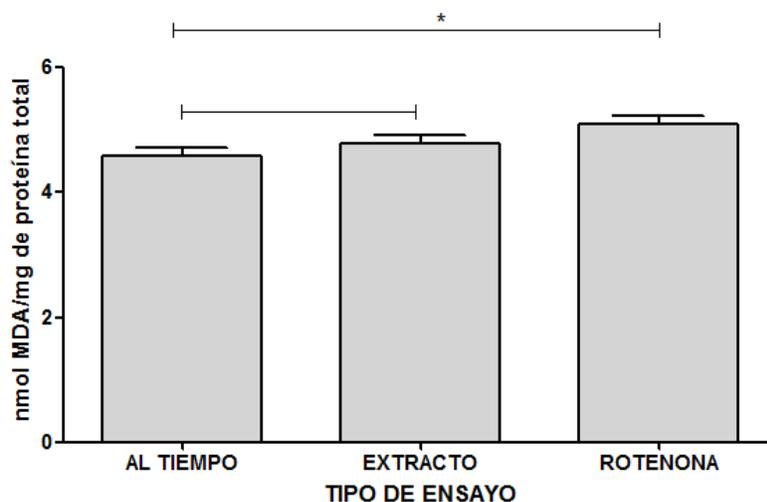
### 5.8.3. Efecto sobre lípidos

Este ensayo se realizó para conocer el estado del daño oxidativo en los lípidos, de acuerdo a la metodología propuesta; donde se esperaban obtener bajas concentraciones de MDA (subproducto de la reacción en cadena de la peroxidación lipídica) [154]. Al igual que en los ensayos anteriores, se tuvieron en cuenta los tres tipos de ensayo. Además, todos los ensayos fueron normalizados a una misma concentración de proteínas, para demostrar que un aumento en la concentración del malondialdehído se debió a un proceso oxidativo y no a una captación de mayor cantidad de muestra. Para obtener los datos de concentración de MDA tal como se reportan en este documento, se realizaron dos curvas de calibración, una para la concentración de proteína y otra para la concentración de malondialdehído (anexos D y E).

El primer análisis desarrollado en esta sección tuvo como objetivo encontrar el tipo de ensayo que exhibiera una menor concentración de malondialdehído, esto con el fin de determinar el modo de protección de los extractos frente a los lípidos. Los resultados fueron graficados en la figura 5-29 luego de realizar un análisis no paramétrico, empleando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por una

comparación múltiple de Dunn. Estos resultados reflejaron que una vez las células fueron sometidas a la sustancia productora de radicales libres (rotenona), les fue difícil a los extractos revertir los daños sobre los lípidos.

**Figura 5-29. Concentración de malondialdehído en la línea celular SH-SY5Y con respecto a los tipos de ensayos planteados**

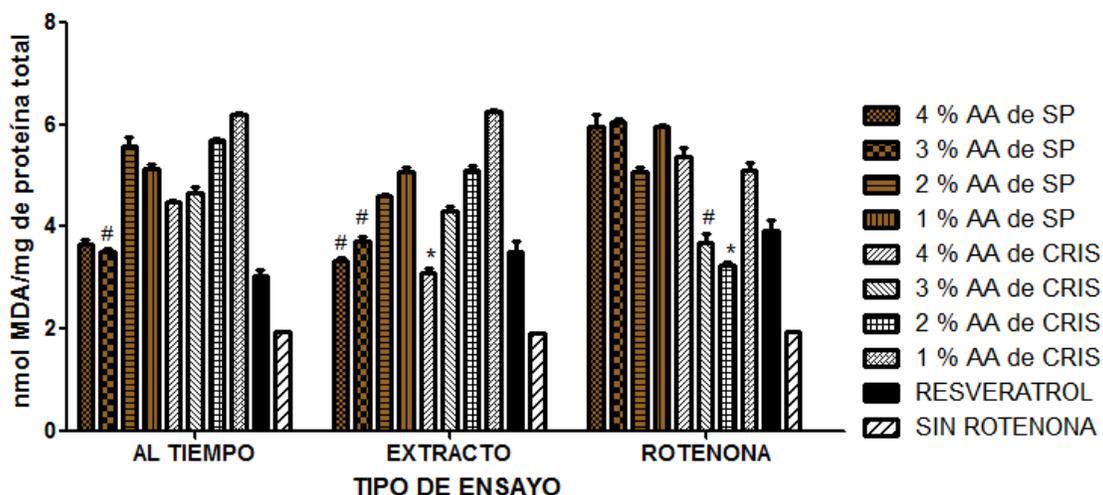


Además, se identificaron los extractos y las concentraciones que cumplían una función protectora frente a los lípidos. Para esto se realizó un ANOVA de dos vías, tomando como variables independientes los extractos de morera con sus respectivos porcentajes de actividad antioxidante y el tipo de ensayo (al tiempo, extracto y rotenona). Al igual que en el apartado anterior se desarrolló una prueba de Bonferroni con una comparación múltiple frente a los valores de malondialdehído alcanzados por el control referencia (resveratrol 5  $\mu$ M). Los resultados se muestran en dos gráficas (gráficas 5-30 y 5-31) aunque el análisis se realizó con la totalidad de los datos.

Los resultados evidenciaron que el resveratrol presentó resultados significativamente diferentes y desfavorables con respecto al control negativo, al igual que todos los extractos de morera. Esto pudo deberse a que la peroxidación lipídica se dio en etapas tempranas de la oxidación, pues la primera barrera con la que se podrían encontrar los radicales libres son los lípidos, componentes principales de las membranas [155].

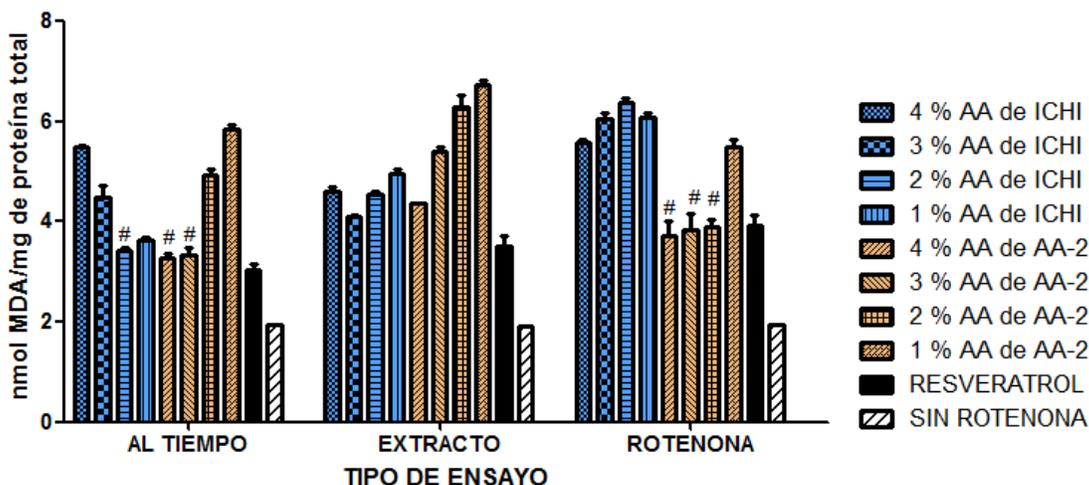
El análisis estadístico reflejó que los extractos estudiados presentaron protección en los lípidos, sin embargo extractos de variedades como AA-2 y Cristiana no tuvieron buenos resultados en el ensayo tipo extracto, esto quizás debido a que sus componentes activos se degradaron fácilmente y su acción se vio limitada. Contrario a lo ocurrido con el extracto de la variedad Subong Pong para el cual se observan los mejores resultados de protección en este ensayo.

**Figura 5-30. Concentración de malondialdehído de la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Subong Pong; Cristiana) y al tipo de ensayo**



Donde: la sigla AA corresponde a actividad antioxidante determinada por DPPH; la sigla SP al extracto de la variedad Subong Pong obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; La sigla CRIS al extracto de la variedad Cristiana obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; RESVERATROL al control referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M); SIN ROTENONA se refiere al control negativo en los ensayos.

**Figura 5-31. Concentración de malondialdehído en la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Ichinose ; AA-2) y al tipo de ensayo**

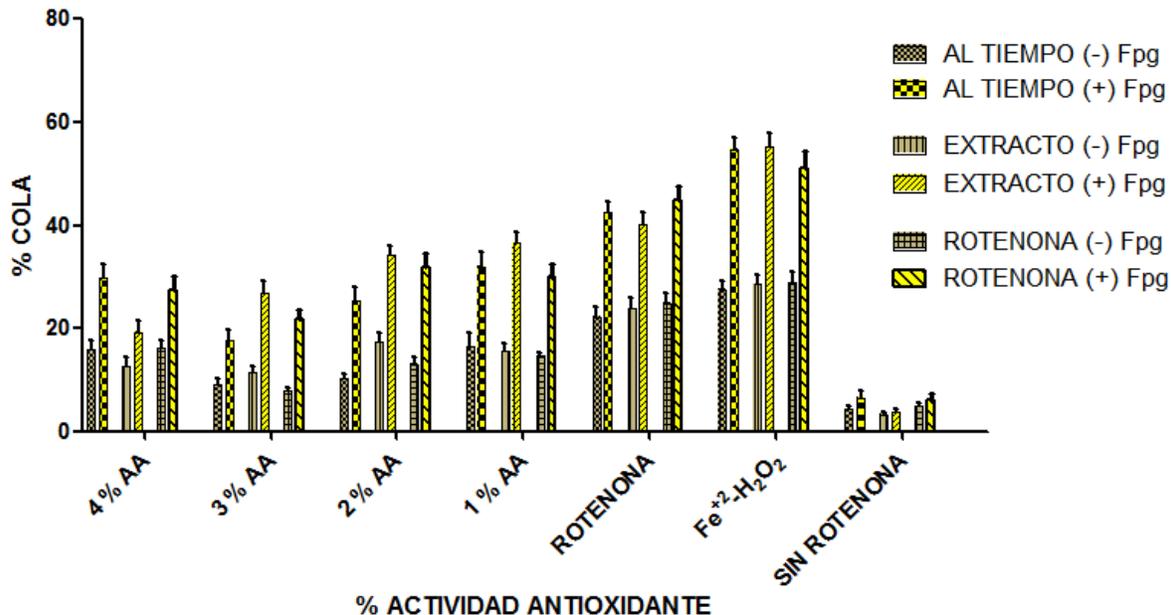


Donde: la sigla AA corresponde a actividad antioxidante determinada por DPPH; la sigla ICHI al extracto de la variedad Ichinose obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; La sigla AA-2 al extracto de la variedad AA-2 obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; RESVERATROL al control referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M); SIN ROTENONA se refiere al control negativo en los ensayos.

### 5.8.4. Efecto sobre el ADN

Los experimentos realizados en esta sección fueron los descritos en la sección 4.9.4 de la metodología, utilizando los extractos de morera identificados como promisorios. Estos experimentos, permitieron conocer los porcentajes de formación del aducto 8-OxoGuanina, principal marcador de daño oxidativo en el ADN. La importancia de este ensayo radica en que la presencia de este aducto puede llegar a producir mutaciones [156], lo que implicaría que la maquinaria celular podría estar comprometida, generando problemas en procesos vitales como la transcripción, replicación y traducción [157]. Además fallas de los mecanismos de control en el ADN podrían conducir a falta de regulación del ciclo celular [158].

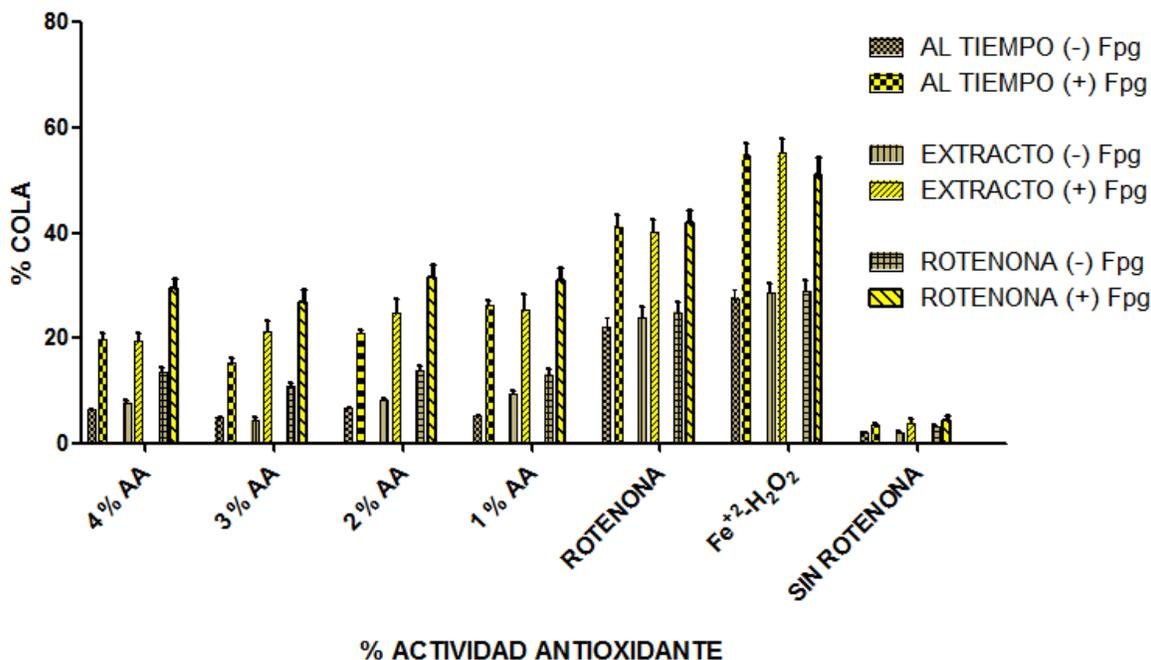
**Figura 5-32. Determinación del porcentaje de cola en extractos de la variedad Subong Pong por medio de los ensayos de cometa**



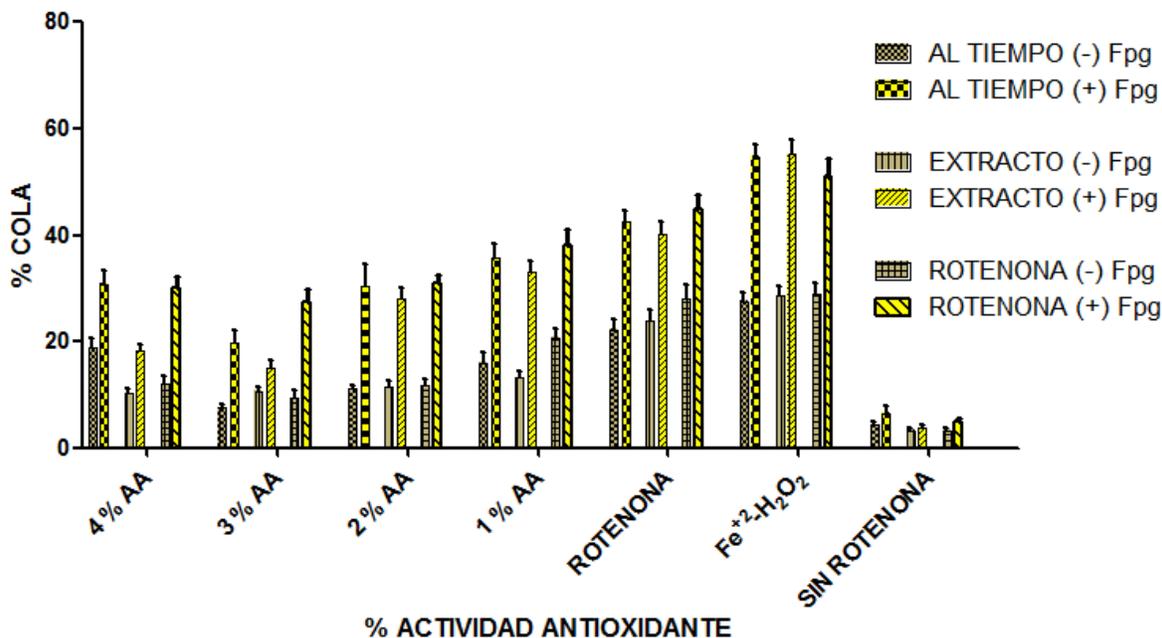
En las gráficas 5-32 a 5-35 se pudo ver que cuando se aplicó la enzima Fpg ocurrió un aumento significativo en el porcentaje en cola del ADN. Esto evidentemente se dio por la presencia de la 8-oxoG pues la enzima Fpg es una DNA-glicosilasa con actividad liasa que reconoce específicamente este aducto, lo que provoca una ruptura de la doble hélice [159]. Un aspecto importante a mencionar es que todas las concentraciones de los diferentes extractos provocaron una disminución en la lectura del porcentaje de cola en el ensayo cometa tradicional, lo cual podría estar relacionado con menor ruptura de la doble hélice, bien sea porque se generó menor daño o porque los mecanismos de reparación no funcionaron adecuadamente. Por tal motivo se hizo conveniente analizar el porcentaje en cola debido solo al aducto 8-oxoG, el cual fue calculado a

partir de la diferencia entre los resultados de los ensayos cometa tradicional y cometa modificado con la enzima Fpg.

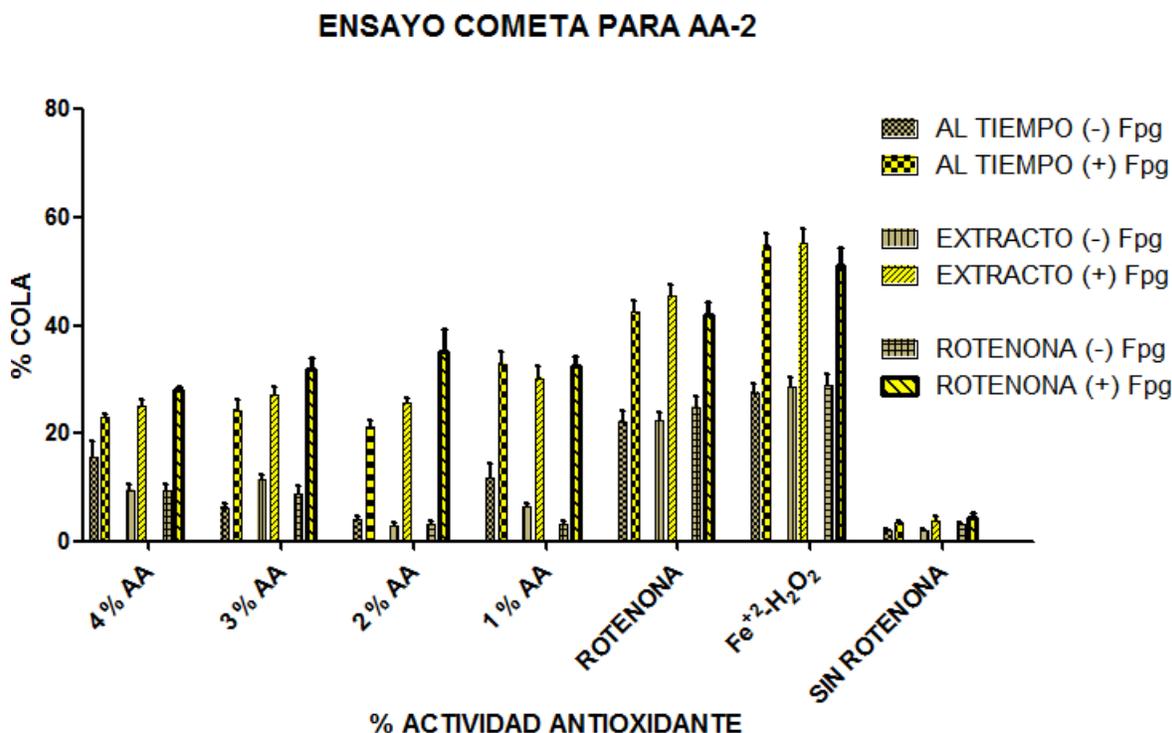
**Figura 5-33. Determinación del porcentaje de cola en extractos de la variedad Ichinose por medio de los ensayos de cometa**



**Figura 5-34. Determinación del porcentaje de cola en extractos de la variedad Cristiana por medio de los ensayos de cometa**



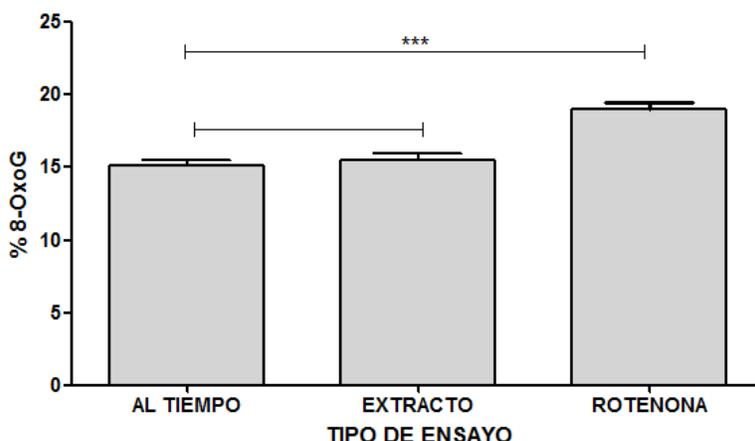
**Figura 5-35. Determinación del porcentaje de cola en extractos de la variedad AA-2 por medio de los ensayos de cometa**



Al obtener el porcentaje en cola de 8-oxoG y realizar una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un análisis post-hoc Dunns para los resultados agrupados por tipo de experimento (al tiempo, rotenona, extracto), se pudo evidenciar que el ensayo tipo rotenona presentó el mayor porcentaje de 8-oxoG (figura 5-36) mostrando diferencias muy significativas (\*\*\*,  $P < 0,001$ ) respecto a los otros dos tipos de ensayo, esto tal vez debido a que en el periodo de 4 horas, durante el cual las células estuvieron expuestas a la  $LD_{50}$  de rotenona sin protección del extracto, se logró generar un daño tal que los niveles de las enzimas de reparación, como MTH1, OGG1 o MUTYH fueron insuficientes. Además, se pudo provocar un deterioro en los mecanismos de reparación [160, 161] que afectó significativamente la remoción del aducto 8-oxoG en el cultivo celular.

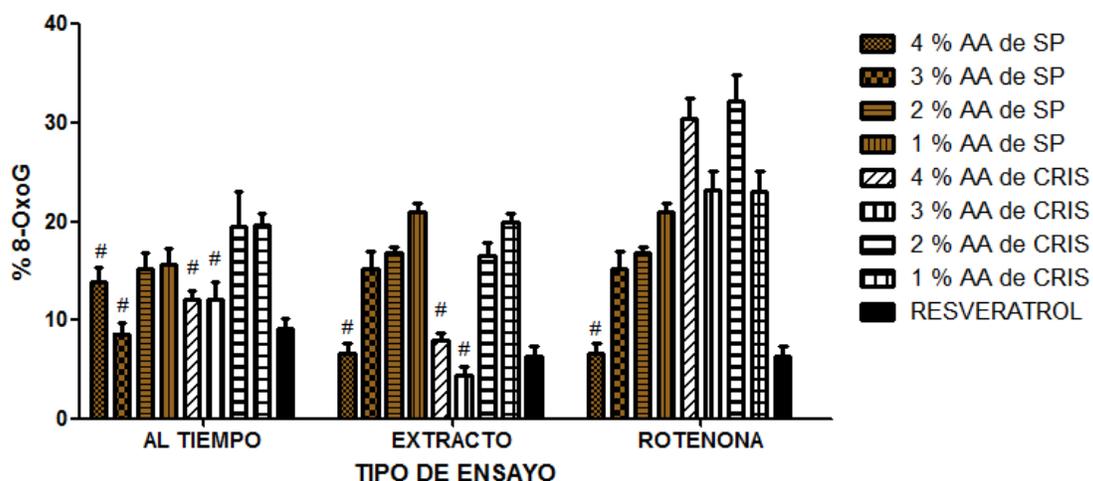
Al igual que en los ensayos anteriores también se realizó un ANOVA de dos vías para identificar las variables y los porcentajes de actividad antioxidante que lograron un menor porcentaje en cola del aducto 8-oxoG, esto con el fin de determinar si los extractos tenían un efecto protector sobre el ADN. Para realizar el análisis estadístico se empleó la prueba pos-hoc Bonferroni, donde todas las comparaciones se realizaron contra el control referencia (resveratrol 5  $\mu$ M). Los resultados pueden observarse en las figuras 5-37 y 5-38.

**Figura 5-36. Porcentaje del aducto 8-oxoGuanina en la línea celular SH-SY5Y con respecto a los tipos de ensayos planteados**



Se evidenció que ningún porcentaje de actividad antioxidante logró un efecto protector sobre el ADN significativamente superior al obtenido con el resveratrol. Sin embargo, marcados con el signo “#”, se presentan los porcentajes de las variedades que obtuvieron al menos un resultado sin diferencias significativas respecto al resveratrol. Los extractos de las variedades Subong Pong y Cristiana tuvieron un rango más amplio de acción, encontrándose que los mejores fueron los porcentajes de actividad antioxidante más altos, debido tal vez a una mayor tasa de transporte pasivo [162].

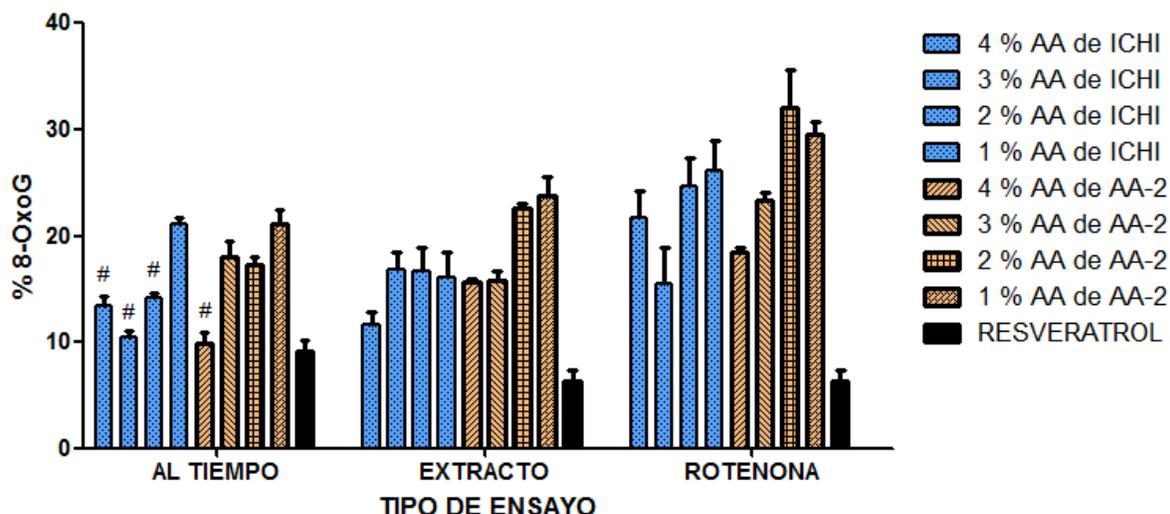
**Figura 5-37. Porcentaje en cola del aducto 8-oxoG en la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Subong Pong; Cristiana) y al tipo de ensayo**



Donde: la sigla AA corresponde a actividad antioxidante determinada por DPPH; la sigla SP al extracto de la variedad Subong Pong obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; La sigla

CRIS al extracto de la variedad Cristiana obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; RESVERATROL al control referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M).

**Figura 5-38. Porcentaje en cola del aducto 8-oxoG en la línea celular SH-SY5Y con respecto a concentraciones de extractos de dos variedades (Ichinose; AA-2) y al tipo de ensayo**



Donde: la sigla AA corresponde a actividad antioxidante determinada por DPPH; ICHI a extracto de la variedad Ichinose obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; AA-2 a extracto de la variedad AA-2 obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua. RESVERATROL al control referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M).

Los resultados para el tipo de ensayo llamado rotenona no fueron los esperados, ya que solo uno de los porcentajes de actividad antioxidante para un extracto (Subong Pong) logró alcanzar los resultados deseados. En el Anexo F, se encuentran las imágenes del ensayo cometa para extractos marcados con el signo “#”.

## 5.9. EVALUACIÓN DE LA NEUROPROTECCIÓN

Debido a la gran cantidad de ensayos y a los resultados alcanzados, se realizó otro análisis para incluir todos los datos obtenidos en los ensayos con células y demostrar las relaciones existentes entre los diferentes parámetros (viabilidad celular, peroxidación lipídica, carbonilación de proteínas y porcentaje del aducto 8-OxoG). Para esto se desarrolló un análisis multivariado llamado análisis de componentes principales, que permitió además, identificar los extractos y sus respectivos porcentajes de actividad antioxidante que presentaron un efecto neuroprotector.

Los datos fueron representados en una gráfica tipo biplot (gráfica de análisis multivariante). De la misma manera que un diagrama de dispersión muestra la distribución conjunta de dos variables, un biplot permite representar tres o más variables [163]. El gráfico biplot exhibió los resultados en forma de un diagrama de

dispersión, en un espacio de dos dimensiones, aunque la configuración original fue de cuatro dimensiones (viabilidad celular, peroxidación lipídica, carbonilación de proteínas y porcentaje de 8-OxoGuanina).

En la figura 5-39 se pudo evidenciar que ningún extracto logró alcanzar resultados similares a los del control negativo (sin rotenona), esto tal vez debido a que el daño que se le indujo a las células fue muy grande para el corto tiempo del ensayo (24 horas). Tal vez, una posible solución a este fenómeno implicaría realizar una diferenciación en la línea celular SH-SY5Y para permitir dosis bajas de rotenona, pero tiempos de tratamiento prolongados. De esta manera, también se lograría mejorar el modelo de estrés oxidativo, ya que se reducirían posibles alteraciones causadas por la proliferación celular [164].

Pese a lo mencionado cabe destacar que relativamente cerca al control negativo se pudo apreciar un grupo, en el cual, además del resveratrol en los tres tipos de ensayo (extracto, al tiempo y rotenona), se encontraron los extractos Ichinose al 4% y 3% en el ensayo tipo extracto, Subong Pong al 4%, 3% en el ensayo tipo extracto y 3% en el ensayo tipo al tiempo; y los extractos de la variedad AA-2 con los porcentajes 4% y 3% en el ensayo tipo al tiempo. Demostrando que algunos de los extractos de morera ejercieron un nivel de protección importante sobre la línea celular SH-SY5Y similar al resveratrol, pero solo a porcentajes altos de actividad antioxidante (4% y 3%) y en los ensayos tipo al tiempo y extracto.

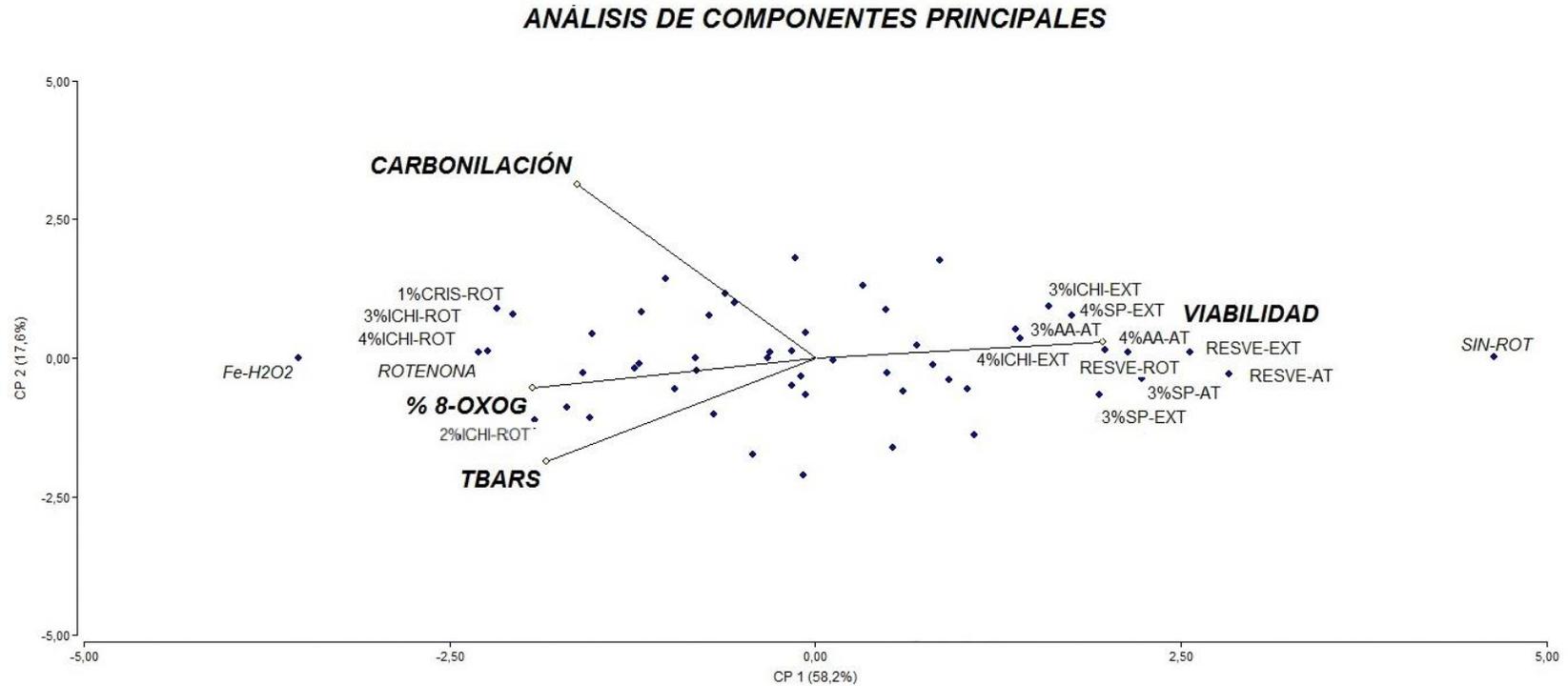
Otro aspecto a destacar resulta en que el ensayo tipo rotenona mostró los resultados más pobres, similares a los alcanzados con los controles positivos (rotenona y  $\text{Fe}^{+2}\text{-H}_2\text{O}_2$ ), lo cual evidencia que los extractos de las variedades de morera no fueron capaces de revertir el daño oxidativo, por lo que su campo de acción se limitó a la prevención y mitigación del efecto de la rotenona y no se puede asociar a la reversión del daño oxidativo.

También por medio del gráfico biplot se pudo determinar una relación inversamente proporcional entre la viabilidad celular y el porcentaje de 8-oxoG presente en el ADN, lo cual concuerda con otros estudios [165, 166]. También se observa una relación, aunque en menor proporción, entre la viabilidad celular con la carbonilación de proteínas y la peroxidación lipídica, esto, tal vez porque los niveles de daño a soportar por las células, en estas macromoléculas son mayores [167].

## **5.10. RESUMEN DE RESULTADOS**

OBJETIVOS	RESULTADOS ALCANZADOS
1. Determinar la actividad antioxidante y la concentración de fenoles totales de los extractos de las 15 variedades de morera.	Se utilizaron cuatro sistemas de extracción de compuestos antioxidantes para las 15 variedades de morera, encontrándose que el método Acetona-Agua/Sonicación fue el más eficiente. Además, se determinó que los extractos de las variedades Nacional, Subong Pong, Cristiana, Ichinose y AA-2 sobresalieron por su alto contenidos de fenoles y porcentajes de actividad antioxidante.
2. Evaluar la toxicidad de los extractos de morera sobre la línea celular SH-SY5Y.	Porcentajes de actividad antioxidante del 4% o inferiores lograron no afectar al cultivo celular.
3. Establecer la línea celular SH-SY5Y como un modelo <i>in vitro</i> para el estudio de la enfermedad de Parkinson.	La exposición de la línea celular SH-SY5Y a rotenona a una concentración de 50 $\mu$ M generó pérdida de viabilidad celular y daño oxidativo en las macromoléculas celulares, características marcadas en la enfermedad de Parkinson.
4. Determinar el efecto de los extractos de morera sobre las macromoléculas y la viabilidad de la línea celular SH-SY5Y expuesta a rotenona.	La exposición a los extractos obtenidos por el método Sonicación/Acetona-Agua, de las variedades Subong Pong, Ichinose y AA-2, previnieron y/o mitigaron el efecto de la rotenona sobre la línea celular SH-SY5Y, pero no se pudieron asociar a la reversión del daño oxidativo.

**Figura 5-39. Biplot del análisis de componentes principales relacionando los ensayos de viabilidad, carbonilación de proteínas, peroxidación lipídica y porcentaje en cola de 8-oxoG, para todos los extractos estudiados**



Donde: VIABILIDAD, TBARS, CARBONILACIÓN Y % 8-OXOG se definen como los componentes principales o los ensayos analizados. Las siglas AT, EXT, ROT se refieren al tipo de experimento en el cual fue evaluado el extracto, es decir, Al tiempo, Extracto o Rotenona respectivamente. Las siglas ICHI, SP, AA, CRIS, son el tipo de extracto empleado, en otras palabras, Ichinose, Subong Pong, AA-2, Cristiana respectivamente. La sigla RESVE es el control de referencia (Resveratrol 5  $\mu$ M) y SIN-ROT es el control negativo (células con medio DMEM suplementado sin modificaciones).

## 6. CONCLUSIONES

Las variedades de morera evaluadas presentaron poca homogeneidad en los valores de actividad antioxidante y concentración de fenoles, hecho que permitió realizar un tamizaje de los extractos con mejores características, e identificar un adecuado sistema de extracción.

De las 15 variedades de morera, solo 3 lograron un efecto protector sobre las células SH-SY5Y sometidas a la neurotoxina rotenona.

El daño oxidativo en las macromoléculas afecta la viabilidad celular, siendo la formación del aducto 8-OxoGuanina en el ADN el factor evaluado que más afecta este parámetro.

El tratamiento de la línea celular SH-SY5Y expuesta a rotenona, con resveratrol, representa un control adecuado para la identificación de extractos con potencial para minimizar el estrés oxidativo.

## 7. RECOMENDACIONES

Para conocer a fondo los metabolitos secundarios de los extractos que lograron tener una actividad protectora sobre la línea celular SH-SY5Y, sería conveniente realizar un fraccionamiento de estos, pues sería ideal conocer si los efectos protectores se deben a una sinergia entre componentes del extracto o a un compuesto fitoquímico específico.

Sería conveniente mejorar el modelo celular del Parkinson, mediante la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y a células tipo neurona, empleando sustancias como el ácido retinoico y ésteres de forbol [168]. Así se lograrían mayores tiempos de exposición a sustancias productoras de radicales libres. Además, se reducirían posibles alteraciones causadas por la proliferación celular [164] y se evaluaría durante más tiempo, la estabilidad y los efectos protectores de los extractos.

Determinar las actividades de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa sería fundamental para identificar si el efecto protector de los extractos de morera fue generado por las actividades antioxidantes de los metabolitos secundarios o por la acción de estas enzimas.

Una manera de mejorar la acción de los compuestos antioxidantes sobre las macromoléculas, podría ser la implementación de estrategias de internalización para los extractos a través de las membranas. De esta manera se podría garantizar su estabilidad en la célula. Dentro de estas estrategias se encuentran los liposomas [169], nanotubos de carbono [170] y microcápsulas [171].

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Johnson, K.E., *Approach to the Patient with Parkinson Disease*. Prim Care, 2015. **42**(2): p. 205-215.
2. Cobb, C.A. and M.P. Cole, *Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration*. Neurobiol Dis, 2015.
3. Hwang, O., *Role of oxidative stress in Parkinson's disease*. Exp Neurol, 2013. **22**(1): p. 11-7.
4. Sanders, L.H. and J.T. Greenamyre, *Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model*. Free Radic Biol Med, 2013. **62**: p. 111-20.
5. Caudle, W.M., et al., *Industrial toxicants and Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 2012. **33**(2): p. 178-88.
6. Moretto, A. and C. Colosio, *Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 2011. **32**(4): p. 383-91.
7. Duty, S. and P. Jenner, *Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease*. British Journal of Pharmacology, 2011. **164**(4): p. 1357-1391.
8. von Wrangel, C., et al., *The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: behavioral and electrophysiological findings*. Behav Brain Res, 2015. **279**: p. 52-61.
9. Wu, F., et al., *Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease*. Neuroscience, 2015. **284**: p. 900-11.
10. Yuan, Y.H., et al., *The molecular mechanism of rotenone-induced alpha-synuclein aggregation: emphasizing the role of the calcium/GSK3beta pathway*. Toxicol Lett, 2015. **233**(2): p. 163-71.
11. Qi, Z., G.W. Miller, and E.O. Voit, *Rotenone and paraquat perturb dopamine metabolism: A computational analysis of pesticide toxicity*. Toxicology, 2014. **315**: p. 92-101.
12. Ittiyavirah, S.P. and J. Hameed, *Herbs treating Parkinson's disease*. Biomedicine & Aging Pathology, 2014. **4**(4): p. 369-376.
13. Ebrahimi, A. and H. Schluesener, *Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls*. Ageing Res Rev, 2012. **11**(2): p. 329-45.
14. Andallu, B., et al., *In vitro free radical scavenging and in vivo antioxidant potential of mulberry (Morus indica L.) leaves*. Journal of Herbal Medicine, 2014. **4**(1): p. 10-17.
15. Kim, H.G., et al., *Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models*. Br J Nutr, 2010. **104**(1): p. 8-16.
16. [http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/index.html](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/index.html)
17. Bowling, A.C., Beal, M.F., *Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Life Sciences, 1995. **56**: p. 1151-71.
18. Jenner, P., *Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease*. Mov Disord, 1998. **13**: p. 24-34.
19. Yeragani, V., et al., *Arvid Carlsson, and the story of dopamine*. Indian Journal of Psychiatry, 2010. **52**(1): p. 87-88.
20. McDowell, K. and M.-F. Chesselet, *Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease*. Neurobiology of Disease, 2012. **46**(3): p. 597-606.
21. Bove, J., et al., *Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease*. The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2005. **2**: p. 484-494.
22. Gao, H.L., et al., *Attenuation of MPTP/MPP+ toxicity in vivo and in vitro by an 18-mer peptide derived from prosaposin*. Neuroscience, 2013. **236**: p. 373-393.
23. Rojas-Charry, L., et al., *Downregulation of Pink1 influences mitochondrial fusion-fission machinery and sensitizes to neurotoxins in dopaminergic cells*. NeuroToxicology, 2014.
24. Izumi, Y., et al., *Endogenous Dopamine is Involved in the Herbicide Paraquat-Induced Dopaminergic Cell Death*. (1096-0929 (Electronic)).
25. Zuluaga-Vélez, A., Gaviria-Arias, D., *Una mirada al estrés oxidativo en la célula*. Revista Médica de Risaralda, 2012. **18**(2): p. 145-154.

26. Halliwell, B., Gutteridge, J.Mc., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th Edition, ed. O.U. Press. 1999.
27. Li, X., Li-Fang, H., Xing-Qi, T., Chi-Xin, T., Tazzari, V., *Therapeutic Effect of Hydrogen Sulfide-Releasing L-Dopa Derivative ACS84 on 6-OHDA-Induced Parkinson's Disease Rat Model*. Plos One, 2013. **8**(4): p. e60200.
28. Panickar, K.S., Anderson, R.A. , *Efect of Polyphenols on Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Neuronal Death and Brain Edema in Cerebral Ischemia*. International Journal of Molecular Sciences, 2011. **12**(11): p. 8181-207.
29. Chang, L.-W., et al., *Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (Morus alba L.) twigs and root bark*. Food and Chemical Toxicology, 2011. **49**(4): p. 785-790.
30. Harvey, B.S., et al., *The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits amyloid- $\beta$  evoked fibril formation and neuronal cell death in vitro*. Food Chemistry, 2011. **129**(4): p. 1729-1736.
31. Asadi, S., Ahmadiani, A., Esmaeili, M. A., Sonboli, A., Ansari, N., Khodaghali, F., *In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six Salvia species from Iran: A comparative study*. Food and Chemical Toxicology, 2010. **48**(5): p. 1341-1349.
32. Okello, E.J., et al., *In vitro protective effects of colon-available extract of Camellia sinensis (tea) against hydrogen peroxide and beta-amyloid (A $\beta$ (1-42)) induced cytotoxicity in differentiated PC12 cells*. Phytomedicine, 2011. **18**(8-9): p. 691-696.
33. Pavlica, S., Gebhardt, R., *Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells*. Life Sciences, 2010. **86**(3-4): p. 79-86.
34. Bae, S.-H. and H.-J. Suh, *Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea*. LWT - Food Science and Technology, 2007. **40**(6): p. 955-962.
35. Harauma, A., Murayama, T., Ikeyama, K., Sano, H., Arai, H., Takano, R., Kita, T., Hara, S., Kamei, K., Yokode, M., *Mulberry leaf powder prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 2007. **358**: p. 751-756.
36. Gaviria-Arias, D., Aguilar-Fernández, E., Navia-Morocho, H., Alegría-Soto, A., *Diversidad genética en el banco de germoplasma de morera [Morus spp. (rosales: Moraceae)] de la granja experimental "el pilamo", Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira (Risaralda), Colombia*. Actual Biol 2012. **96**(34): p. 33-42.
37. Dirección Nacional de Planeación(2011). Conpes 3697. Consejo Nacional de Política Económica y Social.
38. Rocha, P., *Propuesta para el Fortalecimiento de la Capacidad Nacional de Bioprospección con el uso de Herramientas Biotecnológicas, en áreas de interés para el desarrollo de Productos con Impacto Comercial*. 2009, Departamento Nacional de Planeación
39. Vijayan, K., Saratchandra, B., Teixeira da Silva, J.A., *Germplasm conservation in mulberry (Morus spp.)*. Scientia Horticulturae, 2011. **128**: p. 371-379.
40. Fotadar, R.K., Dandin, S.B., *Genetic divergence in mulberry*. Sericologia, 1998. **38**(1): p. 115-125.
41. Hirano, H., *Varietal differences of leaf protein profiles in mulberry*. Phytochemistry, 1982. **21**: p. 1513-1518.
42. Awasthi, A.K., Nagaraja, G.M., Naik, G.V., Kanginakudru, S., Thangavelu, K., Nagaraju, J. , *Genetic diversity and relationships in mulberry (genus Morus) as revealed by RAPD and ISSR marker assays*. BMC Genetics, 2004. **5**: p. 1-8.
43. Sharma, A., Sharma, R., Machii, H., *Assesment of genetic diversity in a Morus germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers*. Theoretical and Applied Genetics, 2000. **101**: p. 1049-1055.
44. Kalpana, D., Hyuk Choi, S., Ki Choi, T., Senthil, K., Soo Lee, Y., *Assessment of genetic diversity among varieties of mulberry using RAPD and ISSR fingerprinting*. Scientia Horticulturae, 2012. **134**: p. 79-87
45. Tsao, R. and Z. Deng, *Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals*. Journal of Chromatography B, 2004. **812**(1-2): p. 85-99.

46. Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., *Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds*. J. Agric. Food Chem. , 47 (1999) 3954. **47**(10): p. 3954-62.
47. Rice-Evans, C.A., et al., *The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids*. Free Radic. Res, 1995. **22**: p. 375-383.
48. Dai, J., Mumper, R. J., *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties*. Molecules, 2010. **15**: p. 7313-52.
49. Katsube, T., et al., *Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (Morus alba L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity*. Food Chemistry, 2006. **97**(1): p. 25-31.
50. Imran, M., et al., *Chemical composition and antioxidant activity of certain Morus species*. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2010. **11**(12): p. 973-80.
51. Mahmood, T., et al., *Effect of Maturity on Phenolics (Phenolic Acids and Flavonoids) Profile of Strawberry Cultivars and Mulberry Species from Pakistan*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**(12): p. 4591-607.
52. Song, W., et al., *Phytochemical Profiles of Different Mulberry (Morussp.) Species from China*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(19): p. 9133-40.
53. Robards, K., *Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables*. J Chromatogr A, 2003. **1000**: p. 657-91.
54. Vilku, K., et al., *Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008. **9**(2): p. 161–9.
55. Garcia-Salas, P., et al., *Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples*. Molecules, 2010. **15**: p. 8813-26.
56. Ahluwalia, S., U.S. Shivhare, and S. Basu, *Supercritical CO2 Extraction of Compounds with Antioxidant Activity from Fruits and Vegetables Waste -A Review*. Focusing on Modern Food Industry (FMFI), 2013. **2**(1): p. 43-62.
57. Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E., *China seeds as a source of natural lipid antioxidants*. J. Am. Oil Chem. Soc., 1984. **61**: p. 928-931.
58. Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T., Namba, T., *Antioxidative effects of phenylethanoids from Cistanche deserticola*. Biol. Pharm. Bull., 1996. **19**(12): p. 1580–1585.
59. Tiwari, A.K., *Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders*. Curr. Sci, 2004. **86**: p. 1092–1102.
60. Simic, M.G., *Mechanisms of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis*. Mutation Research, 1998. **202** p. 377–386.
61. Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C. M., Seo, B. B., Richardson, J. R., Kim, J. H., Miller, G. W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Greenamyre, J. T., *Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease*. The Journal of Neuroscience, 2003. **23**(34): p. 10756 – 10764.
62. Cannona, J.R., Greenamyre, J. T. , *Gene–environment interactions in Parkinson's disease: Specific evidence in humans and mammalian models*. Neurobiology of Disease, 2013. **57**: p. 38-46.
63. Tanner, C.M., *Smoking and Parkinson's disease in twins*. Neurology, 2002. **58**: p. 581–588.
64. Wirdefeldt, K., *Risk and protective factors for Parkinson's disease: a study in Swedish twins*. Ann. Neurol, 2005. **57**: p. 27–33.
65. Galvani, P., Fumagalli, P., Santagostino, A. , *Vulnerability of mitochondrial complex I in PC12 cells exposed to manganese*. Eur. J.Pharmacol, 1995. **293**: p. 377–383.
66. Hatcher, J.M., Pennell, K. D., Miller, G. W., *Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**: p. 322–329.
67. Dick, F.D., *Parkinson's disease and pesticide exposures*. Br Med Bull, 2006. **79-80**: p. 219–231.
68. Tolosa, E., Gaig, C., Santamaría, J., Compta, Y., *Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease*. Neurology, 2009. **72**: p. S12–S20.
69. Chaudhuri, K.R., D.G. Healy, and A.H. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. Lancet Neurol, 2006. **5**: p. 235–245.

70. Bové, J., Perier, C., *NEUROTOXIN-BASED MODELS OF PARKINSON'S DISEASE*. Neuroscience, 2012. **211**: p. 51–76.
71. Sanders, L.H. and J. Timothy Greenamyre, *Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model*. Free Radical Biology and Medicine, 2013. **62**: p. 111-120.
72. Talpade, D.J., *In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [3H]dihydrorotenone*. J Neurochem, 2000. **75**: p. 2611–2621.
73. Heikkila, R.E., *Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity*. Neurosci Lett, 1985. **62**: p. 389–394.
74. Betarbet, R., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat Neurosci, 2000. **3**: p. 1301–1306.
75. Sherer, T.B., *An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage*. J Neurosci, 2002. **22**: p. 7006–7015.
76. Panov, A., *Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication*. J Biol Chem 2005. **280**: p. 42026–42035.
77. Higgins, D.S., Greenamyre, J. T., *[3H] Dihydrorotenone binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain : an autoradiographic study*. J Neurosci, 1996. **16**: p. 3807–3816.
78. Feng, J., *Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins*. Neuroscientist, 2006. **12**: p. 469–476.
79. Dasuri, K., L. Zhang, and J.N. Keller, *Oxidative Stress, Neurodegeneration, and the Balance of Protein Degradation and Protein Synthesis*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **62**: p. 170-85.
80. Berg, J.M., et al., *Biochemistry*. Company WHFa, ed. S. ed. 2012.
81. Frankland-Searby, S. and S.R. Bhaumik, *The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2012. **1825**(1): p. 64-76.
82. Jung, T., B. Catalgol, and T. Grune, *The proteasomal system*. Molecular Aspects of Medicine, 2009. **30**(4): p. 191-296.
83. Radak, Z., et al., *Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA*. Molecular Aspects of Medicine, 2011. **32**(4-6): p. 305-15.
84. Jung, T., N. Bader, and T. Grune, *Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **462**: p. 231–7.
85. Keller, J.N., et al., *Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(12): p. 2376-91.
86. Höhn, A., et al., *Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs*. Free Radical Biology and Medicine, 2011. **50**(5): p. 585-91.
87. Höhn, A., et al., *Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: Role in senescent cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2010. **48**(8): p. 1100-8.
88. Requena, J.R., Levine, R. L., Stadtman, E. R., *Recent advances in the analysis of oxidized proteins*. Amino Acids, 2003. **25**: p. 221–226.
89. Hawkins, C.L., P.E. Morgan, and M.J. Davies, *Quantification of protein modification by oxidants*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **46**(8): p. 965-988.
90. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl groups in oxidized proteins*. Methods Mol. Biol., 2000. **99**: p. 15–24.
91. Kryston, T.B., et al., *Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2011. **711**(1-2): p. 193-201.
92. Cooke, M.S., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. The FASEB Journal, 2003. **17**(10): p. 1195-214.

93. Jeppesen, D.K., V.A. Bohr, and T. Stevnsner, *DNA repair deficiency in neurodegeneration*. Progress in Neurobiology, 2011. **94**(2): p. 166-200.
94. Kuper, J. and C. Kisker, *Damage recognition in nucleotide excision DNA repair*. Current Opinion in Structural Biology, 2012. **22**(1): p. 88-93.
95. Weissman, L., et al., *DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration*. Neuroscience, 2007. **145**(4): p. 1318-29.
96. Hsieh, P. and K. Yamane, *DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing*. Mechanisms of Ageing and Development, 2008. **129**(7-8): p. 391-407.
97. Moskalev, A.A., et al., *The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria*. Ageing Research Reviews, 2012. **12**(2): p. 661-84.
98. Silva, J.P., A.C. Gomes, and O.P. Coutinho, *Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells*. European Journal of Pharmacology, 2008. **601**(1-3): p. 50-60.
99. Arrebola, A., Fernández,R., *Evaluation of Sprague Dawley rats as biomodels to detect damage on DNA in leukocytes of peripheral blood and hepatic cells, by means of the comet assay*. Ars. Pharm., 2010. **51**: p. 49-56.
100. Collins, A.R., *The Comet Assay for ADN Damage and Repair*. Principles. Mol. Biotech. , 2004. **26**: p. 249-261.
101. Choi, S.K., et al., *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Inhibition Improves Coronary Arteriole Function in Type 2 Diabetes Mellitus*. Hypertension, 2012. **59**(5): p. 1060-1068.
102. Collins, A., Dusinska, M., Gedik, C.,and Stetina, R. , *Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?* . Environmental Health Perspectives, 1996. **104**: p. 465–469.
103. Collins, A.R., *Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2014. **1840**(2): p. 794-800.
104. Azqueta, A., et al., *A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays*. Toxicology in Vitro, 2013. **27**(2): p. 768-773.
105. Catalá, A., *Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions*. Chem Phys Lipids, 2009. **157**: p. 1-11.
106. Chen, L., et al., *Possible mechanisms underlying the biphasic regulatory effects of arachidonic acid on Ca<sup>2+</sup> signaling in HEK293 cells*. Cellular Signalling, 2012. **24**(8): p. 1565-72.
107. Fam, S.S., Morrow, J. D. , *The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation – a review*. Curr Med Chem, 2003. **10**: p. 1723-40.
108. Niki, E., *Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **47**(5): p. 469-84.
109. Reed, T.T., *Lipid peroxidation and neurodegenerative disease*. Free Radical Biology and Medicine, 2011. **51**(7): p. 1302-19.
110. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., *Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **338**(1): p. 668-76.
111. Buege, J.D. and S. Aust, *Microsomal lipid peroxidation* Methods in Enzymology, 1978. **30**: p. 303–310.
112. Murillo, J., *Las Euphorbiaceas de Colombia*. Biota Colombiana-Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt, 2004. **5**(2): p. 183-199.
113. Romdhane, N. and C. Gourdon, *Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound*. Chemical Engineering Journal, 2002. **87**: p. 11-9.
114. Kiendrebeogo, M., et al., *Experimental design optimization for screening relevant free phenolic acids from various preparation used in Burkina Faso folk medicine*. Afr J Traditional, 2006. **1**(3): p. 115-8.
115. Brand-Williams, B. and W. Berset, *Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method*. LWT - Food Science and Technology, 1997. **30**: p. 609-615.

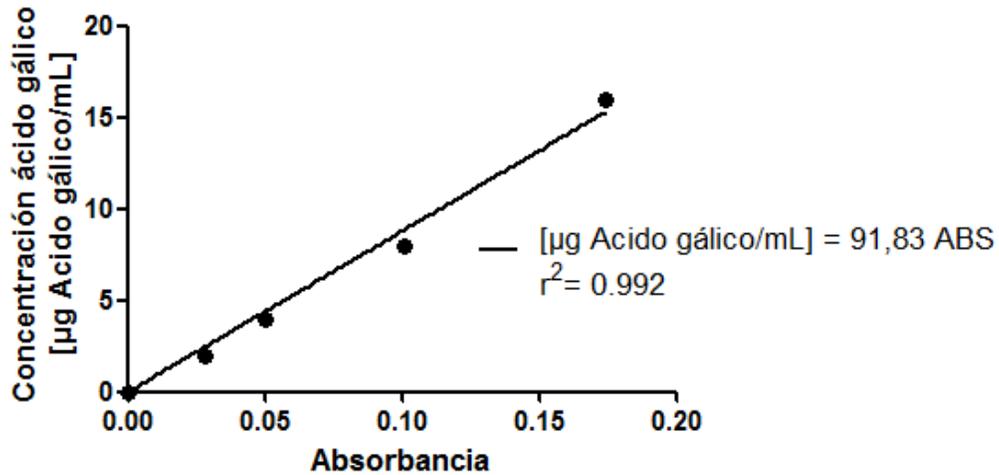
116. Matthaus, B., *Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002. **50**: p. 3444–3452.
117. Reyes-Caudillo, E., A. Tecante, and M.A. Valdivia-López, *Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (Salvia hispanica L.) seeds*. Food Chemistry, 2008. **107**(2): p. 656-663.
118. Siqueira, S., et al., *Biological activities of Solanum paludosum Moric. extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction*. The Journal of Supercritical Fluids, 2011. **58**(3): p. 391-397.
119. Wagner, H. and S. Bladt, *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas*. 2 Edition ed. 1996: Springer – Verlag.
120. ATCC, *Product Sheet: SHSY5Y (ATCC® CRL 2266™)*, American Type Culture C. ATCC, Editor. 2015: Manassas, VA 20108 USA.
121. Chung, W.-G., C.L. Miranda, and C.S. Maier, *Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells*. Brain Research, 2007. **1176**: p. 133–142.
122. Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Fifth ed, ed. I. John Wiley & Sons. 2005.
123. Wang, J., et al., *Protective Effect of Total Phenolic Compounds from Inula helenium on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **77**(2): p. 163-169.
124. Lee, M.K., et al., *Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine*. Exp Mol Med, 2007. **39**(1226-3613 (Print)): p. 376-384.
125. Winterbourn, C.C., Buss, H., *Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay*. Methods Enzymol, 1999. **300**: p. 106–111.
126. Dawn-Linsley, M., Ekinci, F.J., Ortiz, D., *Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system*. Journal of Neuroscience Methods, 2005. **141**(2): p. 219-222.
127. Goulart, M., Batoréu, M.C., Rodrigues, A.S., Laires, A., Rueff, J., *Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers*. Mutagenesis, 2005. **20**(5): p. 311-5.
128. Proestos, C. and M. Komaitis, *Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds*. LWT - Food Science and Technology, 2008. **41**(4): p. 652-659.
129. Azmir, J., et al., *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review*. Journal of Food Engineering, 2013. **117**(4): p. 426-436.
130. Medina-Remon, A., et al., *Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake*. Anal Chim Acta, 2009. **634**(1): p. 54-60.
131. [www.nist.gov](http://www.nist.gov).
132. Foti, M.C. and R. Amorati, *Non-phenolic radical-trapping antioxidants*. J Pharm Pharmacol, 2009. **61**(11): p. 1435-48.
133. Taresco, V., et al., *Antimicrobial and antioxidant amphiphilic random copolymers to address medical device-centered infections*. Acta Biomater, 2015. **22**: p. 131-40.
134. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. Eur J Med Chem, 2015. **97**: p. 55-74.
135. Zimmerman, M.T., et al., *Sulfur and selenium antioxidants: challenging radical scavenging mechanisms and developing structure-activity relationships based on metal binding*. J Inorg Biochem, 2015. **145**: p. 30-40.
136. Oroian, M. and I. Escriche, *Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis*. Food Research International, 2015. **74**: p. 10-36.
137. Gronau, I. and S. Moran, *Optimal implementations of UPGMA and other common clustering algorithms*. Information Processing Letters, 2007. **104**(6): p. 205-210.
138. Xiong, N., et al., *The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling*. Behav Brain Funct, 2013. **9**: p. 13.

139. Song, J.X., et al., *Chrysotoxine, a novel bibenzyl compound selectively antagonizes MPP(+), but not rotenone, neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells*. *Neurosci Lett*, 2012. **521**(1): p. 76-81.
140. Molina-Jimenez, M.F., et al., *Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells*. *Brain Res*, 2004. **1009**(1-2): p. 9-16.
141. Hemanth Kumar, K., et al., *Phytochemical analysis and biological properties of Cyperus rotundus L*. *Industrial Crops and Products*, 2014. **52**: p. 815-826.
142. Deepa, M., et al., *Purified mulberry leaf lectin (MLL) induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer and colon cancer cells*. *Chem Biol Interact*, 2012. **200**(1): p. 38-44.
143. Zhang, M., et al., *A New Flavanone Glycoside with Anti-proliferation Activity from the Root Bark of Morus alba*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2009. **7**(2): p. 105-107.
144. Yang, Y., et al., *Two new chalcones from leaves of Morus alba L*. *Fitoterapia*, 2010. **81**(6): p. 614-6.
145. Mitjavila, M.T. and J.J. Moreno, *The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases*. *Biochem Pharmacol*, 2012. **84**(9): p. 1113-22.
146. Pasinetti, G.M., et al., *Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1852**(6): p. 1202-1208.
147. Ferreres, F., et al., *HPLC-DAD-ESI/MS(n) analysis of phenolic compounds for quality control of Grindelia robusta Nutt. and bioactivities*. *J Pharm Biomed Anal*, 2014. **94**: p. 163-72.
148. Almeida, I.F., P.C. Costa, and M.F. Bahia, *Evaluation of functional stability and batch-to-batch reproducibility of a Castanea sativa leaf extract with antioxidant activity*. *AAPS PharmSciTech*, 2010. **11**(1): p. 120-5.
149. Bhullar, K.S. and B.P. Hubbard, *Lifespan and healthspan extension by resveratrol*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1852**(6): p. 1209-1218.
150. Novelle, M.G., et al., *Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go?* *Ageing Res Rev*, 2015. **21**: p. 1-15.
151. Ruskovska, T. and D.A. Bernlohr, *Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue - implications for insulin resistance and diabetes mellitus*. *J Proteomics*, 2013. **92**: p. 323-34.
152. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression*. *J Cell Mol Med*, 2006. **10**(2): p. 389-406.
153. Grimsrud, P.A., et al., *Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(32): p. 21837-41.
154. Phillipson, O.T., *Management of the aging risk factor for Parkinson's disease*. *Neurobiol Aging*, 2014. **35**(4): p. 847-57.
155. Singh, M., A. Kapoor, and A. Bhatnagar, *Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls*. *Chem Biol Interact*, 2015. **234**: p. 261-73.
156. Nakabeppu, Y., et al., *Programmed cell death triggered by nucleotide pool damage and its prevention by MutT homolog-1 (MTH1) with oxidized purine nucleoside triphosphatase*. *Mutat Res*, 2010. **703**(1): p. 51-8.
157. Jeppesen, D.K., V.A. Bohr, and T. Stevnsner, *DNA repair deficiency in neurodegeneration*. *Prog Neurobiol*, 2011. **94**(2): p. 166-200.
158. Mantha, A.K., B. Sarkar, and G. Tell, *A short review on the implications of base excision repair pathway for neurons: relevance to neurodegenerative diseases*. *Mitochondrion*, 2014. **16**: p. 38-49.
159. Duclos, S., et al., *Structural and biochemical studies of a plant formamidopyrimidine-DNA glycosylase reveal why eukaryotic Fpg glycosylases do not excise 8-oxoguanine*. *DNA Repair (Amst)*, 2012. **11**(9): p. 714-25.
160. Morreall, J., et al., *Inactivation of a common OGG1 variant by TNF-alpha in mammalian cells*. *DNA Repair (Amst)*, 2015. **26**: p. 15-22.

161. Fukae, J., Y. Mizuno, and N. Hattori, *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Mitochondrion, 2007. **7**(1-2): p. 58-62.
162. Hendrich, A.B., *Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(1): p. 27-40.
163. Gabriel, K.R. and C.L. Odoroff, *Biplots in biomedical research*. Statistics in Medicine, 1990. **9**(5): p. 469-485.
164. Yan, Y., et al., *Tetramethylpyrazine promotes SH-SY5Y cell differentiation into neurons through epigenetic regulation of Topoisomerase IIbeta*. Neuroscience, 2014. **278**: p. 179-93.
165. Charao, M.F., et al., *Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line*. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2015. **784-785**: p. 1-9.
166. Yang, W., et al., *Deoxynivalenol induced oxidative stress and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes*. Food Chem Toxicol, 2014. **64**: p. 383-96.
167. Chondrogianni, N., et al., *Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases*. Ageing Res Rev, 2015. **23**(Pt A): p. 37-55.
168. Dwane, S., P.A. Durack E Fau - Kiely, and P.A. Kiely, *Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration*. BMC Res Notes, 2013(1756-0500 (Electronic)).
169. Eloy, J.O., et al., *Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **123**: p. 345-63.
170. Wong, B.S., et al., *Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(15): p. 1964-2015.
171. Hernandez, R.M., et al., *Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(7-8): p. 711-30.

## 9. ANEXOS

### Anexo A. Curva de calibración para determinar la concentración de fenoles totales en términos de ácido gálico

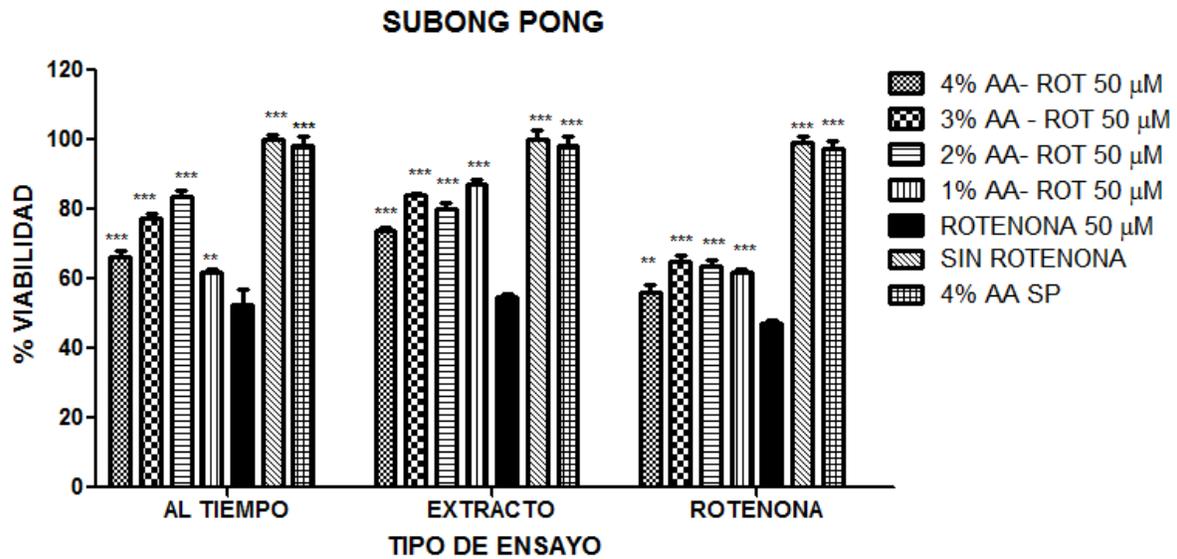


### Anexo B. Tabla de resultados de la marcha fitoquímica

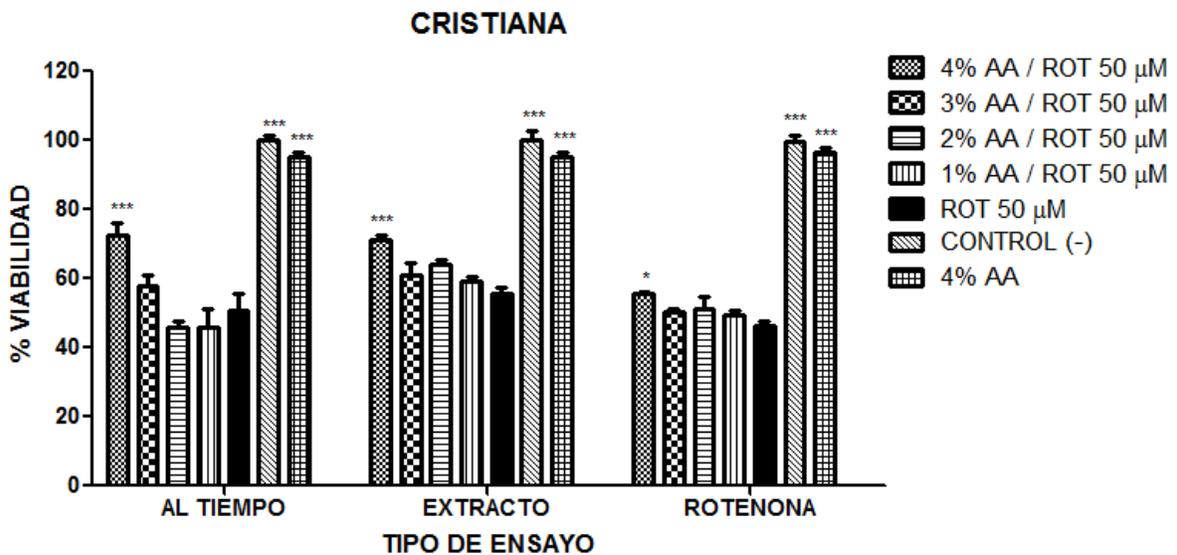
Variedad	Núcleo fitoquímico						
	Alcaloides	Quinonas	Cumarinas	Esteroides y Saponinas	Flavonoides	Taninos y fenoles	Amidas
AA-2	+	+	+	+	+	-	-
Cristiana	+	+	+	+	+	+	+
Ichinose	+	+	+	+	+	-	-
Subong pong	+	+	+	+	+	+	+
Nacional	-	+	+	+	+	-	+

Donde el símbolo “-“ se refiere a la ausencia del núcleo en la marcha fitoquímica y el símbolo “+” indica presencia del núcleo fitoquímico.

**Anexo C. Efecto del extracto de las variedades Ichinose, Subong Pong, Cristiana y AA-2 sobre la viabilidad celular según el tipo de ensayo**

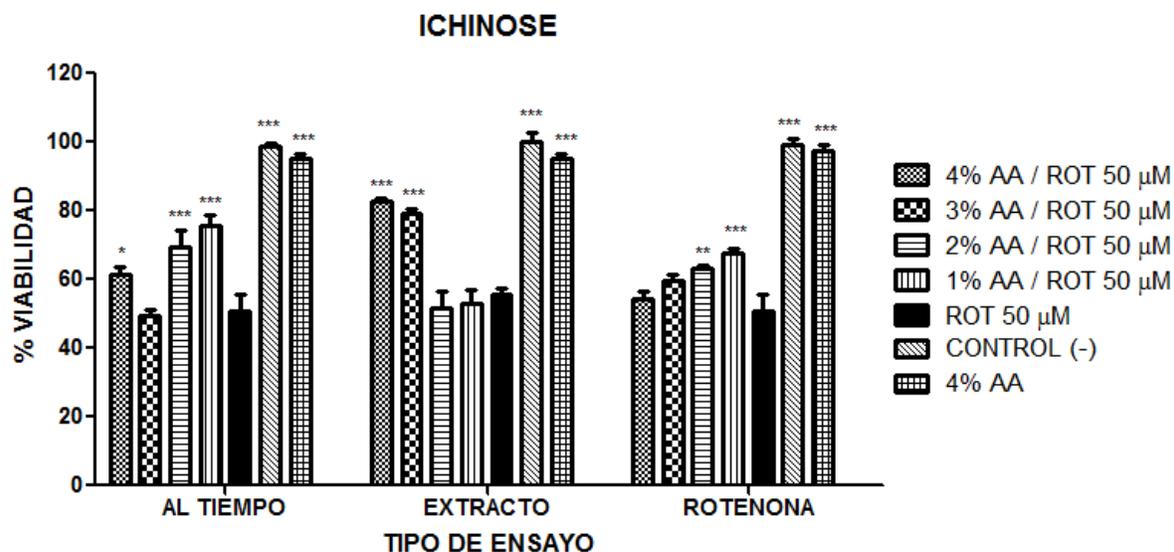


Donde: la sigla AA corresponde actividad antioxidante en extracto de la variedad Subong Pong obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; ROT 50 μM corresponde a la LD<sub>50</sub> de rotenona (control positivo 1). SIN ROTENONA se refiere a la viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin agente rotenona ni extracto (control negativo). 4% AA SP corresponde a la viabilidad de las células expuestas a 4 % de actividad antioxidante del extracto de Subong Pong obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua (control sustrato).

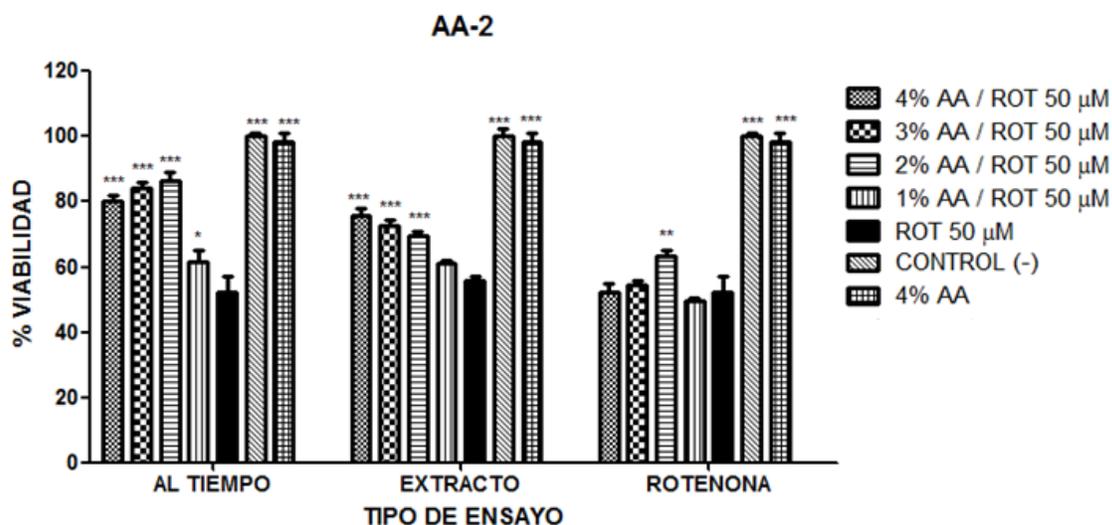


Donde: la sigla AA corresponde actividad antioxidante en extracto de la variedad Cristiana obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; ROT 50 μM corresponde a la LD<sub>50</sub> de rotenona (control positivo 1). CONTROL (-) se refiere a la viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin

agente rotenona ni extracto (control negativo). 4% AA corresponde a la viabilidad de las células expuestas a 4 % de actividad antioxidante del extracto de Cristiana obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua (control sustrato).

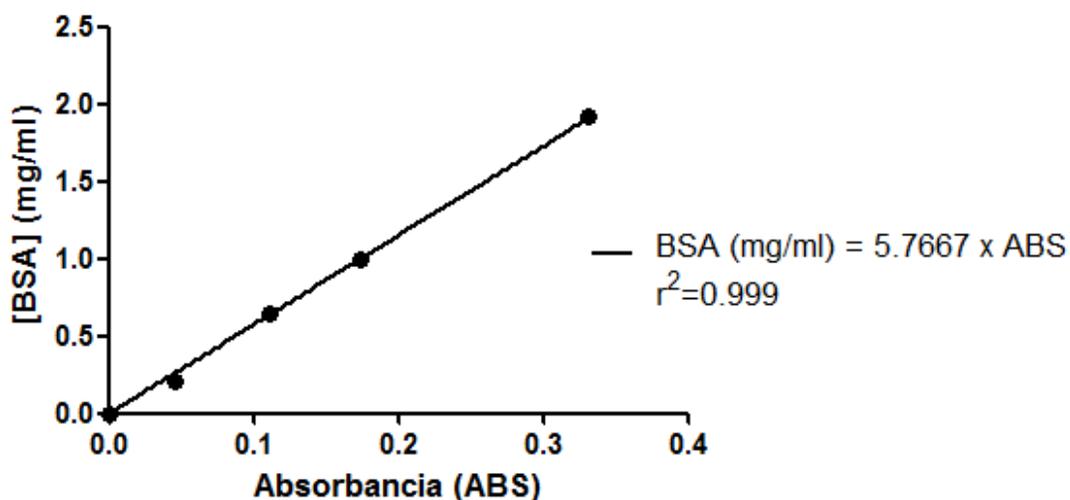


Donde: la sigla AA corresponde actividad antioxidante en extracto de la variedad Ichinose obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; ROT 50 μM corresponde a la LD<sub>50</sub> de rotenona (control positivo 1). CONTROL (-) se refiere a la viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin agente rotenona ni extracto (control negativo). 4% AA corresponde a la viabilidad de las células expuestas a 4 % de actividad antioxidante del extracto de Ichinose obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua (control sustrato).

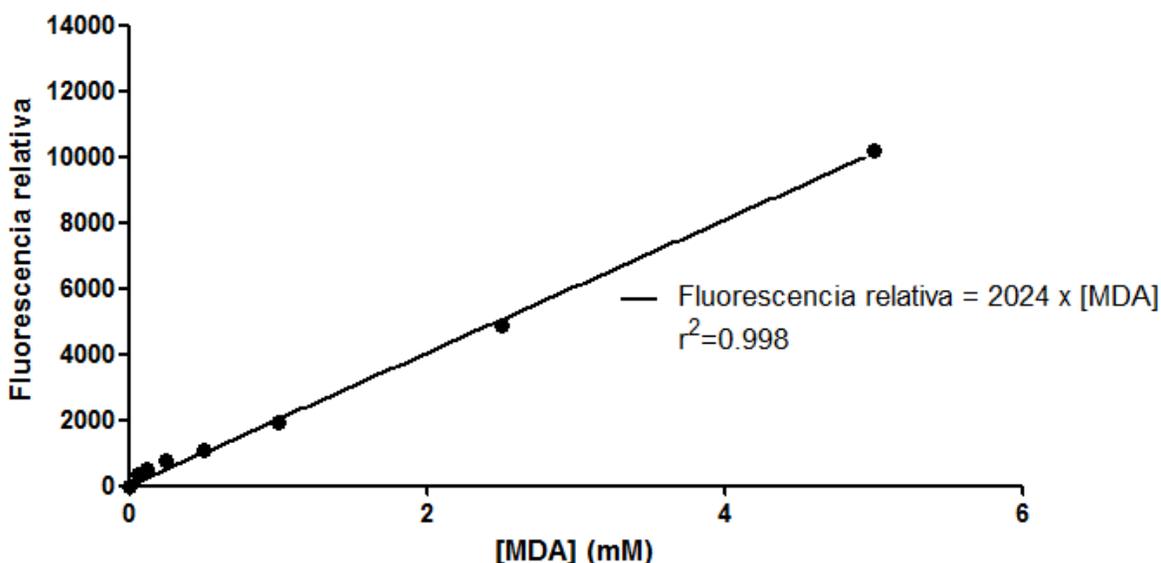


Donde: la sigla AA corresponde actividad antioxidante en extracto de la variedad AA-2 obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua; ROT 50  $\mu$ M corresponde a la LD<sub>50</sub> de rotenona (control positivo 1). CONTROL (-) se refiere a la viabilidad de las células expuestas a DMEM completo sin agente rotenona ni extracto (control negativo). 4% AA corresponde a la viabilidad de las células expuestas a 4 % de actividad antioxidante del extracto de AA-2 obtenido por el método sonicación/Acetona-Agua (control sustrato).

#### Anexo D. Curva de calibración de BSA leída a 280 nm para determinar la concentración de proteínas

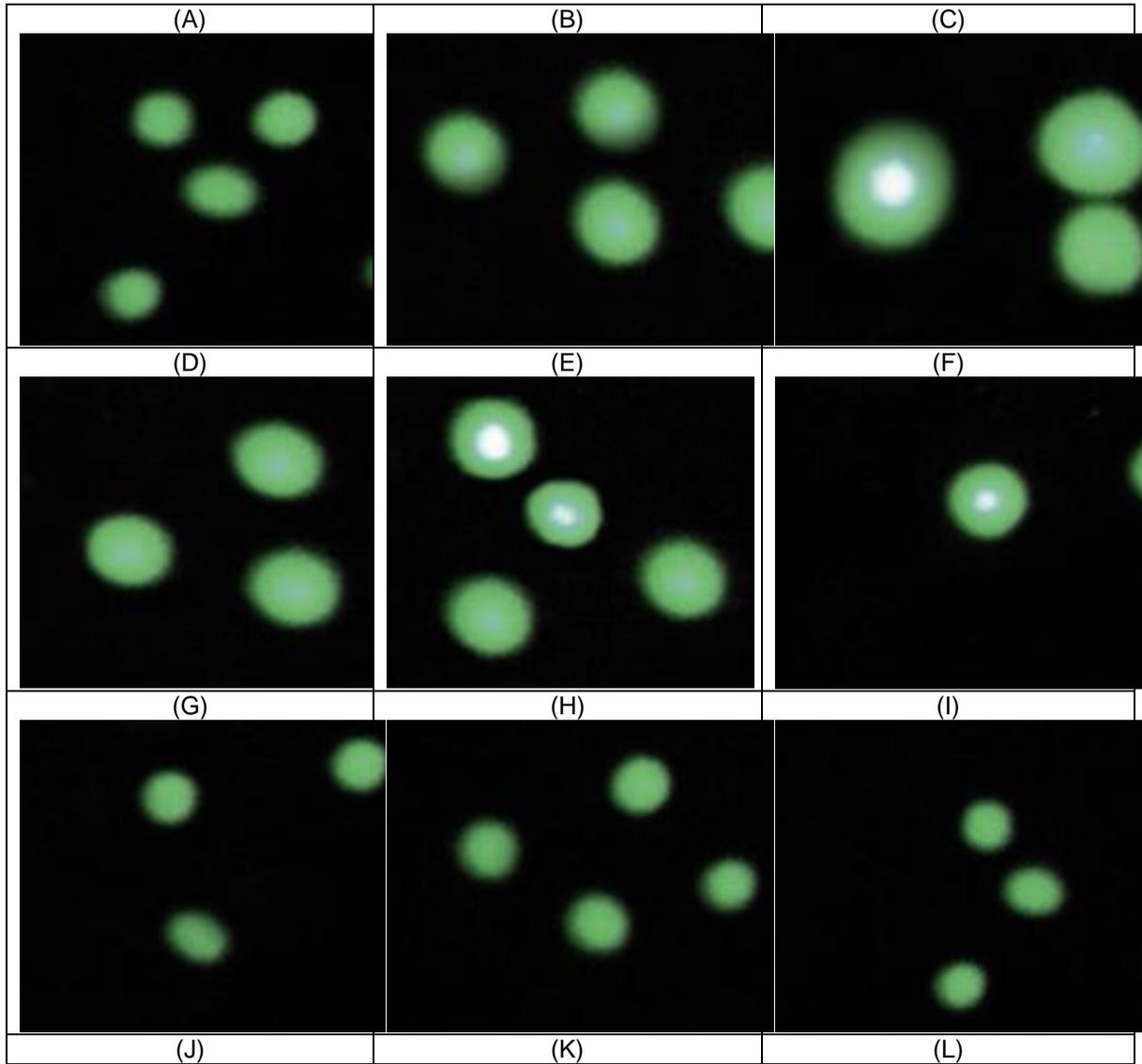


#### Anexo E. Curva de calibración para determinar la concentración de malondialdehído (MDA) a partir de las medidas de fluorescencia.



**Anexo F. Registro fotográfico del ensayo cometa**

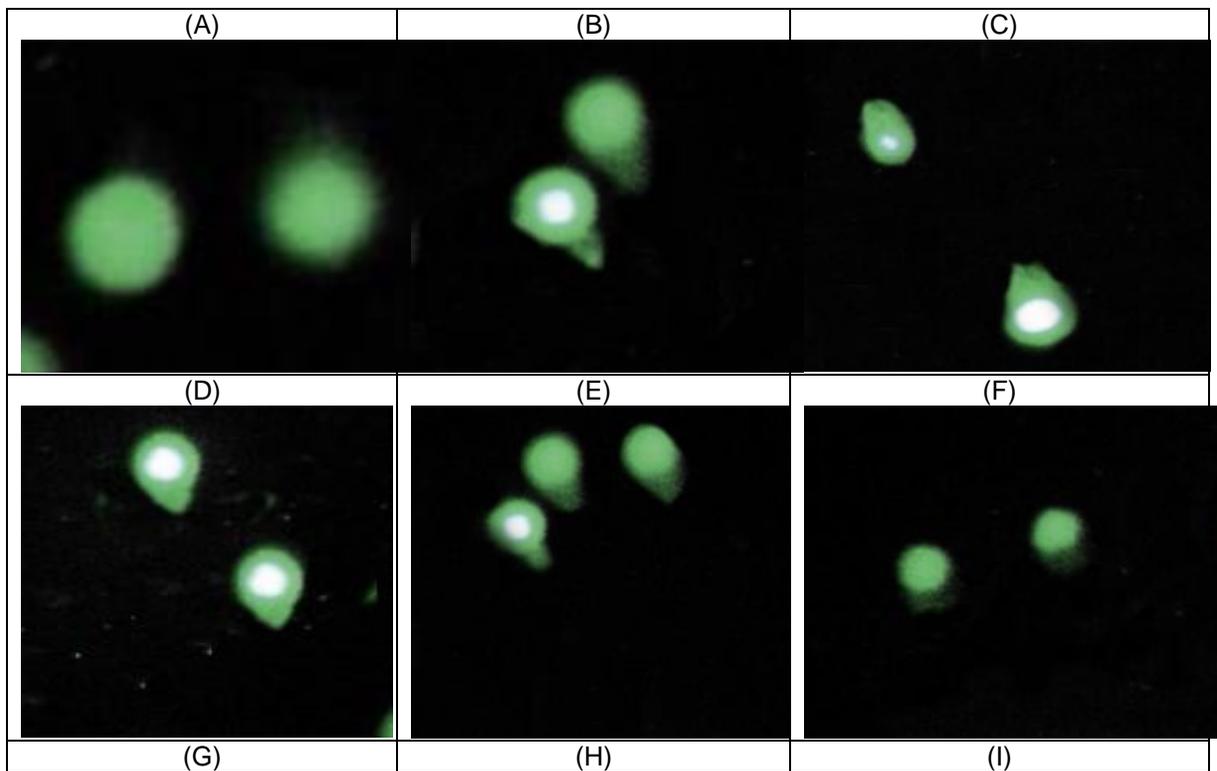
**Figura 9-1. Imágenes del ensayo cometa sin enzima Fpg, experimento tipo “Al tiempo” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios.**

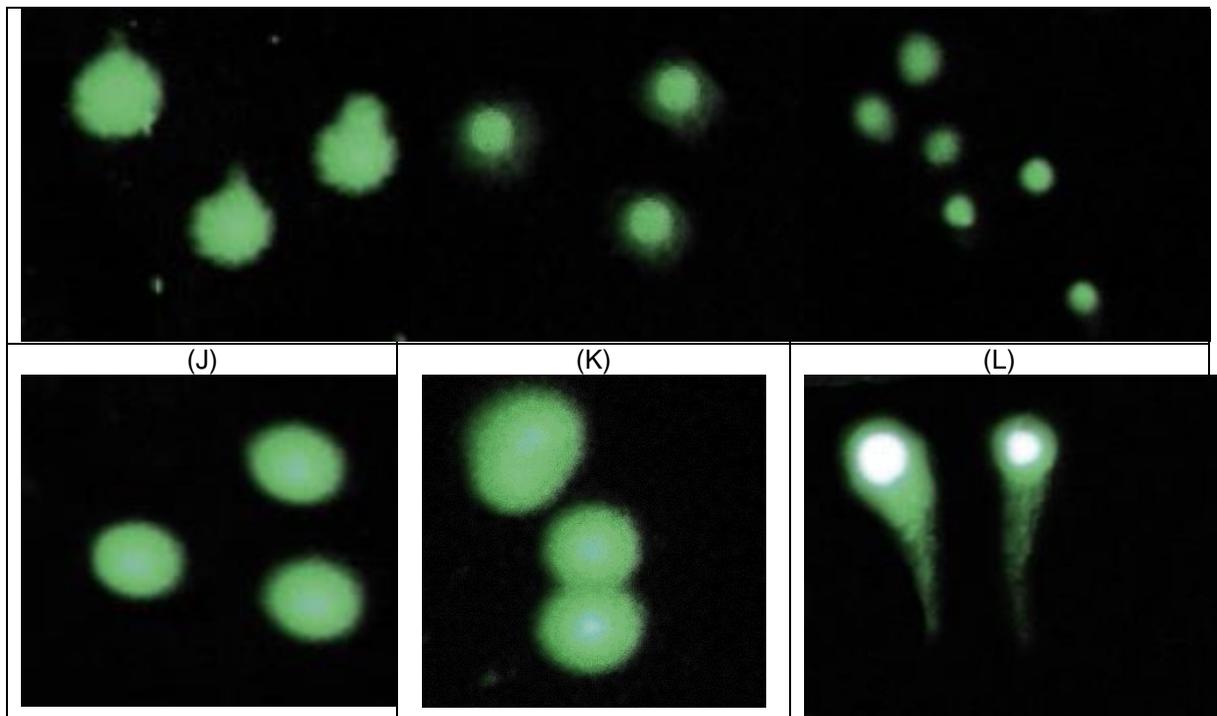




Donde: (A) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Subong Pong al 4%. (B) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Subong Pong al 3%. (C) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Cristiana al 4% (D) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Cristiana al 3%. (E) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Ichinose al 4%. (F) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Ichinose al 3%. (G) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Ichinose al 2%. (H) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto AA-2 al 4%. (I) Células + LD<sub>50</sub> + 5  $\mu$ M Resveratrol. (J) Células con DMEM sin modificaciones. (K) Células con + LD<sub>50</sub> de rotenona.

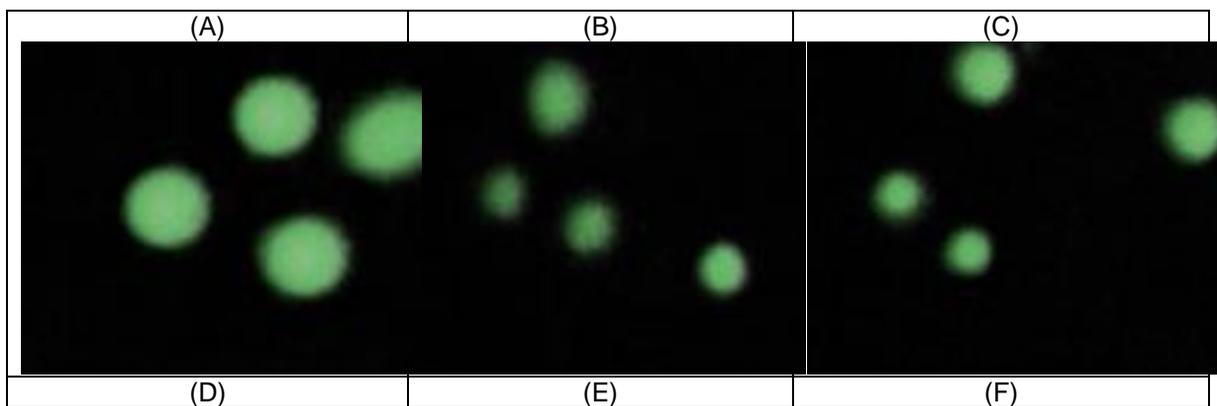
**Figura 9-2. Imágenes del ensayo cometa con enzima Fpg, experimento tipo “Al tiempo” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios**

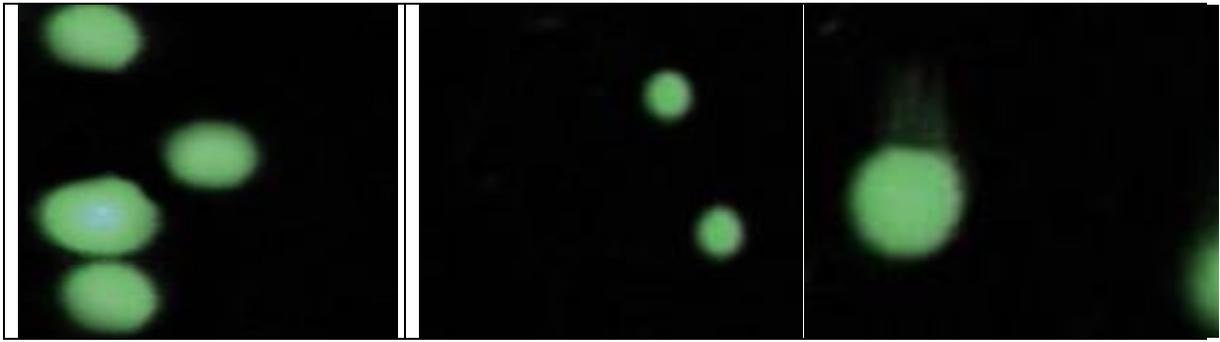




Donde: (A) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Subong Pong al 4%. (B) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Subong Pong al 3%. (C) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Cristiana al 4% (D) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Cristiana al 3%. (E) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Ichinose al 4%. (F) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Ichinose al 3%. (G) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Ichinose al 2%. (H) Células +  $LD_{50}$  + Extracto AA-2 al 4%. (I) Células +  $LD_{50}$  + 5  $\mu$ M Resveratrol. (J) Células con DMEM sin modificaciones. (K) Células con +  $LD_{50}$  de rotenona.

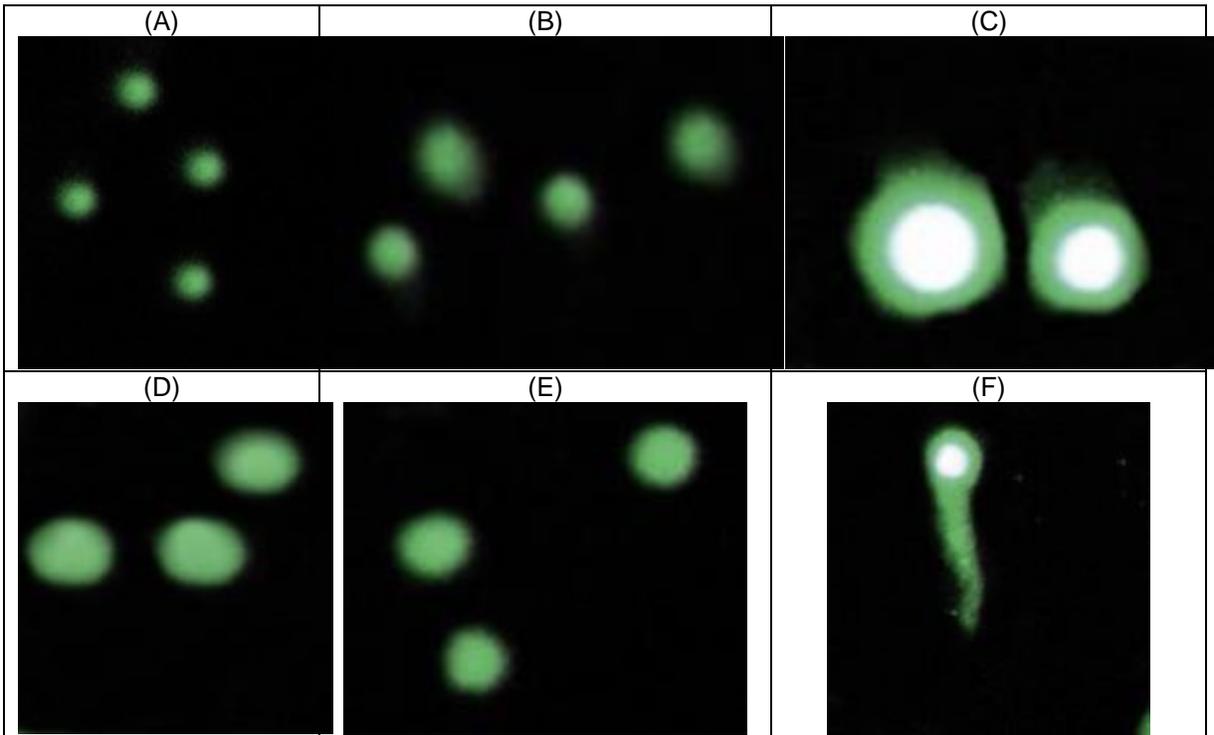
**Figura 9-3. Imágenes del ensayo cometa sin enzima Fpg, experimento tipo “Extracto” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios**





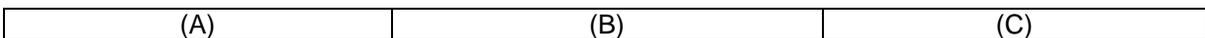
Donde: (A) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Subong Pong al 4%. (B) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Cristiana al 4% (C) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Cristiana al 3%. (D) Células + LD<sub>50</sub> + 5 μM Resveratrol. (E) Células con DMEM sin modificaciones. (F) Células con + LD<sub>50</sub> de rotenona.

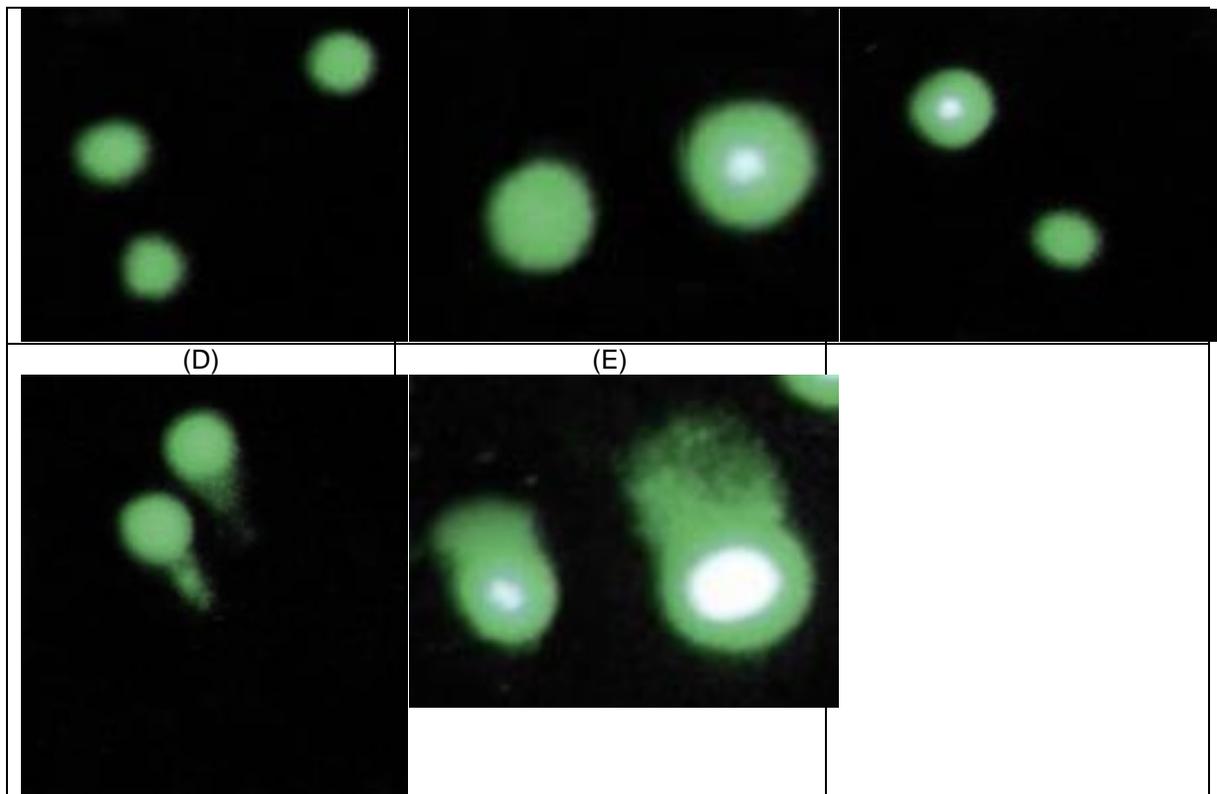
**Figura 9-4. Imágenes del ensayo cometa con enzima Fpg, experimento tipo “Extracto” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios**



Donde: (A) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Subong Pong al 4%. (B) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Cristiana al 4% (C) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Cristiana al 3%. (D) Células + LD<sub>50</sub> + 5 μM Resveratrol. (E) Células con DMEM sin modificaciones. (F) Células con + LD<sub>50</sub> de rotenona.

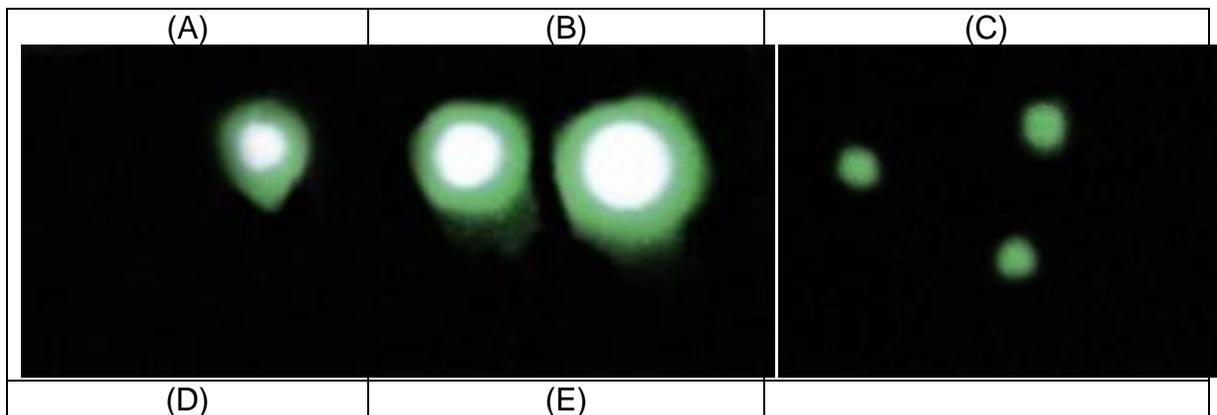
**Figura 9-5. Imágenes del ensayo cometa sin enzima Fpg, experimento tipo “Rotenona” de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios**





Donde: (A) Células + LD<sub>50</sub> + Extracto Subong Pong al 4%. (B) Células + LD<sub>50</sub> + 5 μM Resveratrol. (C) Células con DMEM sin modificaciones. (D) Células con + LD<sub>50</sub> de rotenona. (E) Células con + Fe<sup>+2</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Figura 9-6. Imágenes del ensayo cometa con enzima Fpg, experimento tipo "Rotenona" de las células SH-SY5Y sometida a rotenona y a los extractos más promisorios**





Donde: (A) Células +  $LD_{50}$  + Extracto Subong Pong al 4%. (B) Células +  $LD_{50}$  + 5  $\mu M$  Resveratrol. (C) Células con DMEM sin modificaciones. (D) Células con +  $LD_{50}$  de rotenona. (E) Células con +  $Fe^{+2}$  +  $H_2O_2$ .