



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Caracterización anatómico-químico del *Desmodium  
tortuosum* y su efecto citoprotector y antioxidante  
en células neuronales SH-SY5Y y células endoteliales  
EA.hy926**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Toxicología

**AUTOR**

Paola Vanessa BERRIOS LEDESMA

**ASESOR**

Dra. Zoyla Mirella CLAVO PERALTA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

## Referencia bibliográfica

---

Berrios P. Caracterización anatómico-química del *Desmodium tortuosum* y su efecto citoprotector y antioxidante en células neuronales SH-SY5Y y células endoteliales EA.hy926 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica/Unidad de Posgrado; 2023.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Paola Vanessa Berrios Ledesma
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70876238
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0009-0004-6901-4782">https://orcid.org/0009-0004-6901-4782</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Zoyla Mirella Clavo Peralta
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07717043
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9845-7997">https://orcid.org/0000-0001-9845-7997</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09597625
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Zoyla Mirella Clavo Peralta
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07717043
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Jose Antonio Llahuilla Quea
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09780810
<b>Miembro del jurado 3</b>	
Nombres y apellidos	Sixto Antonio González Elera
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	08063663
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos terapéuticos: (estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos, procesos de industrialización)
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. PCONFIGI A21081221
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Medicina Veterinaria Laboratorio de Fisiología País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Calle: Av. Circunvalación 2800 Latitud: -12,080208 Longitud: -76,987495
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022-2023
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05</a>  Toxicología <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07</a>  Tecnologías que implican la manipulación de células, tejidos, órganos o todo el organismo <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.02">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.02</a>



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR  
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA**

Siendo las **14:00 hrs. del 15 de agosto de 2023** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr Yovani Martín Condorhuamán Figueroa e integrado por los siguientes miembros: Dra. Zoyla Mirella Clavo Peralta (asesora), Dr. Jose Antonio Llahuilla Quea y el Mg Sixto Antonio González Elera; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "**CARACTERIZACIÓN ANATOMO-QUÍMICO DEL *Desmodium tortuosum* Y SU EFECTO CITOPROTECTOR Y ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS NEURONALES SH-SY5Y Y CÉLULAS ENDOTELIALES EA.hy926**" presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Paola Vanessa Berríos Ledesma**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Toxicología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

..... **A - Excelente - 19 (Diecinueve)** .....

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Paola Vanessa Berríos Ledesma**, el Grado Académico de Magíster en **Toxicología**.

Siendo las **14:40** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **15:30** hrs. del 15 agosto de 2023.

  
.....  
Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa (P. Asoc. T.P.)  
Presidente

  
.....  
Dra. Zoyla Mirella Clavo Peralta (P.P. D.E.)  
Miembro - Asesora

  
.....  
Dr. Jose Antonio Llahuilla Quea (P. Asoc. T.C.)  
Miembro

  
.....  
Mg Sixto Antonio González Elera (P. Asux., T.P.)  
Miembro

**Observaciones:**

.....  
.....



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Unidad de Posgrado**



**LA DIRECTORA DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,**

# **CONSTANCIA**

**00008-FFB-UPG-2023**

Que, mediante procedimiento de la evaluación de originalidad según Resolución Rectoral N° 043005-R-18, de la tesis intitulada: **CARACTERIZACIÓN ANATOMO-QUÍMICO DEL *Desmodium tortuosum* Y SU EFECTO CITOPROTECTOR Y ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS NEURONALES SH-SY5Y Y CÉLULAS ENDOTELIALES EA.hy926**, presentado por **Paola Vanessa Berrios Ledesma**, con fecha de recepción 10/03/2023, con fecha de aplicación al programa de similitud el 15/03/2023 con el software utilizado el TURNITIN, con la configuración de exclusión de textos entrecomillas, bibliografías y cadenas menores a 40 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **10%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18.

**Lima, 15 de marzo de 2023**



**UNMSM**

Firmado digitalmente por RAMOS  
CEVALLOS Norma Julia FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 15.03.2023 16:04:04 -05:00

**DRA. NORMA JULIA RAMOS CEVALLOS**  
**DIRECTORA**

*NJRC/ecj*

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a Dios, por la vida y por permitir darme las fuerzas de seguir adelante, guiando día a día mis pasos.

A mi familia por ser mi gran soporte. Mis padres, por todo su apoyo, comprensión, consejos y por no dejarme sola ante cada adversidad. Mis hermanos, por su apoyo académico desde muy pequeña y hasta el día de hoy, porque son mi ejemplo a seguir.

A mi ángel, que me cuida desde el cielo y vive en mi corazón.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por darme la oportunidad de brindarme nuevos conocimientos y ser parte de mi crecimiento profesional.

Asimismo, agradezco profundamente a mi asesora y docentes que han sido parte de toda esta investigación, por su paciencia, tiempo, dedicación y por cada enseñanza impartida.

## ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
2.2. BASES TEÓRICAS.....	9
2.2.1. Género <i>Desmodium</i> .....	9
2.2.2 <i>Desmodium Tortuosum</i> .....	12
2.2.3 Distribución geográfica.....	12
2.2.4 Células SH-SY5Y .....	12
2.2.5. Células EA.hy926.....	13
2.2.6. Especies reactivas de oxígeno.....	13
2.2.7. Apoptosis.....	13
2.2.8. Las caspasas.....	14
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	15
3.1 Tipo de investigación.....	15
3.2 Consideraciones éticas.....	15
3.3 Diseño metodológico.....	15
3.4 Unidad de análisis.....	19
3.5 Población de estudio.....	19
3.6 Muestra o tamaño de muestra.....	19
3.7 Criterios de selección.....	19
3.7.1 Criterios de inclusión.....	19
3.7.2 Criterios de exclusión.....	19
3.8 Recolección de datos.....	20
3.9 Análisis de datos.....	20
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	21
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	31
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	36
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES.....	37
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

## RESUMEN

Se ha propuesto que el estrés oxidativo es un mecanismo patogénico para inducir citotoxicidad y la aparición de enfermedades cardiovasculares y neuronales. En la actualidad se han utilizado compuestos naturales como los extractos de plantas para reducir los efectos citotóxicos que producen los agentes que inducen el estrés oxidativo. Nuestro estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad antioxidante y citoprotectora del extracto de *Desmodium tortuosum* (*D. tortuosum*) en cotratamiento y pretratamiento en líneas celulares EA.hy926 y SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo inducido por t-BOOH. Se evaluaron la viabilidad celular, las especies reactivas de oxígeno (ROS), y la expresión molecular de biomarcadores de estrés oxidativo (SOD2, NRF2) y muerte celular (APAF1, Caspase3). Se observó que el extracto de *D. tortuosum* de manera dosis-dependiente, fue capaz de reducir los efectos oxidativos y de citotoxicidad inducidos por el t-BOOH, incluso estos niveles fueron normalizados a la dosis de 200 µg/mL de *D. tortuosum*, lo que sería debido al alto contenido de compuestos fenólicos. Finalmente, estos resultados son indicadores de que el extracto de podría ser una alternativa natural frente a la exposición citotóxica de agentes químicos estresantes y citotóxicos.

**Palabras clave:** Antioxidantes vegetales, fitoquímicos, polifenoles, plantas medicinales, endotelio vascular, neuroprotección

## ABSTRACT

It has been proposed that oxidative stress is a pathogenic mechanism to induce cytotoxicity and the appearance of cardiovascular and neuronal diseases. At present, natural compounds such as plant extracts have been used to reduce the cytotoxic effects produced by agents that induce oxidative stress. Our study aimed to evaluate the antioxidant and cytoprotective capacity of *Desmodium tortuosum* (*D. tortuosum*) extract in co-treatment and pre-treatment in EA.hy926 and SH-SY5Y cell lines subjected to oxidative stress induced by t-BOOH. Cell viability, reactive oxygen species (ROS), and molecular expression of oxidative stress biomarkers (SOD2, NRF2) and cell death (APAF1, Caspase3) were evaluated. It was observed that the *D. tortuosum* extract, in a dose-dependent manner, was able to reduce the oxidative and cytotoxicity effects induced by t-BOOH, even normalized to a dose of 200 µg/mL, which would be due to the high content of phenolic compounds. Finally, these results are indicators that the extract could be a natural alternative against the cytotoxic exposure of stressful and cytotoxic chemical agents.

**Keywords:** Plant antioxidants, phytochemicals, polyphenols, medicinal plants, vascular endothelium, neuroprotection

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1.** Identificación de compuestos bioactivos por UHPLC/MS en el extracto de *D. tortuosum*
- Figura 1.** Efectos de citoprotección del extracto de *D. tortuosum* en células EA.hy926.
- Figura 2.** Efectos de citoprotección del extracto de *D. tortuosum* en células SH-SY5Y.
- Figura 3.** Efectos antioxidantes del extracto de *D. tortuosum* frente a la producción de ROS inducida por t-BOOH en células EA.hy926.
- Figura 4.** Efectos antioxidantes del extracto de *D. tortuosum* frente a la producción de ROS inducida por t-BOOH en células SH-SY5Y.
- Figura 5.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* sobre la expresión de SOD2 en células EA.hy926.
- Figura 6.** Efecto del extracto de *D. tortuosum*) sobre la expresión de SOD2 en células SH-SY5Y.
- Figura 7.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* sobre la expresión de NRF2 en células EA.hy926.
- Figura 8.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* sobre la expresión de NRF2 en células SH-SY5Y.
- Figura 9.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* sobre la expresión de APAF1 en células EA.hy926.
- Figura 10.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* sobre la expresión de APAF1 en células SH-SY5Y.
- Figura 11.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* sobre la expresión de Caspasa3 en células EA.hy926.
- Figura 12.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* sobre la expresión de Caspasa3 en células SH-SY5Y.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los fármacos y xenobióticos pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y daños mediados por radicales libres que pueden dar lugar a procesos de muerte celular<sup>(1)</sup>. Después de la absorción, el primer tejido afectado es el endotelio vascular, siendo este el primer paso hacia el desarrollo de enfermedades vasculares, como la hipertensión y la aterosclerosis <sup>(2)</sup>. El estrés oxidativo puede provocar alteraciones funcionales del endotelio vascular y así modificar la función y estructura de los tejidos vasculares <sup>(3)</sup>. De hecho, el daño al endotelio vascular es la principal complicación de la diabetes mellitus tipo 2 que conduce a la disfunción endotelial y luego a la nefropatía diabética <sup>(4)</sup>. Por lo tanto, la prevención del estrés oxidativo es actualmente uno de los principales propósitos de la investigación cardiovascular, y las plantas medicinales naturales son una fuente de sustancias activas con aplicaciones prometedoras <sup>(5)</sup>. Durante la última década, varios estudios han demostrado que los antioxidantes vegetales protegen el endotelio contra el estrés oxidativo, una opción efectiva para tratar enfermedades vasculares <sup>(6,7)</sup>.

Enfermedades neurodegenerativas, caracterizadas por disfunción progresiva y senescencia celular de sistemas neuronales específicos, que implican daño estructural y funcional de las neuronas; puede ser causado por el estrés oxidativo <sup>(1,8,9)</sup>. La creciente evidencia reciente sugiere que el estrés oxidativo en las células neuronales contribuye a la neuroinflamación, facilitada por la activación constante de la microglía, lo que induce necrosis neuronal y apoptosis <sup>(8,9)</sup>. Dado que la aparición de un estrés oxidativo parece ser una de las principales causas contribuyentes de las patologías cardiovasculares y neurodegenerativas, la protección de las células, los tejidos y los órganos contra esta condición desafiante es el principal objetivo de muchos estudios que se ocupan de la prevención nutricional y farmacológica de las patologías.

Durante las últimas dos décadas, la extensa investigación sobre los antioxidantes vegetales, especialmente los polifenoles, ha demostrado de manera inequívoca su papel como compuestos bioactivos que protegen contra el estrés oxidativo y previenen o retrasan la aparición de muchas patologías <sup>(5,9,10)</sup>. Por ejemplo, enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 o las complicaciones cardiovasculares tienen como factor común el daño endotelial y, además, se caracterizan por un exceso de radicales libres, estrés oxidativo y citoquinas proinflamatorias creando un ambiente oxidativo y proinflamatorio <sup>(11)</sup>, y algunas alternativas para contrarrestar estos efectos se encuentran plantas

medicinales como *D. tortuosum* que posee una actividad antioxidante debido a su alta concentración en polifenoles, politerpenos y flavonoides y sus metabolitos. Además, continuando con el endotelio vascular, el beneficio mejor establecido de los flavanoles, en particular de las catequinas del cacao, sobre la salud es su efecto positivo sobre la función cardiovascular<sup>(10,12)</sup>, proclamado desde los estudios pioneros de hace dos décadas<sup>(13,14,15)</sup>, hasta las revisiones recientes<sup>(12,16,17)</sup>. Sin embargo, el efecto beneficioso sobre la función cardiovascular no es privativo de los flavanoles o flavonoides en general<sup>(16)</sup> como ya hemos descrito antes, también muchos otros compuestos fenólicos o extractos de plantas han mostrado ese potencial<sup>(18)</sup>. Además, recientemente se ha informado que los metabolitos secundarios de las saponinas y los taninos tienen cierta actividad antioxidante que puede desempeñar un papel importante en la actividad antidiabética<sup>(19)</sup>. De hecho, mediante el uso de una línea de células endoteliales humanas, EA.hy926, se ha demostrado el efecto protector de un extracto de *Silybum marianum*, rico en derivados de flavonol conocidos como flavonolignanos, en células endoteliales cultivadas sometidas a una alta concentración de glucosa<sup>(20)</sup>. En el mismo modelo, el extracto de corteza de tallo de *Vochysia rufa*, rico en azúcares reductores y flavonoides, también mostró una protección significativa contra el daño por glucosa alta<sup>(21)</sup>. De manera similar, los extractos de yerba mate y café verde, así como sus principales ácidos hidroxycinámicos y metabolitos microbianos previnieron una inflamación inducida por TNF- $\alpha$ <sup>(22)</sup>, y más recientemente, se demostró que los flavanoles del cacao protegen a las mismas células EA.hy926 contra una inflamación inducida químicamente<sup>(23)</sup>. Todos estos estudios confirman el efecto protector sobre la función endotelial de extractos vegetales y compuestos antioxidantes puros, además de avalar la fiabilidad del modelo de cultivo celular.

Por otro lado, los efectos preventivos de los antioxidantes polifenólicos en el envejecimiento y la neurodegeneración asociados con el estrés oxidativo han sido ampliamente informados<sup>(1,9,24,25)</sup>. Dado que el cultivo de neuronas primarias es bastante difícil, las líneas celulares establecidas se han utilizado ampliamente para probar el efecto neuroregulador de diferentes compuestos bioactivos y sus efectos específicos a nivel celular y molecular. El neuroblastoma SH-SY5Y, derivado de la línea celular SK-N-SH, es uno de los cultivos de células similares a las neuronales más utilizados y se ha validado recientemente como un modelo simple y confiable de células similares a las neuronales que es susceptible de análisis biológico, investigación bioquímica y electrofisiológica<sup>(26)</sup>. De hecho, utilizando esta línea celular humana como modelo de cultivo de células

neuronales, se ha informado recientemente del efecto quimioprotector de un extracto acuoso de compuestos fenólicos de cacao (principalmente flavanoles) frente a una neurodegeneración inducida por estrés oxidativo <sup>(27)</sup>, así como la de un extracto de *Sambucus nigra* (flor de saúco), rico en flavonoides y ácidos hidroxicinámicos <sup>(28)</sup>.

Por lo tanto, para delinear los posibles mecanismos de protección a través de los cuales los extractos de *D. tortuosum* protegen la función de las células endoteliales y neuronales, se usaron dos líneas celulares humanas, endotelial EA.hy926 y neuroblastoma SH-SY5Y, como modelos de cultivo celular y tratamiento con un fuerte pro-oxidante, terc-butilhidroperóxido (t-BOOH), se utilizó para reproducir una condición de cultivo celular de estrés oxidativo.

### **Objetivo general**

- Evaluar la composición química y el efecto citoprotector y antioxidante del extracto de *Desmodium tortuosum* en células neuronales SH-SY5Y y células endoteliales EA.hy926 frente al daño inducido por t-BOOH.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la caracterización histoquímica del extracto de *Desmodium tortuosum*, por cromatografía líquida LC/MS.
- Evaluar la citoprotección (MTT) producida por el extracto de *Desmodium tortuosum* en células SH-SY5Y y EA.hy926, con daño inducido por t-BOOH.
- Evaluar el efecto antioxidante del extracto de *Desmodium tortuosum* mediante ensayos de estrés oxidativo (ROS) en células SH-SY5Y y EA.hy926, con daño inducido por t-BOOH.
- Evaluar la expresión de genes relacionados a estrés oxidativo por *Desmodium tortuosum* en células SH-SY5Y y EA.hy926, con daño inducido por t-BOOH.
- Evaluar la expresión de genes relacionados a muerte celular por *Desmodium tortuosum* en células SH-SY5Y y EA.hy926, con daño inducido por t-BOOH.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

## 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Las plantas del género *Desmodium* suelen presentar bastante actividad antioxidante, así lo describe François y colaboradores en el 2011<sup>(29)</sup>, en el cual determinaron la cantidad y calidad de sus diversos componentes del *D. Adscendens* evaluados por ABTS (2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazilo) y pruebas celulares, en la cual obtuvieron una correlación directa entre compuesto fenólicos y su actividad antioxidante ( $r = 0,96$ ) concluyendo que esta planta posee potente actividad antioxidante, incrementando el valor terapéutico de la misma.

El extracto etanólico de la hoja del *Desmodium triquetrum*, en un estudio realizado en el 2011 por Kalyanil y colaboradores, tuvo como objetivo conocer su actividad hepatoprotectora y antioxidante del extracto etanólico de dicha planta, la cual, tras análisis bioquímicos dio a conocer su actividad antioxidante al revertir los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticas, infiriendo dicha actividad, a la presencia de flavonoides en la planta<sup>(30)</sup>.

Las plantas medicinales son de gran ayuda terapéutica, así lo demostró Venkatachalam y colaborador en el 2012, al evaluar el modo de acción antioxidante del extracto etanólico de *D. gangeticum* en sus compuestos fenólicos y flavonoides. Algunos de los métodos usados fueron el de DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazilo) en la cual se midió la concentración inhibidora a la que se eliminaron los radicales DPPH. Otro, fue la actividad de radicales de óxido nítrico generado a partir del nitroprusiato de sodio, el cual al interactuar con el oxígeno produjo el ion nitrito el cual fue analizado en el cromatógrafo. También se usó el método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) para permitir calcular el porcentaje de inhibición. Los resultados demostraron la presencia de flavonoides con actividad antioxidante, además sugiere fuertemente que los fenólicos son componentes importantes de esta planta. La capacidad de reacción del radical DPPH se determinó por la disminución de su absorbancia a 515 nm. inducida por antioxidantes; en la actividad del óxido nítrico, el porcentaje de inhibición se incrementó al aumentar la concentración del extracto: El efecto eliminador del radical ABTS (max. 734 nm.) aumentó con la concentración del extracto etanólico. Se concluyó que las hojas de *D. gangeticum* poseen propiedades antioxidantes y podrían servir como inhibidores de radicales libres o antioxidantes primarios<sup>(31)</sup>

En el 2014, Li y colaboradores presentaron un estudio de la especie *D. caudatum*, la cual tenía como objetivo demostrar, por medio de sus compuestos (flavonoides y xantonas), la actividad antiinflamatoria y antioxidante de la planta. Se usó metanol para el extracto, el cual se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice para conocer la concentración de los compuestos que, al tratarse en células dendríticas, inhibió la producción de citosinas inflamatorias. El ensayo de DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazilo) muestra un cambio de color purpura a amarillo ante la presencia de un compuesto antioxidante. El estudio concluyó, la capacidad de eliminación de especies reactivas de oxígeno y su actividad antiinflamatoria de la planta, por lo cual estos resultados justifican los posibles beneficios de los compuestos del *D. caudatum*.<sup>(32)</sup>

Un estudio realizado por Qian-Nan y colaboradores en el 2020, tuvo como objetivo demostrar la actividad antioxidante del *D. caudatum* en nuevos compuestos fenólicos. El extracto de la planta, obtenido con etanol, permitió aislar compuestos como flavonoides y descaudatina (glucósido fenólico no descrito). Se utilizó el ensayo de DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazilo), el cual es preciso para valorar grupos oxidables de antioxidantes, en los compuestos aislados, dando como resultado para la descaudatina, un IC<sub>50</sub> (actividad antioxidante) de 58,59 µM, mucho mayor comparado con el control positivo. El estudio concluyó, que algunos de los compuestos presentaron una potente actividad antioxidante y otros una actividad moderada al eliminar especies reactivas de oxígeno<sup>(33)</sup>

La actividad antioxidante del *D. velutinum* fue demostrado en un estudio de Chinenye y colaboradores en el 2018, donde evaluaron los constituyentes del extracto metanólico de la corteza del tallo de esta planta y el efecto sobre el estado antioxidante en ratas intoxicadas. Se aplicaron análisis fitoquímicos cualitativos y cuantitativos para los componentes, y uno de los métodos utilizados en los roedores, para el efecto, fue la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA). Los resultados revelaron al análisis fitoquímico, la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, glucósidos, esteroides, carotenoides, antocianinas, terpenoides y fenoles. Los roedores tratados con el extracto presentaron un nivel más bajo de MDA en comparación con las no tratadas, concluyendo así que el extracto de *D. velutinum* presenta compuestos que poseen actividad antioxidante y reducen la peroxidación lipídica en ratas intoxicadas.<sup>(34)</sup>

Ayoola y colaboradores en el 2018, evaluaron el perfil fitoquímico, la toxicidad, y las actividades antioxidantes y antiulcerosas, del extracto metanólico del tallo y hoja del *Desmodium adscendens*, el cual se preparó por procesos de maceración. La actividad antioxidante fue realizada por medio del ensayo DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazilo) y el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP), para la actividad citoprotectora se usó un modelo de ulcera inducida por etanol, mientras que la toxicidad se evaluó observando la mortalidad de ratones. Los resultados demostraron la presencia de glucósidos, alcaloides, taninos y saponinas en tallos y hojas de la planta, el cual presenta actividad antioxidante media y actividad citoprotectora significativa, concluyendo que dicha planta presenta una importante actividad citoprotectora contra la ulceración, la cual puede estar relacionada con la actividad antioxidante. <sup>(35)</sup>

Los antioxidantes son sustancias químicas que interactúan con los radicales libres, neutralizándolas y evitando así causar daños. En un estudio, Siju y colaboradores en el 2019, tuvieron como objetivo demostrar la propiedad antioxidante del *Desmodium triquetrum*. Se realizó por medio del ensayo de potencia reductora y el ensayo DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazilo), la cual mostró como resultado una muy buena actividad antioxidante en comparación con el ácido ascórbico. Se le atribuyó dicha actividad antioxidante a la presencia de flavonoides en la planta, la cual demostró también actividad anticancerígena. <sup>(36)</sup>

El *Desmodium adscendens* es muy usado en la medicina tradicional, por lo cual Pascal y colaboradores en el 2020, realizaron estudios en el extracto acuoso de dicha planta, para probar sus propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras en hepatocitos de ratas. Se realizaron cinco ensayos de antioxidantes químicos para dicha propiedad, mientras que para la hepatotoxicidad se evaluó midiendo la viabilidad celular y el contenido de malondialdehído (MDA) como marcador de la peroxidación de la membrana lipídica. Sus resultados mostraron un efecto citoprotector en células hepáticas al aumentar el porcentaje de viabilidad celular y disminuir la formación de malondialdehído, además de presentar una capacidad antioxidante. Se concluyó que el extracto acuoso del *Desmodium adscendens* posee una gran actividad antioxidante y efecto hepatoprotector ante lesiones hepáticas. <sup>(37)</sup>

El estudio realizado por Francois y colaboradores en el 2015, tuvo como objetivo evaluar la seguridad y el efecto protector del extracto de *D. adscendens* en células hepáticas (HepG2). Se utilizó el extracto hidroalcohólico sometido a pruebas de

viabilidad celular MTS 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio, ensayos de citotoxicidad de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y estudios de morfología celular para determinar los efectos de la planta en la célula. Los resultados revelaron que el *D. adscendens* a dosis de 100 mg/ml disminuyó significativamente la viabilidad celular y en dosis de 1 mg/ml o 10 mg/ml protegió a la célula ante un estrés oxidativo, concluyendo que el uso de *D. adscendens* como planta medicinal por su actividad antioxidante debe ser usada para la salud, pero en bajas dosis.<sup>(38)</sup>

En el 2020, Ezealigo y colaboradores, evaluaron el extracto metanólico del *Desmodium ramosissimum* para investigar su contenido fenólico total y contenido total de flavonoides, así como determinar su capacidad antioxidante. Se realizó mediante el método de capacidad antioxidante total (TAC), el DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidrazilo) y el poder antioxidante reductor férrico (FRAP). Los resultados revelaron niveles elevados de contenido fenólico y contenido de flavonoides en algunas fracciones del extracto. La cantidad de flavonoides por medio del ensayo DPPH, obtuvo una captación de radicales de 86 %. Por todo ello, concluyeron que el *D. ramosissimum*, es considerado como una fuente rica en antioxidantes naturales, justificando así su uso farmacológico.<sup>(39)</sup>

El extracto etanólico del *D. Molliculum* respecto a su actividad antiinflamatoria y analgésica, descrito por Poma en 2018, mediante el ensayo de edema plantar y la prueba de placa caliente demostró actividad antiinflamatoria significativa para la especie, mas no presento efecto analgésico en ninguna concentración.<sup>(40)</sup>

*Desmodium gangeticum*(DG) pertenece a la familia *Leguminosae*, y se ha utilizado en diversos países subtropicales como parate de la medicina tradicional para eliminar la estasis sanguínea, activar la circulación sanguínea y reducir la inflamación. También se han documentado sus efectos antioxidantes y su capacidad de reducir afecciones digestivas como úlceras gástricas en animales de experimentación. De ahí que, en el 2022, Chen y colaboradores observaron los efectos del extracto de esta planta en células pulmonares A549. Se analizaron los efectos del extracto sobre la viabilidad celular, el ciclo celular y la apoptosis de las células A549. Los hallazgos mostraron que DG puede inhibir el crecimiento de células de pulmón humano A549 de una manera dependiente de la concentración y el tiempo. La DG detuvo las células A549 en la fase G1 al aumentar la expresión de

las proteínas p21, p27, ciclina D1 y ciclina E. Además, la DG disminuyó la expresión de las proteínas ciclina A, B1 y Cdc 2<sup>(41)</sup>.

Se evaluó la actividad dual hipoglucemiante e hipolipidémica de la raíz, tallos y hojas de *Desmodium caudatum*, que se utilizan para la medicina tradicional china. Se prepararon doce extractos con diferentes condiciones de extracción y se encontró que presentaban actividades inhibitorias potenciales de la fructosa-1, 6-bisfosfatasa (FBPasa),  $\alpha$ -glucosidasa y lipasa pancreática. Además, promovieron el consumo celular de glucosa y reducir el contenido celular de lípidos. El flavonoide 8-prenilquercetina extraído de *D. caudatum* exhibió una potente inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (IC<sub>50</sub>=4,38  $\mu$ M) y fue capaz de promover el consumo de glucosa y reducir el contenido de lípidos<sup>(42)</sup>.

Xu y colaboradores en el 2021 aislaron de la planta entera de *Desmodium caudatum* Descaudatine A y diez flavonoides. Los compuestos exhibieron potentes actividades antioxidantes con IC<sub>50</sub>=58,59  $\mu$ M, que se aproximaron a las del control positivo vitamina C (IC<sub>50</sub>=46,32  $\mu$ M). Mientras tanto, otros compuestos mostraron actividad antioxidante moderada con el IC<sub>50</sub>=173,9  $\mu$ M. Además, los compuestos fenólicos inhibieron la proliferación de células HeLa con IC<sub>50</sub>=56,14  $\mu$ M<sup>(43)</sup>.

*Desmodium triquetrum* (Fabaceae) es una planta muy importante usada como remedio a base de hierbas. El estudio realizado por Vedpal y colaboradores se centra en el aislamiento, estudios *insilico* e *in vitro* de dos alcaloides (5-(4-[(metilcarbamoil) amino]-2-oxopirimidin-1(2 H)-il) tetrahydrofurano-2 -il) metil metil carbamato y 13-docosenamida. *In silico* se ha realizado un estudio de acoplamiento molecular, y ambos compuestos han mostrado una perfecta afinidad de unión a las enzimas TNF  $\alpha$ , IL-4, IL-13 y 5 LOX. Los compuestos también exhibieron puntuaciones G y valores de energía Glide comparables en comparación con la dexametasona estándar. Además, ambos compuestos han sido probados para el ensayo antioxidante *in vitro* utilizando el método ABTS y DPPH y los resultados se compararon con el ácido ascórbico estándar, mostrando actividad antioxidante significativa respecto al ácido ascórbico<sup>(44)</sup>.

## 2.2. BASES TEÓRICAS

### 2.2.1. Género *Desmodium*

### **a. Generalidades**

El género *Desmodium* es un gran miembro de la familia *Papilionaceae* (Fabaceae). Contiene unas 350 especies que se distribuyen principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo <sup>(45)</sup>. La mayoría de sus plantas son hierbas, arbustos o subarbustos, pero rara vez son árboles. Además de su uso popular como alimento, también se utilizan en la medicina tradicional. Más de 20 especies de este género tienen un efecto antifebril muy importante <sup>(46)</sup>. La decocción de agua de plantas de *Desmodium* ha sido ampliamente utilizada para tratar diversas enfermedades como asma, fiebre tifoidea, inflamaciones, malaria, desnutrición infantil, disentería, pirexia. Por ejemplo, *Desmodium styracifolium* es una importante planta medicinal que se ha utilizado para tratar la colopania, algunos tipos de enfermedades urinarias como la coleditiasis, la sensación de ardor al orinar y el edema <sup>(47)</sup>.

Debido a sus versátiles usos medicinales tradicionales, se han realizado un número creciente de estudios fitoquímicos en plantas de *Desmodium*. Se han aislado más de 200 compuestos, incluidos flavonoides, alcaloides, esteroides, terpenoides, fenilpropanoides y otros constituyentes de las especies de este género, pero solo se ha evaluado la actividad biológica de una parte de ellos. Los flavonoides y alcaloides se consideran los principales constituyentes y quizás los responsables de la mayoría de las actividades mostradas por las plantas de este género <sup>(48-50)</sup>. Además, tanto *in vivo* como *in vitro* han indicado que los extractos de plantas de *Desmodium* poseían una amplia gama de propiedades farmacológicas, incluida la mejora de las funciones cardiovasculares y cerebrovasculares y la regulación del sistema inmunitario, así como propiedades antiinflamatorias, citotóxicas, antiparasitarias, antidiabéticas, antinefrolíticas, antibacterianas y nootrópicas <sup>(51,52)</sup>.

### **b. Uso tradicional**

El uso de especies de *Desmodium* con fines etnomedicinales data desde hace 3000 años. Según la teoría de la medicina tradicional china, las hierbas del género *Desmodium* se han utilizado principalmente para aliviar la fiebre, neutralizar toxinas, inhibir el dolor, vigorizar la circulación sanguínea, suprimir la tos y aliviar la disnea <sup>(53)</sup>. Basado en el sistema de medicina chino e indio, la mayor parte de las especies de *Desmodium* se pueden utilizar para tratar tipos de enfermedades como pirexia, reumatismo, ostealgia, hemoptisis, tos, absceso, resfriado común, heridas, hepatitis

ictérica, faringitis, desnutrición infantil, disentería, enfermedades urinarias, parotiditis, colecistitis, paludismo, encefalitis epidémica, etc. <sup>(54)</sup>. Un uso médico tradicional característico de estas especies es para tratar todo tipo de heridas como quemaduras, escaldaduras, mordeduras, traumatismos y también aliviar las complicaciones de estas heridas como son la inflamación y la formación de abscesos<sup>(55)</sup>.

### ***c. Preparaciones tradicionales medicinales del género Desmodium***

La planta entera es la más utilizada, seguida de las raíces y las hojas. El modo habitual de preparación es la decocción, un método de extracción por ebullición de material vegetal disuelto, que puede administrarse por vía oral o tópica. En general, la planta entera se extrae con agua y se toma por vía oral, mientras que la hoja fresca se muele directamente para obtener jugo y se usa por vía tópica. Ocasionalmente, el material vegetal puede tomarse directamente por vía oral. Por ejemplo, las hojas de *Desmodium triangulare* se toman directamente para tratar la diarrea. También *Desmodium* puede cocinarse con carne de cerdo o pollo y comerse como verdura, no con fines nutritivos, sino como remedio para una determinada dolencia, como *Desmodium microphyllum* y *Desmodium styracifolium*, cuya planta entera se cocinó y tomó como alimento para tratar la desnutrición infantil, mientras que *Desmodium sequax*, se aplica para tratar la tuberculosis pulmonar <sup>(56)</sup>.

### ***d. Fitoquímica***

Los estudios fitoquímicos se han centrado principalmente en las especies *Desmodium adscendens*, *Desmodium blandum*, *Desmodium canum*, *Desmodium caudatum*, *Desmodium gangeticum*, *Desmodium gyrans*, *Desmodium microphyllum*, *Desmodium oxyphyllum*, *Desmodium podocarpum*, *Desmodium pulchellum*, *Desmodium sambuense*, *Desmodium styracifolium* *tiliaefolium*, *Desmodium triflorum* y *Desmodium uncinatum*. Hasta el momento, se han aislado e identificado un total de 81 flavonoides, 40 alcaloides, 14 terpenoides, 13 esteroides, 10 fenoles, 8 fenilpropanoides, 2 glucósidos y varios aceites volátiles, que representan un amplio espectro de clases de metabolitos secundarios, de especies de *Desmodium*. Las investigaciones fitoquímicas en esas especies mostraron que los flavonoides y los alcaloides son los principales metabolitos de este género.

El género *Desmodium* es rico en flavonoides, especialmente en isoflavonoides. Los principales tipos de flavonoides encontrados en las plantas de *Desmodium* fueron flavonas, flavonoides de 7, 8-prenil-lactona, flavonoles, flavan-3-oles y flavanonoides, mientras que los isoflavonoides de *Desmodium* incluyen isoflavonas, isoflavanonas, pterocarpans y cumaronocromona. Se aislaron un total de 40 alcaloides de especies de *Desmodium* y se caracterizaron principalmente como alcaloides de indol, seguidos de alcaloides de feniletilamina, alcaloides de pirrolidina, alcaloides de amida y alquilamina simple. Además de flavonoides y alcaloides, se ha informado sobre una variedad de terpenoides, esteroides, fenoles, fenilpropanoides, glucósidos y aceites volátiles del *Desmodium*.

#### ***e. Actividad antioxidante***

Se ha demostrado que el extracto acuoso y metanólico del *Desmodium adscendens* posee una considerable actividad antioxidante <sup>(57)</sup>. También se observó que diversos extractos de *Desmodium triflorum*, fueron capaces de reducir la actividad de los radicales DPPH con capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) de 0,4 mg. Otros estudios han mostrado que el pretratamiento de ratas con 0,5 y 1,0 g/kg de extracto de *Desmodium triflorum* aumentaron significativamente las actividades de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa <sup>(58)</sup>.

*Desmodium gangeticum* es una planta con una potente actividad de eliminación de DPPH <sup>(59)</sup>. La fracción de acetato de etilo del extracto alcohólico de *Desmodium gangeticum* (100 mg/kg) mostró una mejora significativa de la función cardíaca y una reducción en la liberación de lactato deshidrogenasa en el efluente coronario, así como una reducción en el nivel de malondialdehído en los tejidos miocárdicos <sup>(60)</sup>.

La actividad antioxidante del extracto alcohólico de *Desmodium styracifolium* se evaluó por método fotométrico. El porcentaje de captación de este extracto sobre el radical hidroxilo, radical superóxido, radical libre del humo del cigarrillo y el efecto inhibitor sobre la peroxidación lipídica fueron del 60,7 %, 87,5 %, 21,1 % y 31,6 % respectivamente <sup>(61)</sup>.

#### ***f. Efecto sobre el sistema cardiovascular***

Varios estudios han demostrado que *Desmodium gangeticum* posee actividad cardioprotectora <sup>(62)</sup>. La coadministración oral de la decocción acuosa de raíces de

*Desmodium gangeticum* (0,1 mg/kg) con insulina (40  $\mu$ U/g) en una proporción de 1:1 (v/v) mostró una recuperación significativa del corazón isquémico de la disfunción contráctil inducida por reperfusión en corazones de ratas diabéticas en comparación con insulina o *Desmodium gangeticum* solos. La recuperación de la presión arterial media, la frecuencia cardíaca y la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo fueron más rápidas en corazones de rata pretratados por vía oral con insulina mezclada con *Desmodium gangeticum* que con la administración única de insulina o extracto de raíz de *Desmodium gangeticum*. Aunque la insulina administrada por vía oral mezclada con extracto de raíces de *Desmodium gangeticum* mostró un efecto hipoglucemiante lento pero prolongado, la cardioprotección que proporcionó fue más significativa que cuando se administró por inyección intraperitoneal, lo que indicó que la mezcla de insulina y *Desmodium gangeticum* pueden superar las barreras del tracto gastrointestinal y ser efectivamente absorbido <sup>(63)</sup>.

### 2.2.2. *Desmodium Tortuosum*

La *Desmodium tortuosum* (Sw.) es una planta que pertenece a la familia de las Fabaceae <sup>(40)</sup>. Es una planta de 1 a 2 m de alt., con tallos verdes, variables en densidad, curvos. Hojas trifolioladas, elípticas, ovaladas, algo cuneados y con algunos pelos. Sus estipulas son persistentes, ovadas y ciliadas. Peciolos con estrías, persistentes, triangulares. Presenta inflorescencias en racimos axilares y terminales. Sus flores pueden ser blanco-rosados o violáceos. El fruto es una legumbre con 2 a 8 artejos ovalados, se adhieren fácilmente a la ropa y a los animales, el fruto posee abundantes semillas <sup>(64-65)</sup>.

**Toxicología:** Las especies del género *Desmodium* han demostrado ser relativamente seguras y no tóxicas. En un estudio para *Desmodium molliculum*, los resultados del bioensayo de toxicidad muestran una concentración letal media, DL50 de 100,427  $\mu$ g/mL. Otro estudio del género, ha demostrado que la administración del extracto acuoso de *Desmodium molliculum* en concentraciones de 500, 1000 y 2000 mg/ kg no provoca muerte de los animales, ni síntomas indicativos de toxicidad. Los diversos estudios realizados en el género *Desmodium* en cuanto a la toxicidad aguda han coincidido en que la DL50 de este género se encuentra por encima de 2000 mg/kg de masa corporal. Solo se han documentado parámetros como picazón, peso

corporal, reacción cutánea, hiperactividad o sedación. No se observó mortalidad después de la administración oral de la dosis más alta (2000 mg/kg) de extracto.

### **2.2.3. Distribución geográfica**

Se extiende desde los Estados Unidos de América hasta la Argentina, suele crecer en dunas costeras, húmedas y en zonas de vegetación como la selva baja y alta. Además, florece y fructifica de junio a abril <sup>(64-65)</sup>.

### **2.2.4. Células SH-SY5Y**

Las líneas de células cancerosas de origen tisular humano se han utilizado ampliamente para investigar la actividad antiproliferativa y la toxicidad de extractos de hierbas, compuestos aislados y fármacos contra el cáncer. Estas líneas celulares están bien caracterizadas genética y/o epigenéticamente para determinar la expresión alterada de proteínas dentro de rutas celulares dadas y genes críticos en el cáncer. La línea celular de neuroblastoma, originalmente derivó de una biopsia de metástasis de tumor óseo, es una sublínea de la línea parental SK-N-SH, contiene una mezcla de células flotantes y adherentes igualmente viables <sup>(66,67)</sup>.

### **2.2.5. Células EA.hy926**

La línea celular de la vena umbilical humana, EA.hy926, se estableció mediante la fusión de células primarias de la vena umbilical humana con un clon resistente a la tioguanina de A549 mediante exposición a polietilenglicol (PEG). Los clones híbridos se seleccionaron en medio HAT (hipoxantina/aminopterin/timidina) y se rastrearon para el antígeno relacionado con el factor VIII. Esta línea celular es ampliamente usada en estudios relacionados a trastornos cardiovasculares y diabetes <sup>(66,67)</sup>.

### **2.2.6. Especies reactivas de oxígeno**

Los radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) son generados *in vivo* como productos del metabolismo normal, mediante mecanismos donde participan enzimas y células; en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno. El exceso de ROS tiene efectos nocivos graves que afectan los componentes celulares como lípidos, proteínas y ADN, conduciendo a estrés oxidativo, que está referido al desequilibrio entre las

concentraciones de ROS y el mecanismo de defensa antioxidante propio del organismo <sup>(66,67)</sup>.

Cuando se pierde el equilibrio oxidante-antioxidante se genera estrés oxidativo, se dañan macromoléculas esenciales para llevar a cabo las funciones normales de la célula lo cual puede traducir en diversos procesos patológicos.

### **2.2.7. Apoptosis**

La apoptosis o “Programmed Cell Death” (PCD) ocurre en un momento específico del desarrollo embrionario y también en los tejidos adultos. Los tejidos se remodelan mediante apoptosis bajo control genético sin dañar el tejido circundante. Tanto la mitosis (proliferación) como la apoptosis, durante la formación de los tejidos, están reguladas genéticamente. En su regulación intervienen diversos estímulos y vías metabólicas que conducen a la muerte de las células sin perjuicio para los tejidos circundantes. El mecanismo es activo y requiere energía que es provista por las mitocondrias en forma de ATP, con la intervienen factores genéticos <sup>(66,67)</sup>.

### **2.2.8. Las caspasas**

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Existen dos grupos de caspasas, las iniciadoras y las ejecutoras. Las primeras son activadas por autoproteólisis, las segundas son activadas mediante el corte específico mediado por caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis <sup>(66,67)</sup>.

## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

### **3.1. Tipo de Investigación**

Es una investigación experimental, debido a que describirán los efectos citoprotectores, antioxidante y antiinflamatorio de *Desmodium tortuosum* y métodos de análisis que se utilizarán.

### **3.2. Consideraciones éticas**

No corresponde

### **3.3. Diseño metodológico**

#### **3.3.1. Lugar de ejecución**

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Animal y la Estación Experimental IVITA-Pucallpa de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.3.2. Reactivos y químicos**

Los compuestos tert-Butil hidroperóxido (t-BOOH), gentamicina, penicilina G y estreptomina se adquirieron de Sigma Chemical Co. (Madrid, España). El acetonitrilo, el metanol de grado HPLC, el dimetilsulfóxido (DMSO) de grado analítico y todos los demás reactivos habituales de laboratorio se adquirieron de Panreac (Barcelona, España). Los medios de cultivo DMEM y el suero fetal bovino (FBS) fueron de Cultek (Madrid, España). Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), diacetato de 4-amino-5-metilamino-2,7-difluorofluoresceína (DAFM-DA), 3-[4,5 dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, D8537) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Nucleo-spin-RNA, qPCRBIO-cDNA-síntesis y ICgreen-amplification-PCR se obtuvieron de Cultek (Madrid, España). Todos los demás reactivos químicos utilizados fueron de alta pureza para biología celular y molecular y estaban disponibles en el laboratorio.

#### **3.3.3. Selección de plantas y preparación de extractos**

El material biológico vegetal fue colectado en el distrito de Monte Alegre, provincia Padre Abad, región Ucayali, Perú coordenadas 0498477LS - 9030950LW, a una altitud de 194 m.s.n.m.; Se recolectaron 10 kilogramos de tallos y hojas (número de comprobante RS978). En el Herbario Regional Ucayali IVITA Pucallpa (HRUIP), las plantas fueron secadas, herbalizadas, ensambladas y se realizó la verificación taxonómica de las especies por comparación con muestras existentes y el uso de bibliografía especializada, comprobante número RS978, perteneciente a la especie *D. tortuosum* (SW) DC., de la familia Fabaceae y fue ingresada al Herbario con el número de registro 12208.

Los tallos y las hojas se recogieron y lavaron en su totalidad, se secaron al aire libre hasta peso constante y se redujeron a un polvo fino. La decocción se desarrolló colocando agua destilada y material vegetal en polvo (10:1) en un vaso de precipitados, calentando hasta hervir y manteniendo durante veinte minutos. El material vegetal agotado por la extracción se separó por filtración y el extracto acuoso se concentró y liofilizó para su conservación.

#### **3.3.4. Caracterización química del extracto**

Brevemente, se diluyeron 20 mg de la muestra con 20 ml de metanol. La mezcla se ultrasonicó durante 10 min. Luego, se filtró a 0,25  $\mu\text{m}$  y se inyectaron 3  $\mu\text{L}$  en un sistema UHPLC (Dionex Ultimate 3000 UHPLC system, Thermo Scientific, EE. UU.). La columna era Luna<sup>®</sup> Omega C18 100 Å, Phenomenex (150 x 2,1 mm, 1,6  $\mu\text{m}$ ), temperatura 40 °C, caudal 0,25 ml/min y eluyentes H<sub>2</sub>O 1 % HCOOH y acetonitrilo 1 % HCOOH. El sistema UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas QExactive PLus (Thermo Scientific, EE. UU.). Los parámetros completos de escaneo de MS estaban en el rango de 120-1500 m/z, resolución 70000, microescaneos 1, objetivo AGC de  $1 \times 10^6$  e IT máximo de 100ms. La resolución MS<sup>2</sup> de los parámetros era 17500, el objetivo de AGC de  $2 \times 10^5$  y el TI máximo de 50 ms. Los parámetros de la fuente de ionización fueron ESI (negativo/positivo), voltaje de pulverización 2,5/3,0, temperatura capilar 280 °C, portador de gas N<sub>2</sub> (tasa de flujo del gas envolvente: 40, tasa de flujo del gas auxiliar: 10), temperatura del calentador de gas de 350 °C, Nivel de RF de lente S de 100 y energía de colisión normalizada de 20, 40, 60. Los valores m/z de los iones detectados en el ESI-MS completo (positivo y/o negativo) y los principales fragmentos observados en el MS/MS espectros, el error en ppm también se indica para el cálculo de la fórmula molecular ( $\leq 5$  ppm).

#### **3.3.5. Cultivo celular y tratamientos**

Las líneas celulares endotelial EA.hy926 y de neuroblastoma humano SH-SY5Y (no diferenciada) se obtuvieron de forma comercial de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). Ambas líneas celulares se cultivaron y se pasaron en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % y 50 mg/l de cada uno de los siguientes antibióticos: gentamicina, penicilina y estreptomina. Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada que contenía 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire a 37 °C; el medio de cultivo se cambió cada dos

días para eliminar las células muertas y no adheridas y las placas generalmente se dividieron 1:3 cuando alcanzaron la confluencia.

Las diferentes concentraciones del extracto de *D. tortuosum* (1, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL) se disolvieron en medio de cultivo y se agregaron a las placas celulares. Para evaluar el efecto protector de las concentraciones de extracto frente a una agresión oxidativa, se llevaron a cabo dos enfoques diferentes, cotratamiento y pretratamiento. En el ensayo de cotratamiento conjunto, las células EA.hy926 y SH-SY5Y se trataron simultáneamente durante 22 h con 100 µM det-BOOH más cualquiera de las diferentes concentraciones; mientras que en el ensayo de pretratamiento, las células se trataron primero con las dosis indicadas de extracto durante 18 h, luego se lavaron y se sometieron a un medio nuevo que contenía 200 µM de t-BOOH durante 4 h, después de lo cual los cultivos celulares se procesaron para cada ensayo <sup>(68)</sup>.

### **3.3.6. Evaluación de la viabilidad celular (MTT)**

El ensayo de viabilidad celular se basa en la capacidad de la actividad mitocondrial para reducir el reactivo MTT, que se determina mediante colorimetría <sup>(69)</sup>. Brevemente, después de los tratamientos, se agregaron 50 µL del reactivo MTT (0,5 mg/mL, concentración final) a cada pocillo durante 2 h, en las mismas condiciones de incubación (humedad, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % oxígeno). Durante estas 2 h, las células EA.hy926 y SH-SY5Y metabólicamente activas redujeron el tetrazolio-MTT (amarillo) a una sal de formazán (púrpura). La absorbancia se midió a 540 nm utilizando un lector de microplacas SPECTROstar BMG. La viabilidad celular se calculó como un porcentaje de células sin extracto (100%).

### **3.3.7. Producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

El estrés oxidativo se puede evaluar por los niveles de producción celular de ROS. La producción de ROS se determinó de acuerdo con protocolos ampliamente estandarizados <sup>(70,71)</sup> mediante el ensayo DCFH-DA utilizando un lector de microplacas de fluorescencia. DCFH-DA ingresa a la célula y es hidrolizado por esterasas intracelulares que permiten la liberación de DCFH y su reacción con ROS para generar DCFH (compuesto fluorescente). Al cuantificar la fluorescencia, se obtuvo una estimación justa de las especies de oxígeno generales generadas en las diferentes condiciones. Brevemente, se añadió DCFH-DA (10 µM, disuelto en

DMSO) a cada pocillo ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) en condiciones de incubación similares (humedad, 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de oxígeno) en una microplaca multipocillo negro. placa durante 30 min. Las placas multipocillo se midieron inmediatamente usando un lector de microplacas fluorescentes (FLx800 Fluorimeter, BioTek, Winooski, VT, EE. UU.) con una excitación  $\lambda$  de 485 nm y una emisión  $\lambda$  de 530.

### 3.3.8. *Extracción/purificación de ARN, síntesis de ADNc y PCR en tiempo real*

Después de los tratamientos, se obtuvo el ARN total utilizando el NucleoSpin®-RNA-Plus (Macherey-Nagel, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de ARN total se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nabi UV/Vis Nano (Microdigital, Seúl, Kr, Corea), obteniendo relaciones A260/A280  $> 1,9, 2,1 <$  en todas las muestras. El ADNc se sintetizó a partir de 1  $\mu$ g de ARN total mediante transcripción inversa (RT) usando el kit de síntesis de ADNc qPCRBIO (PCRBiosystems, PA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, comenzando con un paso de eliminación de ADN genómico. Finalmente, el cDNA se diluyó 1:10 en agua libre de nucleasas y se almacenó a -80 °C para su posterior análisis. Se realizaron ensayos de PCR cuantitativos en tiempo real para evaluar la expresión del mRNA de los genes de estrés oxidativo SOD2 y NRF2, y de muerte celular APAF1 y Caspase 3. La amplificación de cDNA se realizó mediante un sistema de PCR en tiempo real (BioRad CFX, CA, EE. UU.), usando ICgreen qPCR Mastermix (Nippon Genetics, Duren, alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la RT-PCR fue necesario utilizar cebadores con concentraciones de 400 nM, y se programó el protocolo de termociclado a 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 5 s a 95 °C, y 30 s a 60 °C.

Los cebadores “forward y reverse” fueron SOD2: 'CCACTGCTGGGGATTGATGT' 'CGTGGTTTACTTTTTGCAAGCC'; NRF2: 'CTGGTCATCGGAAAACCCCA' 'TCTGCAATTCTGAGCAGCCA'; APAF1: 'TCTTCCAGTGGTAAAGATTCAGTT' 'CGGAGACGGTCTTTAGCCTC'; Caspase3: 'GTGGAGGCCGACTTCTTGTA' 'TTTCAGCATGGCACAAAGCG'. Se usó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de normalización y se extrajeron las eficiencias de los datos sin procesar usando el software LinRegPCR.<sup>(72)</sup>

### **3.4. Unidad de análisis**

Células neuronales SH-SY5Y y células endoteliales EA.hy926

### **3.5. Población de estudio**

Cultivos celulares neuronales humanas SH-SY5Y de European Collection of Authenticated Cell Cultures, Sigma-Aldrich.

Cultivos celulares endoteliales EA.hy926 de European Collection of Authenticated Cell Cultures, Sigma-Aldrich.

### **3.6. Muestra**

Se utilizarán los extractos de las plantas *Desmodium tortuosum*, obtenidos de muestras de tallos y hojas seleccionados (10kg) que sean estabilizados a 40°C por tres días, y posteriormente trozado y macerado en etanol 96° por una semana hasta el filtrado y desecado.

### **3.7. Criterios de selección**

#### **3.7.1. Criterios de inclusión**

Los extractos con la certificación correspondiente donde se indique la especie.

Células inmortales

Líneas celulares estandarizadas

#### **3.7.2. Criterios de exclusión**

Los extractos sin la certificación correspondiente.

Cultivos primarios

Células no diferenciadas

Para cada experimento independiente se ha utilizado 100 g de maíz amarillo duro que fue contaminado y utilizados en el presente estudio, y los tratamientos fueron realizados por triplicado, teniendo en consideración el teorema de límite central.

### **3.8. Instrumentos de recolección de datos**

Fichas de recolección de datos elaboradas por la tesista

Lector de microplacas UV-VIS

Espectrofluorímetro  
 Termociclador a tiempo real  
 Software Origin Pro 9.0  
 GraphPad Prism 6.0

### 3.9. Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos obtenidos de los estudios de cultivos celulares se realizó de la siguiente manera: antes del análisis, se analizó la homogeneidad de las varianzas de los datos mediante la prueba de Levene; para comparaciones múltiples, ANOVA unidireccional fue seguido por una prueba *post hoc* de Tukey cuando las varianzas eran homogéneas. El nivel de significación fue  $P < 0,05$ . Se utilizó un programa GraphPad Prism versión 6.0.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### 4.1. Análisis químico del extracto de *D. tortuosum*

Se identificaron treinta compuestos en *D. tortuosum* en función de su tiempo de retención relativo, espectros de masas y estándares comerciales. La Tabla 1 muestra el tiempo de retención (RT), la fórmula molecular, la masa exacta del ion molecular  $[M - H]^-$  después de la ionización negativa-positiva y los fragmentos MS<sup>2</sup> de los principales compuestos identificados en *D. tortuosum* por UHPLC/MS. El mayor número de compuestos identificados fueron ácidos fenólicos y flavonoides, y en menor medida compuestos derivados del ácido linoleico, entre otros.

**Tabla 1.** Identificación de compuestos bioactivos por UHPLC/MS en el extracto de *D. tortuosum*

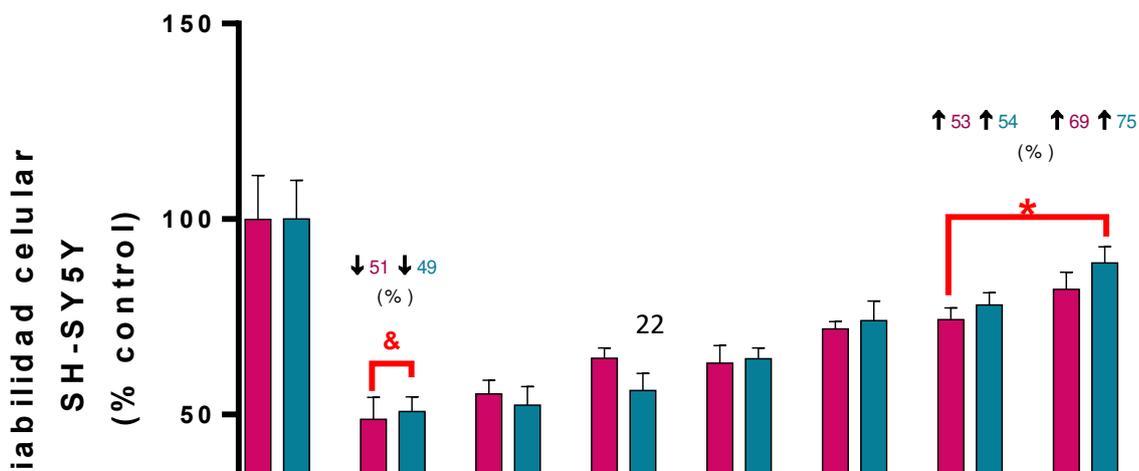
Compuesto Identificado	Tiempo de Retención (min)	Formula Molecular	MS-ESI <sup>-</sup>	MS <sup>2</sup>	MS-ESI <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup>	Masa Nominal
<b>ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS E HIDROXICINATOS</b>							
Ácido 4-cumárico	8.79	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163	119, 93			164
<b>CAROTENOIDES</b>							
Loliolida	9.60	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>			197	179, 161, 135, 133	196

#### **4.2. Viabilidad Celular**

El primer parámetro para determinar la citoprotección potencial de los extractos de *D. tortuosum* fue la viabilidad celular después de un desafío oxidativo por t-BOOH. Se probaron concentraciones de extracto de 1, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL para determinar su capacidad citoprotectora. Como se muestra la exposición a t-BOOH provocó una disminución significativa de la viabilidad celular de alrededor del 62 % en las células EA.hy926 (Figura 1), y del 50 % en las células SH-SY5Y (Figura 2). Las concentraciones crecientes de extracto provocaron una recuperación parcial pero significativa dependiente de la dosis de la viabilidad celular en las dos líneas celulares tanto en el cotratamiento como en el pretratamiento. Las concentraciones de extracto de 100 µg/mL y superiores aumentaron significativamente la viabilidad de las células SH-SY5Y tanto en el cotratamiento como en el pretratamiento (Figura 2), y en el

pretratamiento de EA.hy926 (Figura 1), mientras que las concentraciones de 50  $\mu\text{g/mL}$  y superiores eran necesarias para recuperar significativamente la viabilidad de las células EA.hy926 en el tratamiento conjunto (Figura 1). La recuperación más alta de la viabilidad celular del daño oxidativo se observó en el cotratamiento y pretratamiento con 200  $\mu\text{g/mL}$  de extracto en SH-SY5Y (Figura 2). Una vez asegurado el efecto citoprotector de algunas de las concentraciones ensayadas del extracto, se procedió al estudio del estado redox y respuesta antioxidante.

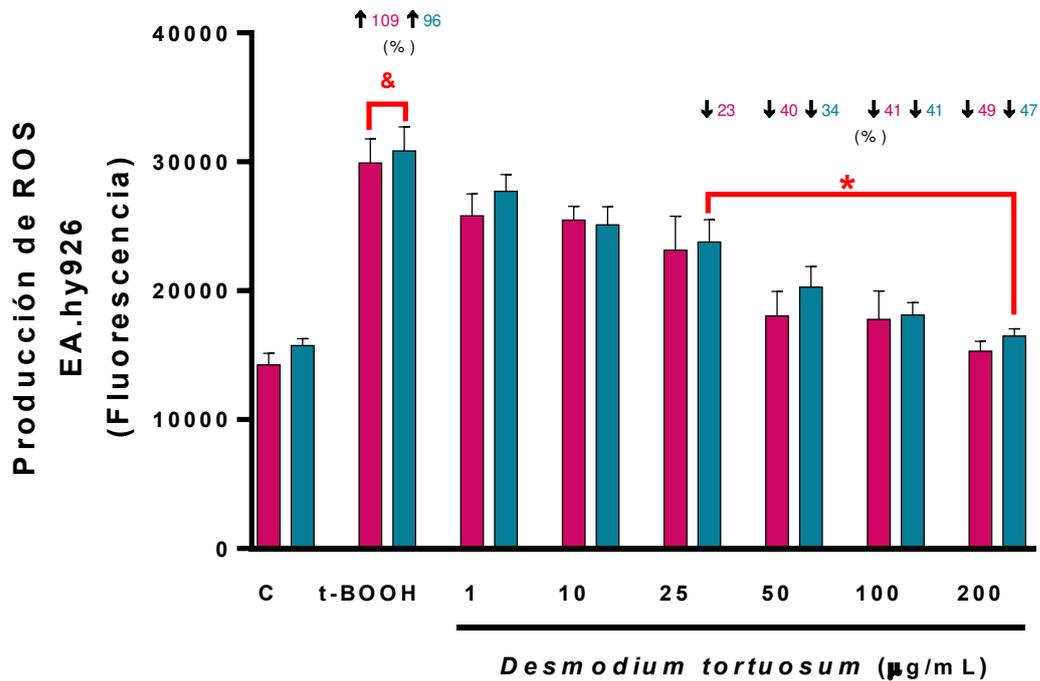
**Figura 1.** Efectos de citoprotección del extracto de *D. tortuosum* en células EA.hy926 después de períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La viabilidad celular se midió como reducción de MTT y los datos se normalizaron como % de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. Diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). &↓representan el porcentaje de disminución con respecto al control, \*↑representan el porcentaje de aumento con respecto al t-BOOH.



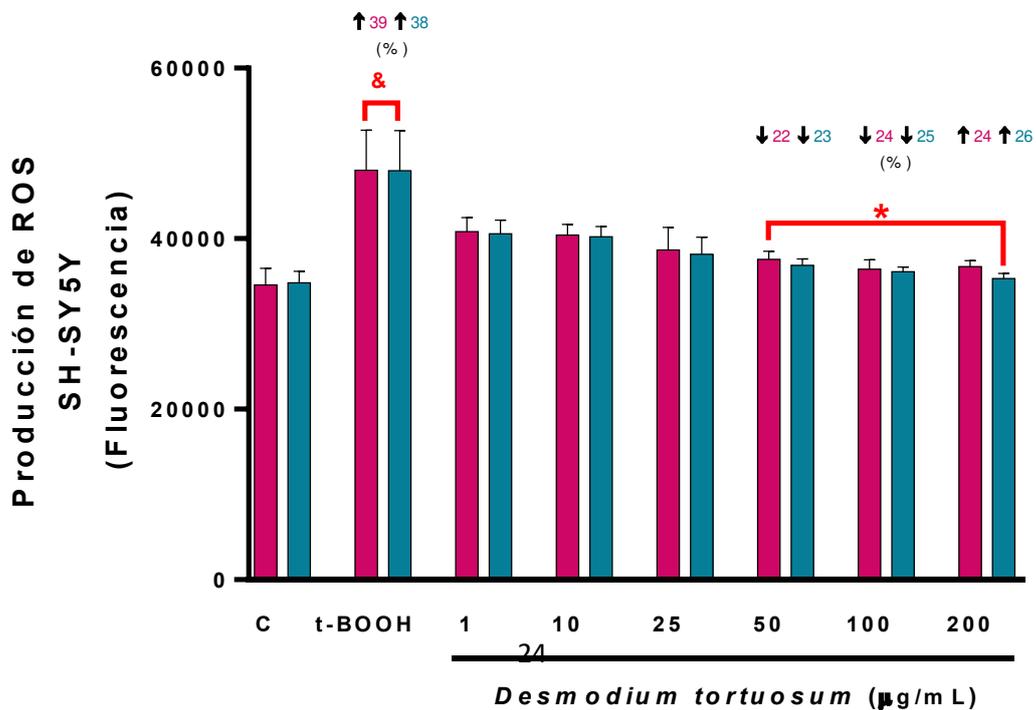
**Figura 2.** Efectos de citoprotección del extracto de *D. tortuosum* en células SH-SY5Y después de períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La viabilidad celular se midió como reducción de MTT y los datos se normalizaron como % de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. Diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). &#x2193;representan el porcentaje de disminución con respecto al control, \*↑representan el porcentaje de aumento con respecto al t-BOOH.

### 4.3. Producción intracelular de ROS

La adición de t-BOOH a los cultivos celulares indujo un aumento notable en la generación de ROS de alrededor del 100 % en EA.hy926 (Figura 3) y alrededor del 40 % en SH-SY5Y (Figura 4) que fue muy similar para ambos tipos de tratamientos, asegurando la confiabilidad del modelo para el daño oxidativo. Las mismas concentraciones de extracto (1-200  $\mu\text{g/mL}$ ) probadas para la viabilidad celular también se analizaron para su capacidad de extinción de ROS. Similar al ensayo de viabilidad celular, se observó una reducción significativa dependiente de la dosis en la producción de ROS con dosis crecientes del extracto y, en el caso de las células EA.hy926, se alcanzó una disminución de ROS casi para controlar los valores previos al estrés con la concentración más alta probada de 200  $\mu\text{g/mL}$  de extracto de *D. tortuosum* (Figura 3). Las dos concentraciones de extracto más altas, 100-200  $\mu\text{g/mL}$ , también fueron completamente eficientes para prevenir la sobreproducción de ROS inducida por t-BOOH en SH-SY5Y (Figura 4). Los resultados indican claramente que tanto el cotratamiento como el pretratamiento con extractos de *D. tortuosum* en el rango de 50-200  $\mu\text{g/mL}$  previenen significativamente el aumento de la generación de ROS inducida por el estrés oxidativo en estas dos líneas celulares (Figuras 3 y 4).



**Figura 3.** Efectos antioxidantes del extracto de *D. tortuosum* frente a la producción de ROS inducida por t-BOOH en células EA.hy926 después de 24 h de tratamiento conjunto (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■). La producción de ROS se midió como unidades de fluorescencia. Los datos representan la media ± SEM de seis experimentos independientes. Diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). &↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control, \*↓ representa el porcentaje de disminución con respecto al t-BOOH.

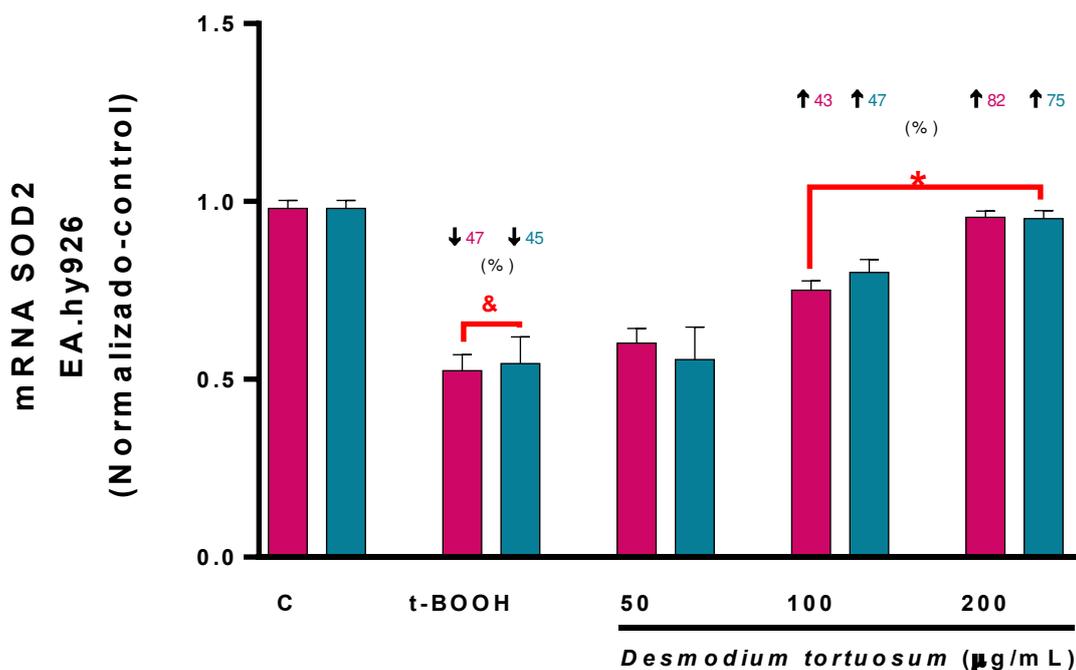


**Figura 4.** Efectos antioxidantes del extracto de *D. tortuosum* frente a la producción de ROS inducida por t-BOOH en células SH-SY5Y después de 24 h de tratamiento conjunto (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■). La producción de ROS se midió como unidades de fluorescencia. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. Diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). &↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control, \*↓ representa el porcentaje de disminución con respecto al t-BOOH.

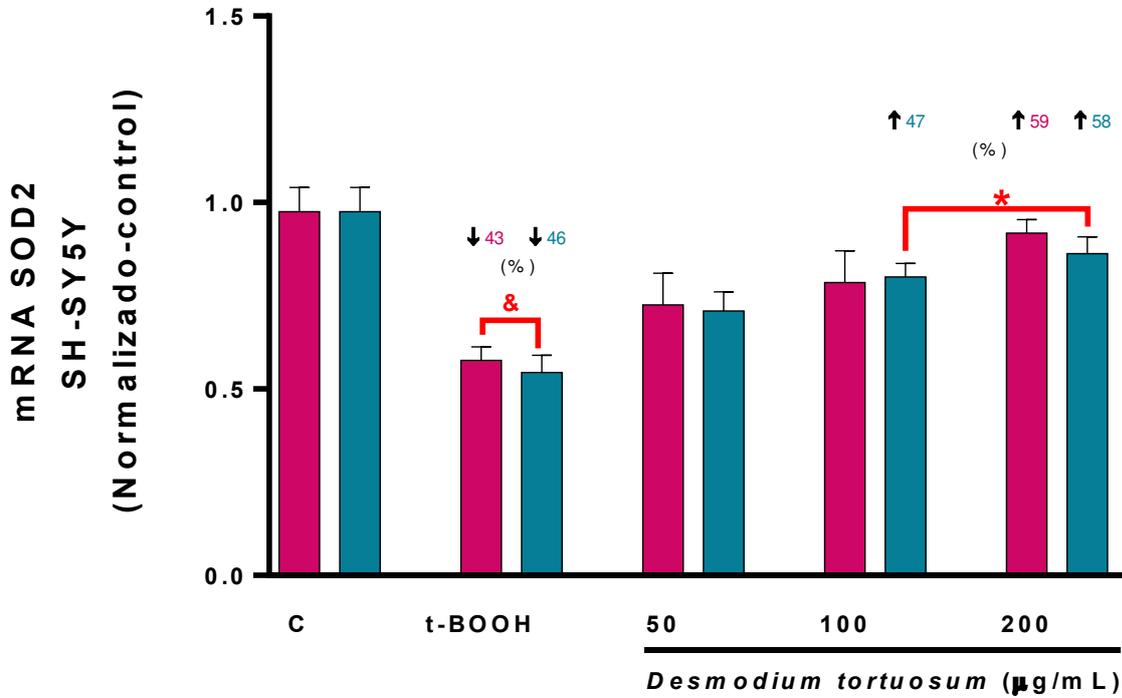
#### 4.4. Expresión génica de biomarcadores oxidativo-antioxidativos

Los genes relacionados con la oxidación-antioxidación (SOD2, NRF2) se evaluaron para determinar los efectos de t-BOOH y del extracto de *D. tortuosum* (co y pretratamiento) en células EA.hy926 y Células SH-SY5Y.

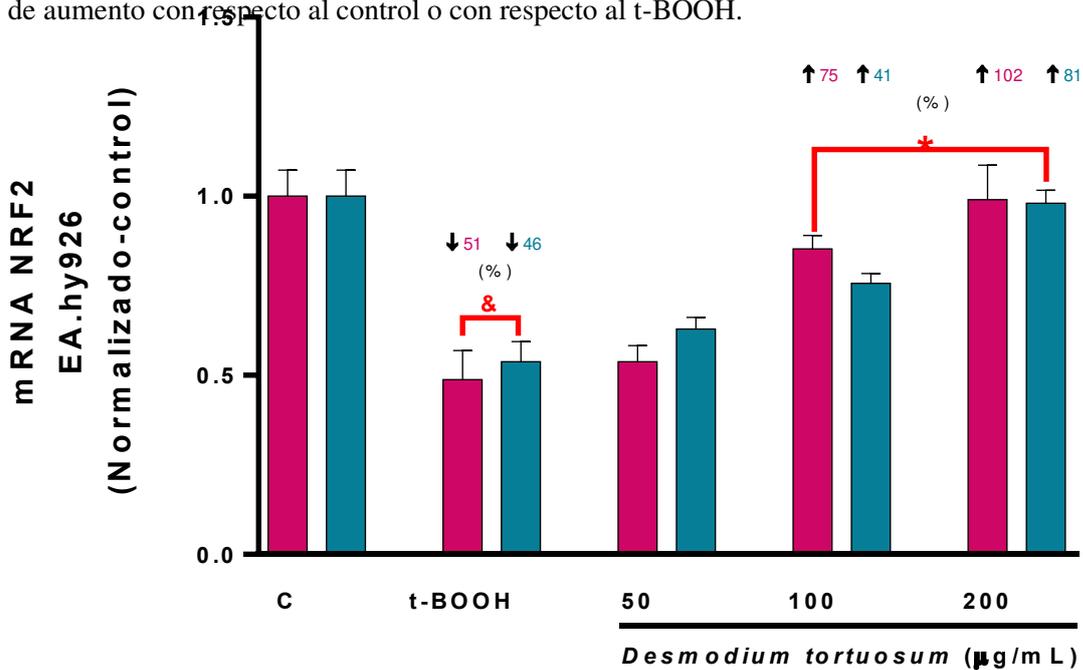
La expresión molecular de SOD2 ha disminuido alrededor de un 45% por efecto del t-BOOH en ambos tipos celulares, pero este efecto fue revertido por el efecto de la mayor concentración del extracto de *D. tortuosum* en EA.hy926, y las concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  en células SH-SY5Y (Figuras 5 y 6). Asimismo, los niveles del gen NRF2 han disminuido alrededor de un 50% y un 55% por el efecto de t-BOOH en las células EA.hy926 y SH-SY5Y, respectivamente; mientras que las dosis de 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ , en ambos tipos de células, tuvieron la capacidad de reducir significativamente el efecto de t-BOOH (Figuras 7 y 8).



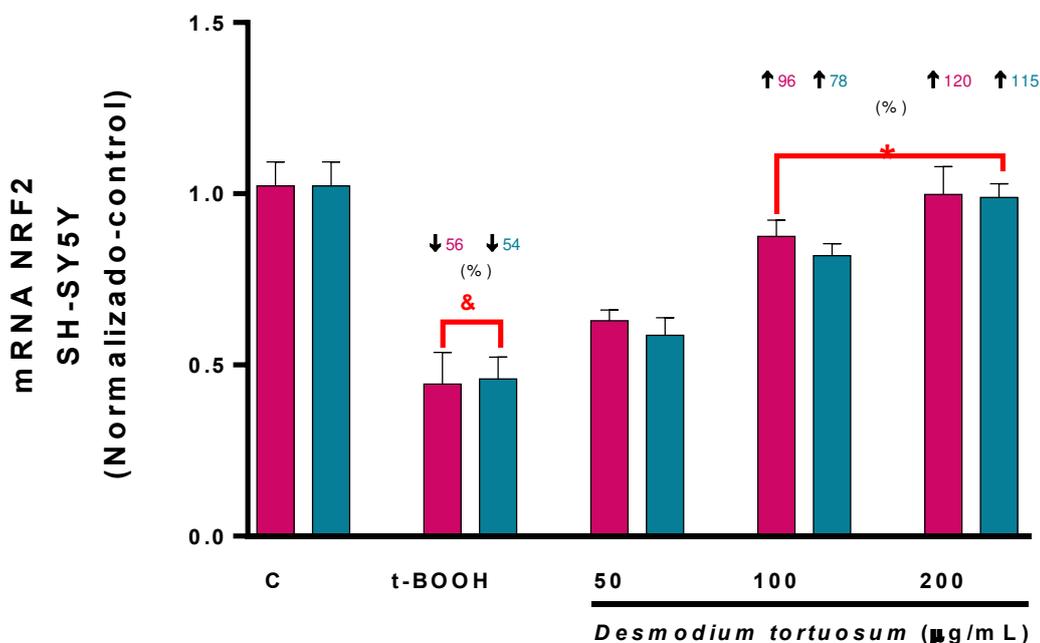
**Figura 5.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200  $\mu$ M) sobre la expresión de SOD2 en células EA.hy926 después de los períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La expresión génica se determinó como valor normalizado de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). &↓ representa el porcentaje de disminución o \*↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control o con respecto al t-BOOH.



**Figura 6.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200  $\mu$ M) sobre la expresión de SOD2 en células SH-SY5Y después de los períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La expresión génica se determinó como valor normalizado de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). &↓ representa el porcentaje de disminución o \*↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control o con respecto al t-BOOH.



**Figura 7.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200  $\mu$ M) sobre la expresión de NRF2 en células EA.hy926 después de los períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La expresión génica se determinó como valor normalizado de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). &↓ representa el porcentaje de disminución o \*↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control o con respecto al t-BOOH.

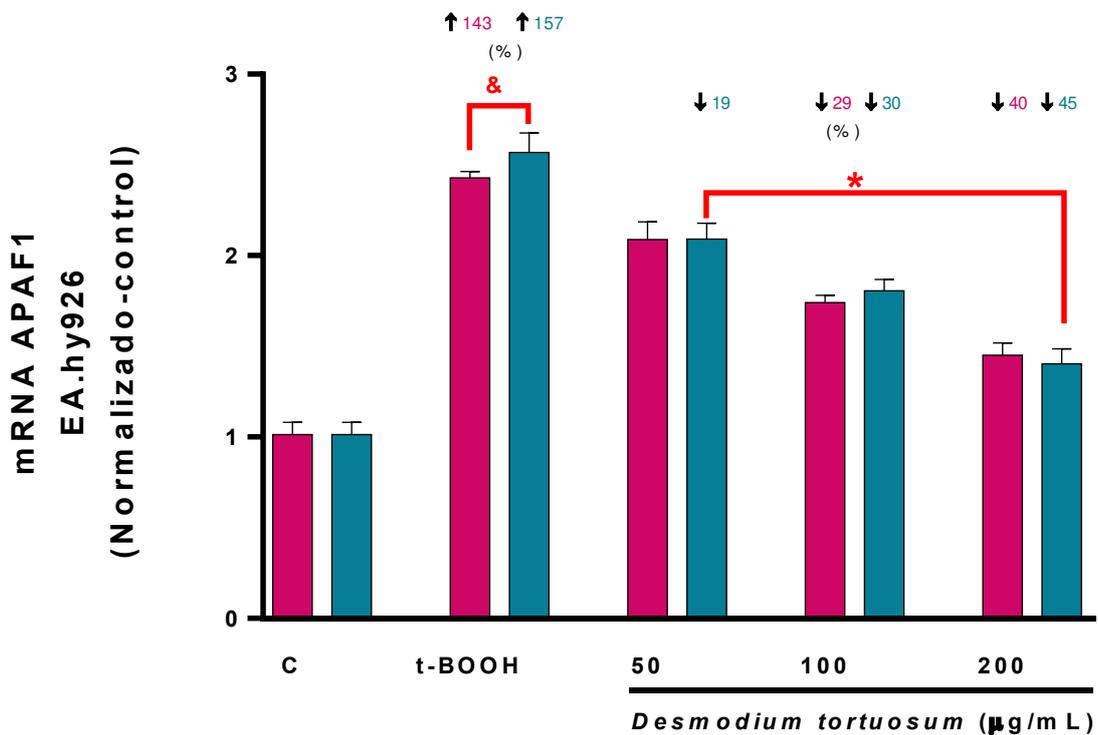


**Figura 8.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200  $\mu$ M) sobre la expresión de NRF2 en células SH-SY5Y después de los períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La expresión génica se determinó como valor normalizado de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). &↓ representa el porcentaje de disminución o \*↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control o con respecto al t-BOOH.

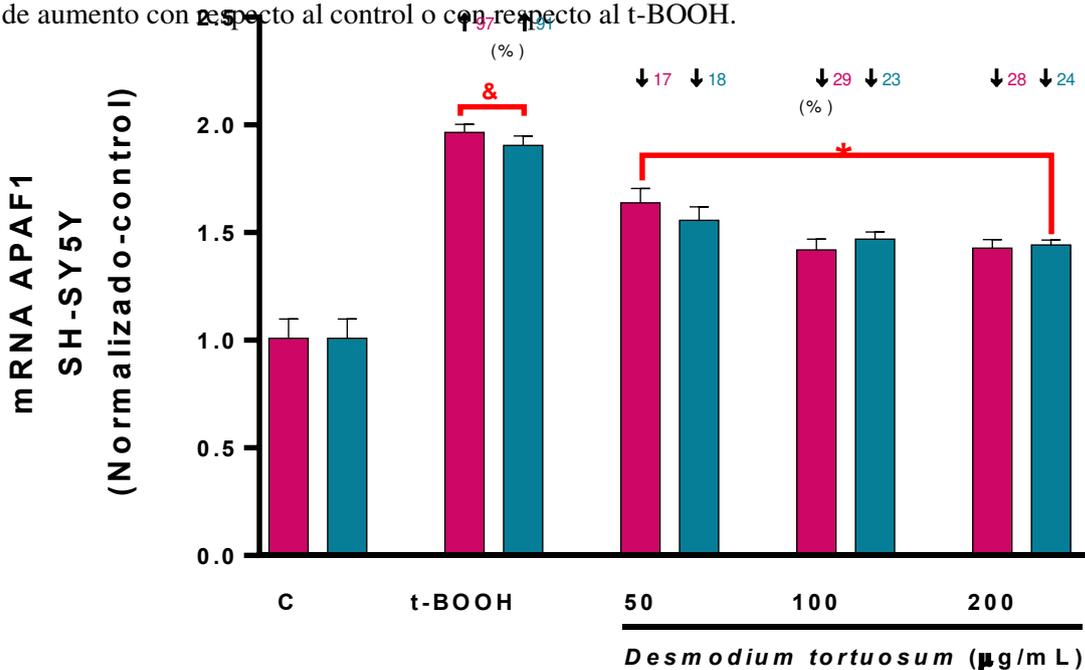
#### 4.5. Expresión génica de biomarcadores de muerte celular

Los genes relacionados con muerte celular (APAF1 y Caspasa3) se evaluaron para determinar los efectos de t-BOOH y del extracto de *D. tortuosum* (co y pretratamiento) en células EA.hy926 y Células SH-SY5Y.

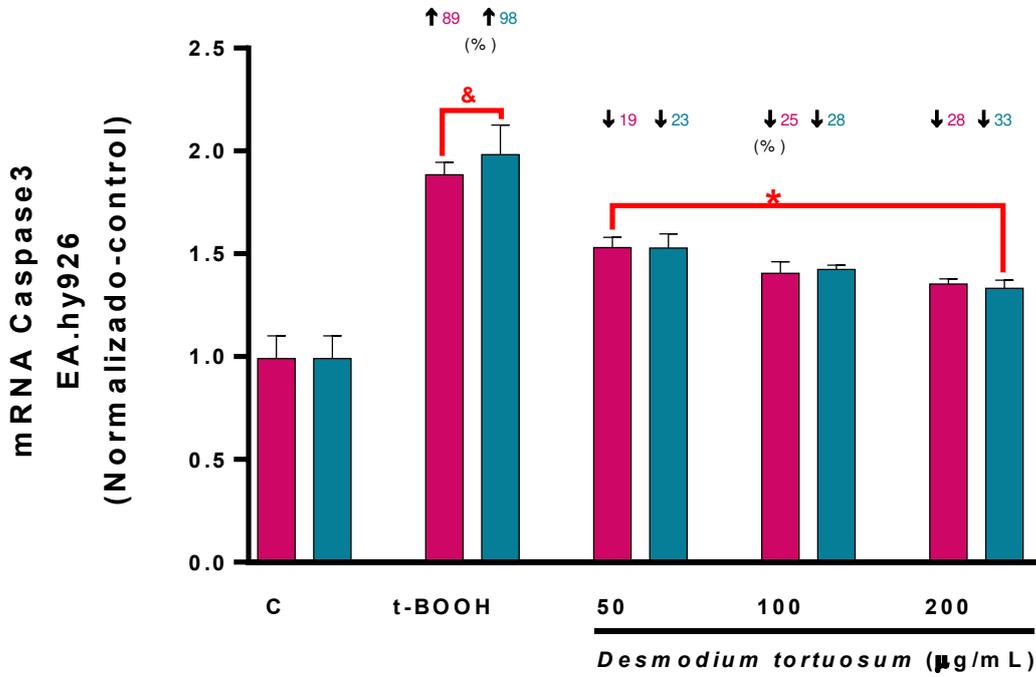
La expresión molecular de APAF1 aumentó significativamente por encima del 140 % y el 90 % por el efecto de t-BOOH en EA.hy926 y SH-SY5Y, respectivamente; pero este efecto fue revertido por el efecto de las concentraciones de 50 (solo cotratamiento en EA.hy926), 100 y 200  $\mu$ g/mL de *D. tortuosum* en EA.hy926 y SH-SY5Y, (Figuras 9 y 10). Asimismo, los niveles de la expresión génica de caspasa3, también se observó que t-BOOH indujo la expresión molecular de caspasa3 por encima del 89% en ambos tipos celulares, la cual fue reducida por el efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200  $\mu$ g/mL) en ambos tipos celulares (Figuras 11 y 12).



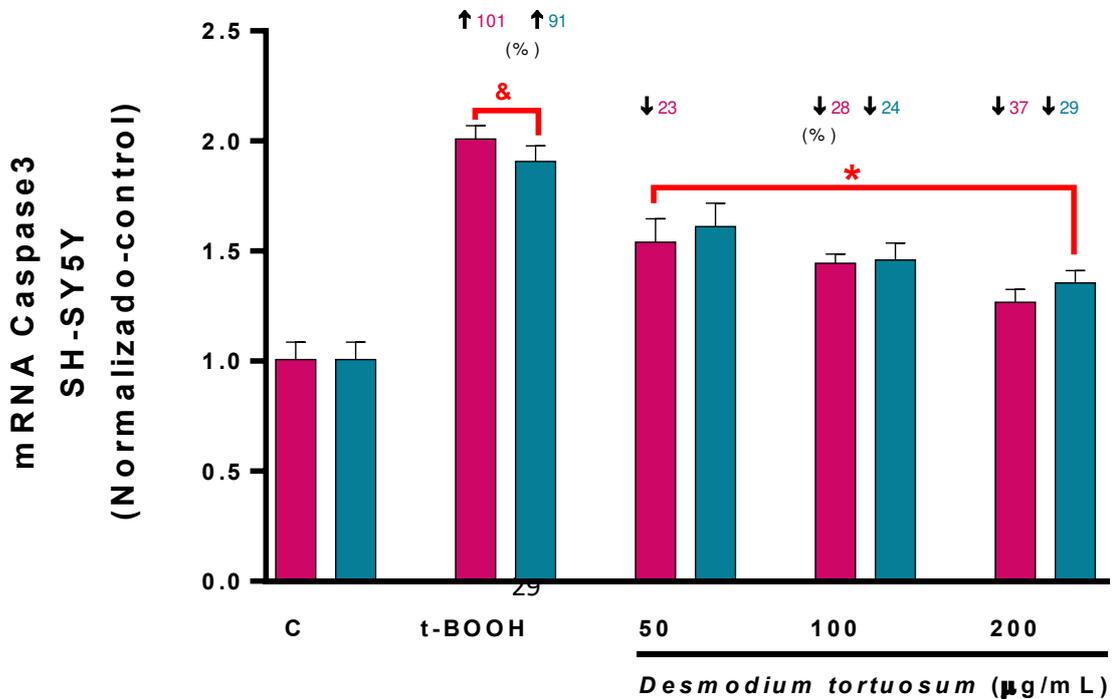
**Figura 9.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200 µM) sobre la expresión de APAF1 en células EA.hy926 después de los períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La expresión génica se determinó como valor normalizado de control. Los datos representan la media ± SEM de cuatro experimentos independientes. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). &↓ representa el porcentaje de disminución o \*↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control o con respecto al t-BOOH.



**Figura 10.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) sobre la expresión de APAF1 en células SH-SY5Y después de los períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La expresión génica se determinó como valor normalizado de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). &↓ representa el porcentaje de disminución o \*↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control o con respecto al t-BOOH.



**Figura 11.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) sobre la expresión de Caspasa3 en células EA.hy926 después de los períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La expresión génica se determinó como valor normalizado de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). &↓ representa el porcentaje de disminución o \*↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control o con respecto al t-BOOH.



**Figura 12.** Efecto del extracto de *D. tortuosum* (50, 100 y 200  $\mu$ M) sobre la expresión de Caspasa3 en células SH-SY5Y después de los períodos de cotratamiento (barras rojas, ■) y pretratamiento (barras azules, ■) de 24 h. La expresión génica se determinó como valor normalizado de control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). &#x2193; representa el porcentaje de disminución o \*↑ representa el porcentaje de aumento con respecto al control o con respecto al t-BOOH.

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En este estudio se preparó un extracto acuoso de *D. tortuosum* y se caracterizaron sus principales compuestos fenólicos por UHPLC/MS, mostrando ácidos fenólicos, flavonoides como flavanonas y flavanoles, carotenoides y otros compuestos antioxidantes (Tabla 1) como principales compuestos bioactivos de alto potencial. El extracto mostró una capacidad antioxidante significativa *in vitro* y efectos en cultivos de células endoteliales y de tipo neuronal que incluyen la regulación sobre la viabilidad celular, la producción de ROS y la regulación molecular de biomarcadores de estrés oxidativo y muerte celular. Todos estos efectos avalan el uso de esta planta desde la antigüedad en la medicina tradicional.

El rango de dosis del extracto de *D. tortuosum* para probar su potencial de estrés antioxidante se seleccionó de acuerdo con datos previos de otros estudios que trabajaron

con extractos de plantas, alimentos y jugos. Así, se encontró una concentración de 35  $\mu\text{M}$  de flavanol epicatequina en suero de rata 1 h después de la administración oral de 172  $\mu\text{mol}$  de epicatequina por kg de peso corporal <sup>(73)</sup>. De manera similar, se han detectado niveles de 30-40  $\mu\text{M}$  de fitoquímicos de arándano en plasma después de la ingesta de jugo de arándano <sup>(74,75)</sup>. Por lo tanto, el rango de concentraciones de extracto de *D. tortuosum* probado no está lejos de ser realista; de hecho, en trabajos anteriores hemos informado actividad quimioprotectora para 0.5–100  $\mu\text{g/mL}$  de extracto de *Vochysia rufa*<sup>(21)</sup>, 5–25  $\mu\text{g/mL}$  de *Silybum marianum*<sup>(20)</sup> y 2.5–20  $\mu\text{g/mL}$  de extracto de cacao <sup>(23)</sup> en células endoteliales EA.hy926 cultivadas. Además, hemos informado recientemente que dosis de 5-25  $\mu\text{g/mL}$  de un extracto de *Sambucus nigra*<sup>(28)</sup> y 25-200  $\mu\text{g/mL}$  de un extracto acuoso de compuestos fenólicos de cacao <sup>(27)</sup> protegen a las células del neuroblastoma SH-SY5Y del estrés oxidativo.

Nuestros resultados anteriores demostraron que el tratamiento de células EA.hy926 con t-BOOH es un excelente modelo de estrés oxidativo en cultivo celular <sup>(20,23,76)</sup>. Probablemente, muy recientemente también hemos establecido un modelo para el estrés oxidativo en SH-SY5Y mediante un tratamiento comparable con el mismo prooxidante, t-BOOH <sup>(27,28)</sup>. Como la mayoría de los peróxidos orgánicos, el t-BOOH se descompone en otros radicales alcoxilo y peroxilo en una reacción asistida por iones metálicos que pueden generar ROS, incluido  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>(68)</sup>. Si la sobreproducción de ROS es duradera, el daño a macromoléculas, proteínas, lípidos y ADN podría ser excesivo y poner en peligro irreversiblemente la viabilidad celular, como se observa en las células tratadas con t-BOOH. Sin embargo, en estas condiciones estresantes, la inhibición significativa de la citotoxicidad inducida por t-BOOH cuando las células EA.hy926 y SH-SY5Y fueron pretratadas o cotratadas con extractos de plantas en dosis realistas durante 20 h indicó que la integridad de las células estresadas estaba notablemente protegida contra el potente desafío oxidativo. La cantidad relevante de compuestos fenólicos bioactivos en el extracto fue lo suficientemente eficaz para una protección celular dependiente de la dosis parcial pero significativa, aunque las diferentes respuestas al tratamiento conjunto y previo sugieren una sensibilidad diferencial de los dos tipos de células a los extractos en condiciones estresantes; el pretratamiento es más efectivo en EA.hy926 mientras que el cotratamiento parece más efectivo en SH-SY5Y. Como se informó anteriormente, se ha informado una capacidad citoprotectora similar con otros extractos fenólicos en ambas líneas celulares, EA.hy926 <sup>(20,21,23)</sup> y SH-SY5Y <sup>(27,28)</sup>.

La evaluación de la generación de ROS es un índice fiable del estado redox, así como del daño oxidativo de las células vivas <sup>(68)</sup>. La adición de t-BOOH a cualquiera de las líneas celulares en condiciones de pretratamiento y cotratamiento provocó un aumento significativo en la generación de ROS que podría ser la causa principal del aumento de la muerte celular. La reducción significativa dependiente de la dosis en la producción de ROS inducida por t-BOOH observada con el cotratamiento y el pretratamiento con extracto en ambas líneas celulares respalda inequívocamente la naturaleza antioxidante de los componentes fenólicos y podría ser una explicación principal de la reducción del estrés oxidativo y posterior protección celular. Curiosamente, se informó una capacidad de extinción de ROS comparable no solo en células EA.hy926 y SH-SY5Y como se mencionó anteriormente <sup>(20,21,23,27,28)</sup>, sino también en células hepáticas cultivadas <sup>(77-85)</sup>, claramente lo que indica que este efecto quimioprotector no es específico de un tipo de célula o tejido en particular, sino una capacidad de estrés antioxidante sistémico de los antioxidantes naturales.

Muchas formas de estrés celular pueden conducir a la inducción de la muerte celular, a través del estrés del retículo endoplásmico o la disfunción mitocondrial <sup>(86)</sup>. En este estudio se ha observado que el t-BOOH es capaz de inducir estrés oxidativo al aumentar los niveles de ROS. Este efecto pudo haber producido un aumento en la actividad de enzimas involucradas en la muerte celular y evaluadas en este estudio a través de la viabilidad celular. También se sabe que, bajo estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno, incluidos los radicales libres como el superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, se generan en niveles elevados, lo que induce daño celular y muerte celular <sup>(87)</sup>. Esta muerte celular a menudo implica la inducción de la apoptosis a través de la activación de las enzimas caspasas <sup>(88)</sup>. En este estudio, la reducción de la viabilidad celular por t-BOOH en las células EA.hy926 y SH-SY5Y se vio mermada de manera dosis-dependiente por el efecto del extracto de *D. tortuosum* a partir de una dosis de 50 µg/mL tanto en co- y pre-tratamiento. Efectos similares han sido reportados en otros estudios, donde observaron que compuestos naturales con alto contenido fenólico reducían la muerte celular en células EA.hy925 <sup>(89,90)</sup> y en células SH-SY5Y <sup>(91,92)</sup>.

En el presente estudio la citotoxicidad observada tiene un componente oxidativo (Niveles de ROS), este efecto fue mermado por el extracto de *D. tortuosum*, que contiene una gran cantidad de compuestos polifenólicos, los cuales tendrían la capacidad de reducir el estrés oxidativo a través de la regulación del glutatión (GSH), que es el mejor

biomarcador del estado redox celular; por lo tanto, un agotamiento o reducción de GSH indica un aumento de la oxidación intracelular y un estado redox precario, mientras que una concentración equilibrada de GSH coloca a la célula en una situación ventajosa para enfrentar un posible ataque oxidativo <sup>(93)</sup>. La concentración de GSH está estrictamente regulada dentro de la célula y una exposición directa a extractos de plantas en concentraciones no tóxicas generalmente no provoca cambios significativos en los niveles basales de GSH <sup>(20-22,68)</sup>. Por otro lado, si GSH disminuyera por la acción de t-BOOH sugiere un estado de estrés oxidativo que podría resultar en un daño oxidativo irreparable en macromoléculas: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Esta situación peligrosa se evitaría con el uso de compuestos antioxidantes como *D. tortuosum*, lo que ha sido observado con otros extractos vegetales ricos en antioxidantes fenólicos como *Silybum marianum*<sup>(20)</sup>, *Vochysia rufa*<sup>(21)</sup> y café verde <sup>(22)</sup> en células EA.hy926, así como cacao <sup>(27)</sup> y *Sambucus nigra*<sup>(28)</sup> en células SH-SY5Y.

La reducción de la producción de ROS por efecto del extracto de *D. tortuosum* podría explicarse por el efecto que tienen los compuestos polifenólicos en su efecto regulador sobre las enzimas de defensa antioxidante, como GPx y GR, esenciales para controlar el estado redox intracelular. GPx cataliza la reducción de especies de peróxido que dañan las células en coordinación con la conversión de GSH a glutatión oxidado <sup>(68,93)</sup>, mientras que GR recicla el glutatión oxidado de nuevo a GSH <sup>(68,93)</sup>, lo que favorece la recuperación efectiva de la concentración de GSH celular en estado estacionario. Es decir que durante o después de un ataque oxidativo inducido, el sistema de defensa antioxidante de las células pretratadas con extracto de *D. tortuosum* pudieron haber regresado más rápidamente a una condición de estado estacionario, lo que reduciría la citotoxicidad y, por lo tanto, permite que la célula se enfrente a ataques oxidativos adicionales en condiciones que son más favorables. Previamente en otros estudios se ha demostrado una respuesta quimioprotectora similar sobre las enzimas de defensa antioxidante mediante otros extractos antioxidantes en las mismas líneas celulares <sup>(20,21,23,27,28)</sup>.

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos a través de los cuales las células responden activando vías de supervivencia o muerte celular. Inicialmente, la célula intenta responder al daño oxidativo de manera positiva, pero si el daño es muy fuerte, se activará el mecanismo de muerte celular. En otras palabras, la alteración de los mecanismos oxidante-antioxidante activará los mecanismos de supervivencia-muerte celular en las células <sup>(94)</sup>. En este estudio se ha observado que la expresión molecular de

los biomarcadores antioxidantes SOD2 y NRF2, se alteran por efecto del t-BOOH y se restablecen por completo con una dosis de 200  $\mu\text{g/mL}$  de *D. tortuosum*. Asimismo, se ha observado que biomarcadores moleculares de muerte celular como APAF1 y Caspase3 se sobreexpresan por efecto de t-BOOH, y este efecto se revierte por las diversas concentraciones de *D. tortuosum* en EA.hy926 y SH-SY5Y células. Por lo que podemos concluir que el extracto de *D. tortuosum* tiene un efecto citoprotector antioxidante y un efecto antiapoptótico directo o indirecto (a través de mecanismos antioxidantes). En otros estudios donde se han utilizado extractos naturales también se ha observado este efecto de asociación antioxidante-antiapoptótico. Es el caso del aumento de los niveles de SOD2 y la disminución de la expresión de las proteínas BAX y Caspasa3 por efecto del extracto de *Scrophularia buergeriana* en las células SH-SY5Y <sup>(95)</sup>. Además, resulta que el género *Astragalus* pudo aumentar los niveles de SOD en las células EA.hy926 <sup>(96)</sup>. Asimismo, en cultivos celulares se ha observado la capacidad de los extractos naturales para aumentar los niveles de SOD y NRF2, dos moléculas implicadas en la actividad antioxidante celular <sup>(97)</sup>, o la reducción de la muerte celular por efectos oxidativos o la reducción de la muerte celular debido a efectos oxidantes <sup>(98)</sup>.

En general, la respuesta de EA.hy926 al estrés fue más constante y sólida que la de SH-SY5Y y el efecto protector del extracto de *D. tortuosum* fue más eficiente en una condición de pretratamiento que en un cotratamiento. Los datos generales indican que, en una condición de estrés oxidativo inducido químicamente, el tratamiento en células endoteliales y de tipo neuronal con el extracto de *D. tortuosum* rico en compuestos antioxidantes reduce los efectos de t-BOOH sobre la viabilidad celular y la producción de ROS. Asimismo, se ha observado que existe una importante asociación entre la expresión de moléculas antioxidantes y la disminución de moléculas que inducen la muerte celular. Esta respuesta bioquímica inclusiva evocada por el extracto bioactivo podría explicar sistemáticamente la citoprotección endotelial y neuronal observada.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

El extracto de *D. tortuosum* es rico en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante. Se identificaron: flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos linoleicos, entre otros, por medio de UHPLC/MS.

El extracto de *D. tortuosum* contribuye a la citoprotección de células endoteliales EA.hy926 y neuronales SH-SY5Y sometidas al daño oxidativo por t-BOOH, a través de la regulación de la viabilidad celular, los niveles de ROS y los biomarcadores moleculares de la muerte celular por estrés oxidativo, siendo la concentración de 200 µg/mL la de recuperación mayor.

Se puede concluir que el tratamiento de EA.hy926 y SH-SY5Y con el extracto de *D. tortuosum* presenta efecto antioxidante de las células estudiadas tras el desafío oxidativo, mediante el ensayo DCFH-DA tanto en el cotratamiento como el pretratamiento.

El extracto de *D. tortuosum* permitió revertir la expresión molecular de los genes SOD2 y NRF2, en ambos tipos celulares, los cuales se evaluaron por PCR. Se demostró que los tratamientos con extracto en mayor concentración presentan una reducción significativa al efecto del t-BOOH.

El extracto de *D. tortuosum* en concentraciones de 50, 100 y 200 µg/mL permitieron revertir la expresión molecular de los genes relacionados con muerte celular APAF1 y Caspasa3, en ambos tipos celulares, los cuales se evaluaron por PCR, y se sobreexpresan por efecto del t-BOOH.

## **CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES**

En base a los resultados y las conclusiones a las que se llegó en el presente estudio se puede sugerir:

Efectuar ensayos con extractos de mayor concentración, que permitan establecer un nivel seguro del efecto citoprotector del *D.tortuosom*. Asimismo, considerar nuevas líneas celulares como patrones de estudio, por ejemplo, las hepáticas, ya que este órgano es uno de los más susceptibles a efectos adversos de los xenobiótico.

Realizar mayores estudios que corroboren los resultados obtenidos en el presente estudio, de manera que ratifique los efectos demostrados, los cuales podrían servir para desarrollar una alternativa natural frente a la exposición de agentes citotóxicos.

## **CAPÍTULO VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS**

1. Andra Ionescu-Tucker, Carl W. Cotman. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 107 (2021) 86–95.
2. Favero, G.; Paganelli, C.; Buffoli, B.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: Life style intervention. *BioMed Res. Int.* 2014, 2014, 801896
3. Polovina, M.M.; Potpara, T.S. Endothelial dysfunction in metabolic and vascular disorders. *Postgrad. Med.* 2014, 126, 38–53.
4. Paneni, F.; Beckman, J.A.; Creager, M.A.; Cosentino, F. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences and medical therapy: Part I. *Eur. Heart J.* 2013, 34, 2436–2443.

5. Ríos, J.L.; Francini, F.; Schinella, G.R. Natural products for the treatment of type 2 Diabetes mellitus. *Planta Med.* 2015, 81, 975–994.
6. González, J.; Valls, N.; Brito, R.; Rodrigo, R. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World J. Cardiol.* 2014, 6, 353–366.
7. Song, P.; Zou, M.H. Redox regulation of endothelial cell fate. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014, 71, 3219–3239.
8. Niedzielska, E.; Smaga, I.; Gawlik, M.; Moniczewski, A.; Stankowicz, P.; Pera, J.; Filip, M. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.*, 2016, 53(6),n4094-4125.
9. Francisca Rivas, Carlos Poblete-Aro, María Elsa Pando<sup>1</sup>, María José Allel, Valentina Fernandez, Angélica Soto, Pablo Nova, Diego Garcia-Diaz. Effects of Polyphenols in Aging and Neurodegeneration Associated with Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 2022, 29, 1045-1060.
10. Martín, M.A.; Goya, L.; Ramos, S. Protective effects of tea, red wine and cocoa in diabetes. Evidences from human studies. *Food Chem. Toxicol.* 2017, 109, 302-314.
11. Romacho T.; Valencia I.; Ramos-González M.; Vallejo S.; López-Esteban M.; Lorenzo O.; Cannata P.; Romero A.; San Hipólito-Luengo A.; Gómez-Cerezo J.F.; Peiró C.; Sánchez-Ferrer C.F. Visfatin/eNamt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Sci Rep* 2020, 10, 5386. doi: 10.1038/s41598-020-62190-w.
12. Martin, M.A.; Ramos, S. Impact of cocoa flavanols on human health. *Food and Chemical Toxicology* 2021, 151, 112121.
13. Kris-Etherton, Penny M.; Keen, Carl L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Current Opinion in Lipidology* 2002, 13, 41-49.
14. Fisher, N.D.; Hughes, M.; Gerhard-Herman, M.; Hollenberg, N.K. Flavanol rich cocoa induces nitric oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J. Hypertens.* 2003, 1, 2281–2286.
15. Heiss, C.; Dejam, A.; Kleinbongard, P.; Schewe, T.; Sies, H.; Kelm, M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *J. Am. Med. Assoc.* 2003, 290, 1030–1031.
16. Ciumarnean, L.; Milaciu, M.V.; Runcan, O.; Vesa,S,C.; Rachis, A.L.; Negrean, V.; Perné, M.-G.; Donca, V.I.; Alexescu, T.-G.; Para, I. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules* 2020, 25, 4320.

17. Ebaditabar, M.; Djafarian, K.; Saeidifard, N.; Shab-Bidar, S. Effect of dark chocolate on flow-mediated dilatation: Systematic review, meta-analysis, and dose–response analysis of randomized controlled trials. *Clin. Nutr. ESPEN* 2020, 36, 17–27.
18. Nardini, M. Phenolic Compounds in Food: Characterization and Health Benefits. *Molecules* 2022, 27, 783.
19. Gutiérrez-Del-Río I.; López-Ibáñez S.; Magadán-Corpas P.; Fernández-Calleja L.; Pérez-Valero Á.; Tuñón-Granda M.; Miguélez E.M.; Villar C.J.; Lombó F. Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation. *Antioxidants (Basel)* 2021, 10, 1264. doi: 10.3390/antiox10081264.
20. Palomino, O.M.; Gouveia, N.M.; Ramos, S.; Martín, M.A. and Goya, L. 2017. Protective effect of *Silybum marianum* on endothelial cells submitted to high glucose concentration. *Planta Medica*, 83: 97-103.
21. Gouveia, N.M.; Ramos, S.; Martín, M.A.; Spindola, F.; Goya, L. and Palomino, O.M. 2017. *Vochysia rufa* stem bark extract protects endothelial cells against high glucose damage. *Medicines*, 4 (9) doi:10.3390/medicines4010009.
22. Wang, S.-L.; Sarriá, B.; Mateos, R.; Goya, L.; Bravo, L. 2019. TNF- $\alpha$  induced inflammation in human EA.hy926 endothelial cells is prevented by yerba mate and green coffee extracts, their main hydroxycinnamic acids, and microbial metabolites. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 70:267-284.
23. Ferreira-Martins, T.; Palomino, O.; Álvarez-Cilleros, D.; Ramos, S.; Goya, L. 2020. Cocoa flavanols protect human endothelial cells from oxidative stress. *Plant Food for Human Nutrition* 75: 161-168.
24. Martín, M.A.; Goya, L. de Pascual-Teresa, S. Effect of Cocoa and Cocoa Products on Cognitive Performance in Young Adults. *Nutrients* 2020, 12, 3691.
25. Goya, L.; San Román, R.; de Pascual-Teresa, S. Polyphenols' effect on cerebrovascular health. *Current Medicinal Chemistry* 2021, 29, 1029-1044.
26. Lisa Strother, Gareth B. Miles, Alison R. Holiday , Ying Cheng , Gayle H. Doherty. Long-term culture of SH-SY5Y neuroblastoma cells in the absence of neurotrophins: A novel model of neuronal ageing. *Journal of Neuroscience Methods* 362 (2021) 109301.
27. Carballeda Sangiao, N.; Chamorro, S.; de Pascual-Teresa, S.; Goya, L. 2021. Aqueous Extract of Cocoa Phenolic Compounds Protects Differentiated Neuroblastoma SH-SY5Y Cells from Oxidative Stress. *Biomolecules* 11, 1266.

28. Palomino, O.; García-Aguilar, A.; González, A.; Guillén, C.; Benito, M.; Goya, L. 2021. Biological Actions and Molecular Mechanisms of *Sambucus nigra* L. in Neurodegeneration: A Cell Culture Approach. *Molecules* 26, 4829.
29. Fenglian C, Shiling W, Honghua X. Analysis of the volatile oil from *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. by gas Chromatography–mass spectrometry. *Guangzhou Univ Chinese Med.* 2005;22:302–3.
30. Xiao J, Capanoglu E, Jassbi AR, Miron A. Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56:29–45.
31. Kurian GA, Paddikkala J. Oral delivery of insulin with *Desmodium gangeticum* root aqueous extract protects rat hearts against ischemia reperfusion injury in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med* 2010;3(2):94–100. doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60043-0
32. Govindarajan R, Asare-anane H, Persaud S, Jones P, Houghton PJ. Effect of *Desmodium gangeticum* Extract on Blood Glucose in Rats and on Insulin Secretion in vitro. *Planta Med.* 2007;73:427–32.
33. Xu Q, Zhu D, Wang G, Lin T, Sun C, Ding R, et al. Phenolic glycosides and flavonoids with antioxidant and anticancer activities from *Desmodium caudatum*. *Nat Prod Res.* 2020;0(0):1–8. doi.org/10.1080/14786419.2020.1739044
34. Hamilton ML, Caulfield JC, Pickett JA, Hooper AM. C -Glucosylflavonoid biosynthesis from 2-hydroxynaringenin by *Desmodium uncinatum* (Jacq) (Fabaceae). *Tetrahedron Lett.* 2009;50(40):5656–9. doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.07.118
35. Li W, Sun YN, Yan XT, Yang SY, Kim S, Chae D, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of phenolic compounds from *Desmodium caudatum* leaves and stems. *Arch Pharm Res.* 2014;37(6):721–7.
36. Tsai JC, Huang GJ, Chiu TH, Huang SS, Huang SC, Huang TH, et al. Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. *African J Pharm Pharmacol.* 2011;5(4):468–76.
37. François C, Fares M, Baiocchi C, Maixent JM. Safety of *Desmodium adscendens* extract on hepatocytes and renal cells. Protective effect against oxidative stress. *J Intercult Ethnopharmacol.* 2015;4(1):1–5.

38. Liu C, Wu Y, Zhang Q-J, Kang W-Y, Zhang L, Zhou Q-D. Advances in studies on chemical constituents and biological activities of *Desmodium* species]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2013;38(23):4006–4014.
39. Poma Hullcapuri RI. Evaluación in vivo del efecto antiinflamatorio en ratas albinas cepa Holtzman y el efecto analgésico en ratones albinos del extracto etanólico de hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (Manayupa). *Univ Nac Mayor San Marcos*. 2018; 447: 73. [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4147/Diaz\\_rc.pdf;jsessionid=CD5A7FF3022F1A5526948369A600356D?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4147/Diaz_rc.pdf;jsessionid=CD5A7FF3022F1A5526948369A600356D?sequence=1)
40. Moustafa Shaheen AS. Morphological and anatomical investigations in *Desmodium Tortuosum* (SW.) DC. (Fabaceae): a new addition to the Egyptian flora. *Bangladesh J Plant Taxon*. 2008;15(1):21–29.
41. Chen YF, Lu YH, Tsai HY. Crude extract of *Desmodium gangeticum* process anticancer activity via arresting cell cycle in G1 and modulating cell cycle-related protein expression in A549 human lung carcinoma cells. *Biomedicine (Taipei)*. 2022 Jun 1;12(2):31-39. doi: 10.37796/2211-8039.1362.
42. Zhang Y, Zhang X, Xiao Z, Zhang X, Sun H. Hypoglycemic and hypolipidemic dual activities of extracts and flavonoids from *Desmodium caudatum* and an efficient synthesis of the most potent 8-prenylquercetin. *Fitoterapia*. 2022 Jan;156:105083. doi: 10.1016/j.fitote.2021.105083.
43. Xu QN, Zhu D, Wang GH, Lin T, Sun CL, Ding R, Tian WJ, Chen HF. Phenolic glycosides and flavonoids with antioxidant and anticancer activities from *Desmodium caudatum*. *Nat Prod Res*. 2021 Nov;35(22):4534-4541. doi: 10.1080/14786419.2020.1739044.
44. Vedpal, Jupudi S, Jubie S, Deepika NP, Dhanabal SP. A new pyrimidine alkaloid from the roots of *Tadehagi triquetrum* (L.) H. Ohashi. *Nat Prod Res*. 2021 Feb;35(3):413-420. doi: 10.1080/14786419.2019.1634716.
45. Liguó Fu, Tanqing Chen, Kaiyong Lang, Tao Hong, Qi Lin. *Higher Plants of China* Qingdao Publishing House, Qingdao. 2008; 152
46. Editorial Committee of Zhejiang Medicinal Flora. *Zhejiang Medicinal Flora*. Zhejiang Science and Technology Press, Hangzhou. 1980; I: 576-582

47. Ma X, Zheng C, Hu C, Rahman K, Qin L. The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol.* 2011; 138(2):314-32. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.053.
48. Gan N, Yang X, Li TH, He P. Studies on constituents of roots and leaves from *Desmodium blandum* and their cytotoxic activity against growth of several tumor cells. *ZhongGuo Zhong Yao Za Zhi.* 2008; 33: 2077-2080
49. Khan ZR, Pickett JA, Wadhams LJ, Hassanali A, Midega CA. Combined control of *Striga hermonthica* and stem borers by maize-*Desmodium* spp. intercrops. *Crop Protection.* 2006; 25: 989-995
50. Ning G, Tianhua L, Xin Y, He P. Constituents in *Desmodium blandum* and their antitumor activity. *Chinese Traditional and Herbal Drug.* 2009; 40: 852-856.
51. Muanda FN, Bouayed J, Djilani A, Yao C, Soulimani R, Dicko A. Chemical composition and cellular evaluation of the antioxidant activity of *Desmodium adscendens* leaves. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2011; 2011: 9
52. Zhu ZZ, Ma KJ, Ran X, Zhang H, Zheng HJ, Han T, Zhang QY, Qin LP. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2010; 133: 1126-1131
53. Editorial Committee of *Zhonghua Bencao* National Traditional Chinese Herb Administration *Zhonghua Bencao* (Chinese Herbal Medicine) Shanghai Science and Technology Publishing House, Shanghai (1996) pp. 3120–3343.
54. R.N. Chopra, S.L. Nayar, I.C. Chopra *Glossary of Indian Medicinal Plants* Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, (1956) p. 94
55. M.L. Hamilton, J.C. Caulfield, J.A. Pickett, A.M. Hooper C-Glucosyl flavonoid biosynthesis from 2-hydroxynaringenin by *Desmodium uncinatum* (Jacq.) (Fabaceae) *Tetrahedron Letters*, 50 (2009), pp. 5656-5659
56. Editorial Committee of *Quan Guo Zhong Cao Yao* *Quan Guo Zhong Cao Yao* People's Medical Publishing House, Beijing (1996) pp. 1028, 1109, 1253, 1547, 1882, 2770–2775
57. F.N. Muanda, J. Bouayed, A. Djilani, C. Yao, R. Soulimani, A. Dicko Chemical composition and cellular evaluation of the antioxidant activity of *Desmodium adscendens* leaves *Evidence based Complementary and Alternative Medicine*, 2011 (2011), p. 9

58. S.C. Lai, Y.L. Ho, S.C. Huang, T.H. Huang, Z.R. Lai, C.R. Wu, K.Y. Lian, Y.S. Chang Antioxidant and antiproliferative activities of *Desmodium triflorum* (L.) DC The American Journal of Chinese Medicine, 38 (2010), pp. 329-342
59. S.C. Lai, W.H. Peng, S.C. Huang, Y.L. Ho, T.H. Huang, Z.R. Lai, Y.S. Chang Analgesic and anti-inflammatory activities of methanol extract from *Desmodium triflorum* DC in mice The American Journal of Chinese Medicine, 37 (2009), pp. 573-588
60. S. Rastogi, M.M. Pandey, A.K.S. Rawat An ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. & *D. adscendens* (Sw.) DC Journal of Ethnopharmacology, 136 (2011), pp. 283-296
61. G.A. Kurian, S. Suryanarayanan, A. Raman, J. Padikkala Antioxidant effects of ethyl acetate extract of *Desmodium gangeticum* root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts Chinese Medicine, 5 (2010), p. 3
62. S. Mao, Z. Li, C. Li. Studies on antioxidation activity of three plants of *Desmodium* Journal of Yun Nan University Natural Sciences, 29 (2007), p. 393
63. G.A. Kurian, J. Paddikkala. Oral delivery of insulin with *Desmodium gangeticum* root aqueous extract protects rat hearts against ischemia reperfusion injury in streptozotocin induced diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 3 (2010), pp. 94-100
64. Vanni RO. El género *Desmodium* (Leguminosae, Desmodieae) en Argentina. Inst botánica darwiniana. 2001; 39:226–86.
65. Torres-Colín L, Duno-de Stefano R, Gómez-Hinostrosa C. Los géneros *Alysicarpus* y *Desmodium* ( Fabaceae ) en la península de Yucatán , México. Rev Mex Biodivers. 2011;82:1087–97.
66. Garcia A J, Blanco C F, Font G, Mj R. Efectos tóxicos de alternariol por ensayos in vitro: revisión. Rev Toxicológica. 2014; 31:196–203.
67. Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu X, Darroudi F, Kassie F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. Toxicology. 2004; 198:329–40.
68. Alía, M.; Ramos, S.; Mateos, R.; Bravo, L.; Goya, L. Quercetin protects human hepatoma cell line (HepG2) against oxidative stress induced by tertbutyl hydroperoxide. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 212, 110-118.

69. Denizot F.; Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986, 89, 271–277. doi: 10.1016/0022-1759(86)90368-6.
70. Wang H.; Joseph J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999, 27, 612–616. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00107-0.
71. Barrios-Arpi L.; Arias Y.; Lopez-Torres B.; Ramos-Gonzalez M.; Ticli G.; Prosperi E.; Rodríguez J.L. In Vitro Neurotoxicity of Flumethrin Pyrethroid on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Apoptosis Associated with Oxidative Stress Toxics 2022, 10, 131. doi: 10.3390/toxics10030131.
72. Ramakers C.; Ruijter J.M.; Deprez R.H.L.; Moorman A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003, 339, 62–66. doi: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4.
73. Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, N.; Muto, Y.; Takizawa, T.; Terao, J. In vivo comparison of the bioavailability of catechin, epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J. Nutr.* 2001, 131, 2885-2891.
74. Pappas, E. & Schaich, K. M. (2009). Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects and processing stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 741-781.
75. Pedersen, C. B., Kyle, J., Jenkinson, A. M., Gardner, P. T., PcPhail, D. B. & Duthie, G. G. (2000). Effects of cranberry and blueberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 405-408.
76. Palomino, O.; Giordani, V.; Chowen, J.A.; Fernández Alonso, S.; Goya, L. 2022. Physiological doses of oleic and palmitic acids protect human endothelial cells from oxidative stress. *Molecules* 2022, 27, 5217.
77. Martín, M.A.; Ramos, S.; Mateos, R.; Serrano, A.B.G.; Izquierdo-Pulido, M.; Bravo, L.; Goya, L. Protection of Human HepG2 Cells against Oxidative Stress by Cocoa Phenolic Extract. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 7765–7772.
78. Martín, M.A., Ramos, S., Cordero-Herrera, I., Bravo, L. and Goya, L. 2013. Cocoa phenolic extract protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Nutrients* 5: 2955-2968.

79. León-González, A., Mateos, R., Ramos, S., Martín, M.A., Sarriá, B., Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Bravo, L. and Goya, L. 2012. Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from *Corema album*. *Food Res. Int.* 49: 728-738.
80. Baeza, G.; Amigo-Benavent, M.; Sarriá, B.; Goya, L.; Mateos, R. and Bravo, L. 2014. Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress. *Food Res. Int.* 62: 1038-46.
81. Martín, M.A.; Ramos, S.; Mateos, R.; Marais, J.; Bravo, L.; Khoo, C. and Goya, L. 2015. Chemical characterization and chemo-protective activity of cranberry phenolic extracts in a model cell culture. Response of the antioxidant defences and regulation of signaling pathways. *Food Res. Int.* 71: 68-82.
82. Castillo G.; Barrios-Arpi L.; Ramos-Gonzalez M.; Vidal P.; Gonzales-Iribarren A.; Ramos-Cevallos N.; Rodríguez JL. Neurotoxicity associated with oxidative stress and inflammasome gene expression induced by allethrin in SH-SY5Y cells. *Toxicol Ind Health* 2022, 38, 777-788. doi: 10.1177/07482337221089585.
83. Barrios-Arpi L.; Arias Y.; Lopez-Torres B.; Ramos-Gonzalez M.; Ticli G.; Prosperi E.; Rodríguez J.L. In Vitro Neurotoxicity of Flumethrin Pyrethroid on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Apoptosis Associated with Oxidative Stress. *Toxics* 2022, 10, 131. doi: 10.3390/toxics10030131.
84. Lee M.H.; Lee J.M.; Jun S.H.; Lee S.H.; Kim N.W.; Lee J.H. The anti-inflammatory effects of *Pyrolae herba* extract through the inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production. *J Ethnopharmacol* 2007, 112, 49–54. doi: 10.1016/j.jep.2007.01.036
85. Adebayo S.A.; Ondua M.; Shai L.J.; Lebelo S.L. Inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activities of four South African medicinal plants. *J Inflamm Res* 2019, 12, 195-203. doi: 10.2147/JIR.S199377.
86. Mariño G.; López-Otín C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *CMLS Cell Mol Life Sci* 2004, 61, 1439–1454.
87. Pelicano H.; Carney D.; Huang P . ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Update* 2004, 7, 97–110.
88. Chen Y.; McMillan-Ward E.; Kong J.; Israels S.J.; Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* 2008, 15, 171-82. doi: 10.1038/sj.cdd.4402233.

89. Li J.K.; Ge R.; Tang L.; Li Q.S. Protective effects of farrerol against hydrogen-peroxide-induced apoptosis in human endothelium-derived EA.hy926 cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2013, 91, 733-40. doi: 10.1139/cjpp-2013-0008.
90. Guo S.; Long M.; Li X.; Zhu S.; Zhang M.; Yang Z. Curcumin activates autophagy and attenuates oxidative damage in EA.hy926 cells via the Akt/mTOR pathway. *Mol Med Rep* 2016, 13, 2187-93. doi: 10.3892/mmr.2016.4796.
91. Morán-Santibañez K.; Vasquez A.H.; Varela-Ramirez A.; Henderson V.; Sweeney J.; Odero-Marah V.; Fenelon K.; Skouta R. Larrea tridentata Extract Mitigates Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y. *Cells Antioxidants (Basel)* 2019, 8, 427. doi: 10.3390/antiox8100427.
92. Jantas D.; Malarz J, Le TN, Stojakowska A. Neuroprotective Properties of Kempferol Derivatives from *Maesa membranacea* against Oxidative Stress-Induced Cell Damage: An Association with Cathepsin D Inhibition and PI3K/Akt Activation. *Int J Mol Sci* 2021, 22, 10363. doi: 10.3390/ijms221910363.
93. Myhrstad, M.C.; Carlsen, H.; Nordstrom, O.; Blomhoff, R.; Moskaug, J.O. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Rad. Biol. Med.* 2002, 32, 386-393.
94. Battistelli M.; Malatesta M.; Meschini S. Oxidative Stress to Promote Cell Death or Survival. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2054650. doi: 10.1155/2016/2054650.
95. Lee H.J.; Spandidos D.A.; Tsatsakis A.; Margina D.; Izotov B.N.; Yang S.H. Neuroprotective effects of *Scrophularia buergeriana* extract against glutamate-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Int J Mol Med* 2019, 43, 2144-2152. doi: 10.3892/ijmm.2019.4139.
96. Huang W.M.; Liang Y.Q.; Tang L.J.; Ding Y.; Wang X.H. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Astragalus polysaccharide* on EA.hy926 cells. *Exp Ther Med* 2013, 6, 199-203. doi: 10.3892/etm.2013.1074.
97. Ma D.; Wang Z.; He Z.; Wang Z, Chen Q.; Qin F.; Zeng M.; Chen J. Pine pollen extract alleviates ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 cells via MAPK signaling. *Food Chem Toxicol* 2023, 171, 113550. doi: 10.1016/j.fct.2022.113550.
98. Chu W.L.; Lim Y.W.; Radhakrishnan A.K. et al. Efecto protector del extracto acuoso de *Spirulina platensis* frente a la muerte celular inducida por radicales libres. *Complemento BMC*, 53 (2010). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-53>.