



**Departamento de Bioquímica  
Facultad de Biología  
Universidad de La Habana**

---

**Actividad antioxidante y neuroprotectora  
*in vitro* del extracto acuoso del alga  
*Bryothamnion triquetrum*  
(Ceramiales, Rhodomelaceae)**

**Resumen de la Tesis presentada para optar por el  
Título de Doctor en Ciencias Biológicas**

**Autor: MSc. Adyary Fallarero Linares  
Tutores: Dr. Alexis Vidal Novoa  
Dr. Pia M. Vuorela**

2005

**Este proyecto de tesis recibió apoyo financiero de:**



***Center for International Mobility (CIMO)***  
**Finlandia**



***Finnish Cultural Foundation***  
**Finlandia**



***International Brain Organization,***  
**(IBRO)**



***Viikki Drug Discovery Technology Center,***  
**Facultad de Farmacia,**  
**Universidad de Helsinki, Finlandia**



**Red Iberoamericana de Ciencia y Tecnología  
para el Desarrollo (CYTED),  
España**

# Índice

---

Síntesis.....	i
Lista de abreviaturas, símbolos y fórmulas químicas.....	ii
<b>CAPÍTULO I: Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II: Materiales y Métodos.....</b>	<b>5</b>
II.1 Preparación del extracto acuoso del alga <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	5
II.2 Ensayos de caracterización de la capacidad <i>in vitro</i> del extracto de <i>Bryothamnion triquetrum</i> para inhibir la peroxidación lipídica, atrapar radicales libres y unir hierro ( <i>Fe</i> ).....	6
II.3 Estudio de los componentes antioxidantes en el extracto de <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	6
II.3.1 Análisis cuantitativo del contenido de <i>Se</i> , ácido ascórbico, carotenos y compuestos fenólicos totales:.....	6
II.3.2 Separación, identificación y cuantificación de ácidos cinámicos.....	7
II.3.2.1 Esquema general de fraccionamiento del extracto acuoso de <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	7
II.3.2.2 Identificación y cuantificación de los ácidos cinámicos en el extracto de <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	7
II.4 Ensayos para la caracterización de la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto acuoso de <i>Bryothamnion triquetrum</i> en células GT1-7.....	7
II.4.1 Cultivo de las células GT1-7 y condiciones de exposición a los compuestos tóxicos, al extracto de <i>Bryothamnion triquetrum</i> y sus ácidos cinámicos.....	7
II.4.2 Modelos experimentales usados para la inducción de estrés oxidativo neuronal.....	8
II.4.3 Determinación de la viabilidad celular.....	8
II.4.4 Determinación de la producción de radicales libres.....	8
II.4.5 Determinación de los niveles de GSH.....	9
II.4.6 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.....	9
II.5. Procesamiento y análisis estadístico de los resultados.....	9
<b>CAPÍTULO III: Resultados.....</b>	<b>10</b>
III.1. Estudio <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante del extracto acuoso de <i>Bryothamnion triquetrum</i> : efectos inhibitorios sobre la peroxidación lipídica, atrapamiento de radicales libres y unión al <i>Fe</i> .....	10
III.2. Estudio de los componentes antioxidantes del extracto acuoso de <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	10
III.2.1 Estudio de los compuestos fenólicos en el extracto de <i>Bryothamnion triquetrum</i> .....	11
III.3. Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto acuoso de <i>Bryothamnion triquetrum</i> en células inmortalizadas de hipotálamo de ratón GT1-7.....	12
III.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora en los modelos de daño neuronal mediados por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y la combinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y FeSO <sub>4</sub> .....	13
III.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora en el modelo de daño neuronal mediado por SIN-1.....	13
III.3.3 Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora en el modelo de daño neuronal mediado por MeHg.....	15
III.3.4 Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora en el modelo de daño neuronal inducido por hipoxia química y aglucemia (HQ/A).....	16
<b>CAPÍTULO IV: Discusión.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO V: Conclusiones.....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO VI: Recomendaciones.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO VII: Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>31</b>
<b>Autobibliografía.....</b>	<b>41</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>44</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>45</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>46</b>

## Síntesis

---

La presente investigación aborda el estudio de las propiedades antioxidantes y neuroprotectoras de un extracto acuoso del alga *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe, así como la relación de tales propiedades con los compuestos fenólicos presentes en este producto natural, mediante el uso de modelos experimentales *in vitro*.

Los resultados mostraron que el extracto acuoso de *B. triquetrum* contiene moléculas que pueden unir *Fe*, atrapar radicales  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $DPPH^{\bullet}$ , e inhibir la peroxidación lipídica espontánea e inducida químicamente en homogenados de tejido cerebral de rata. Dentro de los componentes químicos con propiedades antioxidantes conocidas, fue determinado que el extracto contiene *Se*, ácido ascórbico, carotenos y compuestos fenólicos. Se profundizó particularmente en la composición de compuestos fenólicos del extracto de *B. triquetrum*, utilizando una combinación de extracciones líquido- líquido, Cromatografía en Capa Delgada preparativa y Cromatografía en Columna de Amberlite XAD-2. Ello permitió obtener fracciones del extracto con actividad inhibitoria sobre la peroxidación lipídica espontánea en homogenados de tejido cerebral de rata, en las que se identificaron y cuantificaron por Cromatografía Gaseosa, los ácidos ferúlico, *p*-cumárico y *trans*-cinámico, que representan el 60% de los compuestos fenólicos totales del extracto.

La actividad neuroprotectora del extracto y los ácidos cinámicos que contiene, fue estudiada en células inmortalizadas de hipotálamo de ratón GT1-7 expuestas a diferentes condiciones experimentales en que se indujo estrés oxidativo. La citotoxicidad producida por  $H_2O_2$ , la combinación de  $H_2O_2$  y  $FeSO_4$ , SIN-1, MeHg y la combinación de hipoxia química y aglucemia en diferentes condiciones de exposición, fue significativamente atenuada por la exposición al extracto de *B. triquetrum* y ello pudo relacionarse, al menos parcialmente, con su contenido de ácido ferúlico. Además, fue demostrado que los ácidos *p*-cumárico y *trans*-cinámico no son responsables de los efectos neuroprotectores observados en neuronas GT1-7 ni incrementan sinérgicamente la actividad registrada para el ácido ferúlico. Con relación a los posibles modos de acción involucrados, fue demostrado que el efecto neuroprotector del extracto puede o no involucrar la disminución en la producción de radicales libres, pero no se relaciona con el incremento en las reservas intracelulares de GSH.

## Lista de abreviaturas, símbolos y fórmulas químicas

---

Las siguientes abreviaturas, símbolos y fórmulas químicas fueron utilizadas a lo largo del texto:

AF:	ácido 4-hidroxi, 3-metoxi cinámico (ácido ferúlico)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	peróxido de hidrógeno
Ap-C:	ácido 4-hidroxi cinámico (ácido <i>p</i> -cu márico)	HAc:	ácido acético
aprox.:	aproximadamente	HBSS:	tampón salino balanceado
ArO•:	radical fenoxilo	HQ/A:	hipoxia química/aglucemia
At-C:	ácido 3-fenil, 2 propenoico (ácido <i>trans</i> -cinámico)	KCN:	cianuro de potasio
BSA:	N,O,bis (trimetil-silil)-acetamida	LOX:	lipooxigenasa
CI <sub>50</sub> :	concentración inhibitoria media	MBCl:	monoclorobimano
CITMA:	Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba	MeHg:	metil mercurio
CL <sub>50</sub> :	concentración letal media	MeOH:	metanol
DCF:	2', 7'- diclorofluoresceina	NBT:	azul de nitrotetrazolio
DCFH:	2', 7'- diclorofluorescina	O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> :	radical superóxido
DCFH <sub>2</sub> - DA:	diacetato de 2', 7' - diclorofluorescina	OH•:	radical hidroxilo
DHR 123:	dihidrorodamina 123	ONOO <sup>-</sup> :	anión peroxinitrito
DMEM:	medio de cultivo Dulbecco Modificado Eagle	PBS:	tampón fosfato salino
DPPH•:	radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil	RNS:	especies reactivas del nitrógeno
DS:	desviación estándar	RO•:	radical alcoxilo
EDTA:	ácido etilén diamino tetraacético	RO <sub>2</sub> •:	radical peroxilo
ES:	error estándar	ROS:	especies reactivas del oxígeno
EtOH:	etanol	SIN-1:	3-morfolinosidnonimina
FLA <sub>2</sub> :	fosfolipasa A <sub>2</sub>	SOD:	superóxido dismutasa
GSH:	glutación reducido	T:	temperatura
GSH-Px:	glutación peroxidasa	TBARS:	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
		TLC:	Cromatografía en Capa Delgada
		TLCP:	Cromatografía en Capa Delgada preparativa
		∅:	diámetro

## CAPÍTULO I: Introducción

Resulta impresionante el número cada vez mayor de estudios científicos que sustentan la participación del estrés oxidativo en diversas patologías de elevada incidencia en la población mundial, como las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer, la aterosclerosis, y los procesos inflamatorios (Gilgun-Sherki *et al.*, 2002). Particularmente en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, aunque los eventos bioquímicos que explican la etiología de la muerte neuronal no están totalmente esclarecidos, el daño mediado por radicales libres parece contribuir de modo decisivo a su desarrollo. Tales hallazgos han permitido ampliar las posibilidades de terapia contra estos trastornos cerebrales utilizando compuestos que eviten o disminuyan el daño oxidativo (Behl y Moosmann, 2002). Dada la complejidad de las rutas intracelulares por las que se pueden generar radicales libres en estas patologías, se ha sugerido que los antioxidantes multifuncionales pueden ser efectivos en la neuroprotección (Youdim *et al.*, 2002).

En los últimos años, el empleo de antioxidantes sintéticos con fines terapéuticos ha sido cuestionado debido a su posible capacidad promotora de tumores y genotoxicidad (Gordon, 1996; Safer y Al-Nughamish, 1999; Rauha, 2001). En este contexto, ha ganado interés la búsqueda y utilización de compuestos antioxidantes de origen natural. Ello se inserta dentro de la tendencia mundial actual a abordar el uso de las fuentes naturales para la obtención de fármacos efectivos contra diversas enfermedades (Raskin *et al.*, 2002).

A partir de estas consideraciones, se ha propuesto el uso de extractos de plantas u otras fuentes naturales como agentes neuroprotectores, ya que estos extractos pueden constituir mezclas de compuestos antioxidantes con diversos modos de acción (Aruoma, 1998; Bastianetto y Quirion, 2002; Aruoma *et al.*, 2003). Entre otras ventajas de los antioxidantes naturales puede mencionarse que exhiben una elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica (Raskin *et al.*, 2002). A ello se une que muchos de estos compuestos no son tóxicos y por ende, su uso es mayormente aceptado como seguro, aunque esto no siempre es cierto y algunos antioxidantes naturales puedan tener algún riesgo toxicológico (Kagan *et al.*, 2002).

Dentro de las fuentes naturales, las algas constituyen opciones para la búsqueda de nuevos productos bioactivos, especialmente antioxidantes, lo que se justifica por diversas razones. Desde un punto de vista general puede decirse que las algas son fuentes de compuestos bioactivos que tienen un carácter renovable y son fácilmente obtenibles. A esto se suma la biodiversidad que presentan estos organismos en regiones tropicales como la nuestra, lo que permite disponer de una amplia variedad y cantidad de especies simultáneamente (Harvey, 2000). Son, además, organismos considerados en general poco

tóxicos (Grabley y Thiericke, 1999). Su consumo como parte de la dieta de algunas poblaciones humanas se ha asociado a una variedad de efectos beneficiosos sobre la salud, por ejemplo la reducción de la incidencia de algunos tipos de cánceres (Hiqashi *et al.*, 1999, Funahashi *et al.*, 1999). Ello por tanto sugiere que las algas contienen compuestos biológicamente activos capaces de modular diferentes funciones fisiológicas del organismo.

La búsqueda de compuestos antioxidantes a partir de las algas ha estado inspirada por el hecho de que se presupone necesaria su presencia como defensas en el medio oxidativo “hostil” en que habitan estos organismos. Las algas están expuestas a una combinación de luz y oxígeno que conlleva a la formación de radicales libres. Sin embargo, la ausencia de daño oxidativo en los componentes estructurales de las algas y su estabilidad frente a la oxidación durante el almacenamiento, sugiere que sus células deben tener antioxidantes efectivos (Matsukawa *et al.*, 1997).

Motivados por todo lo anterior, en los últimos años se han publicado diferentes trabajos referidos a la actividad antioxidante de extractos de algas y microalgas en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Estos estudios han permitido identificar a los compuestos fenólicos, los carotenoides y algunos tipos de aminoácidos, como los principales responsables de la actividad antioxidante que presentan las algas y microalgas (Nakamura *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1997; Matsukawa *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1999; Duval *et al.*, 2000; Matsukawa *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000; Jiménez-Escrig *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2001; Ruberto *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002a; Yoshie *et al.*, 2002; Fisch *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; Siriwardhana *et al.*, 2003; Huang y Wang, 2004; Kang *et al.*, 2004; Siriwardhana *et al.*, 2004). Sin embargo, el uso de extractos de algas y microalgas como fuentes de antioxidantes naturales útiles en el campo de la neuroprotección ha sido escasamente abordado (Ikeda *et al.*, 2003).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y representativos de metabolitos secundarios de las plantas y algas (Bravo, 1998). Están presentes en la mayoría de los productos vegetales consumidos por el hombre y se han descrito ampliamente sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticarcinogénicas, lo que sugiere sus potenciales efectos beneficiosos sobre la salud humana (Bravo, 1998; Kahkonen *et al.*, 1999; Tapiero *et al.*, 2002).

La especie *Bryothamnion triquetrum*, es un alga perteneciente al Phylum Rhodophyceae que habita en nuestra plataforma insular (Littler y Littler, 2000). Considerando, entre otros elementos, la abundancia de esta especie y la facilidad de su colecta, durante la década iniciada en el año 1980 varios investigadores cubanos dirigieron su interés hacia el estudio de los componentes químicos de *B. triquetrum*, pero se enfocaron solamente hacia el contenido de polisacáridos (Fernández *et al.*, 1987;

González y García, 1988; García *et al.*, 1988). En particular, la caracterización de los ficocoloides que fueron obtenidos del alga mostró que podían tener diferentes aplicaciones industriales y entre ellas se propuso su introducción como aditivos en la alimentación humana (García *et al.*, 1988). Así, estos hallazgos impulsaron las investigaciones que permitieron establecer las condiciones de cultivo del alga en nuestro país, específicamente en el área ubicada en la rada del Instituto de Oceanología de Cuba (Arecas, 1995).

En períodos recientes, grupos de investigadores brasileños han dirigido su atención hacia la presencia de compuestos biológicamente activos en esta alga, específicamente hacia las lectinas (Ainouz *et al.*, 1992; 1995; Calvete *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2002). Los hallazgos de estos autores no sólo han demostrado la existencia en *Bryothamnion triquetrum* de una molécula nueva dentro de una nueva familia de lectinas (Calvete *et al.*, 2000), sino que además han aportado evidencias convincentes de las posibilidades de las lectinas de esta alga como fármacos analgésicos (Freitas *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2002). Todo ello ha sustentado el interés por el estudio de *Bryothamnion triquetrum* como fuente de compuestos biológicamente activos, entre los que pueden encontrarse antioxidantes.

La posibilidad de que *Bryothamnion triquetrum* constituya una fuente de moléculas antioxidantes efectivas, está sustentada en las siguientes razones: i) esta alga se localiza en la zona fótica, con lo que se expone a niveles notables de radiación solar que favorecen la generación de radicales libres, y probablemente condicionan la existencia de compuestos antioxidantes que la protejan; ii) se ha referido una actividad antioxidante alta para extractos de otras 4 especies de algas rojas que están incluidas en la misma familia a la que pertenece *Bryothamnion triquetrum* (Rh.; Ceramiales, Rhodomelaceae): *Polysiphonia urceolata*, *Rhodomela teres*, *Rhodomela confervoides* y *Symphyclocladia latiuscula* (Fujimoto y Kaneda, 1984; Yan *et al.*, 1998; Huang y Wang, 2004) y iii) *Bryothamnion triquetrum* es un alga roja y se conoce que las especies de este Phylum contienen una variedad de compuestos fenólicos (Whitfield *et al.*, 1999), cuyas propiedades antioxidantes han sido muy bien documentadas (Bravo, 1998).

A partir de estos elementos, la presente investigación tuvo su punto de partida en la formulación de la siguiente **Hipótesis**:

**“El extracto acuoso del alga *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe posee propiedades antioxidantes y neuroprotectoras que guardan relación con su contenido de compuestos fenólicos”.**

Para examinar esta hipótesis, se propuso el siguiente **Objetivo General**:

**Investigar las propiedades antioxidantes y neuroprotectoras del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum* en modelos de estrés oxidativo *in vitro* y los posibles modos de acción involucrados, así como la relación de tales propiedades con el contenido de compuestos fenólicos del extracto.**

Para dar cumplimiento a este objetivo, se diseñaron las siguientes **Tareas**:

- Establecimiento de la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de *B. triquetrum* tanto para inhibir la peroxidación lipídica en homogenados de tejido cerebral de rata, como para atrapar diferentes tipos de radicales libres y unir hierro
- Determinación de componentes antioxidantes en el extracto acuoso de *B. triquetrum* y estudio específico de los compuestos fenólicos que pueden ser responsables de proteger contra la peroxidación lipídica en homogenados de tejido cerebral de rata
- Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto acuoso de *B. triquetrum* y sus ácidos fenólicos (específicamente cinámicos) en la línea celular inmortalizada de hipotálamo de ratón GT1-7, frente al daño neuronal mediado por especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno que induce el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el compuesto 3-morfolinosidnonimina (SIN-1)
- Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto acuoso de *B. triquetrum* y sus ácidos cinámicos en la línea celular GT1-7, frente al daño oxidativo neuronal mediado por metil mercurio (MeHg) y la combinación de hipoxia química y aglucemia como modelo de isquemia neuronal

La **novedad científica** de esta tesis radica en que por primera vez para la ciencia, se caracterizan las propiedades neuroprotectoras en modelos de estrés oxidativo *in vitro* de un extracto de una especie del Reino Algae y se relacionan con su contenido de ácidos cinámicos (ácidos ferúlico, *p*-cumárico y *trans*-cinámico). Se refiere además, por primera vez, la capacidad neuroprotectora de un extracto crudo obtenido de una fuente natural frente al daño oxidativo inducido *in vitro* por MeHg. Por último, para el extracto acuoso de la especie *B. triquetrum* se sustentan nuevas propiedades (antioxidantes y neuroprotectoras) *in vitro*, se aborda el estudio de sus compuestos fenólicos y se demuestra la importancia del ácido ferúlico como compuesto al menos parcialmente responsable de tales propiedades neuroprotectoras.

Los hallazgos de esta tesis enriquecen el conocimiento científico sobre los compuestos antioxidantes de naturaleza fenólica que están presentes en extractos de algas y sustentan su utilidad como agentes

neuroprotectores en modelos experimentales de estrés oxidativo *in vitro*, todo lo cual constituye el **aporte** de esta tesis **a las Ciencias Biológicas**.

Finalmente, esta tesis tiene **valor práctico** ya que sustenta la efectividad del extracto acuoso de *B. triquetrum* como agente antioxidante y neuroprotector en modelos experimentales *in vitro* y los resultados sugieren su posible aplicación futura en patologías relacionadas con el estrés oxidativo, lo que debe ser evaluado en investigaciones posteriores utilizando modelos experimentales *in vivo*. Además, en esta tesis se desarrollan metodologías experimentales para el estudio de los ácidos cinámicos presentes en el extracto acuoso de *B. triquetrum* y la evaluación de sus propiedades neuroprotectoras en células GT1-7, y éstas pueden ser aplicadas al estudio de otros extractos acuosos de algas.

La presente tesis consta de **129** páginas, distribuidas en **8** Capítulos; **I**: Introducción, **II**: Revisión Bibliográfica, **III**: Materiales y Métodos, **IV**: Resultados, **V**: Discusión, **VI**: Conclusiones, **VII**: Recomendaciones y **VIII**: Referencias Bibliográficas. Además se incluyen **3** Anexos. Se muestran **26** Tablas, **18** Figuras y se citan **276** Referencias Bibliográficas. Los resultados incluidos en la presente tesis han sido presentados en **6** publicaciones (**4** artículos en revistas internacionales, **1** capítulo de un libro publicado por una editorial extranjera y **1** artículo en una revista cubana). Además, se han presentado en **8** eventos científicos internacionales que han tenido lugar en Cuba y en **4** reuniones internacionales que se han celebrado en otros países. La mayor parte de estos resultados han sido obtenidos en el contexto de la colaboración establecida con el *Drug Discovery Technology Center* de la Facultad de Farmacia, perteneciente a la Universidad de Helsinki en Finlandia, el Departamento de Alimentos y Nutrición Experimental de la Universidad de Sao Pablo, en Brasil y el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad de Kuopio, en Finlandia. Estos hallazgos han sido presentados en varias instituciones académicas europeas, como las Universidades de Kuopio y Helsinki en Finlandia y el Instituto de Fitoquímica y Farmacognosia de la Universidad de Lausanne, en Suiza. La predefensa de esta tesis se realizó ante el Consejo Científico y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

## **CAPÍTULO II: Materiales y Métodos**

### **II.1 Preparación del extracto acuoso del alga *Bryothamnion triquetrum***

Los especímenes de *Bryothamnion triquetrum* se colectaron en la dársena del Instituto de Oceanología (CITMA, Ciudad Habana). Los ejemplares se lavaron con H<sub>2</sub>O de mar y se homogeneizaron en H<sub>2</sub>O destilada manteniendo una relación 1:4 (p/v: peso en gramos del alga/ volumen en mL de H<sub>2</sub>O). Los homogenados se centrifugaron (800g, T= +4°C, 20 minutos) y los sobrenadantes fueron liofilizados y

conservados a T= -20°C. El rendimiento del extracto final liofilizado en relación con el alga fresca fue de 0.5%. Se controló la calidad de cada lote de extractos recién preparados mediante la determinación de la actividad inhibitoria sobre la peroxidación lipídica espontánea (parámetro biológico, se describe luego en **II.2**) y la medición de la concentración de compuestos fenólicos totales (parámetro químico, se describe posteriormente en **II.3.1**).

## **II.2 Ensayos de caracterización de la capacidad *in vitro* del extracto de *Bryothamnion triquetrum* para inhibir la peroxidación lipídica, atrapar radicales libres y unir hierro (Fe)**

La capacidad del extracto para inhibir la peroxidación lipídica fue medida en homogenados de tejido cerebral de rata, los que se obtuvieron mediante la metodología de Ohkawa *et al.*, (1979). En el ensayo de peroxidación lipídica espontánea, se incubó el homogenado de cerebro de rata con igual volumen del extracto de *B. triquetrum* o sus fracciones a T=+37°C durante 40 minutos. Los pasos posteriores para monitorear la formación de TBARS también se realizaron según Ohkawa *et al.*, (1979). En el ensayo de peroxidación lipídica inducida, se añadió además en la mezcla inicial de incubación FeSO<sub>4</sub> 50 μmol·L<sup>-1</sup> y ácido ascórbico 400 μmol·L<sup>-1</sup>, y ésta se mantuvo a T=+25°C durante 30 minutos. Las etapas restantes se realizaron mediante la metodología de Ohkawa *et al.*, (1979). En ambos ensayos se determinó el valor de concentración del extracto de *B. triquetrum* que produce el 50% de inhibición de la formación máxima de TBARS (CI<sub>50</sub>), como se describe en **II.5**.

La actividad atrapadora de radicales O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (**I**) fue determinada espectrofotométricamente según Fridovich y McCord, (1969) a través de la capacidad para inhibir la reducción del NBT que es mediada por O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Para determinar la actividad atrapadora de radicales OH<sup>•</sup> y unión al Fe se empleó el ensayo de la 2-desoxi-*d*-ribosa (**II**) en sus variantes con EDTA y sin EDTA respectivamente, según Aruoma, (1994). La concentración del extracto que produce el 50% de inhibición de la reducción máxima del NBT (en **I**) y las concentraciones que producen el 50% de inhibición de la formación máxima de TBARS (en las dos variantes de **II**) (CI<sub>50</sub>), fueron calculadas como se describe en **II.5**. Para determinar la actividad atrapadora de radicales DPPH<sup>•</sup> se empleó el protocolo descrito por Goupy *et al.*, (1999). La concentración del extracto que produce el 50% de inhibición de la absorbancia máxima del radical DPPH<sup>•</sup> (CI<sub>50</sub>) también se calculó como refiere Goupy *et al.*, (1999).

## **II.3 Estudio de los componentes antioxidantes en el extracto de *Bryothamnion triquetrum***

**II.3.1 Análisis cuantitativo de l contenido de Se, ácido ascórbico, carotenos y compuestos fenólicos totales:** El contenido de Se fue cuantificado utilizando el método de absorción electrotérmica atómica descrito por Kumpulainen *et al.*, (1983). El contenido de ácido ascórbico, carotenos y compuestos fenólicos totales fue determinado espectrofotométricamente según Natelson, (1964); AOAC, (1990) y

Quettier-Deleu *et al.*, (2000), respectivamente.

### **II.3.2 Separación, identificación y cuantificación de ácidos cinámicos**

**II.3.2.1 Esquema general de fraccionamiento del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum*:** El extracto acuoso de *B. triquetrum* fue fraccionado de acuerdo al esquema que se presenta en el **Anexo I**. En cada etapa, las fracciones fueron concentradas y liofilizadas para la determinación del porcentaje de rendimiento con relación al extracto acuoso liofilizado y la detección de la presencia de compuestos fenólicos por análisis de TLC. Para este último ensayo, el soporte empleado fue sílica gel G (Merck, Alemania), el solvente de corrida: butanol:HAc:H<sub>2</sub>O 5:1:2.6, y la placa fue revelada con los reactivos de Folin- Ciocalteau alcalino y FeCl<sub>3</sub> 1% según Stahl, (1969)a y Stahl, (1969)b respectivamente. Además, en las fracciones se evaluó la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica espontánea de homogenados de tejido cerebral de rata como se describió en **II.2**.

**II.3.2.2 Identificación y cuantificación de los ácidos cinámicos en el extracto de *Bryothamnion triquetrum*:** Las fracciones a estudiar se silinizaron mediante la adición de BSA y luego se aplicaron en un Cromatógrafo de Gas Shimadzu QP 5000 (Shimadzu, Japón) utilizando una columna capilar semipolar de polimetilfenilsiloxona DB5 (Supelco, E.U.) de 30 metros de largo y 0.25 mm de Ø interno. Las condiciones operacionales fueron: i) volumen de muestra inyectada = 1 µL; ii) T del inyector = +310°C; iii) detector de ionización de llama con T = +320°C; iv) el flujo del gas portador (helio) = 1 mL·min<sup>-1</sup>. El programa de T utilizado fue: T inicial = +150°C, isotérmica 3 minutos, con incremento de +5°C·min<sup>-1</sup> hasta T=+300°C e isotérmica 3 minutos. El procesamiento de los resultados (identificación y cuantificación de los ácidos cinámicos) se realizó con el programa EZ Chrom para Windows NT Workstation 4.0 (Microsoft software Inc, E.U.).

### **II.4 Ensayos para la caracterización de la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum* en células GT1-7**

**II.4.1 Cultivo de las células GT1-7 y condiciones de exposición a los compuestos tóxicos, al extracto de *Bryothamnion triquetrum* y sus ácidos cinámicos:** Las células GT1-7 (Mellon *et al.*, 1990) se cultivaron en medio DMEM (Gibco, Inglaterra) de alta concentración de glucosa (25 mmol·L<sup>-1</sup>), como se describe en Loikkanen *et al.*, (1998). Los compuestos tóxicos, el extracto de *B. triquetrum*, los controles positivos y la glucosa se disolvieron en diferentes solventes para preparar soluciones *stock*, y se filtraron usando filtros de 0.2 µm (Millipore, Francia). Las soluciones *stock* de los ácidos cinámicos se prepararon en EtOH absoluto, se esterilizaron por filtración y se añadieron a las células de modo que sus concentraciones finales correspondieron con las que se encuentran en el extracto de *B. triquetrum* (0.05, 0.25 y 0.50 mg·mL<sup>-1</sup>): 0.1, 0.6, 1.1 µmol·L<sup>-1</sup> para el ácido ferúlico (AF);

1.3, 6.4, 12.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para el ácido *p*-cumárico (Ap-C) y 0.08, 0.4, 0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para el ácido *trans*-cinámico (At-C).

**II.4.2 Modelos experimentales usados para la inducción de estrés oxidativo neuronal:** Se emplearon los modelos de daño neuronal inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la combinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{FeSO}_4$ , SIN-1 y MeHg. Luego de lavar inicialmente las células con medio de cultivo o diferentes soluciones tampones, las células se expusieron al extracto de *B. triquetrum*, o sus ácidos cinámicos o los compuestos controles. Inmediatamente después se agregó el compuesto tóxico, durante períodos entre 2 y 24 horas, dependiendo del modelo. Las exposiciones que duraron hasta 3 horas se realizaron en tampón HBSS y las de mayor duración se realizaron en medio de cultivo. Las concentraciones de los compuestos tóxicos empleadas en cada modelo fueron escogidas a partir de experimentos preliminares en los que se midió el efecto de diferentes concentraciones sobre la viabilidad de las neuronas GT1-7. En el caso de los modelos de daño neuronal mediado por SIN-1 y MeHg, el resto de las condiciones de exposición se seleccionaron a partir de los protocolos propuestos por Bonfoco *et al.*, (1996) y Sarafian *et al.*, (1994). Además se utilizó el modelo de daño neuronal inducido por la combinación de hipoxia química y aglucemia (HQ/A), mediante una modificación del método propuesto por Myers *et al.*, (1995). Luego del lavado inicial, las células se expusieron al medio control (sin KCN, con glucosa 5.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) o a HQ/A (medio sin glucosa y con KCN 3  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en presencia o no del extracto de *B. triquetrum* o sus ácidos cinámicos o los compuestos controles, durante un período de 1.75 ó 3 horas en dependencia del experimento, a  $T = +37^\circ\text{C}$ . Al finalizar, las células fueron reperfundidas con medio de cultivo de las células GT1-7 o tampón PBS con glucosa 25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , durante un período entre 0 y 24 horas, en dependencia del experimento.

**II.4.3 Determinación de la viabilidad celular:** En todos los modelos, el porcentaje de viabilidad celular se determinó al finalizar los eventos citotóxicos. Para ello, se utilizó el método fluorimétrico descrito por Loikkanen *et al.*, (1998). La fluorescencia fue medida en un fluorímetro Fluoroskan Ascent (Labsystems, Finlandia), al igual que en los ensayos descritos en **II.4.4** y **II.4.5**.

**II.4.4 Determinación de la producción de radicales libres:** En las exposiciones al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , SIN-1 y MeHg que duraron hasta 3 horas (**A**), luego de la etapa inicial de lavado se agregó la sonda  $\text{DCFH}_2\text{-DA}$  20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Molecular Probes, E.U.) en tampón HBSS por 20 minutos,  $T = +25^\circ\text{C}$ . Luego se añadieron el extracto de *B. triquetrum*, o sus ácidos cinámicos o el control positivo, antes de la adición del agente tóxico. Para las exposiciones de más de 3 horas (**B**), el medio fue retirado al concluir la exposición al agente tóxico y al extracto de *B. triquetrum*, o sus ácidos cinámicos o el control positivo, y se agregó  $\text{DCFH}_2\text{-DA}$  40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en tampón HBSS a cada pozo, durante 15 minutos. Se determinó

el incremento porcentual en la fluorescencia de la DCF durante el período de exposición al compuesto tóxico y a la sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (en **A**), o durante el período posterior de exposición a la sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (en **B**). La fluorescencia fue medida como en Loikkanen *et al.*, (1998). Para la medición del incremento en la producción de radicales libres luego de 1.75 horas de HQ/A y 3 horas de reperfusión, esta última etapa se produjo en tampón PBS que contenía DHR 123 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Molecular Probes, E.U.) y glucosa 25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . La fluorescencia de la sonda fue medida según Almaas *et al.*, (2002).

**II.4.5 Determinación de los niveles de GSH:** Luego de finalizada la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SIN-1 y MeHg o a las 1.75 horas de HQ/A y 3 horas de reperfusión, la solución tampón o el medio en que fue realizada la exposición fue retirado y se adicionó tampón HBSS o tampón PBS (con glucosa 25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) respectivamente que además contenían 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de MBCl (Molecular Probes, E.U.) durante 15 minutos, T=+25°C en la oscuridad. Luego, la fluorescencia de la sonda fue medida como en Loikkanen *et al.*, (1998) y los valores se expresaron como porcentajes de fluorescencia con relación a las células controles no expuestas a las condiciones que producen daño neuronal (consideradas 100%).

**II.4.6 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes:** Los lisados de las células GT1-7 sometidas a 1.75 horas de HQ/A y 3 horas de reperfusión fueron obtenidos según Loikkanen *et al.*, (2003). En ellos se cuantificaron las actividades de superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), catalasa (EC 1.11.1.6) y glutatión peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) utilizando juegos de reactivos comerciales (Cayman Chemical Company, E.U.). Además, se cuantificó la concentración de proteínas (Bradford, 1976) y se calcularon las actividades enzimáticas específicas.

## **II.5. Procesamiento y análisis estadístico de los resultados**

El análisis estadístico de los resultados se realizó con los programas Sigma Plot 2000 (versión 6.10 para Windows, SPSS Inc., E.U.) y GraphPad Prism (versión 3.00 para Windows, GraphPad software Inc, E.U.). En los estudios incluidos en **II.2** las curvas fueron ajustadas a un comportamiento sigmoide mediante GraphPad Prism, y con este programa se determinaron los valores de CI<sub>50</sub>. Se realizaron pruebas de normalidad a todos los datos (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianzas (prueba de Bartlett) y se demostró que se ajustaban a una distribución normal y cumplían homogeneidad de varianzas, por lo que se utilizaron pruebas paramétricas: ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey para comparaciones múltiples.  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo en todos los casos.

## CAPÍTULO III: Resultados

### III.1. Estudio *in vitro* de la actividad antioxidante del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum*: efectos inhibitorios sobre la peroxidación lipídica, atrapamiento de radicales libres y unión al *Fe*

En la **Tabla 1** se presentan, de modo resumido, los valores de  $CI_{50}$  obtenidos para el extracto acuoso de *B. triquetrum* en los diferentes modelos experimentales en que fue evaluada su capacidad *in vitro* para inhibir la peroxidación lipídica espontánea e inducida en homogenados de tejido cerebral de rata, atrapar radicales libres y unir *Fe*. El extracto mostró actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica tanto espontánea como inducida químicamente por  $FeSO_4$ /ascorbato en homogenados de tejido cerebral de rata, y este efecto fue dependiente de su concentración. Además, el extracto pudo secuestrar específicamente radicales  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $DPPH^{\bullet}$  y unir *Fe*, también de una manera dependiente de la concentración. Por tratarse de un extracto crudo, no se pudo determinar la constante de velocidad de su reacción con los radicales específicos.

### III.2. Estudio de los componentes antioxidantes del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum*

Los hallazgos anteriores (**III.1**) motivaron la búsqueda de los componentes del extracto posiblemente responsables de tales propiedades antioxidantes. Así, se demostró que el extracto de *B. triquetrum* contiene *Se* ( $0.10 \pm 0.009 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $0.4 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), carotenos ( $0.04 \pm 0.005 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y compuestos fenólicos ( $8.0 \pm 0.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Los resultados relacionados con el control de la calidad realizado a todos los lotes del extracto preparados como parte de esta investigación, se presentan en el **Anexo II**. Este estudio permitió demostrar que existe una correlación entre la actividad antioxidante del extracto en la inhibición de la peroxidación lipídica espontánea de homogenados de tejido cerebral, y su contenido total de compuestos fenólicos. Así, la disminución estadísticamente significativa en la actividad antioxidante de los lotes rechazados se correlacionó con una disminución estadísticamente significativa en el contenido

**Tabla 1.** Resultados obtenidos (en términos de valores de  $CI_{50}^{\dagger}$ ) para la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica, atrapamiento de radicales libres y la capacidad de unión al *Fe* que exhibe el extracto de *B. triquetrum*

Actividad medida	$CI_{50}^{\dagger}$ ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
Inhibición de la peroxidación lipídica espontánea en homogenados de tejido cerebral	0.87
Inhibición de la peroxidación lipídica inducida por $FeSO_4$ /ascorbato en homogenados de tejido cerebral	1.91
Atrapamiento de radicales $O_2^{\bullet-}$	0.36
Atrapamiento de radicales $OH^{\bullet}$	0.37
Unión al <i>Fe</i>	2.11
Atrapamiento de radicales $DPPH^{\bullet}$	1.17

<sup>†</sup> - la definición de  $CI_{50}$  en cada modelo experimental fue detallada en **II.2**. Los experimentos se repitieron 2 veces con 5 réplicas en cada caso (N=10).

total de polifenoles. Ello sugirió la importancia de estas entidades químicas como posibles agentes responsables de la actividad antioxidante del extracto en la inhibición de la peroxidación lipídica de homogenados de tejido cerebral de rata. La importancia que tienen los compuestos fenólicos como agentes responsables de las propiedades antioxidantes de extractos de algas (Yoshie *et al.*, 2000; Ruberto *et al.*, 2001; Fisch *et al.*, 2003; Takamatsu *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; 2004) unido a estos hallazgos anteriores, motivaron el estudio detallado de estas entidades químicas en el extracto acuoso de *B. triquetrum*.

**III.2.1 Estudio de los compuestos fenólicos en el extracto de *Bryothamnion triquetrum*:** Esta etapa contempló el fraccionamiento del extracto de *B. triquetrum* según el esquema que se presenta en el **Anexo I**. Luego, en las fracciones obtenidas, se abordó la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos relacionados con la capacidad del extracto para inhibir la peroxidación lipídica espontánea de los homogenados de tejido cerebral de rata.

Con este esquema de fraccionamiento se obtuvo una mayor actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica espontánea de homogenados de tejido cerebral de rata en las fracciones más polares del extracto de *B. triquetrum* (resultados que se presentan en el **Anexo III**), lo que sugiere que la actividad obedece a la presencia de compuestos polares como los compuestos fenólicos. Ello se corroboró por el hecho de que en todas las fracciones activas del extracto (con porcentajes de la peroxidación lipídica mayores del 80%), se detectó la presencia de compuestos fenólicos. Éstas fueron: TLCP but-2, TLCP but-6, F 3-4, F 5-8 y F 9-14 (**Anexo III**). Por el contrario, en aquellas fracciones en que se no se encontraron manchas positivas para los reveladores de compuestos fenólicos la actividad antioxidante fue baja (fracción acetato de etilo y F 15-22). La única excepción a estas dos situaciones es el precipitado 1-2 (P 1-2), cuya actividad antioxidante es alta, pero en él no se detectaron compuestos fenólicos en el estudio por TLC (**Anexo III**).

De todas las fracciones activas, se escogieron TLCP but-6, P 1-2, F 5-8 y F 9-14 para estudiar la presencia de compuestos fenólicos por Cromatografía Gaseosa. Se descartó la fracción TLC but-2 por poseer un valor bajo de rendimiento, así como la fracción F 3-4, por poseer una elevada cantidad de manchas positivas reveladas con el reactivo de Folin-Ciocalteu en el estudio por TLC. El cromatograma obtenido para la F 5-8 se presenta en la **Figura 1**. En esta fracción, al igual que en el resto de las fracciones estudiadas (TLCP but-6, P 1-2 y F 9-14) se obtuvieron varios picos, lo que evidencia que éstas son fracciones que contienen una mezcla de compuestos que resulta activa en la inhibición de la peroxidación lipídica de homogenados de tejido cerebral de rata.

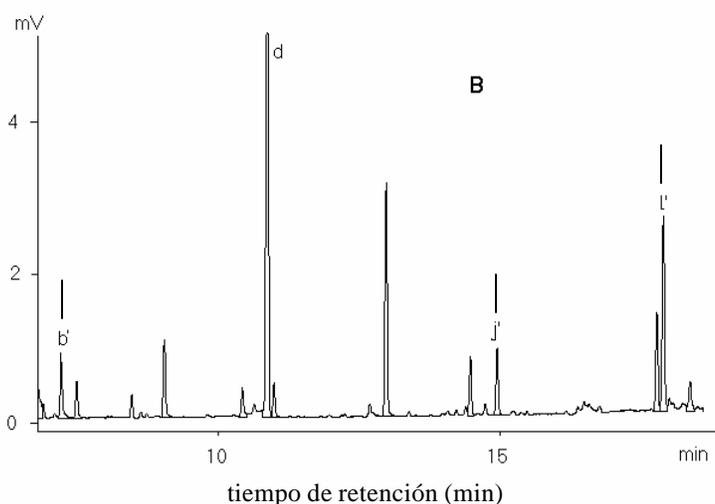
De todos los picos obtenidos en el cromatograma de la fracción F 5-8, se identificaron tres (b', j' y l', señalados con flechas en la **Figura 1**) que correspondieron a los ácidos *trans*-cinámico, *p*-cumárico y ferúlico respectivamente. Al analizar los cromatogramas de las otras fracciones (que no se presentan) se identificaron también el ácido *trans*-cinámico en las fracciones TLCP but-6 y F 9-14 y el ácido *p*-cumárico en las fracciones TLCP but-6, P 1-2 y F9-14.

Los resultados de la cuantificación de los ácidos cinámicos en las fracciones estudiadas se muestra en la **Tabla 2** El contenido total de ellos en el extracto de *B. triquetrum* fue  $4.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , lo que representó el 60% del total de los compuestos fenólicos presentes ( $8.0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

A continuación, la investigación se enfocó hacia la caracterización de la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto acuoso de *B. triquetrum* y sus ácidos cinámicos en células neuronales GT1-7 sometidas a diferentes condiciones que inducen estrés oxidativo.

### III.3. Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum* en células inmortalizadas de hipotálamo de ratón GT1-7

En esta serie de experimentos se evaluó la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto de *B. triquetrum*. Además se comparó con el efecto producido por los ácidos cinámicos puros que fueron identificados y cuantificados en las fracciones del extracto con actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica espontánea en homogenados de tejido cerebral de rata.



**Figura 1.** Cromatograma obtenido en el estudio de Cromatografía Gaseosa para la fracción F 5-8 obtenida de la Cromatografía en Columna de Amberlite XAD-2

Las fracciones a estudiar se silinizaron mediante la adición de BSA y luego se aplicaron en una columna capilar semipolar de polimetilfenilsiloxona DB5 (Supelco, E.U.). Se identificaron los picos señalados con flechas mediante la comparación con patrones de ácidos fenólicos.

**Tabla 2.** Contenido de los ácidos cinámicos en las diferentes fracciones estudiadas, referidas a 1 g del extracto acuoso liofilizado de *B. triquetrum*

Fracciones	Cantidades de ácidos cinámicos ( $\mu\text{g}$ ) (media $\pm$ DS)		
	<i>At-C</i>	<i>Ap-C</i>	AF
<b>TLCP but-6</b>	$84.8 \pm 6.5$	$205.6 \pm 15.4$	–
<b>P 1-2</b>	–	$3808.5 \pm 137.4$	–
<b>F 5-8</b>	$71.8 \pm 5.8$	$87.3 \pm 5.2$	$442.3 \pm 31.9$
<b>F 9-14</b>	$65.4 \pm 4.2$	$85.9 \pm 6.3$	–
<b>TOTAL</b>	$221.9 \pm 5.7$	$4187.3 \pm 91.4$	$442.3 \pm 31.9$

**III.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora en los modelos de daño neuronal mediados por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la combinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{FeSO}_4$ :** Primeramente, el efecto del extracto y sus ácidos cinámicos fue evaluado frente a la muerte neuronal inducida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los resultados que se obtuvieron en este modelo tras la adición de la más alta concentración del extracto ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y sus ácidos cinámicos se muestran en la **Tabla 3I**. El extracto no afectó la viabilidad de las neuronas en ausencia de agentes neurotóxicos y esto fue igualmente registrado en los experimentos posteriores realizados en esta línea celular. La exposición al  $\text{H}_2\text{O}_2$  indujo muerte en las células GT1-7, pero en presencia del extracto de *B. triquetrum*  $0.25$  y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (**Tabla 3I**) se produjo un incremento estadísticamente significativo de la viabilidad con relación a las células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sólo el ácido ferúlico o la combinación de los tres ácidos cinámicos protegieron contra la citotoxicidad inducida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cuando se añadieron a las concentraciones en que están contenidos en el extracto de *B. triquetrum*  $0.25$  y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (**Tabla 3I**), pero el efecto producido por el extracto fue siempre significativamente mayor.

Además, fue evaluado el efecto del extracto de *B. triquetrum* frente a la generación citosólica de ROS y RNS y el agotamiento de niveles intracelulares de GSH, producidos por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a las concentraciones de  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente. Se observó primeramente que la producción de ROS y RNS así como los niveles intracelulares de GSH en ausencia del compuesto tóxico, no se afectaron por la adición del extracto a la concentración más alta estudiada, lo que también fue registrado en el resto de las experiencias realizadas en esta línea neuronal. Durante 3 horas, la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  indujo un aumento estadísticamente significativo en los niveles intracelulares de ROS y RNS y agotó los niveles intracelulares de GSH, lo que no pudo ser revertido por la adición del extracto de *B. triquetrum*. Debido a la ausencia de efecto protector en estas circunstancias, no se evaluó el efecto producido por los ácidos cinámicos del extracto.

En el modelo de muerte neuronal inducida por la combinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{FeSO}_4$ , el extracto de *B. triquetrum* a la concentración de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  protegió contra la citotoxicidad producida por esta mezcla (**Tabla 3II**). También resultó protector el ácido ferúlico así como la combinación de los tres ácidos cinámicos, pero la adición del extracto de *B. triquetrum* proporcionó una mayor protección.

**III.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora en el modelo de daño neuronal mediado por SIN-1:** De acuerdo con los resultados que se presentan en la **Tabla 3III**, la exposición de las células al compuesto SIN-1 redujo significativamente la viabilidad celular, y esta citotoxicidad pudo ser atenuada por el extracto de *B. triquetrum* a las concentraciones de  $0.25$  y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , aunque en la **Tabla 3III** se muestra solamente el efecto del extracto a la más alta concentración.

**Tabla 3.** Efecto del extracto de *B. triquetrum* (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) y los ácidos cinámicos (ferúlico, *p*-cumárico y *trans*-cinámico) frente a la muerte de las células GT1-7 inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y FeSO<sub>4</sub>, SIN-1, MeHg y la combinación de hipoxia química y aglucemia (HQ/A)

Modelo experimental		Viabilidad celular (%) (media ± ES)							
		células controles	células + condición que induce toxicidad	células + extracto (0.5mg·mL <sup>-1</sup> )	células + condición que induce toxicidad				
					+ extracto (0.5 mg·mL <sup>-1</sup> )	+ AF (1.1 μmol·L <sup>-1</sup> )	+ Ap-C (12.8 μmol·L <sup>-1</sup> )	+ At-C (0.8 μmol·L <sup>-1</sup> )	+ AF / Ap-C / At-C
<b>I</b>	<b>Citotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 mmol·L<sup>-1</sup>; 3 horas)</b>	94 ± 0.4 <sup>a</sup>	6 ± 0 <sup>d</sup>	95 ± 1 <sup>a</sup>	43 ± 3 <sup>b</sup>	31 ± 1 <sup>c</sup>	5 ± 0 <sup>d</sup>	6 ± 0 <sup>d</sup>	30 ± 1 <sup>c</sup>
<b>II</b>	<b>Citotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mmol·L<sup>-1</sup>) + FeSO<sub>4</sub> (150 μmol·L<sup>-1</sup>) (2 horas)</b>	93 ± 1 <sup>a'</sup>	62 ± 2 <sup>c'</sup>	95 ± 1 <sup>a'</sup>	88 ± 3 <sup>a'</sup>	76 ± 2 <sup>b'</sup>	60 ± 2 <sup>c'</sup>	58 ± 2 <sup>c'</sup>	74 ± 3 <sup>b'</sup>
<b>III</b>	<b>Citotoxicidad inducida por SIN-1 (2 mmol·L<sup>-1</sup>; 18 horas)</b>	85 ± 1 <sup>a''</sup>	39 ± 2 <sup>d''</sup>	89 ± 1 <sup>a''</sup>	64 ± 2 <sup>b''</sup>	55 ± 1 <sup>c''</sup>	38 ± 1 <sup>d''</sup>	41 ± 1 <sup>d''</sup>	56 ± 1 <sup>c''</sup>
<b>IV</b>	<b>Citotoxicidad inducida por MeHg (35 μmol·L<sup>-1</sup>; 3 horas)</b>	90 ± 1 <sup>a*</sup>	26 ± 3 <sup>e*</sup>	90 ± 2 <sup>a*</sup>	58 ± 2 <sup>b*</sup>	51 ± 2 <sup>b*</sup>	28 ± 2 <sup>c*</sup>	28 ± 3 <sup>e*</sup>	51 ± 2 <sup>b*</sup>
<b>V</b>	<b>Citotoxicidad inducida por MeHg (5 μmol·L<sup>-1</sup>; 24 horas)</b>	82 ± 2 <sup>a†</sup>	36 ± 3 <sup>c†</sup>	84 ± 1 <sup>a†</sup>	81 ± 2 <sup>a†</sup>	69 ± 1 <sup>b†</sup>	36 ± 2 <sup>c†</sup>	37 ± 2 <sup>c†</sup>	72 ± 2 <sup>b†</sup>
<b>VI</b>	<b>Citotoxicidad aguda inducida por 3 horas de HQ/A</b>	97 ± 1 <sup>a#</sup>	44 ± 2 <sup>d#</sup>	95 ± 1 <sup>a#</sup>	82 ± 1 <sup>b#</sup>	69 ± 2 <sup>c#</sup>	35 ± 6 <sup>d#</sup>	34 ± 9 <sup>d#</sup>	68 ± 1 <sup>c#</sup>
<b>VII</b>	<b>Citotoxicidad tardía inducida por 3 horas de HQ/A</b>	88 ± 1 <sup>a·</sup>	23 ± 1 <sup>c·</sup>	89 ± 2 <sup>a·</sup>	37 ± 4 <sup>b·</sup>	35 ± 2 <sup>b·</sup>	16 ± 1 <sup>d·</sup>	26 ± 2 <sup>c·</sup>	37 ± 1 <sup>b·</sup>
<b>VIII</b>	<b>Citotoxicidad aguda inducida por 1.75 horas de HQ/A</b>	98 ± 1 <sup>a§</sup>	88 ± 1 <sup>c§</sup>	99 ± 1 <sup>a§</sup>	97 ± 1 <sup>a§</sup>	92 ± 0 <sup>b§</sup>	87 ± 1 <sup>c§</sup>	87 ± 2 <sup>c§</sup>	92 ± 1 <sup>b§</sup>
<b>IX</b>	<b>Citotoxicidad inducida por 1.75 horas de HQ/A y 3 horas de reperusión</b>	98 ± 1 <sup>a×</sup>	82 ± 1 <sup>d×</sup>	99 ± 0 <sup>a×</sup>	95 ± 0 <sup>b×</sup>	92 ± 0 <sup>c×</sup>	83 ± 1 <sup>d×</sup>	84 ± 1 <sup>d×</sup>	93 ± 0 <sup>c×</sup>
<b>X</b>	<b>Citotoxicidad tardía inducida por 1.75 horas de HQ/A</b>	98 ± 0 <sup>a?</sup>	77 ± 1 <sup>c?</sup>	98 ± 1 <sup>a?</sup>	90 ± 1 <sup>b?</sup>	84 ± 1 <sup>b?</sup>	76 ± 1 <sup>c?</sup>	75 ± 2 <sup>c?</sup>	85 ± 2 <sup>b?</sup>

Los experimentos en los modelos experimentales **I**, **IV**, **V**, **VI** y **VII** se realizaron 2 veces con 5 réplicas (N=10). En el modelo **III** se utilizaron sólo 5 réplicas (N=5), mientras que en los modelos **II**, **VIII**, **IX** y **X** se realizaron 3 experimentos con 4 réplicas (N=12). En todos los casos se incluyó un control positivo con trolox 100 o 400 μmol·L<sup>-1</sup>. Se compararon en cada modelo las células tratadas (con el extracto o los ácidos cinámicos) con las células controles respectivas, para lo cual se empleó ANOVA y prueba de Tukey. Las diferencias estadísticas obtenidas en los 10 modelos (correspondientes a las filas **I** a **X**) se indican en la Tabla con diferentes series de letras (a/a'/a''/a\*/a†/a#/a·/a§/a×/a?). *p*<0.05 se consideró estadísticamente significativo en todos los casos.

Se observó además que el ácido ferúlico contenido en el extracto, así como la combinación de los tres ácidos cinámicos ejercieron protección, pero el efecto del extracto fue siempre significativamente mayor.

La exposición durante 18 horas al compuesto SIN-1  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , incrementó significativamente la producción citosólica de radicales libres y agotó los niveles intracelulares de GSH. En estas condiciones experimentales, al igual que en el modelo de daño neuronal mediado por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el extracto de *B. triquetrum* no pudo prevenir el incremento en la oxidación de la sonda DCFH ni la disminución en la formación de los complejos fluorescentes entre el GSH y el MBCl, inducidos por el SIN-1. Teniendo ésto en consideración, no fue estudiado en este modelo el efecto de los ácidos cinámicos sobre la producción de radicales libres y los niveles intracelulares de GSH.

**III.3.3 Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora en el modelo de daño neuronal mediado por MeHg:** En este caso se evaluó la capacidad del extracto de *B. triquetrum* y sus ácidos cinámicos para proteger frente a la muerte neuronal inducida por el MeHg en dos condiciones de exposición: 3 horas en tampón HBSS y 24 horas en medio de cultivo, lo que se muestra en la **Tabla 3IV** y **3V**, respectivamente. El extracto de *B. triquetrum*, incluso a la concentración más baja de  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (resultado no mostrado) incrementó significativamente la viabilidad de las neuronas expuestas al MeHg en las dos condiciones de exposición. En el segundo caso (**Tabla 3V**) las células tratadas con el extracto de *B. triquetrum* no difirieron significativamente de los controles no expuestos al MeHg. Además, el ácido ferúlico y la combinación de los tres ácidos cinámicos ejercieron también efecto protector en las dos condiciones experimentales, y éste fue similar al del extracto durante las exposiciones de corta duración (**Tabla 3IV**).

El efecto del extracto de *B. triquetrum* a la concentración de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y sus ácidos cinámicos frente al daño neuronal mediado por MeHg, en términos de producción citosólica de ROS y RNS (medida a través de la oxidación de la sonda DCFH), se muestra en la **Tabla 4**. La exposición de las células GT1-7 al MeHg a las concentraciones de  $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (durante 3 horas) o de  $3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (durante 24 horas) produjo un aumento significativo en la generación de radicales libres (**Tabla 4A** y **4B**, respectivamente). En presencia del extracto de *B. triquetrum*, o del ácido ferúlico, o de la combinación de los tres ácidos cinámicos, se previno completamente la producción de radicales libres inducida por el MeHg. La protección ejercida por el extracto de *B. triquetrum* fue similar a la producida por el ácido ferúlico o por los tres ácidos cinámicos juntos, y entre estos dos últimos tratamientos tampoco existieron diferencias para ninguna de las concentraciones evaluadas.

**Tabla 4** Efecto ejercido por el extracto de *B. triquetrum* ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y los ácidos cinámicos sobre la producción de radicales libres en el modelo de daño neuronal inducido por MeHg en las células GT1-7

Tratamientos		Incremento porcentual en la fluorescencia de la DCF (%) (media $\pm$ ES)	
		3 horas en tampón HBSS (A)	24 horas en medio de cultivo (B)
células controles		$523.4 \pm 19.7^b$	$567.6 \pm 15.9^{b'}$
células + MeHg		$737.4 \pm 28.1^a$	$686.8 \pm 9.9^{a'}$
células + extracto $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$		$527.3 \pm 8.6^b$	$553.2 \pm 14.6^{b'}$
células + MeHg	+ extracto $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$473.7 \pm 12.5^b$	$520.9 \pm 6.7^{b'}$
	+ AF $1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$523.1 \pm 13.6^b$	$588.3 \pm 18.6^{b'}$
	+ Ap-C $12.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$761.6 \pm 18.2^a$	$696.8 \pm 22.7^{a'}$
	+ A-C $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$765.6 \pm 15.9^a$	$703.7 \pm 19.4^{a'}$
	+ AF/ Ap-C/ A-C	$529.4 \pm 16.2^b$	$567.9 \pm 8.5^{b'}$

Se empleó como control positivo el ácido ascórbico  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (en A:  $550.3 \pm 60.0\%$  y en B:  $564.4 \pm 73.2\%$ ). Los experimentos se repitieron 2 veces con 5 réplicas (N=10). Se empleó ANOVA y prueba de Tukey para la comparación de los tratamientos en las dos condiciones de exposición (A y B). Las diferencias estadísticas se indican en los dos casos con dos series diferentes de letras (a/a'),  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

Este agente neurotóxico, cuando se añadió a las células GT1-7 durante exposiciones cortas ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 3 horas) así como durante exposiciones más largas ( $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 24 horas) disminuyó significativamente los niveles intracelulares de GSH, y ello no pudo ser prevenido por la adición simultánea del extracto de *B. triquetrum*. El efecto de los ácidos cinámicos en términos de niveles intracelulares de GSH no fue estudiado en estas condiciones experimentales.

**III.3.4 Evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora en el modelo de daño neuronal inducido por hipoxia química y aglucemia (HQ/A):** Finalmente, se estudió la capacidad del extracto de *B. triquetrum* y sus ácidos cinámicos para proteger frente a la muerte celular inducida por HQ/A, lo que constituye un modelo *in vitro* de isquemia neuronal (Farooqui *et al.*, 1994). Tras un período de 3 horas de exposición a HQ/A, se midió la viabilidad celular inmediatamente o 24 horas después de iniciada la reperfusión. La citotoxicidad observada en esas condiciones de reperfusión se definió como muerte neuronal aguda y tardía respectivamente, en correspondencia con Myers *et al.*, (1995). El efecto del extracto de *B. triquetrum* ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y sus ácidos cinámicos, frente a la citotoxicidad aguda y tardía producida por 3 horas de HQ/A se presenta en la **Tabla 3VI** y **VII**, respectivamente.

El evento isquémico que se produjo en estas condiciones incrementó significativamente la muerte celular, al medirla tanto inmediatamente como 24 horas luego de iniciada la reperfusión, aunque fue mayor en este último caso. El evento de HQ/A de 3 horas de duración fue considerado severo, y este término se utilizó posteriormente. El extracto, agregado durante el período de isquemia severa, protegió contra la citotoxicidad aguda en todo el intervalo ensayado de concentraciones, pero el efecto

fue mayor a la concentración de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (**Tabla 3VI**). Por su parte, el efecto protector contra la citotoxicidad tardía se observó sólo a la mayor concentración (**Tabla 3VII**). En ambos casos, tanto el ácido ferúlico contenido en el extracto, como la combinación de los tres ácidos cinámicos ejercieron protección. El efecto del extracto de *B. triquetrum* fue significativamente mayor que el del ácido ferúlico o los tres ácidos cinámicos combinados sólo cuando se midió la viabilidad celular aguda (**Tabla 3VI**).

La presencia de glucosa en el extracto, cuyo contenido es de  $8.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de extracto liofilizado (Barro *et al.*, 2001), podría estar relacionada con el efecto protector observado frente a condiciones severas de HQ/A. Para evaluar esta posibilidad, se estudió el efecto provocado por la glucosa en este modelo experimental. Se observó que la mínima concentración de glucosa necesaria para ejercer efecto protector frente a la citotoxicidad aguda y tardía producida por HQ/A severa, debe estar situada en el intervalo entre  $150$  y  $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Tales concentraciones de glucosa sólo pueden alcanzarse a concentraciones del extracto de *B. triquetrum* situadas entre  $3.1$  y  $10.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , las cuales fueron superiores a las utilizadas en el presente estudio.

Por otro lado, se evaluó el efecto del extracto de *B. triquetrum* ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y sus ácidos cinámicos, frente al daño neuronal producido por un evento de HQ/A de menor duración (1.75 horas), considerado moderado. El extracto de *B. triquetrum*, a la concentración de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , incrementó de modo significativo la viabilidad de las neuronas medida durante diferentes períodos de la reperusión: inmediatamente (**Tabla 3VIII**), 3 horas (**Tabla 3IX**) o 24 horas (**Tabla 3X**) luego de finalizada la isquemia. Al igual que en el resto de los experimentos, el ácido ferúlico y la combinación de los tres ácidos cinámicos ejercieron protección. En todos los casos, excepto cuando se midió la citotoxicidad tardía, el efecto provocado por el extracto fue significativamente mayor que el producido por estos dos tratamientos. Con relación a la glucosa se demostró que cuando ésta se añade, a la concentración de  $150 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  durante la etapa de HQ/A moderada, tampoco ejerció efecto protector si se mide la viabilidad celular inmediatamente, 3 o 24 horas luego de iniciada la reperusión.

Además se profundizó en el efecto del extracto de *B. triquetrum* ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), en términos de producción de radicales libres, niveles intracelulares de GSH y actividad de diferentes enzimas antioxidantes, frente al daño provocado por 1.75 horas de HQ/A y 3 horas de reperusión, lo que se muestra en la **Tabla 5**. El extracto, a las concentraciones de  $0.25$  y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , pudo reducir significativamente la formación de radicales libres a las 3 horas luego de ser reperfundidas las neuronas GT1-7 sometidas a HQ/A moderada. En este caso, sin embargo, los ácidos cinámicos identificados en el extracto, no ejercieron protección para ninguna de las concentraciones estudiadas. Con relación a los

niveles intracelulares de GSH, no se registró efecto protector del extracto de *B. triquetrum* y por ello, no se evaluó el efecto de los ácidos cinámicos del extracto sobre los niveles intracelulares de GSH.

**Tabla 5.** Efecto ejercido por el extracto de *B. triquetrum* (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo tras 1.75 horas de hipoxia química y aglucemia (HQ/A) y 3 horas de reperfusión

Tratamientos	Incremento porcentual en la fluorescencia de la DCF (%) (media ± ES)	Fluorescencia del MBCI (% de los controles) (media ± ES)	Actividad específica SOD (U/mg) (%) (media ± ES)	Actividad específica catalasa (U/mg) (%) (media ± ES)	Actividad específica GSH-Px (U/mg) (%) (media ± ES)
células controles	39.7 ± 1.5 <sup>c</sup>	100.00 ± 1.5 <sup>a'</sup>	137.5 ± 5.4 <sup>b''</sup>	46.9 ± 0.8 <sup>a*</sup>	48.6 ± 1.9 <sup>a†</sup>
células + HQ/A	97.5 ± 2.3 <sup>a</sup>	74.7 ± 6.3 <sup>b'</sup>	65.5 ± 3.7 <sup>d''</sup>	30.9 ± 0.9 <sup>b*</sup>	6.9 ± 0.4 <sup>c†</sup>
células + extracto 0.5 mg·mL <sup>-1</sup>	43.7 ± 1.4 <sup>c</sup>	104.2 ± 3.1 <sup>a'</sup>	151.9 ± 2.2 <sup>a''</sup>	49.8 ± 0.5 <sup>a*</sup>	48.3 ± 0.3 <sup>a†</sup>
células + HQ/A + extracto 0.5 mg·mL <sup>-1</sup>	75.8 ± 2.1 <sup>b</sup>	78.6 ± 4.7 <sup>b'</sup>	96.9 ± 2.3 <sup>c''</sup>	33.2 ± 0.4 <sup>b*</sup>	18.3 ± 0.5 <sup>b†</sup>

Los experimentos se repitieron 3 veces con 4 réplicas en cada caso (N=12). Se empleó ANOVA y prueba de Tukey para la comparación de los tratamientos. Las diferencias estadísticas para los 5 indicadores (correspondientes a las 5 columnas de la Tabla) se indican con diferentes series de letras (a/a'/a''/a\*/a†).  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

La adición del extracto de *B. triquetrum* (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>) en ausencia de HQ/A moderada, produjo un aumento en la actividad SOD de las células tratadas con el extracto en comparación con las células controles (Tabla 5). Este aumento específico basal de la actividad SOD no se relacionó con un aumento en la producción basal de ROS y RNS, ni con agotamiento en los niveles intracelulares de GSH, ni tampoco afectó la viabilidad de las neuronas expuestas al extracto en las mismas condiciones experimentales (Tabla 3IX). Entonces, este cambio provocado por el extracto en la actividad SOD de las células GT1-7, no pareció tener efectos negativos sobre éstas. La disminución en la actividad de las enzimas SOD y GSH-Px, registrada tras 1.75 horas de HQ/A y 3 horas de reperfusión, pudo ser prevenida tras añadir el extracto de *B. triquetrum* (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>). Sin embargo, en el caso de la actividad catalasa, el extracto no tuvo efecto protector. La adición de los ácidos cinámicos del extracto, por otro lado, no protegió contra la disminución en la actividad de las tres enzimas antioxidantes estudiadas, cuando ésta fue medida luego de 1.75 horas de HQ/A y 3 horas de reperfusión.

## CAPÍTULO IV: Discusión

Los antioxidantes multifuncionales se han convertido en una promisoriosa estrategia terapéutica para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Gilgun-Sherki *et al.*, 2002). En este contexto, se ha propuesto el uso de extractos de plantas u otras fuentes naturales como agentes neuroprotectores, toda vez que éstos contienen compuestos que pueden actuar como antioxidantes con diferentes mecanismos de acción, sobre las complejas vías en que participan los radicales libres durante

las enfermedades neurodegenerativas (Youdim *et al.*, 2002). Así, la capacidad neuroprotectora de extractos de plantas o algas, constituye un campo de interés creciente para la comunidad científica internacional (Aruoma, 1998; Aruoma *et al.*, 2003). Insertada en este interés, la presente investigación estuvo dirigida a la evaluación de la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelin) M. Howe y a la identificación de los posibles compuestos químicos responsables de estas propiedades.

Primeramente, se llevó a cabo el estudio de la actividad antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de *B. triquetrum*, para lo cual se tomaron en consideración: i) las estrategias experimentales que se han propuesto para la caracterización de los efectos antioxidantes *in vitro* de productos naturales (Aruoma, 2003) y ii) los requerimientos básicos generales propuestos por Verhagen *et al.*, (2003) para las investigaciones sobre la actividad antioxidante de un determinado producto.

El punto de partida consistió en el estudio de la actividad inhibitoria del extracto sobre la peroxidación lipídica espontánea e inducida químicamente en homogenados de tejido cerebral de rata. Teniendo en consideración las diferencias en los mecanismos de iniciación del daño lipídico que tienen lugar en estas dos condiciones experimentales (Arai *et al.*, 1987; Fauré *et al.*, 1990; Callaway *et al.*, 1998), se ha sugerido que en el primer caso, la actividad registrada se relaciona preferentemente con la presencia de moléculas capaces de atrapar radicales  $RO_2^\bullet$  y  $RO^\bullet$ , aunque no puede descartarse la quelación de  $Fe^{2+}$ . Sin embargo, en el segundo ensayo, la actividad antioxidante se vincula en mayor medida a la quelación de este metal prooxidante, y en menor medida al atrapamiento de los radicales lipídicos que participan en las reacciones de peroxidación. El valor de  $CI_{50}$  determinado en el primer ensayo fue aproximadamente 2 veces menor que en el segundo. Ello indica que aunque el extracto puede actuar por los dos modos de acción antioxidante (atrapamiento de radicales libres y quelación de  $Fe$ ), muestra aparentemente una mayor capacidad para el primero de éstos.

Para continuar la caracterización de las propiedades antioxidantes del extracto relacionadas con estos dos modos de acción inicialmente propuestos, se estudió además, en ensayos específicos, su capacidad para atrapar diferentes tipos de radicales libres y unir  $Fe^{2+}$ .

Así, se demostró la habilidad del extracto para atrapar radicales  $O_2^{\bullet-}$ , que es dependiente de su concentración. El valor de  $CI_{50}$  obtenido es menor que los referidos para otros extractos vegetales antioxidantes (Matsuda *et al.*, 1998; Babu *et al.*, 2001) y ello demuestra que el extracto de *B. triquetrum* posee una elevada efectividad como atrapador de radicales  $O_2^{\bullet-}$ . En el modelo de la 2-desoxi-*d*-ribosa, se obtuvieron resultados que sustentan la capacidad del extracto de *B. triquetrum* para secuestrar directamente radicales  $OH^\bullet$  y unir  $Fe$ , así como la dependencia de ambos efectos con la concentración

del extracto. En la primera variante del ensayo (con EDTA) la actividad antioxidante registrada constituye una medida de la habilidad del extracto para competir con la 2-desoxi-*D*-ribosa en la reacción con los radicales OH<sup>•</sup> generados en solución. El valor de CI<sub>50</sub> obtenido en este caso es similar al referido para el extracto de *Ginkgo biloba* (extracto GB4), cuyas propiedades antioxidantes son bien conocidas (Guidetti *et al.*, 2001). Además, este valor fue aproximadamente 6 veces menor que el determinado para la capacidad de unión al *Fe* (segunda variante del ensayo, en ausencia de EDTA). Ésto último se corresponde con los resultados obtenidos para la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica en homogenados de tejido cerebral de rata y sustenta, de modo directo, la mayor habilidad del extracto de *B. triquetrum* para el atrapamiento de radicales libres en relación con el efecto de quelación de *Fe*<sup>2+</sup>. A las propiedades antioxidantes anteriores se une la capacidad del extracto para atrapar radicales DPPH<sup>•</sup> con una efectividad, medida en términos de CI<sub>50</sub>, mayor que la referida para otros extractos de algas con propiedades antioxidantes (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002a).

La existencia de moléculas que actúan como antioxidantes directos (atrapan radicales libres) e indirectos (previenen su generación, mediante la quelación de *Fe*<sup>2+</sup>) en el extracto de *B. triquetrum* puede explicar su efecto protector contra la peroxidación lipídica en homogenados de tejido cerebral de rata. La participación de la peroxidación lipídica como evento que conduce al daño celular en diferentes patologías neuronales degenerativas ha sido bien demostrada y apunta hacia la posible relevancia de las propiedades antioxidantes del extracto de *B. triquetrum* en el área de la neuroprotección (Schulz *et al.*, 2000; Behl y Moosmann, 2002; Gilgun-Sherki *et al.*, 2002).

Una vez caracterizadas las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *B. triquetrum*, la investigación se dirigió hacia el estudio de sus componentes químicos, que podrían ser responsables de tales propiedades examinadas. Así, se determinó que el extracto de *B. triquetrum* contiene *Se*, en niveles similares a los que han sido referidos para otras algas rojas (Mabeau y Fleurence, 1993; Hou y Yan, 1998). Como componente esencial de las enzimas antioxidantes GSH-Px y tioredoxina reductasa, este elemento puede favorecer la capacidad enzimática endógena para proteger contra la excesiva generación de radicales libres (Combs y Gray, 1998).

Además del *Se*, el extracto posee otros componentes con conocidas propiedades antioxidantes. En primer lugar resalta el ácido ascórbico, cuyo contenido se encuentra dentro del intervalo referido en la literatura para algas rojas (Burtin, 2003). Con relación a su función, esta molécula se caracteriza no sólo por ser un antioxidante directo sino también por su capacidad para mantener los niveles intracelulares de las formas reducidas de algunos antioxidantes endógenos (Rice, 2000). En segundo lugar, debe mencionarse la presencia de carotenos en el extracto. Sin embargo, el contenido de estas entidades

resulta bajo cuando se le compara con el que se ha referido para otras algas rojas como *Gracilaria changgi* (Norziah y Ching, 2000) y *Porphyra tenera* (Jiménez-Escrig y Goni Cambrodon, 1999). Ello, por tanto, reduce la importancia de estos componentes como agentes responsables de las propiedades antioxidantes del extracto de *B. triquetrum*.

Por último, el extracto muestra un contenido de compuestos fenólicos similar a los referidos para otras algas rojas como *Hypnea charoides*, *Hypnea japonica* (Wong y Cheung, 2001), *Porphyra umbicalis* y *Chondrus crispus* (Jiménez-Escrig *et al.*, 2001). Las propiedades antioxidantes de estos compuestos tanto en lo referido al atrapamiento de radicales libres como a la quelación de  $Fe^{2+}$ , han sido muy bien documentadas (Rice-Evans *et al.*, 1995; 1996; Bravo, 1998). De hecho, entre todos los componentes antioxidantes del extracto de *B. triquetrum* que se refirieron anteriormente, los compuestos fenólicos han sido los más extensamente relacionados con las propiedades antioxidantes de las algas y microalgas (Fujimoto y Kaneda, 1984; Nakamura *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 1999; Yoshie *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2001; Ruberto *et al.*, 2001; Yoshie *et al.*, 2002; Fisch *et al.*, 2003; Takamatsu *et al.*, 2003; Siriwardhana *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003; 2004). Ello justificó el estudio detallado de los compuestos fenólicos en el extracto acuoso de *B. triquetrum*.

Los procedimientos empleados en el presente trabajo para el fraccionamiento del extracto de *B. triquetrum* y la identificación y cuantificación de sus compuestos fenólicos han sido utilizados para el estudio de los componentes antioxidantes de diferentes extractos de plantas (Häkkinen, 2000; Deliorman *et al.*, 2000; Solon *et al.*, 2000). Con esta metodología, se identificó la mayor parte del contenido total de compuestos fenólicos en el extracto (aproximadamente el 60%) que corresponde a los ácidos *p*-cumárico (aprox. 52%), ferúlico (aprox. 5%) y *trans*-cinámico (aprox. 3%).

El más abundante de los tres ácidos fenólicos identificados es el ácido *p*-cumárico, el cual se considera un metabolito intermediario de la síntesis de otros compuestos fenólicos más complejos en las algas (Pryce, 1972). El ácido *trans*-cinámico, por otro lado, ha sido identificado y relacionado con las propiedades antioxidantes en los extractos de las microalgas *Chlorella vulgaris* (en la cual constituye el más abundante de los ácidos fenólicos) y *Spirulina maxima* (Miranda *et al.*, 1998; 2001). Por su parte el ácido cafeíco, ha sido identificado y cuantificado en el alga verde *Halimeda macroloba* (Yoshie *et al.*, 2002). Aparentemente, los tipos y cantidades de los ácidos fenólicos en las algas dependen de la especie en cuestión (Whitfield *et al.*, 1999).

Las propiedades antioxidantes *in vitro* que han sido demostradas para el extracto de *B. triquetrum* pueden guardar relación con su contenido de ácidos cinámicos, fundamentalmente de ácido ferúlico. En comparación con los otros dos compuestos, el ácido ferúlico presenta una mayor capacidad atrapadora

de radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1996; Kanski *et al.*, 2002). Se ha propuesto que la interacción del ácido ferúlico con un radical libre resulta en la abstracción del átomo de hidrógeno del grupo 4-hidroxi para formar el radical  $\text{ArO}^\bullet$ . Este electrón desapareado puede delocalizarse en toda la molécula del ácido ferúlico y el radical  $\text{ArO}^\bullet$  formado puede ser estabilizado por resonancia. La presencia del grupo 3-metoxi en el anillo aromático, al ser un grupo donador de electrones, favorece la mayor estabilización del radical  $\text{ArO}^\bullet$ , y esto sustenta la mayor actividad antioxidante del ácido ferúlico en comparación con el ácido *p*-cumárico (Graf, 1992). El radical del ácido ferúlico, una vez generado, no participa en nuevas reacciones oxidativas, sino que, con mayor probabilidad reacciona con otro radical de ácido ferúlico, y forma una estructura dimérica llamada curcumina (Graf, 1992; Rice-Evans *et al.*, 1996). El ácido ferúlico posee habilidad tanto para atrapar radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  como para impedir la oxidación de la 2-desoxi-*d*-ribosa mediada por radicales  $\text{OH}^\bullet$  en presencia de EDTA (Toda *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1993). De los tres ácidos cinámicos, además, sólo el ácido ferúlico presenta actividad significativa en el atrapamiento de los radicales DPPH $^\bullet$  (Fukumoto y Mazza, 2000; Kikuzaki *et al.*, 2002). Igualmente, se ha demostrado su habilidad para inhibir la peroxidación lipídica espontánea en homogenados de tejido cerebral de rata (Cuvelier *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1993).

No obstante, al igual que el ácido ferúlico, los *trans*-cinámico y *p*-cumárico poseen una cadena insaturada enlazada al grupo carboxilo, que puede ofrecer sitios para el ataque de los radicales libres y probablemente permitir el anclaje de estos compuestos a la bicapa lipídica (Kanski *et al.*, 2002; Kikuzaki *et al.*, 2002). Por eso, se ha propuesto que la presencia de esta estructura en los ácidos cinámicos podría proteger las membranas biológicas contra el daño oxidativo (Kanski *et al.*, 2002) y así sustentar la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica registrada en las fracciones obtenidas durante el fraccionamiento del extracto de *B. triquetrum*.

Las células neuronales inmortalizadas de hipotálamo de ratón GT1-7 se han convertido en un modelo adecuado para el estudio del efecto citoprotector *in vitro* de nuevos fármacos neuroprotectores entre los que se encuentran antioxidantes (Kane *et al.*, 1993; Sarafian *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1995; Wei y Perry, 1996; Wei *et al.*, 1998; Sortino *et al.*, 1999). Por ello, se evaluó la actividad antioxidante y neuroprotectora del extracto de *B. triquetrum* en esta línea celular, sometidas a diferentes condiciones que inducen estrés oxidativo.

En el primer modelo, se empleó  $\text{H}_2\text{O}_2$  para inducir daño neuronal oxidativo. Este compuesto es una especie reactiva del oxígeno, generada dentro de las vías intracelulares que conducen al estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas y de ahí la importancia de estudiar el efecto protector del extracto contra el daño producido por este compuesto (Simonian y Coyle, 1996). La muerte celular

producida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  o la combinación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el  $\text{Fe}^{2+}$  es significativamente atenuada en presencia del extracto de *B. triquetrum*. Comparativamente, el extracto de *B. triquetrum* produce un efecto protector mayor que el referido para el extracto de *Orostachys japonicus* en células GT1-1 expuestas al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Yoon *et al.*, 2000) y similar al informado para el extracto de *Ginkgo biloba* (extracto GB4) en neuronas corticales expuestas a la combinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{Fe}^{2+}$  (Guidetti *et al.*, 2001). De los ácidos cinámicos contenidos en el extracto de *B. triquetrum*, el ácido ferúlico ejerce neuroprotección frente a la muerte neuronal mediada por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero ésta es menor que la producida por el extracto. Entonces, la capacidad neuroprotectora de éste puede asociarse al ácido ferúlico pero no únicamente a este compuesto. Por otro lado, los ácidos *p*-cumárico y *trans*-cinámico no son responsables de la actividad neuroprotectora observada. El ácido ferúlico también ha sido identificado como agente neuroprotector en las plantas medicinales *Scrophularia buergiana* y *Ligusticum wallichii* contra el daño *in vitro* mediado por glutamato y  $\text{Fe}^{2+}$  respectivamente (Kim y Kim, 2000; Zhang *et al.*, 2003).

La neurotoxicidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se relaciona principalmente con la generación excesiva de radicales libres por vías que involucran no sólo la reacción de Fenton, sino también el agotamiento en los niveles intracelulares de GSH y alteraciones en el metabolismo intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  (Farber *et al.*, 1990; Rimpler *et al.*, 1999). Los modos de acción antioxidantes que tienen como resultado final la disminución en la producción intracelular citosólica de ROS y RNS, o el incremento en los niveles intracelulares de GSH, no parecen contribuir al efecto neuroprotector del extracto frente a la muerte inducida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por tanto, se sugiere que otras vías antioxidantes deben estar involucradas en la actividad neuroprotectora del extracto de *B. triquetrum* frente a este compuesto químico.

El SIN-1 es un compuesto generador de radicales  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{NO}^{\bullet}$  cuya reacción produce peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Bonfoco *et al.*, 1996). Como la exposición al SIN-1 puede mimetizar algunas de las vías generadoras de especies reactivas del nitrógeno en varias enfermedades neurodegenerativas (Simonian y Coyle, 1996), este modelo resulta útil para evaluar la capacidad neuroprotectora del extracto de *B. triquetrum*. Así, se demostró que el extracto de *B. triquetrum* protege contra la citotoxicidad producida por el SIN-1 y el efecto protector observado es semejante al referido para el extracto antioxidante estandarizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761) en un modelo similar de estrés oxidativo utilizando cultivos mixtos hipocámpales de rata (Bastianetto *et al.*, 2000). El ácido ferúlico resulta protector en estas condiciones experimentales, pero no puede reproducir completamente los efectos observados para el extracto. Al igual que en el modelo anterior, la actividad neuroprotectora observada en el extracto no se relaciona con la presencia de los ácidos *p*-cumárico y *trans*-cinámico.

En correspondencia con hallazgos previos en otros sistemas celulares (Bastianetto *et al.*, 2000; Russo *et*

*al.*, 2003) fue demostrado que la neurotoxicidad del SIN-1 en las células GT1-7 involucra no sólo la excesiva generación citosólica de RNS y ROS sino también el agotamiento de los niveles de GSH. Pero, al igual que en el modelo anterior, el extracto de *B. triquetrum* no puede modular favorablemente tales parámetros.

De los resultados obtenidos en los dos primeros modelos de estrés oxidativo puede concluirse que el extracto acuoso de *B. triquetrum* ejerce neuroprotección, y ésta se relaciona, al menos parcialmente, con la presencia del ácido ferúlico. Pero también fue demostrado que las vías por las cuales el extracto ejerce efecto neuroprotector en estos dos modelos no se relacionan con la disminución en la producción de radicales libres, sino con otros modos de acción antioxidante. Ésto podría resultar contradictorio, toda vez que el extracto exhibe, a la concentración de  $0.50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , propiedades antioxidantes, como el atrapamiento de radicales libres, que fueron demostradas en los experimentos iniciales.

Para intentar explicar esta contradicción, deben tomarse en consideración hallazgos previos que demuestran que la citoprotección ejercida por ácidos fenólicos (como aquellos contenidos en el extracto de *B. triquetrum*) y otros compuestos fenólicos, en modelos clásicos de estrés oxidativo, no siempre está asociada con una disminución en la producción de radicales libres (Vieira *et al.*, 1998a; Ishige *et al.*, 2001). Por un lado, Vieira *et al.*, (1998a) han profundizado en los posibles mecanismos de acción citoprotectora del ácido cafeico y han demostrado que este ácido cinámico tiene efecto protector que no se asocia a su capacidad para impedir la oxidación de las LDL, o sea al efecto de atrapamiento directo de radicales libres. Sin embargo, a las concentraciones empleadas en ese estudio ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), las propiedades de atrapamiento de ROS y RNS del ácido cafeico han sido bien documentadas (Chen y Ho, 1997; Kikuzaki *et al.*, 2002; Son y Lewis, 2002). Se han publicado resultados similares, concernientes al efecto protector de flavonoides (6-hidroxi flavonol, 7- hidroxi flavonol) en células neuronales HT-22, frente a la muerte apoptótica producida por diferentes agentes (como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que inducen estrés oxidativo (Ishige *et al.*, 2001). La protección, en este caso, tampoco guarda relación ni con la disminución en la producción de radicales libres ni con el incremento en las reservas intracelulares de GSH. Estos hallazgos han permitido sugerir que varios antioxidantes, como algunos compuestos fenólicos, podrían actuar por vías alternativas que involucren la interrupción de los eventos intracelulares que conducen a la muerte celular y son desencadenados por la acción de los radicales libres, sin que ello implique disminución en los niveles de ROS y RNS (Ishige *et al.*, 2001).

Durante la muerte neuronal apoptótica, como la que puede tener lugar tras la exposición al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y al SIN-1, en diferentes líneas celulares y específicamente en las células neuronales GT1-7, tienen lugar un complejo grupo de eventos desencadenados por el exceso de ROS y RNS (Bonfoco *et al.*, 1996;

Chandra *et al.*, 2000; Ishige *et al.*, 2001). Estas especies reactivas pueden alterar la homeostasis mitocondrial y, de esta manera, favorecer la salida del citocromo c hacia el citosol. Este evento dispara a su vez una nueva secuencia de eventos que conducen a la activación de caspasas, las que ocasionan muerte celular por su acción proteolítica sobre una variedad de proteínas intracelulares (Chandra *et al.*, 2000). Por otro lado, el exceso de ROS puede además activar algunos factores de transcripción los cuales pueden incrementar la expresión de proteínas citotóxicas (Dröge, 2002). Entonces, la muerte celular ocurre como resultado de una compleja secuencia de eventos letales, que son promovidos por las ROS y RNS generadas tras la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o al SIN-1.

De este modo, el efecto del extracto acuoso de *B. triquetrum* en estos dos modelos podría producirse mediante la interrupción en alguno de estos eventos y en virtud, al menos parcialmente, de la presencia de un ácido fenólico como el ácido ferúlico. En tal sentido, aunque ésta podría ser una explicación plausible para los resultados obtenidos, ello debe ser aún demostrado experimentalmente. Del mismo modo, es importante esclarecer en el futuro las razones por las cuales prevalecen otros modos de acción antioxidante del extracto en estos dos modelos, que no se relacionan con su capacidad para atrapar radicales libres. Ciertamente, la determinación de un modo de acción es particularmente compleja en el caso de un extracto natural como el extracto acuoso de *B. triquetrum*, toda vez que su efecto farmacológico puede ser el resultado de la acción conjunta de sus componentes (Aruoma, 2003).

Se estudió además el efecto del extracto de *B. triquetrum* en el modelo de daño oxidativo inducido por MeHg. Una gran cantidad de evidencias *in vitro* e *in vivo* han sugerido que la acción del MeHg sobre las neuronas es muy compleja e involucra diferentes mecanismos, uno de los cuales parece ser la inducción de estrés oxidativo (Usuki *et al.*, 2001). La efectividad de antioxidantes como agentes protectores frente a esta neurointoxicación, ha sido avalada en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* (Gasso *et al.*, 2001; Usuki *et al.*, 2001; Shanker y Aschner, 2003).

La disminución observada en la viabilidad de las células GT1-7 como resultado de la exposición al MeHg durante períodos de exposición cortos (3 horas) y largos (24 horas), es significativamente atenuada por el extracto de *B. triquetrum*, y ello puede relacionarse con su contenido de ácido ferúlico. En las exposiciones de corta duración, el efecto producido por el extracto puede atribuirse completamente a la presencia de ácido ferúlico.

Entre las diversas vías que conducen al estrés oxidativo y la muerte celular provocados por el MeHg se incluyen: agotamiento de los niveles de GSH por reacción directa con los grupos tiólicos (Sarafian *et al.*, 1994), desregulación de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> (Atchison y Hare, 1994) y disminución de la biodisponibilidad de Se intracelular (Salonen *et al.*, 2000). El MeHg puede actuar como agente

desacoplante de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, y ésto conduce no sólo a la generación directa de ROS ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ) sino también a la acidificación del medio citosólico que favorece la liberación de  $Fe^{2+}$  y la ocurrencia de la reacción de Fenton (Shenker *et al.*, 1999). Entonces, como el mecanismo de neurotoxicidad del MeHg transita por la generación intracelular de  $H_2O_2$ , el efecto protector observado para extracto de *B. triquetrum* y el ácido ferúlico guarda correspondencia con lo obtenido frente a la muerte celular mediada por  $H_2O_2$ .

El MeHg produce un aumento significativo de la generación de ROS y RNS en las células GT1-7, no sólo luego de 3 horas de exposición, en correspondencia con lo demostrado por Sarafian *et al.*, (1994) sino también durante exposiciones de 24 horas. En este modelo, el extracto de *B. triquetrum* disminuye la producción intracelular de ROS y RNS provocada por el MeHg en las dos condiciones y este efecto es también registrado para el ácido ferúlico. Puede sugerirse que este efecto del extracto de *B. triquetrum* esté relacionado con una combinación de factores como la captura de radicales libres, la unión de iones  $Fe^{2+}$  y la posibilidad de favorecer el funcionamiento de antioxidantes endógenos, al servir como fuente de *Se* que prevenga los efectos negativos del MeHg sobre el funcionamiento de las proteínas antioxidantes que contienen *Se* (GSH-Px y tioredoxina reductasa). Pero, al igual que en los estudios anteriores, el extracto no favorece la recuperación de los niveles intracelulares de GSH, luego de su agotamiento inducido por el MeHg.

Tras una extensa revisión de la literatura, no se han encontrado estudios similares a la presente investigación, concernientes a la capacidad neuroprotectora de extractos antioxidantes obtenidos de plantas u otras fuentes naturales, frente al estrés oxidativo inducido por el MeHg. La evaluación de la actividad protectora de los ácidos ferúlico, *p*-cumárico y *trans*-cinámico tampoco ha sido abordado previamente en este modelo, aunque existen estudios del efecto producido por otros compuestos fenólicos (Gasso *et al.*, 2001; Shanker y Aschner, 2003).

La isquemia constituye otra enfermedad neurodegenerativa que se ha referido como la tercera causa de muerte en todo el mundo (Mattson *et al.*, 2001). Esta patología tiene lugar *in vivo* tras la interrupción temporal (completa o parcial) del flujo sanguíneo a un área específica del cerebro y su posterior reperusión. En esta segunda etapa, la participación de los radicales libres como mediadores de la muerte celular durante la isquemia cerebral ha sido extensamente sustentada en los últimos años y ello ha motivado la utilización de antioxidantes como alternativas terapéuticas (Behl y Moosmann *et al.*, 2002; Gilgun-Sherki *et al.*, 2002). El evento isquémico puede ser modelado *in vitro* mediante la privación temporal a las células de oxígeno y glucosa, al ser éstas las perturbaciones básicas que originan el daño isquémico *in vivo* (Farooqui *et al.*, 1994).

La cascada de eventos moleculares que es inducida por la isquemia converge en determinados momentos en la generación excesiva de ROS y RNS como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $NO^{\bullet}$  y  $ONOO^-$ , por vías que son complejas y que probablemente involucran todas las vistas en los modelos anteriores (Dröge, 2002). Se sugiere que el fallo energético que tiene lugar tras la ausencia de glucosa y oxígeno conlleva a la despolarización de la membrana plasmática, lo que produce un incremento de las concentraciones citosólicas de  $Ca^{2+}$  que por diversos mecanismos, conduce a la producción de radicales libres y al agotamiento en los niveles de GSH (Facchinetti *et al.*, 1998). Por otro lado, el aumento en las concentraciones de  $Ca^{2+}$  induce disfunción mitocondrial y ello además exacerba el daño isquémico. Al complejo escenario anterior, se suma el hecho de que la isquemia produce disminución del pH intracelular y ello motiva la liberación del *Fe*, que en su estado reducido puede estimular reacciones adicionales generadoras de radicales libres (Mattson *et al.*, 2001).

La actividad neuroprotectora del extracto de *B. triquetrum* se evaluó primeramente en condiciones de daño neuronal severo. La presencia del extracto de *B. triquetrum* durante las 3 horas de exposición a HQ/A protege contra la citotoxicidad inmediata y tardía, altamente significativa, que se registra en esas circunstancias. Se plantea que las células sometidas a HQ/A pueden aumentar su sobrevivencia mediante el uso anaeróbico de la glucosa (Lipton, 1999), pero el contenido de esta molécula en el extracto no explica el efecto protector observado en estas condiciones severas. De los tres ácidos cinámicos, el ácido ferúlico resulta protector contra la ocurrencia de citotoxicidad aguda y tardía y de hecho a él puede atribuirse completamente el efecto protector del extracto frente a la muerte neuronal tardía provocada por las condiciones moderadas de HQ/A.

Además, se estudió el efecto del extracto de *B. triquetrum* y sus ácidos cinámicos frente a la muerte neuronal y los cambios en el equilibrio oxidativo que tienen lugar tras condiciones moderadas de HQ/A. La producción de radicales libres así como la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GSH-Px que tienen lugar a las 3 horas post-reperfusión luego de 1.75 horas de HQ/A, son atenuadas por la adición del extracto de *B. triquetrum* durante la isquemia. Ésto podría explicar la neuroprotección ejercida por el extracto contra la citotoxicidad observada a las 3 horas post-reperfusión y posiblemente también contra la muerte tardía provocada por la isquemia moderada, que parece estar desencadenada por el desbalance oxidativo temprano.

Los efectos positivos del extracto de *B. triquetrum* sobre la actividad de las enzimas antioxidantes pueden guardar relación tanto con la presencia de moléculas que tienen actividad atrapadora de radicales  $O_2^{\bullet-}$  como con el contenido de *Se*. Ello podría favorecer la actividad de la enzima SOD y de la GSH-Px, respectivamente. A lo anterior podría añadirse la presencia en el extracto de entidades que

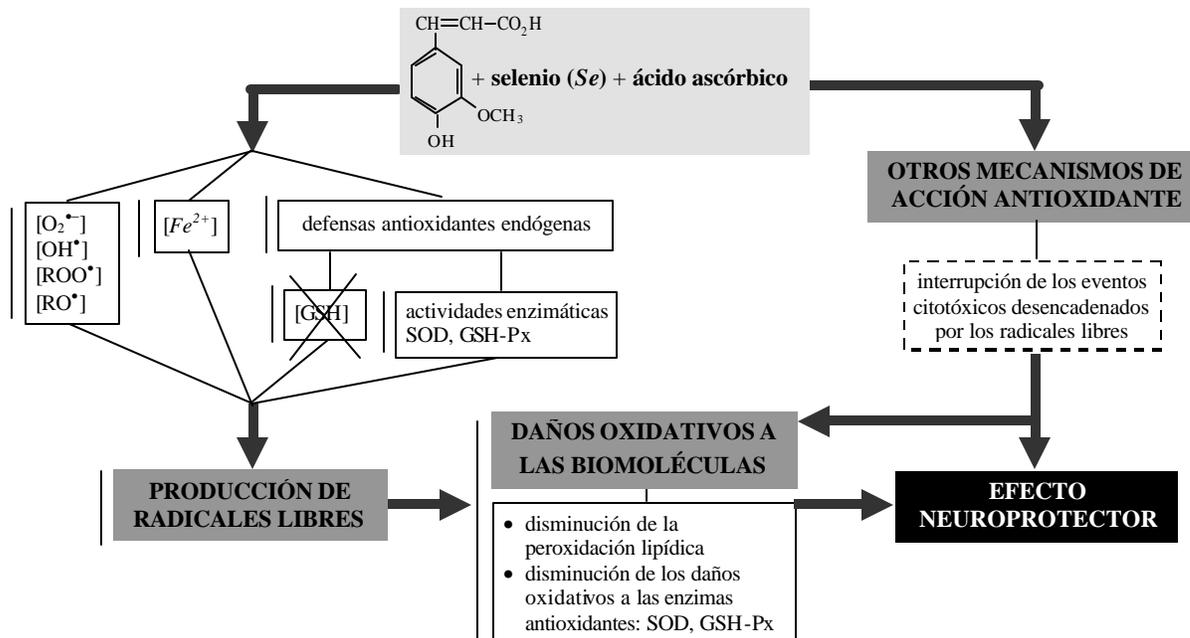
atrapan otros radicales como el  $\text{OH}^\bullet$  o unen  $\text{Fe}$  y la actividad combinada de todas ellas resultaría en el efecto de disminución en la producción de radicales libres que se observa tras la ocurrencia de HQ/A moderada en células expuestas al extracto de *B. triquetrum*. En lo referido a los ácidos cinámicos, ninguno de ellos puede explicar estos efectos positivos del extracto específicamente sobre los marcadores de estrés oxidativo de las células GT1-7. Entonces, aunque el ácido ferúlico puede explicar algunos de los efectos neuroprotectores observados para el extracto en términos de viabilidad celular en este modelo, otros compuestos deben también estar implicados. Al igual que en los modelos anteriores, el efecto neuroprotector del extracto no se vincula con su capacidad para incrementar las reservas intracelulares de GSH.

En la literatura se ha referido el efecto de los extractos antioxidantes de *Ginkgo biloba* (EGb 761) (Kriegelstein *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2002b; Du *et al.*, 2004) y de *Radix salvia* (RSM) (Jun *et al.*, 1998) frente a la muerte neuronal producida *in vitro* por condiciones experimentales de anoxia o hipoxia química. El extracto de *B. triquetrum* muestra un efecto protector comparable o incluso mayor que los de tales extractos, frente al daño neuronal producido *in vitro* por las condiciones de HQ/A.

A partir de todos los hallazgos que se han obtenido en esta investigación, puede plantearse que el ácido ferúlico es al menos parcialmente responsable de los efectos neuroprotectores observados, pero otros compuestos deben también estar presentes en el extracto, que podrían ejercer neuroprotección independientemente o mediante la acción sinérgica con el ácido ferúlico. Del resto de los compuestos identificados y cuantificados en esta investigación, los ácidos *p*-cumárico y *trans*-cinámico, aunque presentes en las fracciones del extracto con actividad inhibitoria sobre la peroxidación lipídica en homogenados de tejido cerebral de rata, no ejercen protección en los modelos de estrés oxidativo en las células GT1-7, ni incrementan sinérgicamente la actividad del ácido ferúlico. Por su parte, el ácido ascórbico, empleado como control positivo a la concentración de  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , produce efectos protectores similares a los del extracto de *B. triquetrum* cuando se mide la producción de ROS y RNS inducida por el MeHg en la línea neuronal GT1-7. Pero dado el contenido del ácido ascórbico en el extracto ( $0.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), se necesitarían concentraciones muy altas de este producto natural ( $> 10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para producir efectos protectores en virtud de la presencia de este compuesto. No obstante, la actividad del ácido ferúlico podría ser favorecida por la presencia del ácido ascórbico, teniendo en cuenta hallazgos recientes que sustentan la acción antioxidante sinérgica de éste con ácidos fenólicos como el ácido cafeico (Vieira *et al.*, 1998b). Esta posibilidad constituye, de hecho, un aspecto relevante que deberá ser investigado en etapas futuras de este proyecto. Del mismo modo, debe reconocerse la posible contribución del *Se* como entidad antioxidante en el extracto de *B. triquetrum*, y la de otros compuestos

fenólicos que forman parte de él, que aún no han sido identificados.

Además, los resultados de esta investigación indican que el extracto acuoso de *B. triquetrum* actúa por varias vías antioxidantes en la protección de las células neuronales GT1-7 contra la muerte mediada por ROS y RNS. Las vías propuestas se resumen en el esquema que se presenta en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Esquema que resume las vías propuestas para el efecto neuroprotector *in vitro* del extracto acuoso de *B. triquetrum*.

Por un lado, el extracto acuoso de *B. triquetrum* disminuye la producción de radicales libres que se produce ante la exposición al MeHg o ante condiciones moderadas de HQ/A. Ello puede ocurrir, posiblemente, por la combinación de sus habilidades en la captura de estas entidades, la unión al *Fe* y el efecto sinérgico con moléculas antioxidantes endógenas. Pero por otro lado, en los modelos de daño neuronal inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  o SIN-1, la neuroprotección tiene lugar sin que se produzca disminución en la generación de radicales libres, lo cual implica la participación de otras rutas de protección antioxidante. Una de éstas fue sugerida previamente en el texto y se señala con líneas discontinuas en la **Figura 2**. En ambas vías propuestas para la acción neuroprotectora del extracto, en las que exista o no disminución en la producción de radicales libres puede participar el ácido ferúlico.

Sin embargo, el extracto acuoso de *B. triquetrum* no favorece la recuperación de los niveles intracelulares de GSH en ninguno de los modelos estudiados de estrés oxidativo (señalado con  $\times$  en la **Figura 2**). Ello resulta interesante toda vez que se conoce que el agotamiento del GSH es un evento primario, necesario aunque no suficiente, que precede a la muerte celular en un amplio grupo de condiciones patológicas asociadas a la generación excesiva de ROS y RNS (Schulz *et al.*, 2000; Dringen y Hirrlinger, 2003). Para explicar el efecto neuroprotector del extracto de *B. triquetrum* que se

registra en células GT1-7 que exhiben agotamiento de los niveles de GSH, podría considerarse una vez más, el contenido de ácido ferúlico del extracto.

Lo anterior guarda relación con diversos estudios que han sustentado que tanto el ácido ferúlico como la curcumina, el dímero del ácido ferúlico, poseen efectos inhibitorios sobre la actividad de las enzimas fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) y lipooxigenasa (LOX) (Conney *et al.*, 1991; Malterud y Rydland, 2000; Yang *et al.*, 2001). Ello resulta importante ya que un evento temprano en la secuencia de procesos que conducen a la muerte celular tras producirse el agotamiento en los niveles de GSH, es la liberación del ácido araquidónico de las membranas por activación de la FLA<sub>2</sub> y su posterior metabolización por la LOX, todo lo cual contribuye a la generación adicional de radicales libres (Mytilineou *et al.*, 2000; 2002). Entonces, tanto el ácido ferúlico contenido en el extracto, como la curcumina posiblemente formada, podrían inhibir los eventos que conducen a la muerte neuronal en células GT1-7 tras el agotamiento de los niveles intracelulares de GSH. Ello permitiría explicar el efecto protector que se observa en células expuestas al extracto acuoso de *B. triquetrum*, en todos los modelos ensayados dentro de la presente investigación.

## CAPÍTULO V: Conclusiones

1. El extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum* posee propiedades antioxidantes *in vitro*, que están dadas por su habilidad tanto para inhibir la peroxidación lipídica espontánea e inducida químicamente en homogenados de tejido cerebral de rata, como para secuestrar radicales O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>, DPPH<sup>•</sup> y unir Fe.
2. El extracto acuoso del alga roja *B. triquetrum* contiene Se (0.1 mg·kg<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (0.4 g·kg<sup>-1</sup>) y compuestos fenólicos (8 g·kg<sup>-1</sup>), los cuales poseen propiedades antioxidantes.
3. La combinación de extracciones líquido-líquido, TLC preparativa y Cromatografía en Columna de Amberlite XAD-2, permite obtener fracciones del extracto acuoso de *B. triquetrum* que muestran actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica y contienen los ácidos ferúlico, *p*-cumárico y *trans*-cinámico, los cuales constituyen el 60% de los compuestos fenólicos del extracto.
4. La muerte de las neuronas inmortalizadas de hipotálamo de ratón GT1-7 inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una combinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y FeSO<sub>4</sub>, SIN-1 y MeHg, es reducida por el extracto acuoso de *B. triquetrum*; éste además previene la producción de radicales libres provocada por el MeHg en esa línea celular.

5. La exposición al extracto acuoso de *B. triquetrum* confiere protección contra la muerte de las neuronas GT1-7 sometidas a la combinación de hipoxia química y aglucemia, lo que no se relaciona con el contenido de glucosa del extracto. Tras la ocurrencia de hipoxia química y aglucemia moderada el extracto protege contra la generación de radicales libres y la disminución de la actividad de las enzimas SOD y GSHPx que tienen lugar durante la reperfusión.
6. En células GT1-7, los efectos neuroprotectores del extracto de *B. triquetrum* son atribuidos, al menos parcialmente, al ácido ferúlico, y no a los ácidos *p*-cumárico y *trans*-cinámico, aunque requieren la participación de otros componentes antioxidantes. Además estos efectos pueden tener lugar con o sin disminución en la producción de radicales libres, pero no guardan relación con el incremento en las reservas intracelulares de GSH.

## CAPÍTULO VI: Recomendaciones

1. Esclarecer las vías de acción neuroprotectora del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum* frente al estrés oxidativo en células GT1-7, que no guardan relación con la disminución en la generación de radicales libres o el incremento en las reservas intracelulares de GSH
2. Profundizar en la posible interacción sinérgica existente entre el ácido ascórbico y los ácidos cinámicos en el extracto acuoso de *B. triquetrum* que pudieran favorecer la actividad antioxidante y neuroprotectora de éste en células GT1-7
3. Evaluar el efecto del extracto acuoso de *B. triquetrum* y sus ácidos cinámicos, fundamentalmente el ácido ferúlico, en modelos *in vivo* de estrés oxidativo neuronal, por ejemplo en modelos de neurointoxicación con MeHg o en modelos de isquemia neuronal

## CAPÍTULO VII: Referencias Bibliográficas

- Ainouz IL, Sampaio AH, Benevides MMB, Freitas ALP, Costa FHF, Carvalho C (1992) Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae. *Bot Mar.* 35: 475- 479
- Ainouz IL, Sampaio AH, Freitas ALP, Benevides NMB, Mapurunga S (1995) Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 7: 15- 19.
- Almaas R, Saugstad OD, Pleasure D, Rootwelt T (2002) Neuronal formation of free radicals plays a minor role in hypoxic cell death in human NT2-N neurons. *Pediatr Res.* 2002. 51: 136-143.
- AOAC (1990) Proccotol. 941.15 En: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Ed: Helrich K. Arlington, Virginia, E.U. p 1048.
- Arai H, Kogure K, Sigioka E, Nakauro M (1987) Importance of two iron reducing systems in lipid

- peroxidation of brain: implications for oxygen toxicity in the central nervous system. *Biochem. Int.* 14: 741-749.
- Areces A (1995) Biotecnología de agarofitas del género *Bryothamnion* kützing. Tesis para optar por el Título de Doctor en Ciencias Biológicas. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Cuba.
  - Aruoma OI (1994) Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods in Enzymol.* 233: 57-66.
  - Aruoma OI (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 671-683.
  - Aruoma OI (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research.* 523-524: 9-20.
  - Aruoma OI, Bahorun T, Jen L-S (2003) Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research.* 544: 203-215
  - Atchison WD, Hare MF (1994) Mechanisms of methylmercury- induced neurotoxicity. *FASEB J.* 8: 622-629.
  - Babu BH, Shylesh BS, Padikkala J (2001) Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia.* 72: 272-277.
  - Barro R, Zaldívar C, Fallarero A, Vidal A (2001) Evaluation of the antioxidant activity of an aqueous extract from the seaweed *Bryothamnion triquetrum*: red seaweed specie from the Caribbean Sea. *Revista Cubana de Química.* XIII (2): 40.
  - Bastianetto S, Zheng W-H, Quirion R (2000) The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J. Neurochem.* 74: 2268-2277.
  - Bastianetto S, Quirion R (2002) Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging.* 23(5):891-897.
  - Behl C, Moosmann B (2002) Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol. Chem.* 383:521-536.
  - Bonfoco E, Zhivotovsky B, Rossi AD, Aguilar-Santelises M, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1996) bcl-2 delay apoptosis and PARP cleavage induced by NO donors in GT1-7 cells. *Neuroreport.* 8:273-276.
  - Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
  - Bravo L (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Rev.* 56(11): 317-333.
  - Burtin P (2003) Nutritional value of seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2(4).
  - Callaway JK, Beart PM, Jarrott B (1998) A reliable procedure for comparison of antioxidants in rat brain homogenates. *J Pharm Toxicol Methods.* 39: 155-162.
  - Calvete JJ, Costa FHF, Saker-Sampaio S, Murciano MPM, Nagano CS, Cavada BS, Grangeiro TB, Ramos MV, Bloch CJr, Silveira SB, Freitas BT, Sampaio AH (2000) The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 343- 350
  - Chen JH, Ho Ch-T (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxy cinnamic

- acid compounds. *J Agric Food Chem.* 45: 2374-2378.
- Combs GF, Gray WP (1998) Chemopreventive agents: Selenium. *Pharmacol. Ther.* 79: 179-192.
  - Conney AH, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Manchand PF, Laskin JD, Huang MT (1991) Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Adv Enzyme Regul.* 31:385-396.
  - Cuvelier M-E, Richard H, Berset C (1992) Comparison of the antioxidant activity of some acid-phenols: structure activity relationship. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 56(2): 324-325.
  - Deliorman D, Çalis I, Ergun F, Uydes Dogan BS, Buharahoglu CK, Kansik I (2000) Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from *Viscum album ssp album*. *J Ethnopharmacol.* 72: 323-329.
  - Dringen R, Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* 384: 505-516.
  - Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82: 47-95.
  - Du G, Willet K, Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Sluse FM (2004) Protective effect of EGb 761 against oxidative phosphorylation of brain mitochondria after anoxia/reoxygenation *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology Mechanisms and Methods.* 14 (1-2): 97-101.
  - Duval B, Shetty K, Thomas WH (2000) Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J. Appl. Phycol.* 11: 559-566.
  - Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM (1998) Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol.* 18(6): 667-682.
  - Farber JL, Kyle ME, Coleman JB (1990) Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest.* 62: 670-679.
  - Farooqui AA, Haun SE, Horrocks LA (1994) Ischemia and hypoxia. En: *Basic Neurochemistry*. Eds: Siegel GJ *et al.* Raven Press Ltd, New York, USA.
  - Fauré M, Lissi EA, Videla LA (1990) Antioxidant capacity of allopurinol in biological systems. *Biochem. Int.* 21: 357- 366.
  - Fernández LE, Valiente OG, García R, Velez H, Machytka D, Zsoldos-Mady V, Neszmelyi A (1987) A proton and carbon-13 NMR study of an agar polysaccharide from *Bryothamnion triquetrum*. *Carbohydrate Research.* 163(1): 143-147.
  - Fisch KM, Böhm V, Wright AD, König GM (2003) Antioxidative meroterpenoids from the brown alga *Cystoseira crinita*. *J. Nat. Prod.* 66: 968-975.
  - Freitas ALP, Viana GSB (2001) Proteins from the marine algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum* as analgesics. Patente BR 209901895 A 20010116, Solicitud BR 99-1895 19990601.
  - Fridovich I, McCord JM (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
  - Fujimoto K, Kaneda T (1984) Separation of antioxidant (antioxigenic) compounds from marine algae. *Hydrobiologia* 1984, 116/117, 111-113.
  - Fukumoto LR, Mazza G (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 48: 3597-3604.
  - Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tsukamura K, Hayakawa Y, Kikumori T, Mase T, Itoh T,

- Nishikawa M, Hayashi H, Shibata A, Hibi Y, Takahashi M, Narita T (1999) Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumours in rats. *J. Cancer. Res.* 90: 922-927.
- García R, González JA, Fernández LE (1988) Structure of agar obtained from the red alga *Bryothamnion triquetrum*. *Rev Cub Farmacia.* 22(2): 100-110.
  - Gasso S, Cristofol RM, Selema G, Rosa R, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C (2001) Antioxidant compounds and Ca<sup>2+</sup> pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. *J Neurosci Res.* 66(1): 135-45.
  - Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D (2002) Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev.* 54:271-284.
  - González JA, García R (1988) Preliminary study for obtaining agar from the red algae *Bryothamnion triquetrum*. *Rev Cub Farmacia.* 22(2): 90-99.
  - Gordon MH (1996) Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat Prod Rep.* 13: 265- 273.
  - Goupy P, Hugues M, Boivin P, Amiot MJ (1999) Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1625-1634.
  - Grabley S, Thiericke R (1999) The impact of natural products on drug discovery. En: *Drug discovery from nature*. Eds: Grabley S. y Thiericke R. Springer, New York, USA.
  - Graf E (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad Biol Med.* 13: 435-448.
  - Guidetti C, Paracchini S, Lucchini S, Cambieri M, Marzatico F (2001) Prevention of neuronal cell damage induced by oxidative stress *in vitro*: effect of different *Ginkgo biloba* extracts. *J Pharm Pharmacol.* 53: 387-392.
  - Häkkinen S (2000) Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Tesis para optar por el Título de Doctor en Medicina, Universidad de Kuopio, Finlandia.
  - Han J, Kang S, Choue R, Kim H, Leem K, Chung S, Kim C, Chung J (2002)a Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia.* 73 (7-8): 710-712.
  - Han J, Xing D, Sun H, Lu H, Li M, Du L (2002)b Comparison of flavonoids, terpenoids and their natural complex in *Ginkgo biloba* on antioxidant effect. *Zhongguo Yaolixue Tongbao.* 18(1): 115-117.
  - Harvey A (2000) Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today.* 5:294-300.
  - Hiqashi OK, Otani S, Okai Y (1999) Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. *Cancer Lett.* 140: 21-25.
  - Hou X, Yan X (1998) Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *The Science of the Total Environment.* 222: 141- 156.
  - Huang H-L, Wang B-G (2004) Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweed collected from the Qingdao Coastline. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4993-4997.
  - Ikeda K, Kitamura A, Machida H, Watanabe M, Negishi H, Hiraoka J, Nakano T (2003) Effect of *Undaria pinnatifida* (wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.* 30:44-48.

- Ishige K, Schubert D, Sagara Y (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three different mechanisms. *Free Rad Biol Med.* 30(4): 433-46.
- Jiménez-Escrig A, Goni Cambron I (1999) Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49:114-120.
- Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R y Saura-Calixto J (2001) Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J. Sci. Food Agric.* 81: 530-534.
- Jun L, Peigen K, Weiping W, Fengying Z, Jiexiao L (1998) *Radix salviae Miltiorrhizae* protects rat hippocampal neurons in culture from anoxic damage. *J Trad Chin Med.* 18(1): 49-54.
- Kagan VE, Kisin ER, Kawai K, Serinkan BF, Osipov AN, Serbinova EA, Wolinsky I, Shvedova AA (2002) Toward mechanism-based antioxidant interventions: lessons from natural antioxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 959:188-198.
- Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
- Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn M, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE (1993) bcl-2 inhibition of neuronal death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* . 262:1274-1277.
- Kang K, Park Y, Hwang HJ, Kim SH, Lee JG, Shin HC (2003) Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch Pharm Res.* 26(4): 286-293.
- Kang HS, Chung HY, Kim JY, Son BW, Jung HA, Choi JS (2004) Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch Pharm Res.* 27(2): 194-198.
- Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield AD (2002) Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems *in vitro*: structure-activity studies. *J Nutr Biochem.* 13: 273-281.
- Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose H, Akiyama K, Taniguchi H (2002) Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2161-2168.
- Kim SR, Kim YCh (2000) Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from roots of *Scrophularia buergeriana*. *Phytochemistry.* 54: 503- 509.
- Kobayashi M, Kakizono T, Nishio N, Nagai S, Kurimura Y, Tsuji Y (1997) Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48: 351-356
- Kriegelstein J, Ausmeier F, El-Abhar H, Lippert K, Welsch M, Rupalla K, Henrich-Noack P (1995) Neuroprotective properties of *Ginkgo biloba* constituents. *Eur J Pharm Sci.* 3: 39-48.
- Kumpulainen J, Raittila AM, Lehto J, Koivistoinen P (1983) Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in foods and diets. *J. Assoc Off Anal. Chem.* 66(5): 1129-1135.
- Li Y, Maher P, Schuber D (1997) A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron.* 19: 453- 463.
- Lim SN, Ooi VE, Cheung PCK, Ang POJr (1998) Antioxidative activities of methanol extracts from some marine macroalgae of Hong Kong. *Abstracts of the International Symposium on*

- Progress and Prospect of Marine Biotechnology*; Ocean University of Qingdao, Qingdao, China: 76.
- Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO (2002) Evaluation of antioxidative activity from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. *J. Agric. Food Chem.* 50:3862- 3866.
  - Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79: 1431-568.
  - Littler DS, Littler MM (2000) En: *Marine plants of the Caribbean: a field guide from Florida to Brazil*. Eds: Atherton L. y Alvarado L.A. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., USA.
  - Loikkanen JJ, Naarala J, Savolainen KM (1998) Modification of glutamate-induced oxidative stress by lead: the role of extracellular calcium. *Free Radic. Biol. Med.* 24:377-384.
  - Loikkanen JJ, Chvalova K, Naarala J, Vahakangas KH, Savolainen KM (2003) Pb<sup>2+</sup>- induced toxicity is associated with p53-independent apoptosis and enhanced by glutamate in GT1-neurons. *Toxicol. Lett.* 144(2): 235-246.
  - Mabeau S, Fleurence J (1993) Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science and Technology.* 4:103-107.
  - Malterud KE, Rydland KM (2000) Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel. *J Agric Food Chem.* 48(11):5576-80.
  - Matsuda H, Ishikado A, Nishida N, Ninomiya K, Fujiwara H, Kobayashi Y, Yoshikawa M (1998) Hepatoprotective, superoxide scavenging and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorg. Med Chem. Lett.* 8: 2939-2944.
  - Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, Chihara M, Yamamoto Y, Niki E, Karube I (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 9:29-35.
  - Matsukawa R, Hotta M, Masuda Y, Chihara M, Karube I (2000) Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.* 12: 263-267.
  - Mattson MP, Duan W, Pedersen WA, Culmsee C (2001) Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis.* 6: 69-81.
  - Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron.* 5:1-10.
  - Miranda MS, Cintra RG, Barros SBM, Mancini-Filho J (1998) Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J. Med. Biol. Res.* 31: 1075-1079.
  - Miranda MS, Sato S, Mancini-Filho J (2001) Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* on special conditions. *Boll. Chim. Farmac.* 140(3): 165-168.
  - Myers KM, Fiskum G, Liu Y, Simmens SJ, Bredesen DE, Murphy AN (1995) bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury and loss of viability. *J. Neurochem.* 65:2432-2440.
  - Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA (2000) Arachidonic acid release and toxicity in glutathione depleted mesencephalic cultures. *Soc. Neurosci Abstr.* 26: 1798-1799.
  - Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA (2002) Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism and Related Disorders* 8: 385-387.
  - Nakamura T, Nagayama K, Uchida K, Tanaka R (1996) Antioxidant activity of phlorotannins

- isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Science* 62(6): 923-926.
- Natelson S (1964) En: *Techniques of clinical chemistry*. Eds: Springfield, C.C. USA, 1971: 162-165.
  - Neves SA, Días-Baruffi M, Freitas ALP, Roque-Barreira MC (2001) Neutrophil migration induced *in vivo* and *in vitro* by marine algal lectins. *Inflamm. Res.* 50: 486-490.
  - Norziah MH, Ching CY (2000) Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry*. 68: 69-76.
  - Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction *Anal Biochem.* 95:331-58.
  - Pryce RJ (1972) The occurrence of lunularic and abscisic acids in plants. *Phytochemistry*. 11: 1759-1761.
  - Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Cazin J-C, Bailleul F, Trotin F (2000) Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Hulls *Ans Flour. J. Ethnopharmacol.* 72(1-2): 35-42.
  - Raskin I, Ribnicky DM, Kormamysky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuc N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B (2002) Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*. 20(12):522- 531.
  - Rauha JP (2001) The search for biological activity in Finnish plant extracts containing phenolic compounds. Tesis para optar por el Título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Helsinki, Finlandia.
  - Rice ME (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23: 209-216.
  - Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant- derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.* 22(4): 375-383.
  - Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 20(7): 933-956.
  - Rimpler MM, Rauen U, Schmidt T, Möröy T, De Groot H (1999) Protection against hydrogen peroxide cytotoxicity in Rat-1 fibroblasts provided by the oncoprotein bcl-2: maintenance of calcium homeostasis is secondary to the effect of bcl-2 on cellular glutathione. *Biochem. J.* 340: 291-297.
  - Ruberto G, Baratta MT, Biondi DM, Amico V (2001) Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *J. Appl. Phycol.* 13: 403-407.
  - Russo A, Borrelli F, Campisi A, Acquaviva R, Raciti G, Vanella A (2003) Nitric oxide- related toxicity in cultured astrocytes: effect of *Bacopa monniera*. *Life Sciences.* 73: 1517- 1526.
  - Safer AM, Al-Nughamish (1999) Hepatotoxicity induced by antioxidant food additive butylated hydroxytoluene (BHT) in rats: an electron microscopial study. *Histopathology.* 14: 391-406.
  - Salonen JT, Seppänen K, Lakka TA, Salonen R, Kaplan G (2000) Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis.* 148(2):265-273.
  - Sarafian TA, Vartavarian L, Kane DJ, Bredesen DE, Verity MA (1994) bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free radical generation and cell killing in a neural cell line. *Toxicol. Lett.* 74:149-155.

- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267: 4904-4911.
- Scott BC, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI (1993) Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Radic Res Commun.* 19(4): 241-253.
- Shanker G, Aschner M (2003) Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 110(1): 85-91.
- Shenker BJ, Guo TL, Insung O, Shapiro IM (1999) Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157: 23-35.
- Simonian NA, Coyle JT (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:83-106
- Siriwardhana SANS, Lee KW, Kim SH, Ha JW, Jeon YS (2003) Antioxidant activity of *Hijikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Science and Technology International.* 9:339-347.
- Siriwardhana SANS, Lee KW, Kim SH, Ha JW, Park JT, Jeon YJ (2004) Lipid peroxidation inhibitory effects of *Hijikia fusiformis* methanolic extract on fish oil and linoleic acid. *Food Science and Technology International.* 10(2):65-68.
- Solon S, Lopes L, Teixeira de Sousa Jr P, Schmeda-Hirschmann G (2000) Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *J Ethnopharmacol.* 72: 173-178.
- Son S, Lewis BA (2002) Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure- activity relationship. *J Agric Food Chem.* 50: 468- 472.
- Sortino MA, Battaglia A, Pamparana F, Carfagna N, Post C, Canonico PL (1999) Neuroprotective effects of nicergoline in immortalized neurons. *Eur. J. Pharm.* 368:285-290.
- Stahl E (1969)a Preparation and application of the spray reagents. En: *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook.* Springer-Verlag, Berlin, Alemania. p 878.
- Stahl E (1969)b Preparation and application of the spray reagents. En: *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook.* Springer-Verlag, Berlin, Alemania. p 875.
- Takamatsu S, Hodges TW, Rajbhandari I, Gerwick WH, Hamann MT, Nagle DG (2003) Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *J. Nat. Prod.* 66: 605-608.
- Tapiero H, Tew KD, Nguyen Ba G, Mathé G (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed Pharmacother.* 56(4):200-207.
- Toda S, Kumura M, Ohnishi M (1991) Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Medica.* 57:8-10.
- Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Tokunaga H, Matsumoto M, Eto K, Ishiura S, Higuchi I (2001) *In vivo* protection of a water soluble derivative of vitamin E Trolox, against methylmercury- intoxication in the rat. *Neurosci Letters.* 304: 199-203.
- Verhagen H, Aruoma OI, van Delft JHM, Dragsted LO, Ferguson LR, Knasmüller S, Pool-Zobel BL, Poulsen HE, Williamson G, Yannai S (2003) The 10 basic requirements for a scientific paper reporting antioxidant,

- antimutagenic or anticarcinogenic potential of test substances in *in vitro* experiments and animals studies *in vivo*. *Food Chem Toxicol.* 41: 603-610.
- Viana GSB, Freitas ALP, Lima MML, Vieira LAP, Andrade MCH, Benevides NMB (2002) Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 35: 713-722.
  - Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile J-P, Laranjinha J, Almeida L, Salvayre R, Nègre-Salvayre A (1998)a Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL *British Journal of Pharmacology.*123: 565-573.
  - Vieira O, Laranjinha J, Madeira V, Almeida L (1998)b. Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation. Concerted antioxidant activity of caffeic and *p*-coumaric acids with ascorbate. *Biochem Pharmacol.* 55: 333-340.
  - Wei H, Perry DC (1996) Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J Neurochem.* 67(6): 2390-2398.
  - Wei H, Wei W, Bredesen DE, Perry DC (1998) bcl-2 protects against apoptosis in neuronal cell line caused by thapsigargin-induced depletion of intracellular calcium stores. *J. Neurochem.* 70: 2305-2314.
  - Whitfield FB, Flodin C, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoironos D (1999) Distribution of bromophenols in species of marine algae from Eastern Australia. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 2367-2373.
  - Wong CK, Ooi VEC, Ang PO (2000) Protective effects of seaweeds against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Chemosphere.* 4 (1-2): 173-176.
  - Wong KH, Cheung CK (2001) Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part II. *In vitro* protein digestibility and amino acid profiles of protein concentrates. *Food Chem.* 72: 11-17.
  - Yan X, Li X, Zhou C, Fan X (1996) Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *J. Appl. Phycol.* 9: 201-203.
  - Yan X, Nagata T, Fan X (1998) Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods Hum Nutr.* 52: 253-262.
  - Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T (1999). Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 605-607.
  - Yang CS, Landau JM, Huang M-T, Newmark H (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev. Nutr.* 21:381-406.
  - Yoon Y, Kim K, Hong S, Kang B, Lee M, Cho D (2000) Protective effects of *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. *J. Ethnopharmacol.* 69:73-78.
  - Yoshie Y, Wang W, Petillo D, Suzuki T (2000) Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fisheries Science.* 66: 998-1000.
  - Yoshie Y, Wang W, Hsieh Y-P, Suzuki T (2002) Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. *Journal of Tokyo University of Fisheries* 88:21-24.
  - Youdim KA, Spencer JPE, Schroeter H, Rice-Evans C (2002) Dietary flavonoids as

---

potential neuroprotectants. *Biol Chem.* 383:503-519.

- Zhang Z, Wei T, Hou J, Li G, Yu S, Xin W (2003) Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Eur J Pharmacol.* 467: 41-47.

## Autobibliografía

**Publicaciones** en las que se incluyen los resultados de la presente tesis de Doctorado:

- **Fallarero A**, Loikkanen JJ, Männistö PT, Castañeda O, Vidal A (2003) Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine*. 10(1): 39-47.
- **Fallarero A**, Peltoketo A, Loikkanen JJ, Tammela P, Vidal A, Vuorela P (2004) Effects of the aqueous extract of *Bryothamnion triquetrum* on chemical hypoxia and aglycemia-induced damage in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine* (en prensa).
- Vidal A, Motidome M, Mancini-Filho J, **Fallarero A**, Midore Tanae M, Brandao Torres LM, Lapa AJ (2001) Antioxidant activity related to phenolic acidics in the aqueous extract of the marine seaweed *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 37(3): 373-382.
- Rivero F, **Fallarero A**, Castañeda O, Dajas F, Manta E, Mancini-Filho J, Vidal A (2003) Antioxidant activity of *Halimeda incrassata* aqueous extracts. *Revista de Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 23(2): 256-263.
- Vidal A, **Fallarero A**, Loikkanen JJ, Zaldívar C, Barro R, Carrillo O, Mancini J, Vuorela P (2004) Algas marinas como fuentes de antioxidantes naturales En: “*Proyecto CYTED XI.19: Aplicación de ingredientes funcionales en alimentación infantil y para adultos. Resultados y conclusiones*” Ed: M. Rivero. Grafiques GISPERT, SA (ISBN: 84-96023-17-6) Barcelona, España.
- **Fallarero A**, Zaldívar C, Barro R, Castañeda O, Rivera F, Vidal A (2002) Perspectivas de las algas marinas como fuentes de antioxidantes naturales. *Revista Cubana de Farmacia*, 36, supl. esp 1 (version electronica).

**Publicaciones internacionales** relacionadas con la temática de la tesis de Doctorado:

- **Fallarero A**, Loikkanen JJ, Mancini-Filho J, Barro R, Vidal A (2004) Antioxidant and neuroprotective activity of the extract from the seaweed *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux, against *in vitro* and *in vivo* toxicity induced by methyl-mercury. *Veterinary and Human Toxicology*. 46(1): 1-5.

- **Fallarero A**, Tammela P, Loikkanen JJ, Vidal A, Vuorela P (2004) Neuroprotective effects of an aqueous extract of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux, on GT1-7 cells exposed to ischemia-like conditions: relation to its radical-scavenging abilities. *Journal of Applied Phycology* (en revisión).
- Vidal A, **Fallarero A** Peña BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, Gutierrez Y, Vuorela P (2003) Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruits extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 89(2-3): 295-300.
- Vidal A, Silva de Andrade-Wartha ER, **Fallarero A**, Pavan R, Genovese MI, Vuorela P, Mancini-Filho J (2005) Antioxidant activity associated to the hydrophilic and lipophilic fractions from the seaweed *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (en revisión).
- Vidal A, **Fallarero A**, Vuorela P (2004) Toxicological evaluation of plant extracts: is it necessary? *Recent Progress in Medicinal Plants – Reviews series* (en revisión)
- Vega-Villasante F, Nolasco-Soria H, **Fallarero A**, Carrillo-Farnés O (2002) Biochemical characterization of crude extract from *Pleurocondes planipes* (Crustacea: Galatheidae) as potential feed additive, considerations for a new fishery along the Mexico Pacific coast. *Hidrobiológica*. 12(2):119-128
- Vega-Villasante F, Nolasco-Soria H, Chong-Carrillo O, **Fallarero A**, Carrillo-Farnés O (2004) Functional feeds in shrimp nutrition: the new research? Theoretical concept and practical approach. *Panorama Acuícola Magazine*. 9(4):22-25.
- Marrero J, González LJ, Sánchez A, Ayala M, Paz-Lago D, González W, **Fallarero A**, Castellanos-Serra L, Orquídea C (2004) Effect of high concentration of Co (II) on *Enterobacter liquefaciens* strain C-1: a bacterium highly resistant to heavy metals with an unknown genome. *Proteomics*. 4: 1265- 1279.

**Eventos Científicos** en los que los resultados de la tesis han sido presentados:

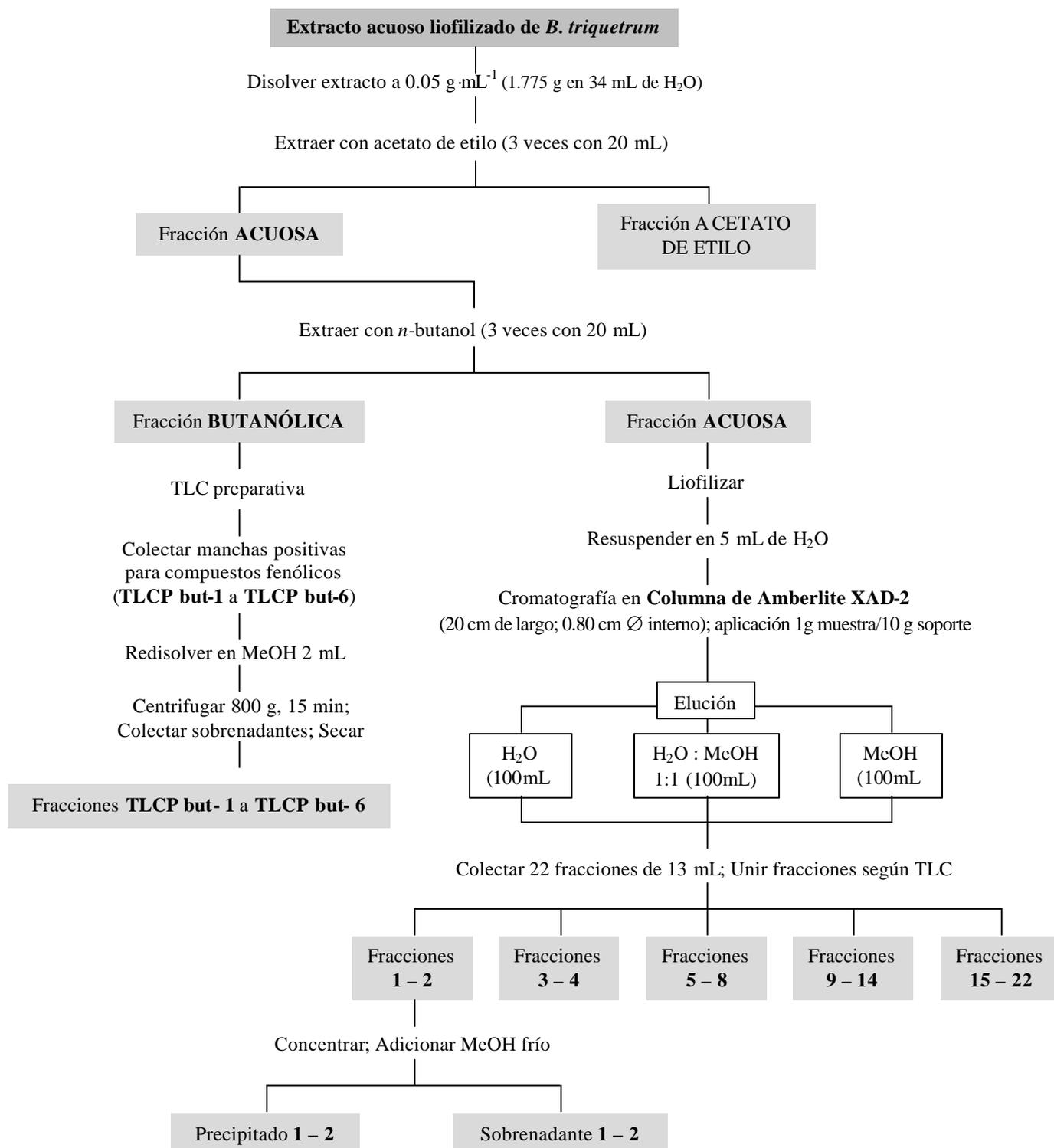
- I Congreso Internacional de la Sociedad Cubana de Farmacología (Ciudad Habana, 1998)
- III Simposio Internacional de Radicales Libres y Biomedicina (Ciudad Habana, 1999)
- II Congreso Internacional de Productos Naturales en 3 continentes (Montevideo, Uruguay, 1999)
- 5<sup>to</sup> Congreso de Ciencias Marinas MarCuba' 2000 (Ciudad Habana, 2000)
- IX Reunión de la Sociedad de Biociencias de Uruguay (Montevideo, Uruguay, 2000)
- II Reunión Internacional de Neurociencias (Ciudad Habana, 2001)
- I Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Ciudad Habana, 2001)

- VII Congreso Internacional de la Federación Europea de Ciencias Farmacéuticas (VII International Congress of the European Federation of Pharmaceutical Sciences, Estocolmo, Suecia, 2002); presentación fue publicada en: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2002) 17 Suppl 1 (S42), short communication.
- II Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas (Ciudad Habana, 2002)
- II Encuentro Interamericano de Farmacia y Nutrición (Ciudad Habana, 2003)
- II Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Ciudad Habana, 2004)
- XI Simposio Internacional de Productos Naturales Marinos (XI Symposium on Marine Natural Products, Sorrento, Italia, 2004)

**Financiamiento recibido** (becas y proyectos) que permitieron la realización de la presente tesis:

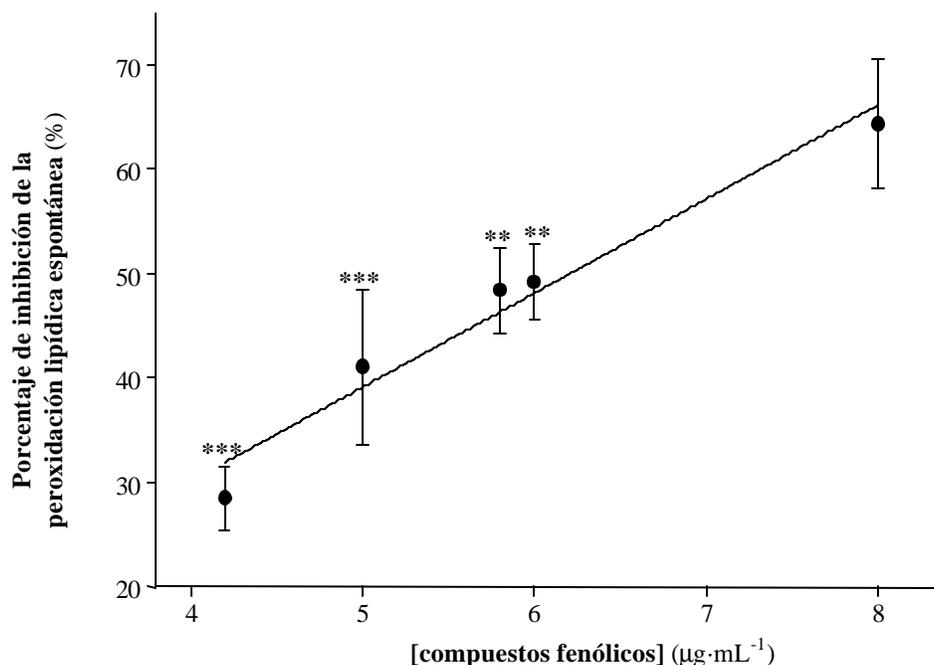
- Becas otorgadas por el *Center for International Mobility* (CIMO) (Finlandia) para estancias de investigación en la Universidad de Kuopio y en la Universidad de Helsinki, Finlandia durante los años 2000 y 2002 respectivamente (*grants* UA9 100 y HA1 169)
- Beca otorgada por la *Finnish Cultural Foundation* para estancia de investigación durante fase de terminación de estudios de Doctorado en la Universidad de Helsinki, Finlandia (2004)
- Beca otorgada por la *International Brain Organization* (IBRO) para financiamiento parcial de estancia de investigación en la Universidad de Helsinki, Finlandia (2004)
- Proyecto **IFS** (*International Foundation for Science*, Suecia) F/2837-1 “Isolation, characterization and purification of antioxidant compounds from Caribbean seaweeds of *Halimeda* genus”
- Proyecto **CYTED** (Red de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, España) XI.19: “Aplicación de ingredientes funcionales en alimentación infantil y para adultos”

## Anexo I



**A- I:** Esquema general del fraccionamiento del extracto acuoso de *B. triquetrum*

## Anexo II



**A-II:** Correlación establecida entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en diferentes lotes del extracto acuoso de *B. triquetrum*

Los lotes recién preparados del extracto acuoso liofilizado de *B. triquetrum* se disolvieron a la concentración de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y se evaluaron, a esa concentración, la actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica espontánea en homogenados de tejido cerebral de rata y la concentración de compuestos fenólicos totales. En la gráfica se presenta la correlación establecida entre estos dos parámetros ( $r= 0.982$ ) obtenidos para los 4 lotes que se rechazaron durante esta investigación, en comparación con un lote del extracto que cumplió con los dos parámetros de calidad (se señala con gris en la gráfica). En esta comparación se empleó prueba t de Student no pareada (ns- diferencias no significativas; \* -  $0.05 > p > 0.01$ ; \*\* -  $0.01 > p > 0.001$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$ ). Los valores incluidos en el gráfico representan la media  $\pm$  DS de 5 determinaciones en cada caso.

### Anexo III

**A- III:** Resultados del porcentaje de rendimiento, presencia de sustancias fenólicas por TLC e inhibición de la peroxidación lipídica espontánea en homogenados de tejido cerebral de rata para las diferentes fracciones obtenidas del extracto acuoso de *B. triquetrum*

Fracciones	Cantidad (mg)	Rendimiento (%)	Presencia de sustancias fenólicas (+):		Porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica espontánea (%) <sup>*</sup>
			Folin-Ciocalteu	FeCl <sub>3</sub>	
Extracto de <i>B. triquetrum</i>	-	-	+	+	90%
Acetato de etilo	3.0	0.2	-	-	sa
Acuosa (etapa 1)	1686.0	95.0	+	-	90%
Butanólica	127.6	7.2	+	-	30%
TLCP but-1	1.5	0.08	+	-	sa
TLCP but-2	8.4	0.5	+	-	85%
TLCP but-3	2.1	0.1	+	-	sa
TLCP but-4	1.1	0.06	+	-	sa
TLCP but-5	3.6	0.2	+	-	sa
TLCP but-6	14.4	0.8	+	-	84%
Acuosa (etapa 2)	1207.0	68.0	+	-	100%
P 1-2	314.6	17.7	-	-	95%
S 1-2	441.0	24.8	+	+	5%
F 3-4	64.6	3.6	+	+	92%
F 5-8	3.5	0.2	+	-	94%
F 9-14	15.0	0.9	+	-	96%
F 15-22	2.7	0.2	-	-	12%

sa - sin actividad antioxidante

\* - la actividad antioxidante tanto del extracto como de sus fracciones se evaluó a la concentración de 5.0 mg·mL<sup>-1</sup>

De cada fracción se determinó el porcentaje de rendimiento con respecto al extracto acuoso liofilizado de *B. triquetrum* y se estudió la presencia de sustancias fenólicas mediante un análisis de TLC en sílica gel G, en el que se emplearon como agentes reveladores los reactivos de Folin-Ciocalteu alcalino y FeCl<sub>3</sub> al 1% según las metodologías de Stahl, (1969)a y Stahl, (1969)b respectivamente. Se evaluó además en cada fracción la actividad inhibitoria sobre la formación espontánea de TBARS en homogenados de tejido cerebral de rata.