



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación de la actividad
neuroprotectora de extractos
alcohólicos de especies de plantas
del piedemonte del Caquetá y de la
reserva natural Ucumarí- Risaralda**

Cesar Augusto Martínez Cotacio

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Neurociencias

Bogotá D.C.

2016

Evaluación de la actividad neuroprotectora de extractos alcohólicos de especies de plantas del piedemonte del Caquetá y de la reserva natural Ucumarí- Risaralda

Cesar Augusto Martinez Cotacio

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Neurociencias

Dirigido por:

MD,MSc,Ph.D. Gonzalo Humberto Arboleda Bustos

Línea de Investigación

Muerte celular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Neurociencias

Bogotá D.C.

2016

Dedicatoria

Para mi hijo Juan David Martínez Reyes.

Agradecimientos

- A Dios y representado en cada uno de los que creyeron en mí.
- A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- Al Dr. Gonzalo Humberto Arboleda Bustos por su colaboración indispensable para el desarrollo, dirección y facilitador de mi trabajo de investigación.
- Al Dr. Oscar Marino Mosquera Martínez, sus aportes, donación de los extractos alcohólicos de las Sp de Euphorbiaceae, y por la fe depositada en este trabajo.
- A la Dra. Zulma Janeth Duenas Gómez, por su colaboración, disposición y apoyo.
- A mi amigo, MSc. William Trujillo Calderón, su aporte desinteresado para la obtención e identificación de las Sp de Piperaceae en el Piedemonte del Caquetá.
- Al Dr. Fernando Cardozo, por su contribución y experiencia para llevar a cabo este trabajo de investigación.
- Al Dr. Fabio Ancizar Aristizabal Gutierrez. Director del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional.
- A la Dra. Sandra Johanna Morantes Medina.
- Al Dr. Humberto Arboleda Granados.
- A las personas que de manera desinteresada hicieron posible el desarrollo de mi trabajo de investigación al inicio o al final del mismo. Gloria Tatiana Vinasco Sandoval, Yeison Guerrero y familia, Linda Patricia Moreno, Laura Corredor, Luis Carlos Morales (Préstamo de la Bata).
- A mi madre Vicenta Cotacio Rojas, mi abuelita Victoria Rojas, a mi hijo (Todo mi esfuerzo para él). A Sara Alejandra Reyes Prada, mis sobrin@s. Primos; Dumas M. Cotacio, Luis C. Cotacio. James M. Cotacio. A mis amigos de infancia; Jadir G. Acuña. Juan C. Sáenz. Inti C. Monge. Didier A. Sepúlveda. Y otros; Norma Cárdenas. Ary, Mazo, Yasito. Ciro.

Resumen

El propósito de este estudio fue analizar la actividad neuroprotectoras de seis extractos alcohólicos de plantas; *Piper tuberculatum* Jacq, *Piper peltatum* Ruiz & Pav, *Piper krukoffii* Yunck, *Piper arboreum* Aubl pertenecientes a la familia Piperaceae, *Acalypha diversifolia* Jacq y *Alchornea calophylla* a la familia Euphorbiaceae extraídas del Piedemonte del Caquetá y de la Reserva Natural Úcumari (Risaralda). La acción neuroprotectora fue estudiada en las líneas celulares CAD de origen murino y MO3.13 de origen humano empleando la C2-ceramida como agente neurotóxico en tiempos de tratamiento de 6 y 24 horas. La viabilidad mitocondrial en las células CAD fue medida con MTT y en las células MO3.13 con WST-1. La investigación demostró que los extractos alcohólicos poseen actividad neuroprotectora o recuperación en la viabilidad mitocondrial significativa $***p < 0.05$ a las 6 horas de tratamiento en la línea celular CAD, los extractos del *Piper arboreum* y *Acalypha diversifolia* demostraron actividad neuroprotectora en la línea celular MO3.13 a las 6 horas de tratamiento.

Palabras claves: Enfermedades neurodegenerativas, extractos alcohólicos, C2-ceramida, CAD, MO3.13, neuroprotección.

ABSTRACT

The purpose of this study was to analyze the neuroprotective activity six alcoholic extracts of plants; *Piper tuberculatum* Jacq, *Piper peltatum* Ruiz & Pav, *krukoffii* Yunck Piper, *Piper arboreum* Aubl belonging to the Piperaceae, *Acalypha diversifolia* Jacq and family Alchornea calophylla the family Euphorbiaceae extracted from Piedemonte of Caqueta and ucumari Nature Reserve (Risaralda). The neuroprotective action was studied in cell lines and murine CAD MO3.13 of human origin using the C2-ceramide as neurotoxic agent treatment times of 6 and 24 hours. Mitochondrial CAD cell viability was measured with MTT and the MO3.13 cells with WST-1. The research showed that alcoholic extracts possess neuroprotective activity or significant recovery in mitochondrial viability *** $p < 0.05$ to 6 hours of treatment in the CAD cell line, extracts of *Piper arboreum* and *Acalypha diversifolia* showed neuroprotective activity in the cell line MO3.13 6 hours treatment

Keywords: Neurodegenerative disease, alcoholic extracts, C2-ceramide, CAD, MO3.13, neuroprotective agent.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ANEXOS.....	XII
LISTA DE ABREVIACIONES.....	XIII
Introducción	1
1. Marco teórico.....	5
1.1 Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas	5
1.2 Fitoquímica.....	8
1.3 Línea celular CAD	10
1.4 Línea celular MO3.13.....	11
1.5 Ceramida.....	14
1.6 Familia Piperaceae.....	14
1.6.1 Hábitat y Distribución Geográfica	14
1.6.2 Género Piper.	15
1.7 Familia Euphorbiaceae.	20
1.7.1 Hábitat y Distribución Geográfica	21
1.7.2 Género <i>Acalypha</i>	21
1.7.3 Genero <i>Alchornea</i>	22
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo General	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. Materiales y métodos.....	29
3.1 Área de estudio	29
3.2 Trabajo de campo	29
3.2.1 Recolección de los especímenes	29
3.3 Trabajo de laboratorio	30
3.3.1 Secado del material vegetal	30
3.3.2 Molienda y maceración del material.....	30
3.3.3 Obtención del extracto etanólico.....	30

3.3.4 Caracterización de los metabolitos secundarios.....	30
3.3.5 Líneas celulares CAD y MO3.13.....	31
3.3.6 Conteo Celular.....	32
3.3.7 Ensayo de citotoxicidad.....	33
3.3.8 Tratamientos Con La Neurotóxina C2-ceramida.....	33
3.3.9 Ensayos De Viabilidad y Muerte Celular.....	33
3.3.10 Análisis estadístico.....	34
4. Caracterización fitoquímica de los metabolitos secundarios de los extractos etanólicos de las especies de plantas del género <i>Piper</i> , <i>Achalypha</i> , <i>Alchornea</i>	35
4.1 Resultados.....	35
4.1.1 Recolección del material vegetal.....	35
4.1.2 Obtención de los extractos etanólicos.....	37
4.1.3 Caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos.....	38
4.2 Discusión.....	41
5. Ensayo de citotóxicidad y neuroprotección de los extractos alcohólicos en las líneas celulares CAD y MO3.13.....	45
5.1 Resultados.....	45
5.1.1 Stocks de los extractos.....	45
5.1.2 Prueba de Citotoxicidad del DMSO en células CAD y MO3.13.....	45
5.1.3 Toxicidad de los extractos alcohólicos en las líneas celulares CAD y MO3.13.....	46
5.2 Ensayo de neuroprotección de los extractos alcohólicos en células CAD y MO3.13.....	55
5.2.1 Ensayo de dosis L50 de C2-ceramida en las células CAD y MO3.13.....	55
5.2.2 Viabilidad mitocondrial de las células CAD.....	56
5.2.3 Viabilidad mitocondrial de las células MO3.13.....	64
5.3 Discusión.....	72
6. Conclusiones, recomendaciones y perspectivas.....	79
6.1 Conclusiones.....	79
6.2 Recomendaciones y Perspectivas.....	80
7. Anexos.....	81
8. Referencias.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Consecuencias de los radicales libres (RL) en la célula	5
Figura 2. Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario en plantas.....	9
Figura 3.Estructura química de la pipartina {5,6-dihidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-2(1H)piridinona}	17
Figura 4 Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de <i>P. obliquum</i> Nuevos alquenilfenoles; Obliquol (1)(2) extraídos de la inflorescencia. 4-cromanona (3). 3-farnecil-4-hidroxi ácido benzoico (4). 2'-hidroxi-3,4,4',6'-tetramatoxicalcona (5) estos últimos tres compuestos extraídos de las hojas..	18
Figura 5. Compuestos aislados de <i>Piper peltatum</i> y <i>Piper umbellatum</i> . (a) 4-nerolidilcatecol. (b) 2-(4',8'-Dimetilnona- 3',7'-dienil)-8-hidroxi-2-metil-2H-cromana-6-ácido carboxílico metil éster.	19
Figura 6. Puntos de muestreo en el departamento del Caquetá	36
Figura 7 Rotavapor para realizar la separación del etanol al 96% de los compuestos del material debidamente filtrado	37
Figura 8. Toxicidad del <i>Piper peltatum</i> en células CAD diferenciadas por 48 horas..	48
Figura 9.Toxicidad del <i>Piper krukofii</i> en células CAD diferenciadas por 48 horas..	48
Figura 10. Toxicidad del <i>Piper tuberculatum</i> en células CAD diferenciadas por 48 horas.	49
Figura 11.Toxicidad del <i>Piper arboreum</i> en células CAD diferenciadas por 48 horas.....	49
Figura 12.Toxicidad del <i>Acalypha diversifolia</i> en células CAD diferenciadas por 48 horas.	50
Figura 13. Toxicidad del <i>Alchornea calophylla</i> en células CAD diferenciadas por 48 horas.	50
Figura 14.Toxicidad del <i>Piper peltatum</i> en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas.	52
Figura 15.Toxicidad del <i>Piper krukofii</i> en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas	52
Figura 16.Toxicidad del <i>Piper tuberculatum</i> en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas.....	53
Figura 17.Toxicidad del <i>Piper arboreum</i> en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas.....	53
Figura 18.Toxicidad del <i>Acalypha diversifolia</i> en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas.	54
Figura 19.Toxicidad del <i>Alchornea calophylla</i> en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas.....	54
Figura 20. Dosis letal 50 de ceramida en células CAD.	55

Figura 21. Dosis letal 50 de ceramida en células MO3.13.	56
Figura 22. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de <i>Achalipha diversifolia</i> y ceramida.	58
Figura 23. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de <i>Piper peltatum</i> y ceramida.	59
Figura 24. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de <i>Alchornea calophyla</i> y ceramida.	60
Figura 25. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de <i>Piper tuberculatum</i> y ceramida.	61
Figura 26. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de <i>Piper arboreum</i> y ceramida.	62
Figura 27. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de <i>Piper krukoffi</i> y ceramida.	63
Figura 28. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de <i>Piper peltatum</i> y ceramida.	66
Figura 29. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de <i>Piper arboreum</i> y ceramida.	67
Figura 30. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de <i>Piper krukoffi</i> y ceramida.	68
Figura 31. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de <i>Piper tuberculatum</i> y ceramida.	69
Figura 32. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de <i>Achalipha diversifolia</i> y ceramida.	70
Figura 33. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de <i>Alchornea calophyla</i> y ceramida.	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.Reveladores para la caracterización de Metabolitos secundarios	30
Tabla 2.Valores de obtención de extractos de las especies de Piperaceae.....	38
Tabla 3.Detección cualitativa de Metabolitos secundarios.	38
Tabla 4.Caracterización de Metabolitos secundarios del genero Piper..	40
Tabla 5.Caracterización de Metabolitos secundarios de plantas de la familia Euphorbiaceae.....	41
Tabla 6.Efecto de los extractos alcohólicos en células CAD.	47
Tabla 7.Efecto de los extractos alcohólicos en células MO3.13.....	51
Tabla 8.Efecto de los extractos alcohólicos en células CAD sometidas al neurotóxico.	57
Tabla 9.Efecto de los extractos alcohólicos en células MO3.13 sometidas al neurotóxico.	65

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. RECOLECCIÓN DE LOS ESPECIES DEL GÉNERO PIPER EN EL PIDEMONTE DEL CAQUETÁ Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	81
ANEXO 2. CÉLULAS CAD.....	83
ANEXO 3. PREPARACIÓN DE LOS STOCK A PARTIR DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS.....	84

LISTA DE ABREVIACIONES

AO	Antioxidante
ATP	Adenosín Trifosfato
CTE	Cadena trasportadora de electrones
DO	Densidad óptica
EA	Enfermedad de Alzheimer
EM	Esclerosis múltiple
EN	Enfermedades Neurodegenerativas
EO	Estrés Oxidativo
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERON	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
FOSOX	Fosforilación oxidativa
MMI	Membrana mitocondrial interna
RL	Radicales libres
βA	Péptido beta-amiloide

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) se caracterizan por una muerte patológica neuronal selectiva en áreas específicas del cerebro. Dentro de las más comunes y relacionadas con el envejecimiento están la EA, la EP y la EM. La primera afectando entre 20-30 millones de personas en todo el mundo, la segunda afectando al 1,8% de personas mayores de 65 años, he incrementa en 2,6% en las personas mayores de 85 años, para el caso de la EM no hay un conceso preciso sobre su incidencia en la población mundial, sin embargo algunos estudios revelan un estimado de 213.8 de personas con EM por cada 100 mil habitantes para Noruega y un aumento de la enfermedad del 50% en los últimos 20 años para España [1,2, 3, 4, 5,6]

Para el caso de Colombia en estimaciones dadas en el año de 1999, la EP tiene un estimado de 180.000 personas que la padecen, estas cifras estarían por encima de otras poblaciones estudiadas, lo que la convierte en un problema de salud pública al que las entidades públicas y privadas han prestado poca atención. [7]

La EA es la forma de demencia más común, con un estimado de 24 a 35 millones de personas afectadas alrededor del mundo. A pesar de que ha sido ampliamente explorada, la patogénesis de la EA aún no ha sido aclarada. De acuerdo con la opinión durante los años setenta y principios de los ochentas la EA fue considerada como un déficit colinérgico, que implica las fallas de las proyecciones colinérgica desde el núcleo basal magnocelular de Meynert a la corteza y el hipocampo.[8]

Estudios posteriores proporcionaron evidencia que la actividad neuronal regula la producción β A y un número elevado de β A disminuye la transmisión sináptica excitatoria debido a la disminución del número de receptores de AMPA (AMPA) y de los receptores de NMDA (NMDARs), que se asocia con el colapso de espinas dendríticas glutamatérgicas.[9]

La EP es un trastorno progresivo del movimiento, caracterizado por bradicinesia progresiva (lentitud de los movimientos voluntarios), rigidez, temblor de reposo y alteraciones en la postura. Además en esta enfermedad se reconocen síntomas no motores que incluyen los autonómicos y cognitivos, trastornos del sueño, la disfunción olfativa y la depresión, esto ocurre probablemente debido a la propagación de la patología más allá de los ganglios basales. En la EP las manifestaciones motoras son atribuidas a la progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) resultando en la disfunción secundaria de los ganglios basales que están involucrados en la iniciación y ejecución de los movimientos. [10]

Las características subcelulares de la EP son las inclusiones intraneuronales de varias estructuras que consisten en su mayoría de fibrillas de α -sinucleína (cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy). Sin embargo la etiología de la enfermedad de Parkinson es actualmente desconocida. Parece que la enfermedad resulta de la combinación y acumulación de las exposiciones ambientales y las interacciones complejas entre genes y entorno. [11]

La mayoría de las formas de EP son idiopáticas, pero aproximadamente el 10-30% de los casos tienen una historia familiar y en una minoría de ellos la enfermedad sigue un patrón de herencia mendeliana, entre esta la enfermedad de inicio temprano que se caracteriza por presentarse generalmente en menores de 40 años. Se han identificado 18 loci, asociados a la EP, los cuales han sido designados en secuencia cronológica (PARK1 – PARK18). Se han hallado mutaciones en genes como PARKIN, DJ-1, PINK, ATP13A2 y FBXO7, que causan la EP Autosómica Recesiva y en genes tales como α -sinucleína, PARK3, UCH-L1, LRRK2, PARK10, OMI/HTRA2, GIGYF2, EIF4G1 y VPS35 que causan la EP Autosómica Dominante. [12,17,13,14]

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad que causa discapacidad en las personas que la padecen. 20 años después de ser diagnosticadas, la mitad de todos los pacientes necesitan asistencia con la movilidad y el 50% desarrollan déficit cognitivo. La enfermedad suele empezar entre los 20 – 40 años de edad, afectando con más frecuencia a mujeres que a hombres. Según el Atlas de la base de datos de EM, en todo el mundo unos 2,5 millones de personas tienen EM y las cifras de la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple sugieren que sólo en Europa la enfermedad cuesta

más de € 15 mil millones cada año en costos directos de atención de salud y pérdida de productividad.[15]

La EM es una enfermedad crónica, autoinmune e inflamatoria del SNC, la desmielinización de los axones de las células nerviosas pueden ser vistos como placas escleróticas en la materia blanca del tejido cerebral y ésta causa neurodegeneración y pérdida axonal. Recientemente se ha reconocido que la inflamación y la patología de la corteza cerebral también juegan un papel importante en la esclerosis múltiple. Esto puede ser debido, en parte, a la inflamación en las meninges de los pacientes con EM, que se asocia con lesiones subpiales.[16]

En base a lo anterior se hace necesaria la búsqueda de alternativas neuroprotectoras, que sean efectivas y de fácil acceso monetario. Los estudios sobre fármacos para el tratamiento de enfermedades neuronales empezaron en el siglo XIX y en efecto, las primeras drogas usadas para tratar condiciones patológicas del SNC fueron basadas en recursos naturales, especialmente en plantas. [17]

Para nuestro siglo las plantas alrededor del mundo siguen siendo utilizadas para el tratamiento de diversidad de enfermedades incluyendo las del sistema nervioso , como los estudios realizados en ciudad de Navarra (España), la etnofarmacología en esta región ha permitido la búsqueda de compuestos para el tratamiento de Parkinson, Alzheimer etc. Paralelo, estudios en Suramérica demuestran la importancia de la fitoterapia, donde las plantas en algunas comunidades aisladas o de influencia indígena son el pilar para el tratamiento de enfermedades incluyendo las neuronales.[18,19,20,21]

En Colombia desde el siglo XVIII existen datos escritos sobre la utilización de las plantas en la medicina tradicional, sin embargo los estudios sobre sus propiedades son escasos. Colombia cuenta con una gran despensa de moléculas resguardadas en su flora y que han sido utilizadas por comunidades ancestrales a través del tiempo, que incluyen la utilización de especies de plantas del género *Piper*, perteneciente a la familia Piperaceae, que incluyen plantas muy conocidas como la pimienta. En Colombia, el Herbario Nacional Colombiano informa de la presencia de 312 especies distribuidas en todo el país, corresponden con el 30% de las especies de *Piper* existentes en el mundo al igual que especies de la familia Euphorbiaceae, que incluyen por ejemplo la hierba buena. La familia Euphorbiaceae incluye cerca de 8000 especies, la mayoría de los cuales se caracterizan por la producción de látex. Algunas especies son importantes como plantas medicinales y nutricionales, mientras que otras son fuentes de aceites y biocombustibles; cerca de 43 especies de plantas del género *Euphorbia* se distribuyen en Colombia y muchas se utilizan en la medicina tradicional. Además, unos 400 diterpenoides han sido aislado a partir de plantas del género *Euphorbia* con un amplio espectro de actividades biológicas, estas dos familias de plantas están ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo.[22,23,24]

Estudios químicos han demostrado que el género *Piper* al igual que otras especies de la familia Euphorbiaceae poseen metabolitos secundarios como amidas insaturadas, flavonoides, lignanos, ésteres de cadenas cortas y largas, terpenos, esteroides, propenil fenoles y alcaloides.[25] En investigaciones realizadas en Colombia en especies de plantas de la familia Piperaceae se han encontrado compuestos con actividad antimalarica, para el control de plagas de insectos y datos de su uso en la etnomedicina.[26,20] La presencia de compuestos con actividad y variedad de metabolitos dan la posibilidad de encontrar neuroprotectores.

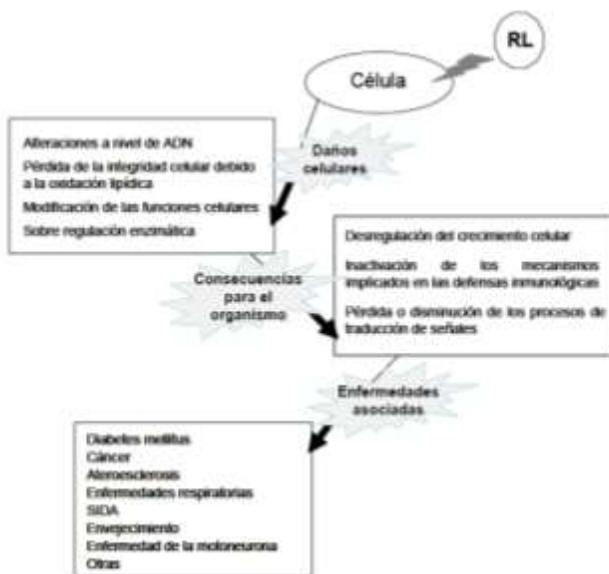
En este proyecto se evaluó la capacidad de extractos etanólicos para contrarrestar la acción neurotóxica provocada por la C2-ceramida, un lípido endógeno que en altas concentraciones intracelulares puede modular la liberación del citocromo C de la mitocondria, la apoptosis, la activación de la caspasa 3 junto con el Factor 1 activador de Proteasa Apoptotica (APAF1), incluso la parada del ciclo celular. La actividad neuroprotectora se determinó en dos tipos de células de líneas celulares, una de tipo murino (CAD) y la otra de oligos de tipo humano MO3.13 [27, 28]

1. Marco teórico.

1.1 Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas

Aunque todos los órganos pueden ser potencialmente modificados por el daño del estrés oxidativo, el cerebro comprende un tejido sensible al daño dada su alta tasa metabólica y disminución en antioxidantes que se acelera durante el envejecimiento, se suma el desorden metabólico y la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como el EA. Las neuronas y su membrana mitocondrial, tienen como función controlar la síntesis de ATP, la acumulación de Ca^{+2} , generación de superóxido, radicales libres y actividad redox. [29,30 31]

Figura 1 Consecuencias de los radicales libres (RL) en la célula [32]



En términos energéticos, la neurotransmisión es posiblemente uno de los procesos biológicos conocidos más costoso. La re-polarización de la membrana plasmática axonal de las neuronas durante los potenciales de acción, depende estrictamente de un bombeo continuo de salida de Na^+ y Ca^{+2} e ingreso de K^+ , un proceso que está acoplado a los gastos de energía en forma de ATP [33,34].

El cerebro uno de los tejidos que dependen en su mayoría de un suministro continuo de energía y por lo tanto uno de los tejidos más vulnerables a la falta de ella. Por ejemplo, durante una isquemia la ausencia de oxígeno y nutrientes, las reservas de energía del cerebro son capaces de mantener los niveles de ATP apropiados para casi 1 minuto. Sin embargo, durante o justo después de la reperfusión hay un aumento significativo en la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON) por las mitocondrias. Las mitocondrias son elementos representativos en la muerte neuronal asociada con trastornos neurológicos, los accidentes cerebrovasculares y el envejecimiento. [22]

La disminución brusca de la concentración de glucosa y de la presión parcial de oxígeno producida por la isquemia, induce inhibición de la cadena respiratoria en la mitocondria y en consecuencia, el bloqueo de la fosforilación oxidativa. La pérdida del gradiente electroquímico mitocondrial da lugar a una depleción de ATP y como consecuencia un descenso en la actividad de las bombas Sodio/Potasio que conlleva una entrada de sodio y una salida masiva de Potasio que genera una despolarización de la membrana, conocida como despolarización anóxica. [35]

Las mitocondrias están presentes en casi todas las células y son el lugar para muchas de las funciones del cuerpo 'limpieza', incluyendo la síntesis y el catabolismo de los metabolitos, la generación y la detoxificación de ERO, la apoptosis, la regulación del calcio en el citoplasma y la matriz mitocondrial y finalmente, la función crítica de la generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa (FOSOX). Cada mitocondria tiene la capacidad para llevar a cabo la fosforilación oxidativa utilizando su cadena de transporte de electrones (CTE), donde los productos metabólicos generados a partir de ciclo de Krebs conducen la generación de un gradiente de protones en la membrana mitocondrial interna (MMI), que proporciona la energía necesaria para la síntesis de ATP. [36]

La mitocondria cumple un papel fundamental para la obtención de energía a partir de la oxidación de moléculas, sin embargo esto conlleva a que se produzcan radicales libres. La primera indicación de la producción de óxido nítrico mitocondrial fue la descripción de la actividad de la NADPH diaforasa en los nervios perivasculares de la arteria basilar. Poco después de este estudio usando microscopía electrónica por inmunomarcaje se encontró inmunoreactividad para óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en las mitocondrias de varios tejidos de rata incluyendo el hígado, el corazón y el cerebro. Esta observación básica abrió la posibilidad de que el óxido nítrico (NO) puede ser un regulador intrínseco de la respiración mitocondrial.[21]

Las mitocondrias fueron puestas en conocimiento de la biología del envejecimiento, debido al papel central de la mitocondria en la producción de energía química (ATP). Se comprende que el envejecimiento es acompañado por un decline general de las funciones fisiológicas en compañía de todas las funciones que dependen del sistema nervioso central. En un estudio realizado en unas series de cepas de ratones, se demostró que la alta calidad en la integridad del sistema nervioso central se asoció con el incremento de la calidad de vida y con una disminución en la neurodegeneración [37].

Un deterioro dependiente de la edad de la función mitocondrial puede ser debido a cualquier disminución de la transferencia de electrones, o aumento de protones H^+ en la permeabilidad de la membrana interna, o disminución de la síntesis ATP impulsado por H^+ . En varios estudios se ha demostrado que las ratas de edad avanzada muestran disminución de potencial de membrana en las mitocondrias corticales y del cuerpo estriado y en las mitocondrias de todo el cerebro, hechos que ahora se interpretan principalmente por la disminución de la transferencia de electrones.[25]

Se ha demostrado que las patogénesis en los astrocitos se potencian por el estrés oxidativo en las mitocondrias, también llamado "fuego dentro". Las ERO mitocondrial (mERO) son generados por la cadena respiratoria durante la síntesis de ATP debido a la fuga de electrones principalmente de complejo I, complejo III y recientemente descubierto en el complejo II. El Estrés Oxidativo mitocondrial conduce no sólo a la interrupción del suministro de energía, sino también a graves daños de los componentes mitocondriales, incluyendo proteínas, lípidos y ADN mitocondrial (ADNmt). Además, el estrés oxidativo se acompaña a menudo de estrés Ca^{+2} , otro inductor importante de apoptosis.[38].

Se puede establecer el alto grado de relación entre el desarrollo de las Enfermedades Neurodegenerativas, el daño mitocondrial y la aparición del EO que desencadena en la producción de ERO. En ejemplo la EP no tiene definida una etología, pero en su gran mayoría afectan la funcionabilidad de la mitocondria. Por esa razón, es importante desarrollar estrategias que puedan ser utilizadas como terapias y que aborden la protección de la mitocondrias a partir de antioxidantes.

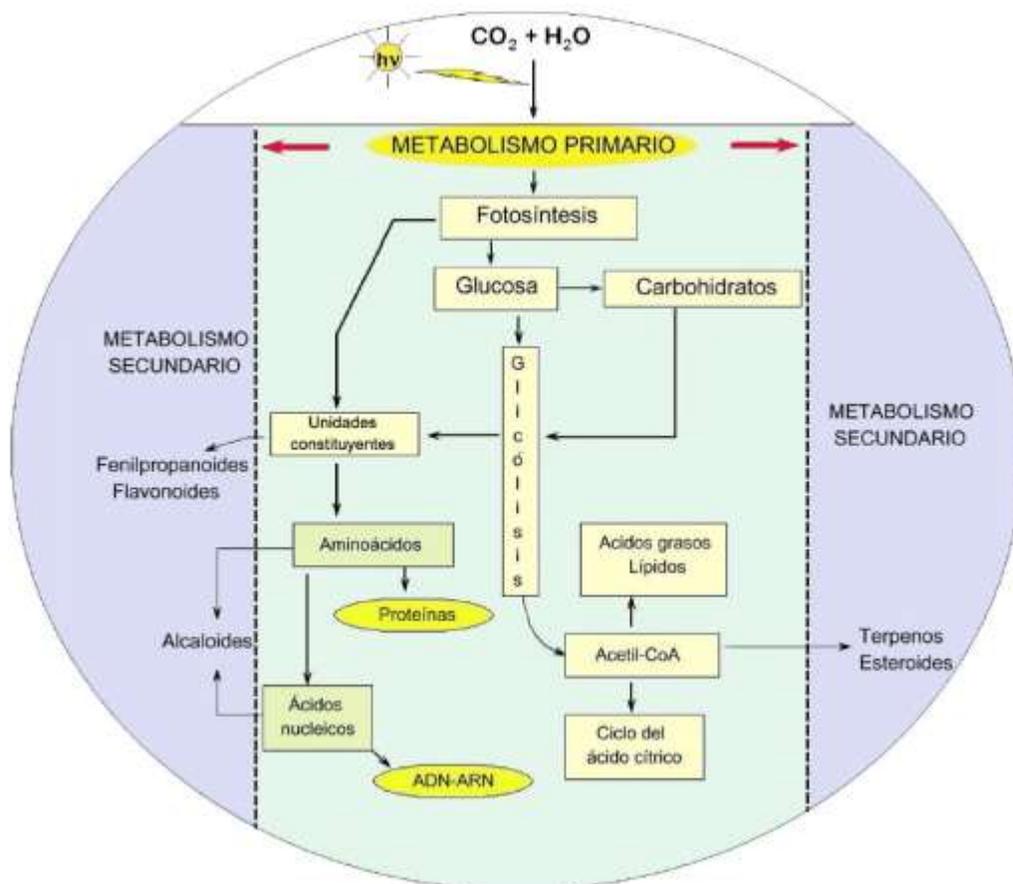
Existe el desarrollo de terapias y fármacos orientados a proteger a la mitocondria, teniendo en cuenta su papel fisiopatológico en procesos de muerte y supervivencia celular. En la actualidad se realizan investigaciones de la acción de antioxidantes sobre tejidos y órganos que por su función están expuestos a una alta inducción de oxidación. Un ejemplo de estos antioxidantes es la MitoQ (Mitoquinona), un antioxidante mitocondrial orientado que permite la prevención selectiva del daño oxidativo mitocondrial. MitoQ ha sido evaluada como un tratamiento oral para la enfermedad de Parkinson y otros trastornos neurodegenerativos asociados con el estrés oxidativo asociado a la disfunción mitocondrial. [26]

1.2 Fitoquímica

El empleo de plantas medicinales con fines curativos es una práctica utilizada desde tiempos inmemorables. El conocimiento de las especies vegetales se profundizó y sus propiedades medicinales han sido ampliamente estudiadas en nuestros días. La etnomedicina y la entofarmacología desde inicios del siglo XX han cobrado importancia para la industria de la farmacia por ser fuentes en la búsqueda de compuestos con actividad biológica. El uso de la medicina tradicional, de fitoterapias, y suplementos dietarios, a partir de plantas utilizadas de forma tradicional según muchos estudios contribuyen al cuidado de la salud humana. La fitoquímica se ha convertido en el primer paso para el desarrollo de terapias a partir de los compuestos encontrados en las plantas de uso etnobotánico, es así que el interés mundial se ha centrado en la medicina tradicional China, africana y suramericana, sin dejar atrás las incesantes investigaciones de entidades públicas y privadas para demostrar el modo de actuar y eficacia de estos compuestos. [39,40]

La fitoquímica es utilizada alrededor del mundo para identificar los metabolitos secundarios de las plantas que son utilizadas en la medicina tradicional, dentro de estos metabolitos están los alcaloides, flavonoides, saponinas, flavonas etc. Hoy existen miles de referencias de investigaciones que se sustentan en dos pilares; la etnobotánica y la fitoquímica. La primera permite dar a conocer las plantas con sus respectivos nombres comunes y científicos y los usos que se le dan por parte de las comunidades indígenas, campesinas o personas del común que tienen algún tipo de conocimiento. [41]

Figura 2. Elementos básicos del metabolismo primario en relación con el metabolismo secundario en plantas. [42]



La fitoquímica permite tomar estas plantas y caracterizar sus metabolitos secundarios y algunas veces el aislamiento de estructuras químicas. Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que se derivan de procesos secundarios de las

plantas y no cumplen una función en procesos primarios como la fotosíntesis, asimilación de nutrientes, transportes de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. Sin embargo su función en las plantas se traduce en inmunidad. Su línea se centra en disminuir la acción de patógenos. [43]

Estos metabolitos están distribuidos en varias familias de compuestos químicos, como los de tipo alcaloides, flavonoides, saponinas, terpenos, antraquinonas etc. No obstante las plantas desarrollan una variedad distinta de metabolitos secundarios, esta variedad es la que buscan los investigadores desde el campo de la fitoquímica. Paralelo la caracterización y determinación de la actividad biológica de los metabolitos secundarios en enfermedades que agobian a los seres humanos, o mecanismos más adecuado para controlar las plagas en los cultivos es el motor de la industria farmacéutica. [44]

1.3 Línea celular CAD

En este proyecto de investigación se utilizó como modelo celular las células CAD (Cath.a-differentiated), una línea murina de neuronas catecolaminérgicas de origen mesencefálico. Resultan de una variación de una primera línea celular catecolaminérgica del sistema nervioso central CATH.a, las cuales fueron obtenidas a partir de un tumor mesencefálico de un ratón transgénico portador del antígeno T grande del SV40 bajo el control transcripcional del promotor de la tirosina hidroxilasa de rata. Las células CATH.a expresan propiedades neuronales pero carecen de morfología neuronal. También expresan las enzimas β -hidroxilasa dopamina y Tirosina Hidroxilasa, además varios marcadores de neuronas diferenciadas, incluyendo proteínas de neurofilamentos, sinaptofisina, canales dependientes de voltaje sensibles a corrientes de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} similares a los reportados en otras neuronas.[45] La diferencia más significativa entre las células CATH.a y las células CAD, es que las células CAD perdieron espontáneamente el oncogen de inmortalización original, el antígeno T SV40, pero aun así por causas desconocidas las células CAD siguen siendo inmortales.[46]

Las células CAD expresan proteínas neuroespecíficas como: β -tubulina clase III, la proteína asociada al crecimiento de 43 kDa (GAP-43), proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-25) y sinaptotagmina, excepto la proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

Adicionalmente, las células CAD expresan tirosina hidrolasa bioactiva y sintetizan L-DOPA. [56]

En medio de cultivo con suero, estas células son morfológicamente indiferenciadas y proliferan con un tiempo de duplicación de 18-22 horas. [56] Cuando el medio de cultivo no contiene suero u otras proteínas exógenas, la división celular se detiene y empieza el proceso de diferenciación celular. Las células CAD tiene cambios dramáticos en su morfología, apareciendo procesos neuríticos elongados con varicosidades incrustadas tanto al final como en el medio de estos procesos, grandes cantidades de microtúbulos y filamentos intermedios.[56, 57, 47]

La supervivencia de las células CAD está regulada de forma autocrina mediada principalmente por la neurotrofina 3 (NT-3) y la expresión de receptores tirosina quinasa C (TrkC) en la membrana, creando un loop auto-trófico. Las células CAD pueden sobrevivir y diferenciarse morfológicamente en ausencia de factores tróficos proporcionados exógenamente. Sin embargo, reactivos que bloquean la acción de la NT-3 y no de otras neurotrofinas, inhibió la supervivencia de células CAD diferenciadas. Las células CAD diferenciadas mueren por apoptosis cuando sus receptores tirosina-quinasa C son bloqueados, mientras que el bloqueo de estos receptores en la células CAD no diferenciadas no tienen ningún efecto sobre la viabilidad celular [48].

Las células CAD tienen la capacidad de diferenciarse ante la ausencia de suero, siendo este proceso reversible, lo que hace de estas células un buen modelo de estudio para los procesos de diferenciación neuronal.[57] En general las células CAD son un modelo atractivo para el estudio de los eventos que ocurren en la EP, dada la expresión de marcadores neuronales, su comportamiento como neuronas catecolaminérgicas, y su capacidad para diferenciarse y la producción de la neurotrofina NT-3.

1.4 Línea celular MO3.13

La mielinización dentro del (SNC) es un proceso que se desarrolla por el metabolismo de proteínas y lípidos dentro de los oligodendrocitos (OLGs). Los estados de los (OLGs) han sido caracterizados por la presencia de marcadores específicos en su membrana. La

presencia de galactocerebrósido (GC), proteína básica de la mielina (MBP) y proteína proteolípídica (PLP) son todos indicadores de (OLGs) diferenciados. [49]

La línea celular MO3.13 es un híbrido humano-humano a partir de células del (SNC) postmitóticas que expresa las proteínas específicas para (OLGs), y posee mucha similitud con cultivos primarios de (OLGs) humanos, tanto a nivel molecular como bioquímico. La transformación de la línea celular empezó con un cultivo de células extraídas a partir de resecciones quirúrgicas para la epilepsia intratable, de las cuales se separaron los oligodendrocitos e inmediatamente fueron sometidos con fusión de rdbomiosarcoma TE671-TG6 de la serie MO. Para generar la inmortalización celular. Se generaron dos líneas celulares la MO1 y la MO3, de las cuales la MO3 mostró mayor inmunoreactividad para (GFAP) y (MBP).[50]

1.5 Ceramida

La ceramida (N-acetil-esfingosina), es un esfingolípido que pertenece a un grupo de segundos mensajeros lipídicos, que a través de la modulación de vías de señalización, regulan diferentes procesos de la actividad celular: apoptosis, senescencia, diferenciación y ciclo celular [51, 52]. La ceramida en mamíferos, se origina por dos mecanismos enzimáticos: síntesis de novo por condensación de serina y palmitoil-CoA para formar 3-oxo-dihidroesfingosina o por acción de la esfingomielinasa neutra (nSMasa). [53, 54]

La ceramida está constituida por una cadena amino alcohol unida covalentemente a un ácido graso de longitud variable por medio de una unión amida. Las ceramidas celulares presentan diferentes longitudes del ácido graso, que puede ser de 16, 18 y 20 carbonos, están se conocen como C16, C18 y C20 ceramida. Las ceramidas sintetizadas, no celulares, presentan cadenas de ácido graso de cadena corta entre ellas están: C2, C4, C6 y C8 ceramida.[88] Se ha visto que las ceramidas sintéticas de cadena corta detienen el ciclo celular y activan la apoptosis, lo cual ha llevado a postular que ellas son moléculas claves en el proceso de muerte celular.[55] Debido a que las ceramidas naturales de cadena larga son insolubles en el agua y difícilmente se insertan en la capa lipídica desde el exterior, las ceramidas sintéticas de cadena corta, especialmente la C2-

ceramida y C6-ceramida han sido utilizadas ampliamente como herramienta experimental debido a su alta solubilidad en agua y permeabilidad en las membranas celulares. [56, 57]

Una de las características de la biología mediada por la ceramida es la variedad de resultados biológicos observados en respuesta a su acumulación intracelular. Los mecanismos moleculares que regulan la célula "toma de decisiones", en respuesta a la ceramida permanecen en gran parte poco clara. En esta perspectiva, el estudio de los modelos neuronales ha comenzado a proporcionar información importante sobre la comprensión de estos mecanismos que regulan la diferenciación y la muerte celular. De hecho, la diferenciación y la muerte celular se encuentran entre los más comunes efectos provocados por la ceramida en la mayoría de tipos de células y en células neuronales. La neurobiología también arrojar luz sobre la regulación de la biología mediada por la ceramida en otros modelos celulares. Puesto que cada vez más pruebas vinculan el metabolismo aberrante de la ceramida a diferentes patologías, la comprensión de los mecanismos subyacentes a estos acontecimientos puede representar la clave para el diseño de nuevos enfoques terapéuticos.[58]

El incremento de los niveles de ceramida es una respuesta celular común de una variedad de tipo de células, ocasionada por la exposición a agentes inductores de estrés celular, tales como: Citoquinas (TNF α , FasL, IL-1), agentes citotóxicos, estrés ambiental y Oxido nítrico. Por tanto, se cree que podría estar implicado en la fisiopatología de la neurodegeneración [87, 88, 89] La ceramida se considera una neurotóxina potencial endógena [92, 59].

La señalización a través de la vía PI3K/AKT es crítica para la supervivencia neuronal [60], y su inhibición por ceramida contribuye a la apoptosis neuronal [61], por tanto se ha propuesto como un camino putativo de muerte neuronal en la Enfermedad de Parkinson [62] El mecanismo de inhibición de AKT por ceramida es aun controvertido e incierto. Algunos estudios afirman que la ceramida inhibe PI3K [63], mientras que otros han postulado que la ceramida induce la redistribución en la membrana celular de PTEN, principal regulador negativo de la vía PI3K /AKT. [64]

1.6 Familia Piperaceae

Descripción; Hierbas, sufrútices, arbustos, pequeños árboles o lianas trepadoras, terrestres o epífitas; haces vasculares dispuestos en varios círculos o dispersos como en las monocotiledoneas, nudos con frecuencias engrosados y prominentes, a ménudo todas las partes de la planta con puntos glandulares y/o tricomas diminutos, uniseriados, 2-3 células, 30-50 μm . de longitud, las superficies papiladas; profilo, cuando presente solitario y lateral, hojas simples alternas o , por reducción entre nudos, pseudo-opuestas o verticiladas, con frecuencia con aroma de anís, pecioladas; pecíolo vaginado basalmente o en toda su extensión, en ocasiones con márgenes prominentes que abrazan el tallo. Inflorescencias en espigas compactas, raramente racemosas, opuestas, terminales o axilares, solitarias o numerosas, confromando inflorescencias compuestas umbeliformes o paniculadas. Flores diminutas, bisexuales o unisexuales, sin periantio, subtendidas por una bráctea floral, hipopeltada y aplanada distalmente; estambres 2-5 (1 estambre en *Piper nematenthera* (Miq) C. DC.) que nacen de la base del pistilo, anteras con (1)- 2-4 tecas, dehiscentes lateralmente, el plano de dehiscencia vertical u horizontal; pistilo sincárpico simple, sésil o pedicelado, 1-4 carpelos, unilocular, con un óvulo basal solitario, estilos ausentes o tantos como los estigmas, estigmas 1-4 fruto drupáceo, carnoso. [65]

1.6.1 Hábitat y Distribución Geográfica

Familia pantropical, con cerca de 3000 especies descritas, la mayor parte de las cuales se encuentran en el Neotrópico. En Colombia, las Piperáceas son particularmente abundantes en la costa del Pacífico, valle del Magdalena y faldas de los Andes. Especies de la Familia son un elemento conspicuo del sotobosque y, en ocasiones, se presentan como parte importante del estrato epífita, particularmente de lugares sombríos y húmedos; algunas prosperan como pioneras en bosques secundarios, pocas crecen en áreas secas. Se conocen representantes de esta familia desde el nivel del mar hasta 3100 m de elevación; en Colombia presenta su mayor diversidad entre los 300 m y 2600 m sobre el nivel del mar. [39]

1.6.2 Género Piper.

Descripción: Sufrútices, arbustos, pequeños árboles, erectos a lianescentes o escandentes, terrestres o epífitos, tallos con haces vasculares en varios círculos concéntricos; profilo solitario y lateral, cubriendo en forma parcial o completa el vástago del tallo en los nudos florígenos. Hojas alternas, lámina foliar entera lobulada (generalmente sólo en la base), de lisa a rugosa o buliforme, suave o escambrosa, glabra, papilada o con tricomas uniseriados, simples o ramificados, en ocasiones glandular-punteada en una o ambas caras, membranácea o grueso-cartácea, con frecuencia asimétrica y desigual en la base; pecíolos con los márgenes prominentes en todos los nudos y abrazando el tallo o inconspicuos en los nudos florígenos. Inflorescencias en espigas solitarias, pedunculadas, terminales y opuestas a las hojas, raramente axilares: en ocasiones las espigas se disponen en grupos conformando inflorescencias compuestas, racemiformes o paniculadas; raquis de la espiga carnoso o filiforme, glabro o pubescente; flores unisexuales (especies paleotropicales) o bisexuales (especies neotropicales), de laxa a densamente agrupadas sobre el raquis, axilares a una bráctea floral epipeltada, orbicular, triangular, cuculada o espatulada; estambres (1)-2-5-(7), filamentos cortos o más largos que el pistilo, a menudo articulados a las anteras y persistentes sobre las paredes del ovario, anteras con dos tecas, lateralmente dehiscentes, leve a profundamente divergentes y dehiscentes en un plano horizontal, oblicuo o vertical, el conectivo a menudo ensanchado basalmente y/o prolongándose por encima de las tecas, formando un disco apical y punteado-glandular; pistilo 3-5-carpelado, sésil o pedicelado; estigmas 3-5, sésiles o sobre igual número de estilos. Fruto drupáceo, carnoso, redondeado a elipsoide, angulado y triangular a oblongo por compresión de frutos adyacentes, glabro, raramente pubescentes o densamente papilado, a menudo punteado-glandular. [39]

- Hábitat Y Distribución Geográfica

Género pantropical con cerca de 1100 especies. En el neotrópico (ca. 800 especies) cinco áreas son particularmente ricas en especies del género: la costa pacífica de Colombia y Ecuador, el oeste de la Amazonía en el Perú y Ecuador, la costa Atlántica del Brasil, los Andes de Venezuela, Ecuador, Colombia y norte del Perú y el sur de México y la península del Yucatán. En el viejo mundo (ca. 300 especies) la mayor parte de las

especies se encuentran en las islas del Pacífico, Filipinas, sureste del Asia (Indochina) y el sur de la India. [39]

El género *Piper* L. está constituido por plantas de preferencias umbrícolas, a menudo riparias o de lugares húmedos y protegidos, que prosperan en bosques del tipo húmedo tropical, premontano y montano; pocas especies (mayormente “malezas”) crecen en lugares expuestas y relativamente secos; algunas especies habitan en bosques deciduos o semideciduos del norte y centro de México. Las especies del género *Piper* L. se encuentran desde el nivel del mar hasta los 2600-(2900) m, abundan especialmente entre los 400 y 2000 m. [39]

En Colombia las especies de *Piper* L. son un elemento conspicuo de la vegetación en muchas áreas, en particular en el piedemonte occidental de la Cordillera Occidental, en los departamentos de la costa del Pacífico, en donde prosperan casi el 50% de las especies que se conocen para el país. [39]

- Bioactividad de Especies del Género *Piper*

Existen muchas especies de pipereaceas utilizadas por milenios e incluso bajo otras modalidades de uso, por ejemplo; en una revisión sobre las plantas llevadas a humo medicinal que son utilizadas alrededor del mundo, se encuentra la especie *Piper brownsbergense*, que es aplicado el humo de manera directa sobre la zona afectada, específicamente en personas que presentan problemas de huecos o hendiduras provocada por parásitos en la piel. [66]

En un estudio llevado a cabo por investigadores de la Universidad de Antioquía en materia de bioactividad de plantas sobre venenos de serpientes, tuvieron en cuenta en primer orden el conocimiento empírico de las comunidades que habitan la zona Pacífica de Colombia, dentro de los cuales se rescatan 13 especies de la familia piperáceas. Evaluaron 75 extractos de los cuales 31 mostraron una moderada y alta neutralización de los venenos. En el caso del *Piper arboreum* H.B.K el extracto demostró la neutralización aproximada del 50% de los efectos hemorrágicos del veneno de la *Bothrops atrox*. [67, 68].

En estudios de melanoma el blanco terapéutico ideal en estos casos es la inhibición de la actividad de la enzima tirosinasa y por esta razón se buscan inhibidores de esta enzima.

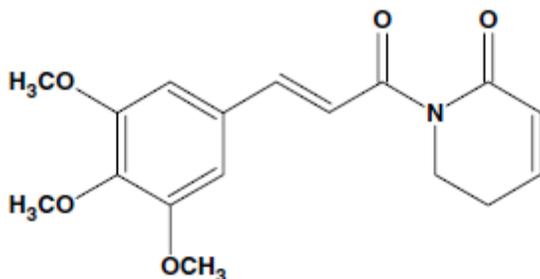
Estudios han demostrado que la *P. arboreum* posee potencial para reducir la actividad anti-tirosinasa. El extracto demostró un porcentaje de inhibición de la actividad de la tirosinasa del 34%. [69]

Debido al interés de la actividad biológica de especies de la familia piperaceae, se han realizado estudios sobre el análisis de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de algunas especies de esta familia, con el fin de establecer los posibles causantes de la actividad biológica. En el caso de la *P. arboreum* se analizó y se encontraron gran cantidad de sesquiterpenos no oxigenados entre el más abundante el γ -eudesmol (14.61%). [70]

Otra especie interesante dentro de la familia piperáceas es la *Piper tuberculatum* Jacq, un ejemplo claro de su actividad biológica se vive en algunas comunidades del norte del Brazil, donde la *P. tuberculatum* popularmente conocida como pimienta longa y/o pimienta darta, es usada como sedante y antídoto para mordedura de serpiente en la medicina tradicional. [71]

La piplartina (Fig 3), es una amida/alcaloide, derivada de la *P. tuberculatum*, que ha mostrado una actividad cito-tóxica sobre líneas celulares tumorales, al igual que propiedades anti-fungales, y anti-mitótica. [72]

Figura 3. Estructura química de la piplartina {5,6-dihidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-2(1H)piridinona} 72



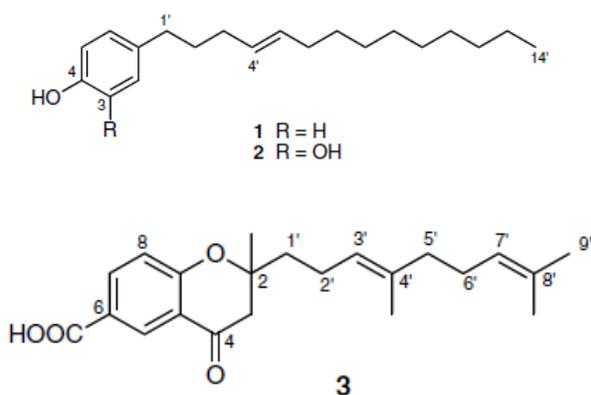
Del *P. tuberculatum* se han aislado una gran variedad de compuestos entre ellos la piperdardina, una piperidina alcaloide, con el fin de establecer los compuestos que inhiben el veneno de las serpientes, o los causantes de la actividad sedante. Además se retoma el papel mutagénico de la piplartina sobre ensayos en *Salmonella typhimurium*,

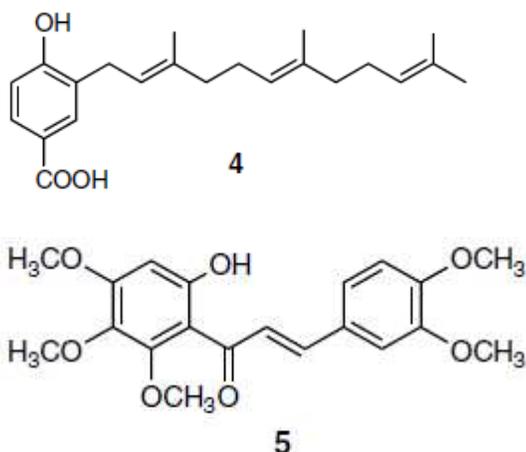
corroborando su capacidad para provocar apoptosis en líneas celulares tumorales y en sistemas eucariotas. De otro modo la pipartina demostró in vitro bajo una concentración de 15.8µM la reducción motora de los gusanos de *Schistosoma mansoni*, y muerte a las 24 horas. [73, 74, 75]

Los aceites esenciales de especies de la familia piperáceas se han convertido en blancos para llevar a cabo estudios de actividad biológicas y farmacológicas. En un estudio realizado por Guerrini y col.[76] probaron la actividad biológica de dos especies de piperáceas; *Piper aduncum* L. y *Piper obliquum*, mostrando actividades analgésicas y antitrombóticas, aunque ambos aceites demostraron poca actividad anti-oxidativa.

En América del Sur, las piperáceas tienen un fuerte interés, como en Bolivia donde son utilizadas popularmente por la comunidad Tacana y reciben el nombre de "Thudas". En el caso de *P. obliquum* se han aislado metabolitos secundarios (Fig 2) y se ha probado su actividad para inhibir la actividad del NF-Kb, vía celular fuertemente implicada en la respuesta inflamatoria, de este modo la inhibición de este complejo por parte de metabolitos secundarios de esta planta, arrojaría propiedades anti-inflamatorias. Igualmente se ha detectado en sus metabolitos propiedades antibacterial, con un amplio espectro e inhibición. [77]

Figura 4 Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de *P. obliquum* Nuevos alquenilfenoles; Obliquol (1)(2) extraídos de la inflorescencia. 4-cromanona (3). 3-farnecil-4-hidroxiácido benzoico (4). 2'-hidroxi-3,4,4',6'-tetramatoxicalcona (5) estos últimos tres compuestos extraídos de las hojas. [77].

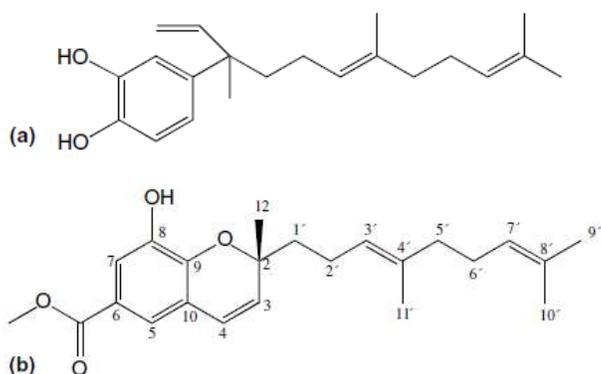




Dentro de las propiedades ya mencionadas de las piperáceas, es su cualidad anti-fungal. Los investigadores realizaron el aislamiento de amidas de las hojas de *P. arboreum* y de las semillas y hojas de *P. tuberculatum*. Estas amidas mostraron actividad antifungal contra *Cladosporium sphaerospermum* y *C. cladosporioides*. [78]

Los extractos de las especies *Piper peltatum* y *Piper umbellatum* actúan sobre el veneno de serpientes, un trabajo de investigación logró aislar el compuesto 4-nerolidilcatecol, en el cual recae la acción de inhibir la actividad enzimática de la miotoxina I, la cual es una fosfolipasa A_2 (PLA₂) un constituyente del veneno de la serpiente *Bothrops asper*. [79]

Figura 5. Compuestos aislados de *Piper peltatum* y *Piper umbellatum*. (a) 4-nerolidilcatecol. (b) 2-(4',8'-Dimetilnona- 3',7'-dienil)-8-hidroxi-2-metil-2H-cromana-6-ácido carboxílico metil ester. [69]



1.7 Familia Euphorbiaceae.

Árboles, arbustos, hierbas o bejucos dioicos o, más frecuentemente, monoicos. Tallo a veces suculento, a menudo con savia lechosa o coloreada (Látex). Hojas alternas, a veces opuestas, raramente verticiladas, simples o compuestas, en ocasiones reducidas, pecioladas y estipuladas. Estípulas simples o palmeado-compuestas, en ocasiones reducidas, pecioladas y estipuladas. Estípulas simples o palmeado-compuestas, nunca pinnadas, libres o connatas, a veces reducidas a glándulas, obsoletas, caducas o ausentes. Lámina foliar con nerviación palmeada o pinnada. Inflorescencias básicamente cimosas, a menudo muy modificadas como racimos, capítulos, espigas, o agregadas en pseudantios; a veces flores solitarias. Flores unisexuales, raramente bisexuales, radiales, simétricas. Perianto llamativo, reducido, inconspicuo o ausente, a menudo desigual en los dos sexos, generalmente pentámero. Cáliz, en general, con 3-6 lóbulos más o menos profundos, valvados o quinculcialmente imbricados, en inflorescencias muy especializadas, a veces muy reducidos o raramente ausentes (*Euphorbia*). Corola de 3-6 pétalos, separados o conniventes, a menudo reducidos o ausentes, a veces unidos (*Jatropha*). Disco nectarífero generalmente presente e uno o ambos sexos, de origen receptacular o estaminoidal, anular, en forma de copa o formado por glándulas separadas. Estambres (1)3-20(-400 ó más), insertos en un receptáculo plano o convexo; Filamentos libres o connatos; anteras con 2-(3-4) lóculos, erectas o inflexas en botón, con dehiscencia longicida o raramente poricida. Granos de polen 2-3 nucleados, con escultura de la exina muy variada, tectados o intectados, frecuentemente tricolporados, a veces inaperturados o politremos. Pistilodio a menudo presente en las flores masculinas. Ovario súpero, de (1-)3-4(-25) carpelos connatos; estilos libres o unidos de forma variable, enteros o multífidos; estigmas enteros, bífidos o lacerados. Óvulos 1-2 en cada carpelo, anátropos, raramente hemítrops, epítropos, crasinucelados, con dos tegumentos: nucela a menudo prolongada en un pico en contacto con el obturador; funículo a menudo engrosado; placentación axial. Fruto generalmente de 3 mericarpos (cocos) separados por una columela central persistente; dehiscencia elástica. Semillas 1-2 en cada coco, o solitarias por aborto de las restantes, generalmente carunculadas; testa delgada, crustácea u ósea; endospermo generalmente abundante, a veces asuente; embrión recto o curvado, grande, acupando la mayor parte de longitud de la

semilla; cotiledones normalmente más anchos que la radícula, planos o raramente arrugados. Saco embrionario normal, monospórico, a veces dispórico o tetraspórico. [39]

1.7.1 Hábitat y Distribución Geográfica

Las *Euphorbiaceae* son una de las más grandes y diversificadas familias de angiospermas, contando con 300 géneros y unas 8000 especies (Cronquist, 1998). Su distribución es principalmente tropical, con máxima diversidad en las Región Indomalaya, seguida de los trópicos del Nuevo Mundo. En África, aunque la representación de la familia es numerosa, no es tan variada como en los demás zonas tropicales. Existen concentraciones locales, especialmente del género *Euphorbia* L., en zonas templadas, como el sur de los Estados Unidos, cuenca mediterránea, Oriente Medio y sur de África. [39]

Sus especies presentan una enorme diversidad ecológica y de formas de crecimiento: grandes árboles de bosques tropicales, arbustos, bejucos, hierbas perennes o anuales mesofíticas, geófitos suculentes, acuáticas flotantes, xerófitos cactiformes. Sólo el hábitat epífita está ausente en la familia. [39]

Para Colombia se tiene un escaso conocimiento de la familia, en el Herbario Nacional Colombiano (COL) se encuentran representados, para el territorio nacional, unos 60 géneros con 350-400 especies, número sin duda muy inferior a la diversidad existente de la familia en el país. En general son más abundantes en tierras bajas, bosques húmedos tropicales y zonas templadas, su número decrece considerablemente en el bosque y páramo andino. [39]

1.7.2 Género *Acalypha*

Hierbas anuales o perennes, arbustos, raramente árboles, monoicos o raramente diocos: indumento de pelos generalmente simples o glándulas. Hojas alternas, simples, pecioladas, estipuladas. Lámina elobada, con margen entero o, más comúnmente, dentado, nerviación palmeada o pinnada. Inflorescencias terminales o axilares, generalmente amentiformes, en espigas, racimos o raramente panículas, unisexuales o

bisexuales; con varias flores masculinas, aglomeradas en cada nudo, en la áxila de una pequeña bráctea: flores femeninas 1-3 en cada nudo, normalmente en la axila de una bráctea grande y foliácea, a menudo lobulada o partida, raramente pequeña y entera. Las inflorescencias andróginas con las flores femeninas en la parte inferior. Flores apétalas, disco ausente. Flores masculinas subsésiles o cortamente pediceladas: cáliz dividido en 4 lóbulos valvados: estambres 4-, filamentos libres o connatos en la base, sacos polínicos libres, péndulos, uniloculares, más o menos alargados y vermiformes: granos de polen oblato-esferoidales, con 3-5 pseudoporos, tectados, psilados: pistilodio ausente. Flores femeninas subsésiles, pediceladas en muy pocas especies: cáliz de 3-5 lóbulos imbricados, connatos en la base: ovario de (1-2)-3 carpelos con un óvulo en cada carpelo, óvulos anátropos, a veces con un corto apéndice nucelar, saco embrionario tetraspóricico; estilos libres o connatos en la base, laciniados o lacerados, raramente bífidos o subenteros. Fruto capsular, pequeño, a veces rodeado por la bráctea femenina acrescente. Semillas ovoides, normalmente carunculadas, lisas o tuberculadas; endospermo blanquecino, carnoso; embrión derecho; cotiledones reniformes, más anchos que la radícula. [39]

- Hábitat y Distribución Geográfica

El género cuenta con unas 400-450 especies de distribución principalmente pantropical, con algunos representantes en zonas templadas. La mayoría son americanas, con la más amplia diversidad de especies en Méjico, América Central y Caribe. [39]

En el Herbario COL se encuentran colecciones de unas vintiuna especies. Prefieren las vertientes más húmedas, márgenes de ríos y zonas sombreadas. [39]

1.7.3 Genero *Alchornea*

Árboles o arbustos, monoicos o, más frecuentemente, dioicos, ramificación laxa, indumento de tricomas simples o estrellados. Hojas alternas, simples, inconspicuamente estipuladas, pecioladas. Lámina foliar generalmente dentada, con nerviación palmeada o pinnada, a menudo triplinerve, comúnmente con manchas glandulares cerca de la base. Inflorescencias en racimos espiciformes, axilares, normalmente unisexuales; los racimos masculinos a menudo compuestos (a veces también los femeninos): brácteas

eglandulares que llevan en la axila 1-3 flores femininas, o de 1 a diversas flores masculinas. Flores masculinas subsésiles: cáliz glaboso, escindido en la antesis en 2-5 lóbulos valvados; pétalos ausentes: estambres normalmente 8, en dos verticilos de 4, filamentos cortos, connatos en un pequeño disco central, anteras oblongas con dehiscencias introrsa y longitudinal: granos de polen esferoidales, tricolporados, colpos operculados; pistilodio ausente: flores femeninas sésiles o cortamente pediceladas; lóbulos de cáliz (3-)4(-6), imbricados; pétalos ausentes y disco obsoleto; ovario de 2-3(-4) carpelos con un óvulo cada uno; estilos 2-3, elongados, libres o connatos en la base, enteros. Fruto capsular, dicoco o tricoco, liso o tuberculado, con la columela persistente después de la dehiscencia. Semillas bivalvas, tuberculadas, generalmente ecarunculadas, con endospermo carnoso: rafe ventral prominente; cotiledones anchos y aplanados, sin curvar. [39]

- Hábitat y Distribución Geográfica

De acuerdo con el tratamiento de F.A. Pax (1914), *Alchornea* comprende unas 50 especies de distribución tropical, principalmente americana. En Colombia se conocen unas tres especies.[39]

- Bioactividad de Especies de los géneros *Acalypha* y *Alchornea*

Alchornea cordifolia Schumach and Thonn es un arbusto ampliamente distribuido a lo largo de las regiones costeras de África occidental donde se usa en forma de decocciones hechas con sus hojas pulverizadas, para el tratamiento local de dolores reumáticos, fiebre, heridas, diarrea, estado de ánimo y trastornos nerviosos. De otro modo sus hojas en infusiones son utilizadas para aliviar enfermedades respiratorias, infecciones vaginales, úlcera gástrica, disentería, purificador de sangre, y tónico para los nervios. [80]

Investigaciones realizadas a extractos de cloroformo de hojas de *Alchornea latifolia* mostraron actividad anti-tumoral en líneas celulares como Hep-G2, MDA-MB231 y actividad antibacterial sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. [81]

Estudios fitoquímicos de extractos de *Alchornea cordifolia* han revelado la presencia de taninos, flavonoides, glucósidos, resinas y carbohidratos. Aunque se ha demostrado

actividad anti-tumoral con estructuras de mayor peso molecular como polisacáridos aislados de Sp. de Euforbiáceas. Esto demuestra probablemente el accionar de las plantas en bebidas folclóricas que la población del occidente de África ingiere para calmar y curar varias enfermedades. Las investigaciones conducen en la caracterización de estos polisacáridos que son extraídos en principio de una manera rudimentaria (Infusión).[82]

La *Alchornea floribunda* Müll.Arg es una especie utilizada en la medicina folclórica de África, las comunidades utilizan desde las raíces hasta los frutos de este arbusto con el fin de tratar problemas urinarios, respiratorios e intestinales. En Camerún las personas utilizan sus hojas para tratar parásitos intestinales e infecciones en la piel. Además distintas partes de la planta es utilizada para tratar la artritis ya que posee cualidades analgésicas y anti-inflamatorios. Esta planta demostró en vitro su potencial para disminuir la proliferación de cepas de bacteria Gram + intestinales como (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*), la relacionada con la piel (*Staphylococcus aureus*), las vías respiratorias (*Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*) y urinaria (*Proteus mirabilis* and *Staphylococcus saprophyticus*).[83]

Las hojas de *Alchornea laxiflora* (Benth.) Pax y Hoffman es utilizada en África para el tratamiento de enfermedades infecciosas e inflamatorias, al igual que en el tratamiento de la malaria. Estudios fotoquímicos sobre las raíces y hojas de esta especie han revelado la presencia de alcaloides, saponinas y compuestos fenólicos. En estudios más específicos se aislaron compuestos de extractos de las hojas de la *A. laxiflora* capaces de inhibir significativamente el crecimiento bacteriano.[84]

El género *Acalypha* es el cuarto más grande de la familia Euphorbiaceae, algunas especies son utilizadas en la medicina folclórica de África, utilizando las raíces, tallos y hojas para el tratamiento y manejo de las dolencias de las enfermedades. Extractos de hexano, metanol y diclorometano de *Acalypha diversifolia* Jacq. Han demostrado actividad anti-bacterial y anti-fúngica, contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además actividad sobre *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium solani*.[85]

En Costa Rica dos especies la *A. diversifolia* y *Acalypha macrostachya* Jacq son utilizadas en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades. Sin embargo son escasos los estudios químicos que puedan revelar los compuestos que probablemente son los responsables de dicha actividad biológica. Es así que fue analizado el extracto del tallo de la *A. macrostachya* la cual mostró la presencia de cuatro compuestos entre ellos diterpenos, sesquiterpenos, N-trans-feruloiltiramina y β -estigmasterona.[86]

Otra especie que ha demostrado actividad biológica contra el *Trypanosoma brucei brucei* es la *Acalypha wilkesiana* Müll Arg el extracto acuoso de las hojas fueron sometidos en vivo contra este protozooario, mostrando reducción en la proliferación y parada de ciclo de vida de este parasito.[87]

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto neuroprotector de los extractos alcohólicos de especies de plantas pertenecientes a las familias Piperaceae y Euphorbiaceae extraídas del piedemonte del Caquetá y de la reserva natural Ucumarí- Risaralda, en las líneas celulares CAD y MO3.13.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto tóxico de los extractos alcohólicos en las líneas celulares CAD y MO3.13
2. Determinar el efecto de extractos alcohólicos sobre la viabilidad celular en respuesta a la exposición a C2-ceramida en las líneas celulares CAD y MO3.13.

3. Materiales y métodos

3.1 Área de estudio

El área para la recolección del material vegetal de las especies de la familia Piperaceae fue realizado en el Departamento del Caquetá. Primer punto en el municipio de Florencia bajo las coordenadas 1°38'11" N -75°36'28" W. El segundo punto en el municipio de la Montañita localizado 1°29'25.8" N - 75°24'10.7" W.

3.2 Trabajo de campo

3.2.1 Recolección de los especímenes

Las especímenes de plantas de la familia Piperaceae fueron debidamente tratadas y herborizadas bajo normas internacionales y radicadas en el Herbario Nacional Colombiano (COL) del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia con las correspondientes determinaciones taxonómicas realizado por el Biólogo Willian Trujillo Calderón.

Los especímenes *Acalypha diversifolia* Jacq y *Alchornea calophylla* pertenecientes a las familia euphorbiaceae fueron extraídos de la Reserva Natural Ucumarí-Risaralda y los respectivos extractos metanólicos fueron donados por el docente Oscar Marino Mosquera Martínez, director del Grupo de Biotecnología-Productos Naturales de la Escuela de Tecnología Química de la Universidad Tecnológica de Pereira (Risaralda-Colombia), para ser parte de este proyecto de investigación.

3.3 Trabajo de laboratorio

3.3.1 Secado del material vegetal

El material de las especies fue dividido en trozos pequeños, secado a temperatura ambiente, hasta que las hojas presentaron ausencia de humedad.

3.3.2 Molienda y maceración del material

El material vegetal fue molido y macerado con etanol al 96% en un frasco de vidrio oscuro, se agitó diariamente por una semana, al final de la cual se filtró, se adiciono nuevamente etanol al material sólido y se repitió el mismo proceso hasta fin de extracción.

3.3.3 Obtención del extracto etanólico

Los filtrados obtenidos en el punto anterior fueron reunidos y concentrados evaporando el etanol, para ello se usó un evaporador rotatorio a una temperatura de 40°C.

3.3.4 Caracterización de los metabolitos secundarios

Caracterización fitoquímica por cromatografía de capa delgada (ccd) de especies del genero *Piper* [88]

Tabla 1.Reveladores para la caracterización de Metabolitos secundarios. Estos reveladores fueron utilizados en la caracterización de los metabolitos secundarios en los extractos alcohólicos de las especies de la familia Piperaceae

METABOLITOS SECUNDARIOS	REVELADORES	PATRÓN (300 ppm)
Alcaloides	Dragendorff	Quinina
Amidas	Etanol al 10% en H ₂ SO ₄ al 98%	Extracto etanólico de <i>Piper nigrum</i>
	I ₂ /Ninhidrina	

	Luz UV a 360 nm	
Cumarinas	KOH al 5% en etanol absoluto	7-Hidroxycumarina
Esteroides y/o Saponinas Esteroidales	Liebermann-Burchard	β -Estradiol Diosgenina Hecogenina
Esteroles, tri-terpénos y/o Saponinas Triterpénicas		Colesterol Estigmasterol Lanosterol Lupeol
Flavonoides	AlCl ₃ al 1% en etanol absoluto (UV 360 nm)	Naringenina
Lactonas	Kedde	Digitoxina
Taninos: hidrolizables y/o compuestos fenólicos; o taninos condensados	FeCl ₃ al 5% en HCl 0.5 N	Ácido Gálico
Quinonas	KOH al 5% en etanol absoluto (UV 360 nm)	Antraquinona

3.3.5 Líneas celulares CAD y MO3.13

En esta investigación se utilizaron como modelo celular la línea murina de neuronas catecolaminérgicas de origen mesencefálico, denominadas células CAD, donadas por la Dra. Chikaraishi DM del departamento de Neurobiología del *Duke University Medical Center, Durham, North Carolina* al Dr. Gonzalo Arboleda del grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia y la línea celular MO3.13 derivada de oligodendrocitos de origen humano e inmortalizadas mediante fusión con rhabdomiosarcoma TE671-TG6 de la serie MO.

▪ *Cultivos Celulares*

Las Células CAD fueron cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 ug/ml en platos de cultivo estándar a una densidad de 5×10^6 para frascos de 75 cm², el medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días, y al obtener una confluencia aproximada del 80 %, se realizaron subcultivos o pasajes. Luego se sembraron a 7×10^3 células por pozo para placas de 96 pozos para realizar la diferenciación, en una incubadora con medio humidificado y una concentración de CO₂ al 5% y temperatura de 37 °C. Para inducir la diferenciación, las células CAD fueron sembradas en medio DMEM/F12 suplementado con 0.1% de suero fetal bovino, sodio selenita 50 ng/ml y antibiótico.

Las Células MO3.13 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 ug/ml en platos de cultivo estándar a una densidad de 5×10^6 para frascos de 75 cm², el medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días, y al obtener una confluencia aproximada del 80 %, se realizaron subcultivos o pasajes. Luego se sembraron a 45×10^3 células por pozo para placas de 96 pozos para realizar diferenciación (72-96 horas), en una incubadora con medio humidificado y una concentración de CO₂ al 5% y temperatura de 37 °C. Para inducir la diferenciación, las células MO3.13 fueron sembradas en medio DMEM suplementado con PMA 100nM (72-96 horas)

3.3.6 Conteo Celular

Las células se despegaron y se resuspendieron usando Tripsina al 0.25% p/v en una solución de PBS y EDTA 0.1% p/v, se tomó una muestra de la suspensión y se diluyó en una solución de azul de Trypan al 0.4% en una proporción de 1:4. Se tomó 10 µl en un hemocitómetro, se contaron los cuatro cuadrantes de las esquinas de ambos retículos teniendo en cuenta que las células ubicadas sobre las líneas límites superior y derecha de cada cuadrante se incluían en el conteo, no así las ubicadas sobre las líneas límites inferior e izquierda. Esta técnica permite diferenciar las células vivas de las muertas, ya que estas últimas se tiñen de azul debido a que el daño en su membrana permite la

inclusión del colorante. Para reportar el número de células vivas por ml se tiene en cuenta el número de cuadrantes contados (8 cuadrantes cada uno con un volumen de 0,1 mm³) y el factor de dilución que por lo general fue de 4, con estos datos se aplicaba la siguiente ecuación.

$$\text{células/ml} = \frac{\text{células vivas contadas}}{0,8 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} \times \text{Factor de dilución}$$

3.3.7 Ensayo de citotoxicidad

Los extractos etanólicos fueron sometidos a la prueba de dosis letal 50 en las líneas celulares CAD y MO3.13. La viabilidad fue analizada con MTT y WST-1 respectivamente.

3.3.8 Tratamientos Con La Neurotóxina C2-ceramida

Las células CAD fueron diferenciadas por 48 horas realizando una siembra a una densidad de 7×10^3 por pozo en una placa de 96 pozos, teniendo cuatro muestras para analizar por cada tratamiento por triplicado, este procedimiento se llevó a cabo en medio de cultivo de diferenciación (DMEM/F12 suplementado con 0.1% de suero fetal bovino, sodio selenita 50 ng/ml, sin antibiótico.). Los extractos fueron depositados con una hora pretratamiento en las dosis adecuadas previos estudios de citotoxicidad, luego la adición de la neurotóxina C2-ceramida a una concentración 25 μM durante 6 horas y 10 μM durante 24 horas (LD50, establecida previamente por el Grupo de Muerte celular de la Universidad Nacional y modificada) Las células MO3.13 fueron diferenciadas por (72-96 horas) realizando una siembra a una densidad de 45×10^3 por pozo en una placa de 96 pozos, teniendo cuatro muestras para analizar por cada tratamiento realizada en tres momentos diferentes, este procedimiento se llevó a cabo en medio de cultivo de diferenciación (DMEM suplementado con PMA a 100 nM, sin antibiótico.). Los extractos fueron depositados con una hora pretratamiento en las dosis adecuadas previos estudios de citotoxicidad, luego la adición de la neurotóxina C2-ceramida a una concentración 50 μM durante 6 horas y 20 μM durante 24 horas.

3.3.9 Ensayos De Viabilidad y Muerte Celular

La viabilidad en las células CAD fue evaluada mediante el ensayo de MTT (Bromuro de

3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico). Las células CAD fueron sembradas a una densidad de 7000 células por pozo en un volumen de 200 μl de medio de diferenciación en una placa de 96 pozos. Las células CAD control, controles de la neurotóxina C2-ceramida 25 μM y 10 μM (6 y 24 horas respectivamente), controles de la acción de los extractos y los tratamientos para medir la neuroprotección, una vez cumplido el tiempo de incubación se removieron 100 μL de medio de cultivo de cada pozo, y se adiciono 20 μl de la solución MTT (5 mg/ml), las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% CO_2 . Una vez cumplido el período de incubación el medio fue removido completamente con micropipeta teniendo la precaución de no retirar los cristales de formazán formados gracias al metabolismo mitocondrial. Luego se adicionaron 100 μl de DMSO, para disolver los cristales. Se cuantificaron los cristales mediante absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm.

Ensayo de WST-1 fue utilizado en las células MO3.13, esta técnica permite establecer la viabilidad celular muy similar a la acción realizada por MTT, la gran diferencia radica en la facilidad del tretazolium de solubilizar con el agua, además la reacción de reducción se da por fuera de la célula, por lo cual no se hace necesario utilizar un disolvente como el DMSO. Las células MO3.13 fueron sembradas a una densidad de 45×10^3 células por pozo en un volumen de 200 μl de medio de diferenciación en una placa de 96 pozos. Las células MO3.13 control, controles de la neurotóxina C2-ceramida 50 μM y 20 μM (6 y 24 horas respectivamente), controles de la acción de los extractos, y los tratamientos para medir la neuroprotección, una vez cumplido el tiempo de incubación se removieron 100 μl de medio de cultivo de cada pozo, las 100 μL restantes en la caja de 96 pozos, se adicionaron 15 μl de la solución WST-1, las placas se incuban durante 2 horas a 37°C y 5% CO_2 . Una vez cumplido el período de incubación se cuantifico la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm.

3.3.10 Análisis estadístico

Los datos se presentan como el $X \pm \text{D.E}$ de mínimo 3 experimentos independientes. Se realizó la prueba de normalidad de D'Agostinos y Pearson, seguida del Análisis de Varianza de Una Vía (ANOVA) seguido "Bonferroni's Multiple Comparison Test" ($p < 0.05$) y analizados por el programa informático Software GraphPad Prism 5.

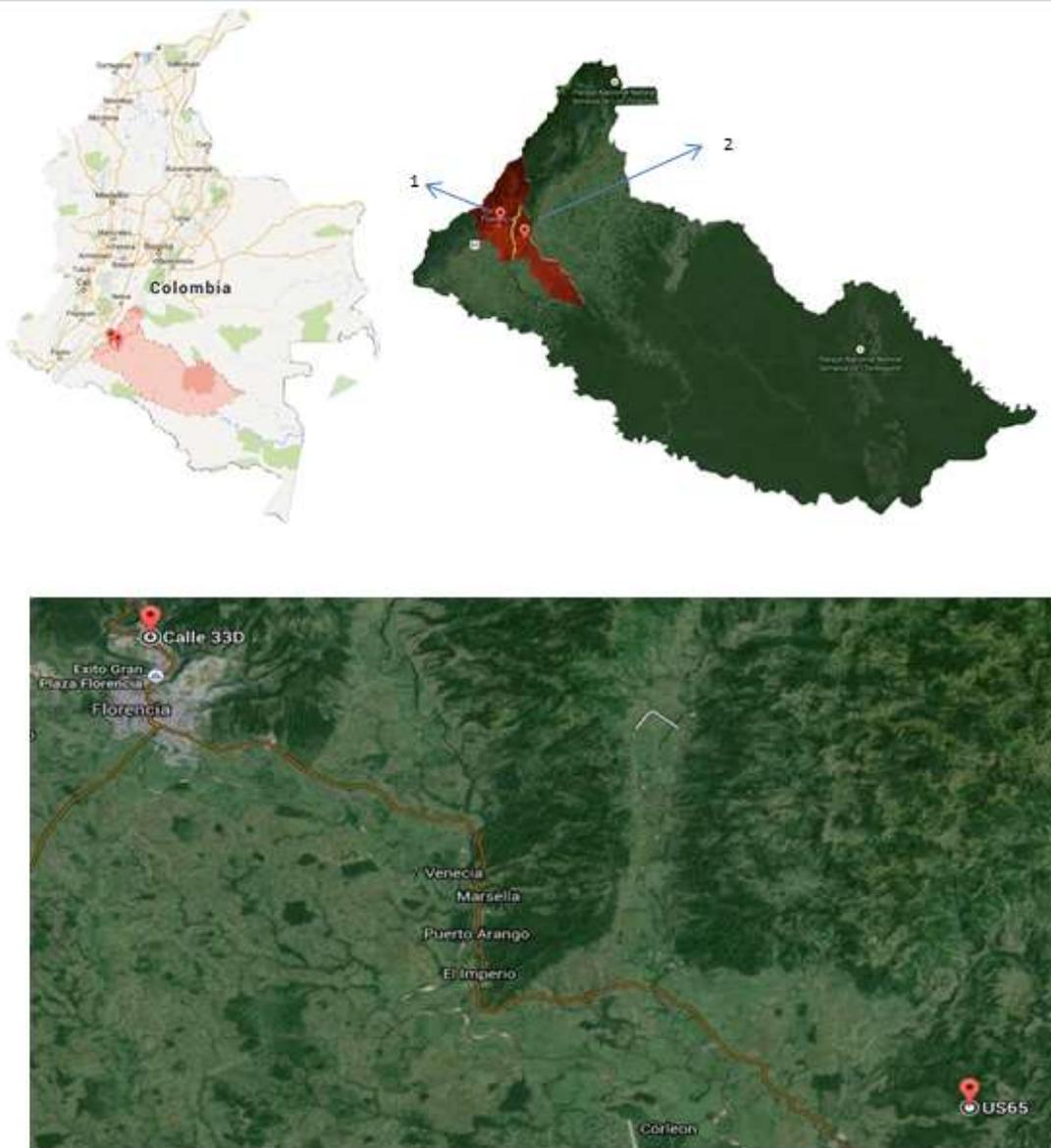
4. Caracterización fitoquímica de los metabolitos secundarios de los extractos etanólicos de las especies de plantas del género *Piper*, *Achalypha*, *Alchornea*.

4.1 Resultados

4.1.1 Recolección del material vegetal

Las especies de la familia Piperaceas fueron colectadas en el departamento del Caquetá, la extensión del departamento cubre un área de 88,462 km² y se encuentra ubicado en el occidente de la amazonia colombiana. Limita al norte con los departamentos Huila, Meta, al occidente con Cauca, Putumayo, al oriente con el Guaviare, Vaupés y al sur con el departamento del Amazonas. Por su ubicación geográfica, el Caquetá es el departamento amazónico con más interrelaciones territoriales [89].

Figura 6. Puntos de muestreos en el departamento del Caquetá (Imágenes extraídas desde Google Maps 2015)



El punto (1) hace referencia al primer sitio de muestréo ubicado $1^{\circ}38'11''N$ $-75^{\circ}36'28''W$. 290 Msnm. En zona urbana barrio Cunday del municipio de Florencia-Caquetá, donde se colectarón las siguientes especies:

1. *Piper tuberculatum* Jacq
2. *Piper peltatum* Ruiz & Pav

El punto (2) con ubicación 1°29'25.8"N -75°24'10.7"W. 320 Msnm. Hace referencia a zona rural del municipio de la Montañita, sitio donde se colectaron las siguientes especies:

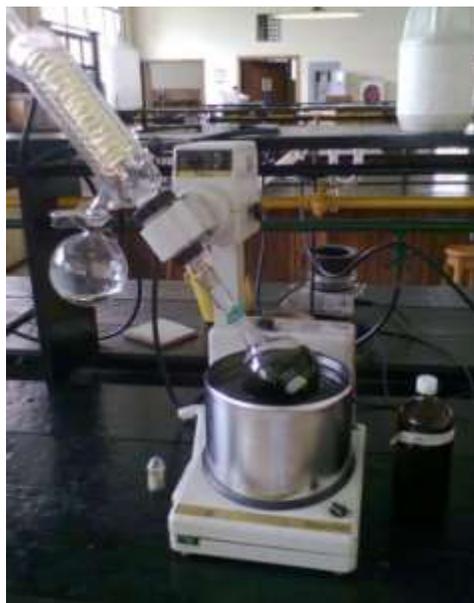
1. *Piper krukoffii* Yunck
2. *Piper arboreum* Aubl

Los especímenes colectados fueron debidamente tratados y herborizados bajo normas internacionales en el Herbario Nacional Colombiano (COL) del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional con números de colecciones *P. arboreum* (565505) *P. peltatum* (566220) *P. tuberculatum* (566219) *P. krukoffii* (566218) determinación taxonómica fue a cargo del Biólogo-Taxónomo William Trujillo Calderón. (Anexo 1)

4.1.2 Obtención de los extractos etanólicos.

Se obtuvo aproximadamente 850 mL del macerado de etanol al 95%. De cada una de las especies de *Piper*. Posteriormente se llevo a rotavapor obteniendo un concentrado de compuestos de color oscuro y consistencia viscosa.

Figura 7 Rotavapor para realizar la separación del etanol al 96% de los compuestos del material debidamente filtrado



La cantidad total de extractos de las especies de Piper obtenidas fueron la siguientes;

Tabla 2. Valores de obtención de extractos de las especies de Piperaceae. Se aprecia el valor obtenido del extracto crudo de las especies de Piperaceae.

MUESTRA	PESO(g)
Extracto etanólico <i>Piper arboreum</i>	7,45
Extracto etanólico <i>Piper krukoffi</i>	7,90
Extracto etanólico <i>Piper peltatum</i>	8,52
Extracto etanólico <i>Piper tuberculatum</i>	6,94

4.1.3 Caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos.

Para determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios se realizó por medio de la observación de los colores característicos y cotejados con lo reportado por la bibliografía,

Tabla 3. Detección cualitativa de Metabolitos secundarios. Características de las manchas en la detección de los metabolitos secundarios por cromatografía de capa delgada (CCD).

FITOCOMPUESTO Y/O METABOLITO SECUNDARIO	REVELADOR	CARACTERÍSTICA DE LA MANCHA	REFERENCIA
Alcaloides	Dragendorff	Color anaranjado	Harborne, (1998)
Amidas	Etanol al 10% en H ₂ SO ₄ al 98%	Se comparó con zonas particulares del extracto de etanol de <i>Piper nigrum</i> que ya han sido identificadas.	Jin et al., (2013)
	I ₂ /Ninhidrina	Color violeta o café	Stahl, (1969)
	Luz UV a 360 nm	Fluorescencia blanca	Stöhr et al., (2001)

		o azul comparadas con el extracto etanólico de <i>Piper nigrum</i> .	
Cumarinas	KOH al 5% en etanol absoluto (UV 360 nm)	Fluorescencia blanca o azul	Harborne, (1998)
Esteroides y/o Saponinas Esteroidales	Liebermann – Burchard	Color amarillo, verde o azul	Farnsworth, (1960)
Esteroles		Color rosa pálido, gris o amarillo claro	
Tri-terpénos y/o Saponinas Triterpénicas		Color morado	
Flavonoides	AlCl ₃ al 1% en etanol absoluto (UV 360 nm)	Fluorescencias blanca, amarilla, roja, verde, naranja y rosada.	
Lactonas	Kedde	Color violeta	Wagner and Blatt, (1996)
Taninos: hidrolizables y/o compuestos fenólicos; o taninos condensados	FeCl ₃ al 5% en HCl 0.5 N	Color azul aguamarina o azul oscuro para fenoles y/o taninos hidrolizables; color verde o café para taninos condensados	Harborne, (1998)
Quinonas	KOH al 5% en etanol absoluto (UV 360 nm)	Fluorescencias de color amarillo, naranja, rojo, o violeta.	

Tabla 4. Caracterización de Metabolitos secundarios del genero Piper. Caracterización fitoquímica por cromatografía de capa delgada (CCD) en los extractos alcohólicos de las plantas del género *Piper*.

Extracto (10000 ppm)	METABOLITOS SECUNDARIOS												
	ALCALOIDES	AMIDAS			CUMARINAS	ESTEROIDES Y/O SAPONINAS ESTEROIDALES	TRI-TERPÉNOS Y/O SAPONINAS TRI-TERPÉNICAS	ESTEROLES	FENOLES TANINOS HIDROLIZABLES Y/O	TANINOS CONDENSADOS	FLAVONOIDES	LACTONAS	QUINONAS
<i>Piper arborescens</i>	-	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	+++	-	-	-	+++
<i>Piper krukoffii</i>	-	+++	+++	++	+++	+++	-	++	+++	-	+++	-	+++
<i>Piper peltatum</i>	-	++	++	+++	++	+++	-	+++	+++	-	++	-	+++
<i>Piper tuberculatum</i>	-	+++	+++	++	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	-	+++
REVELADOR	Dragendorff	Etanol al 10% en H ₂ SO ₄	I ₂ /Ninhi drina	Luz UV a 360 nm	KOH al 5% en etanol absoluto (UV 360 nm)	Liebermann-Burchard			FeCl ₃ al 5% en HCl 0.5 N		AICl ₃ al 1% en etanol absoluto (360 nm)	Kedde	KOH al 5% en etanol absoluto (360 nm)
PATRÓN (300 ppm)	Quinina	Extracto de etanol de <i>Piper nigrum</i>			7-Hidroxi- Cumarina	β-Estradiol, Colesterol, Diosgenina, Hecogenina, Lanosterol Lupeol			Estigmasterol, Ácido gálico		Naringenina	Digitoxina	Antraquin ona

 Posible compuesto con estructura química similar a la 7-Hidróxi-cumarina

- +Presencia mínima del metabolito
- ++Presencia media del metabolito
- +++Alta presencia del metabolito
- No hay presencia del metabolito

Tabla 5. Caracterización de Metabolitos secundarios de plantas de la familia Euphorbiaceae. Caracterización fitoquímica por cromatografía de capa delgada (CCD) en los extractos alcohólicos de *Achalypha diversifolia* Jacq y *Alchornea calophylla*.

EXTRACTO 1000 ppm	METABOLITOS SECUNDARIOS					
	FENOLES Y TANINOS	TERPENOS	SAPONINAS	FLAVONOIDES	LACTONAS Y SESQUITERPENL ACTONAS	CUMARINAS
<i>Achalypha diversifolia</i>	+++	+	-	++	-	-
<i>Alchornea calophylla</i>	++	+	-	+++	-	-
REVELEDOR	FeCl ₃ al 5% en HCl 0.5 N	Liebermann-Burchard		AlCl ₃ al 1% en etanol absoluto (360 nm)	Kedde	KOH al 5% en etanol absoluto (uv 360 nm)
PATRÓN (300 ppm)	Ácido gálico	Lupeol	Digitonina	Apigenina	Digitóxina	Hidroxicumarina

+Presencia mínima del metabolito
 ++Presencia media del metabolito
 +++Alta presencia del metabolito
 -No hay presencia del metabolito

4.2 Discusión

Los metabolitos secundarios cumplen funciones protectores en las plantas, estos metabolitos se acumulan como compuestos de bajo peso molecular para facilitar su desplazamiento. Los metabolitos son enviados como respuesta hipersensible ante la invasión de un patógeno, inhibiendo la acción de bacterias, hongos etc. Otra función que cumplen los metabolitos, es su participación en la inactivación de radicales libres y la capacidad de las amidas para generar una mayor rigidez en la pared celular y de los alcaloides que pueden actuar como neurotóxicos para evitar el daño provocado por herbívoros o insectos.[90]

El número de estudios de los metabolitos secundarios se ha elevado en los últimos 50 años, al representar una fuente importante de compuestos con actividad farmacológica,

llevando a la industria farmacéutica a desarrollar estrategias donde se intentan obtener estos metabolitos a partir de cultivos celulares de plantas.[91]

Para el caso de la salud humana, se busca en los metabolitos secundarios la cura o tratamiento de enfermedades que van desde el control o erradicación de tumores, cáncer [92], autoinmunes, como la modulación de células TH2 y la activación de células eosinófilos [93], hasta el tratamiento de enfermedades tan complejas como las neurodegenerativas.

El caracterizar metabolitos secundarios es una oportunidad en la tarea de establecer que tipo de compuestos estarían actuando sobre una enfermedad, esto ha permitido desarrollar medicamentos como el Taxol, droga de origen natural y utilizada para el tratamiento del cáncer.[94] El análisis fitoquímico realizado a las especies de la familia Piperaceae mostró en común la ausencia de compuestos perteneciente a la familia de alcaloides, triterpénos y/o saponinas triterpénicas, taninos condensados y lactonas. Sin embargo presencia positiva de compuestos amidas, cumarinas, esteroides y/o saponinas esteroidales, esteroles, fenoles y/o taninos hidrolizables, flavonoides y quinonas.

Los compuestos del grupo amida mostraron una alta presencia con los tres reveladores empleados. Las amidas se caracterizan por la conexión entre un grupo amina y un grupo acilo. Estas tienen gran importancia en el campo de la farmacología, uno de los mejores ejemplos recaé en el Gambogic amida, esta es una molécula agonista para el receptor de Tropomiosina receptor kinasa A (TrkA) por lo cual es capaz de imitar las funciones prosupervivencia del factor de crecimiento nervioso, además de prevenir la muerte neuronal inculda por la excesiva liberación de glutamato y es capaz de promover el crecimiento de neuritas en las células PC12. [95] Otros compuestos derivados de amidas han mostrado propiedades antioxidantes evitando la peroxidación de lípidos y la producción de radicales libres que se puedan producir después de una isquemia cerebral o en desordenes neurodegenerativos. Otro derivado es la palmitoiletanolamida compuesto similar a los endocannabinoides aislado por primera vez de la lecitina de soya poseen actividad anti-inflamatoria y modulación del sistema inmune. [96,97]

Se determinó en los extractos la presencia de cumarinas en tres especies del género piper; la *Piper peltatum*, la *Piper Krukoffi* y la *Piper tuberculatum*. Con mayor presencia

en las dos últimas. Las cumarinas conocidas desde 1820 cuando fueron aisladas, consideradas en primera aproximación lactonas de los ácidos 2-hidroxi-Z-cinámicos. Todas las cumarinas se encuentran sustituidas en C-7 por un hidróxilo, en conclusión pueden sufrir modificaciones que dan origen a varios compuestos farmacológicos, entre ellos: la Cumarina, Kellina, Visnadina, Bergapteno, Xantotoxina. Las cumarinas han demostrado cualidades positivas, ejemplo son algunas con propiedades vasodilatadoras coronarias y actividad favorable en los trastornos del envejecimiento cerebral, además por sus propiedades antiedematosas, se ha utilizado en la realización de estudios clínicos en pacientes con cánceres avanzados, por su condición inmunoestimulante y actividad citotóxica.[98]

La presencia de saponinas esteroidales se evidenció en los extractos alcohólicos de las plantas analizadas, estos compuestos igualmente se han encontrado en extractos de plantas del género *Paris* de la familia Liliaceae y son utilizados en la medicina tradicional China para el tratamiento de tumores, como agentes analgésicos y antimicrobials.[99] Otro ejemplo radica en plantas pertenecientes al género *Solanum* en las cuales se han encontrado este tipo de compuestos y algunos aislados siendo nuevos para la comunidad científica, sin embargo la actividad biológica para contrarrestar úlceras inducidas en ratones, la ha mostrado los extractos alcohólicos con notable eficacia.[100]

Las quinonas son dicetonas cíclicas, son portadoras de electrones que les permite tomar un papel importante en la fotosíntesis. Como vitaminas, ellas representan una clase de moléculas que previenen y tratan algunas enfermedades como la osteoporosis y enfermedades cardiovasculares. Otros compuestos a base de quinonas están en fase de ensayo clínico para tratar el cáncer.[101]

Aunque se considera de vital importancia los metabolitos antes mencionados, se destaca el hallazgo de la alta presencia de compuestos fenólicos en los extractos alcohólicos del género *Piper*. Los fenoles son compuestos con una alta actividad antioxidante, dicha acción se basa por su capacidad de secuestrar radicales libres y de quelación de metales, formando compuestos de transición más estables y menos reactivos, debido a la presencia de anillos aromáticos y grupos hidroxilo en su estructura que permiten la deslocalización de electrones. A los fenoles se les atribuye propiedades antimicrobianas y antimutagénicas, inhiben *in vitro* las lipoproteínas de baja densidad (LDL) relacionadas

con enfermedades coronarias y protegen el ADN del daño oxidativo que tiene graves consecuencias en algunos cánceres relacionados con la edad, además inhiben la agregación plaquetaria y presentan efectos antiinflamatorios. [102]

Los flavonoides se caracterizan por ser polifenoles de bajo peso molecular, en su mayoría son compuestos que se encuentran en frutas, vegetales, en bebidas de té, por lo tanto hacen parte de nuestra dieta [103], su alta distribución y cantidad proporcionan actividad antioxidante, antiulcero, antibacteriana, antiinflamatoria, y analgésicas [104]. Uno de sus compuestos ejemplos es la quercetina, hesperidina, naringenina, rutina. Que pueden tener una actividad antilipoperoxidante dependiendo de la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica del flavonoides, así podrá actuar sobre membranas celulares o macromoléculas.[105] Los flavonoides además han mostrado actividad de protección ante la reperfusión después de una isquemia aguda al miocardio. Los flavonoides actúan ante la producción de ERO ocasionado por el desacoplamiento del complejo I y III de la cadena respiratoria, o en los canales de potasio que ocasionan la apertura irreversible del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm).[106]

La mayoría de compuestos que están considerados antioxidantes, antiinflamatorios, o de captura de radicales libres se encuentran en la familia de los flavonoides y/o compuestos fenólicos. Estos hicieron parte de los metabolitos secundarios a caracterizar en esta investigación, con presencia positiva de los mismos en los extractos alcohólicos de las especies de Pipereaceae y Euphorbiaceae. Implica que la actividad neuroprotectora reace sobre este tipo de compuestos.

5. Ensayo de citotoxicidad y neuroprotección de los extractos alcohólicos en las líneas celulares CAD y MO3.13

5.1 Resultados

5.1.1 Stocks de los extractos

Los seis extractos entre metanólicos y etanólicos fueron diluidos en DMSO concentrado, llevados a una concentración inicial de 800mg/ml. Estos stocks fueron almacenados a una temperatura de -20°C, y los extractos crudos almacenados a 4 °C.

5.1.2 Prueba de Citotoxicidad del DMSO en células CAD y MO3.13

El dimetilsulfóxido es un compuesto altamente polar, el cual fue utilizado para disolver los extractos. Por lo cual era necesario probar su toxicidad en las líneas celulares CAD y MO3.13. La línea celular CAD fue diferenciada por 48 horas. (Anexo 2). Las CAD eran tomadas de las cajas de cultivos, sembrando 7000 cel/pozo en caja de 96 pozos, agregando 200ml/pozo de DMEM F12+SFB 0.25%. La línea celular MO3.13 fue diferenciada por 120 horas, sembrando 50000 cel/pozo en caja de 96 pozos, en medio DMEM+PMA. Se evaluó la concentración DMSO más alta depositada en las células diferenciadas calculada en 0.02%. El estudio se realizó por 24 horas de exposición del DMSO en células CAD y MO3.13, la viabilidad celular fue medida por MTT.

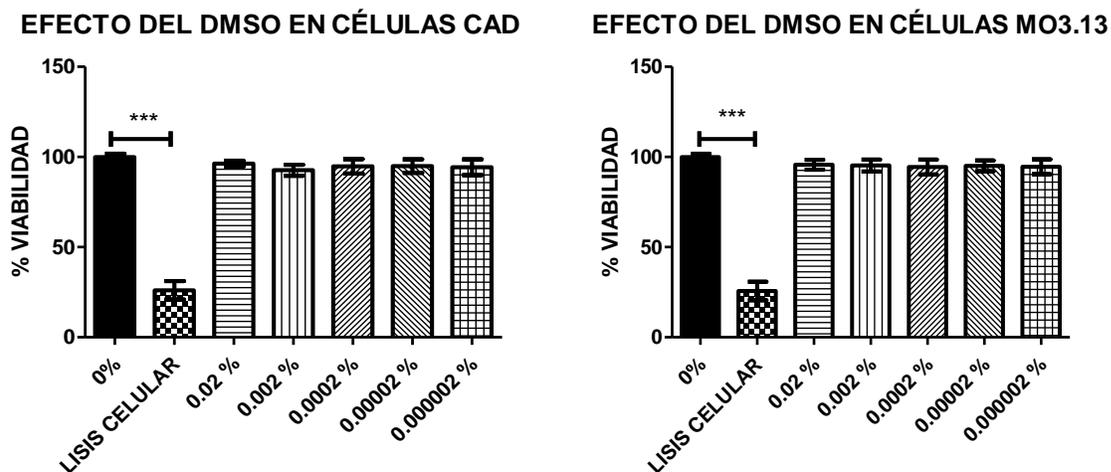


Figura 5.1. Toxicidad del DMSO en células CAD y MO3.13. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" *** $p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a la células no tratadas con DMSO (barra negra).

5.1.3 Toxicidad de los extractos alcohólicos en las líneas celulares CAD y MO3.13.

La concentración máxima utilizada de los extractos en las células CAD y MO3.13 diferenciadas fue de 160ug/ml, dosis de partida y bajando su concentración a la mitad. Obteniendo las siguientes dosis 160, 80, 40, 20, 10 ug/ml. (Anexo 3)

Los ensayos fueron realizados en dos periodos de tiempo (6 y 24 horas). Los extractos del genero *Piper*, mostraron una alta toxicidad a bajas concentraciones en las dos líneas celulares (CAD y MO3.13). Un mayor tiempo de exposición de las células a los extractos del genero *Piper* generaron una menor viabilidad. El extracto de *Piper peltatum*, mostró la más alta toxicidad en las líneas celulares demostrado por la baja viabilidad celular en las dos líneas celulares

- Toxicidad de los extractos alcohólicos en células CAD

En la Tabla 5.1 se relacionan los resultados de toxicidad que presentaron los extractos alcohólicos en la línea celular CAD, en concentraciones decrecientes en dos tiempos de tratamientos (6 y 24 horas)

Tabla 6.Efecto de los extractos alcohólicos en células CAD. Las células CAD fueron diferenciadas por 48 horas y luego expuestas a 5 concentraciones decrecientes de los extractos alcohólicos durante 6 y 24 horas respectivamente. La viabilidad celular se calculó mediante el reactivo de MTT continuando con un periodo de incubación de dos horas. La fluorescencia fue medida a una D.O de 492nm. Los valores representan la media \pm D.E de mínimo 3 experimentos independientes cada uno con 5 réplicas de cada concentración de extracto alcohólico analizado. $p \geq 0.05$.

Extracto etanólico	6 HORAS		24 HORAS	
	Concentración del extracto	Viabilidad celular	Concentración del extracto	Viabilidad celular
<i>Piper peltatum</i> (P.P)	0 ug/ml	100,0 \pm 7,093	0 ug/ml	100,0 \pm 3,999
	160 ug/ml	35,57 \pm 5,734	160 ug/ml	13,63 \pm 0,8554
	80 ug/ml	49,88 \pm 2,374	80 ug/ml	14,15 \pm 0,9529
	40 ug/ml	64,67 \pm 4,500	40 ug/ml	14,68 \pm 0,9097
	20 ug/ml	83,51 \pm 5,090	20 ug/ml	20,42 \pm 2,245
	10 ug/ml	96,26 \pm 3,249	10 ug/ml	74,40 \pm 9,778
<i>Piper krukoffii</i> (P.K)	0 ug/ml	100,0 \pm 1,628	0 ug/ml	100,0 \pm 6,889
	160 ug/ml	28,75 \pm 4,509	160 ug/ml	18,65 \pm 2,760
	80 ug/ml	71,00 \pm 11,50	80 ug/ml	14,53 \pm 0,8668
	40 ug/ml	86,18 \pm 3,108	40 ug/ml	44,93 \pm 6,635
	20 ug/ml	97,47 \pm 4,473	20 ug/ml	87,23 \pm 7,176
	10 ug/ml	100,9 \pm 6,633	10 ug/ml	102,7 \pm 5,446
<i>Piper tuberculatum</i> (P.T)	0 ug/ml	100,0 \pm 7,688	0 ug/ml	100,0 \pm 6,404
	160 ug/ml	65,77 \pm 7,767	160 ug/ml	12,16 \pm 1,062
	80 ug/ml	74,81 \pm 2,564	80 ug/ml	15,01 \pm 0,4420
	40 ug/ml	85,77 \pm 5,968	40 ug/ml	29,59 \pm 3,305
	20 ug/ml	99,55 \pm 7,507	20 ug/ml	75,01 \pm 5,173
	10 ug/ml	101,7 \pm 12,95	10 ug/ml	91,44 \pm 4,543
<i>Piper arboreum</i> (P.A)	0 ug/ml	100,0 \pm 9,467	0 ug/ml	100,0 \pm 8,922
	160 ug/ml	92,49 \pm 2,042	160 ug/ml	55,30 \pm 3,589
	80 ug/ml	89,66 \pm 6,298	80 ug/ml	64,93 \pm 6,885
	40 ug/ml	99,48 \pm 2,459	40 ug/ml	76,75 \pm 6,755
	20 ug/ml	99,32 \pm 8,099	20 ug/ml	90,33 \pm 10,13
	10 ug/ml	92,37 \pm 5,968	10 ug/ml	92,52 \pm 8,668
<i>Achalipha diversifolia</i> (A.D)	0 ug/ml	100,0 \pm 2,895	0 ug/ml	100,0 \pm 4,124
	160 ug/ml	100,4 \pm 2,962	160 ug/ml	56,38 \pm 2,520
	80 ug/ml	90,79 \pm 4,601	80 ug/ml	67,74 \pm 2,182
	40 ug/ml	95,25 \pm 2,972	40 ug/ml	78,78 \pm 4,850
	20 ug/ml	99,89 \pm 3,044	20 ug/ml	85,32 \pm 7,241
	10 ug/ml	102,8 \pm 4,826	10 ug/ml	92,47 \pm 6,761
<i>Alchornea calophylla</i> (A.C)	0 ug/ml	100,0 \pm 2,857	0 ug/ml	100,0 \pm 2,490
	160 ug/ml	82,44 \pm 2,649	160 ug/ml	70,73 \pm 1,635
	80 ug/ml	96,00 \pm 3,962	80 ug/ml	74,21 \pm 2,792
	40 ug/ml	92,43 \pm 5,017	40 ug/ml	85,84 \pm 4,776
	20 ug/ml	95,76 \pm 1,927	20 ug/ml	83,44 \pm 4,551
	10 ug/ml	103,9 \pm 1,328	10 ug/ml	93,45 \pm 1,870

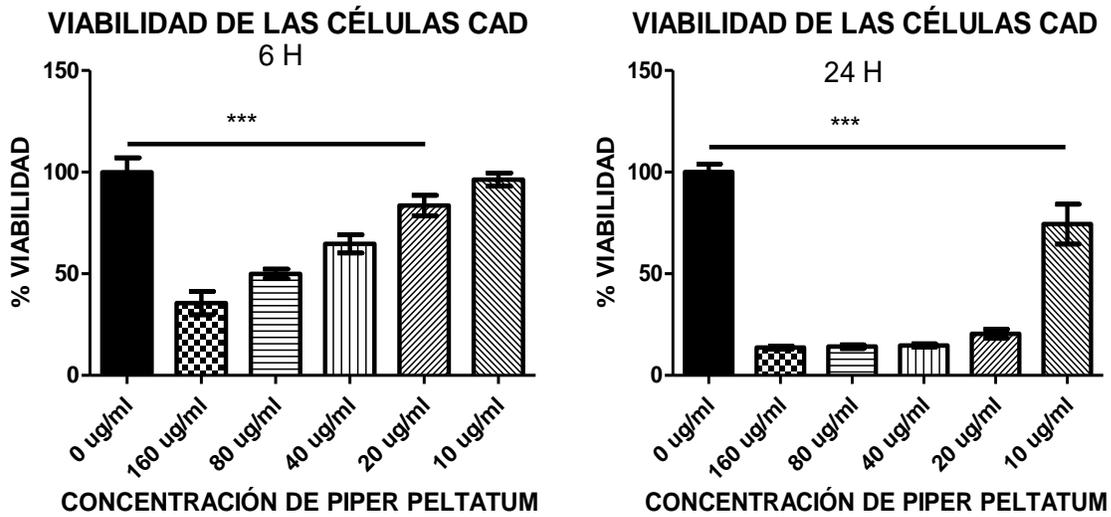


Figura 8. Toxicidad del Piper peltatum en células CAD diferenciadas por 48 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

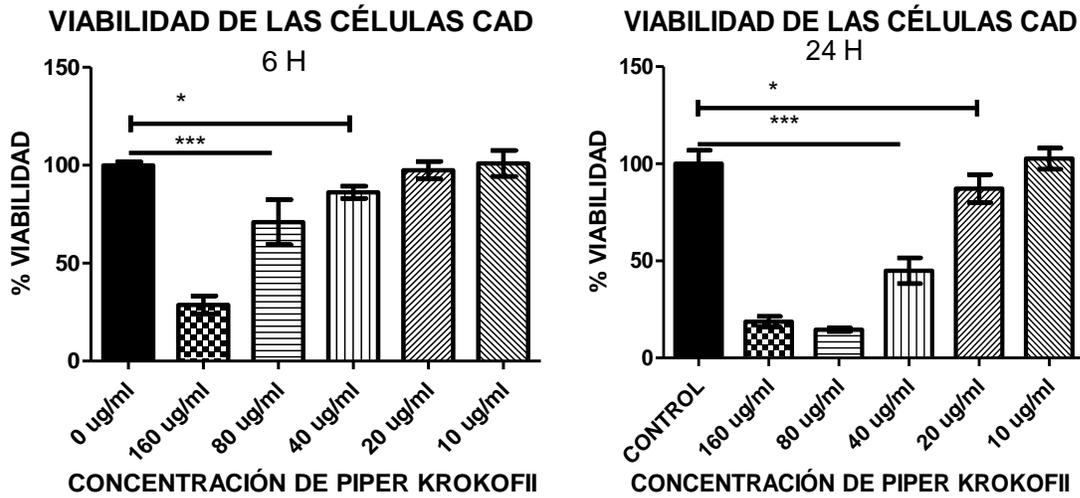


Figura 9. Toxicidad del Piper krokofii en células CAD diferenciadas por 48 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a la células no tratadas con el extracto (barra negra).

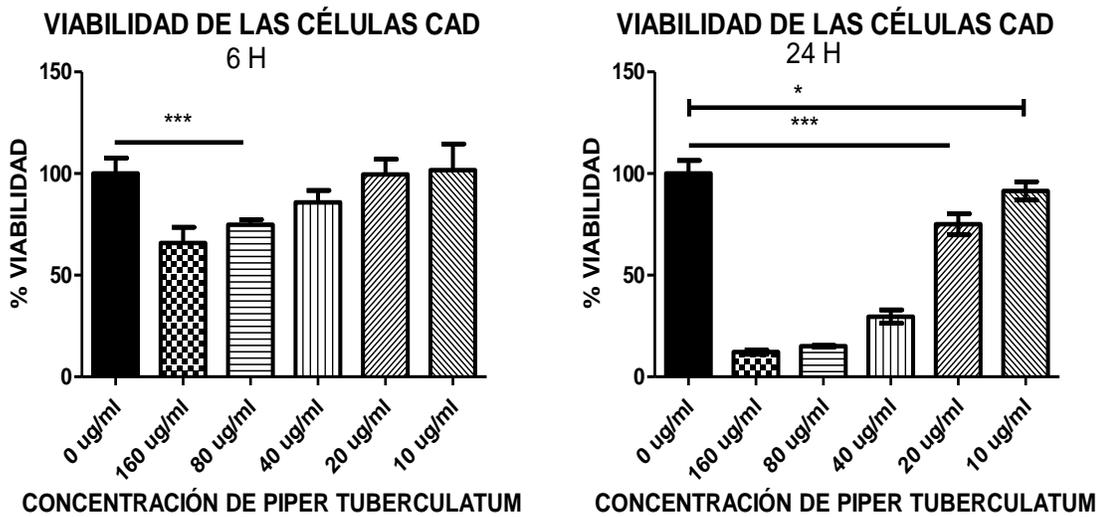


Figura 10. Toxicidad del Piper tuberculatum en células CAD diferenciadas por 48 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a la células no tratadas con el extracto (barra negra).

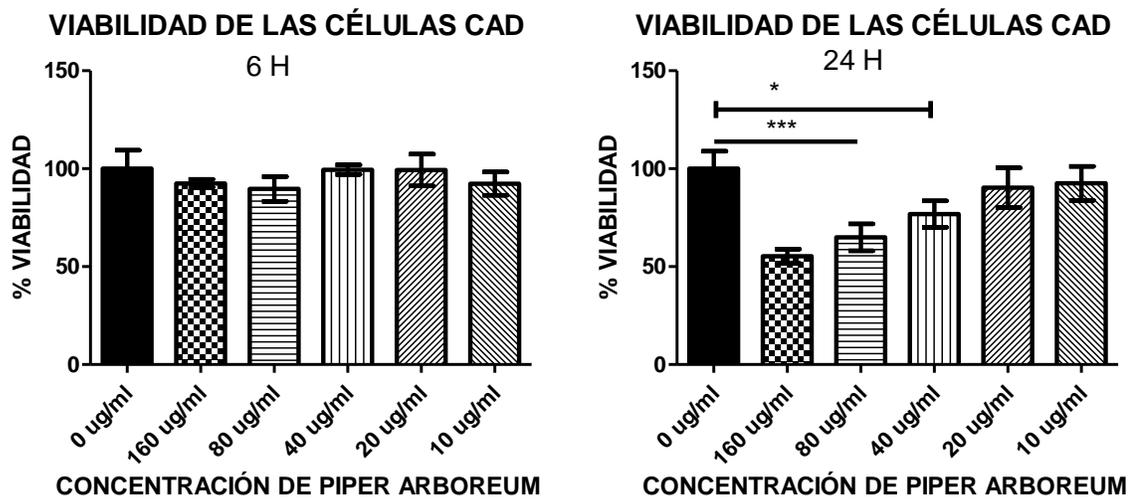


Figura 11. Toxicidad del Piper arboreum en células CAD diferenciadas por 48 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a la células no tratadas con el extracto (barra negra). Sin embargo para el tratamiento de 6 horas no se encontraron diferencias en el análisis de varianza de una sola vía ni entre las medias $***p < 0.05$.

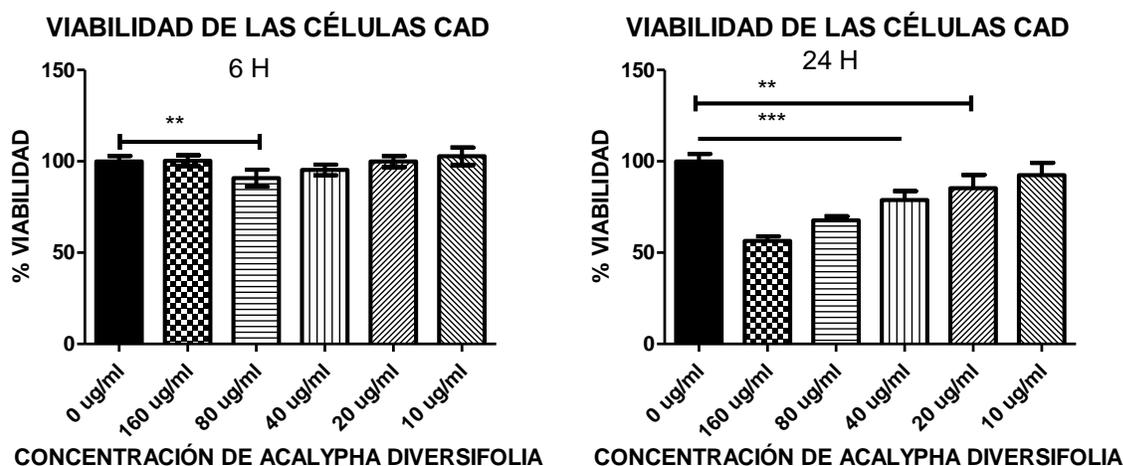


Figura 12. Toxicidad del *Acalypha diversifolia* en células CAD diferenciadas por 48 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

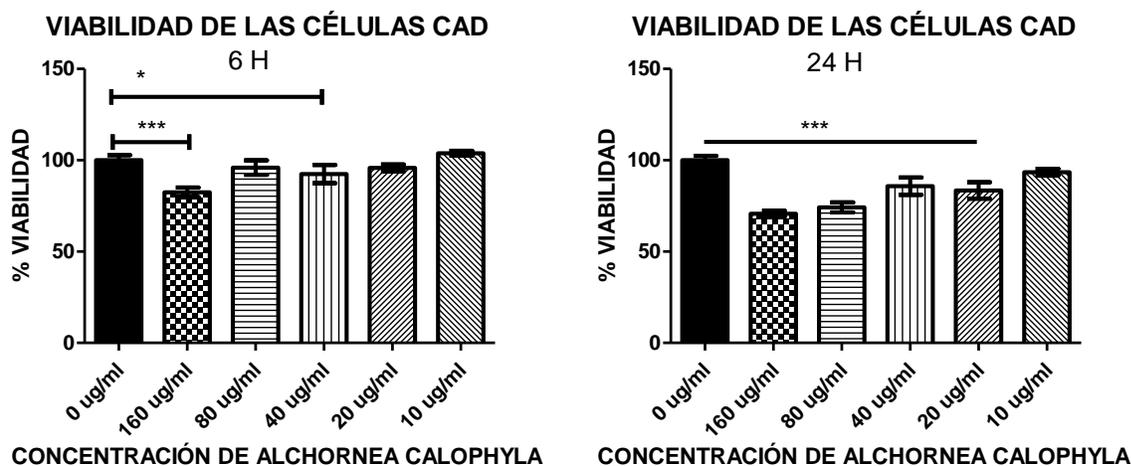


Figura 13. Toxicidad del *Alchornea calophylla* en células CAD diferenciadas por 48 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

- Toxicidad de los extractos alcohólicos en células MO3.13

En la Tabla 3.2 se relacionan los resultados de toxicidad que presentaron los extractos alcohólicos en la línea celular MO3.13, en concentraciones decrecientes en dos tiempos de tratamientos (6 y 24 horas)

Tabla 7. Efecto de los extractos alcohólicos en células MO3.13. Las células MO3.13 fueron diferenciadas por 120 horas y luego expuestas a 5 concentraciones decrecientes de los extractos alcohólicos durante 6 y 24 horas respectivamente. La viabilidad celular se calculó mediante el reactivo de MTT continuando con un periodo de incubación de dos horas. La fluorescencia fue medida a una D.O de 492nm. Los valores representan la media \pm D.E de mínimo 3 experimentos independientes cada uno con 5 réplicas de cada concentración de extracto alcohólico analizado. $p \geq 0.05$.

Extracto etanólico	6 HORAS		24 HORAS	
	Concentración del extracto	Viabilidad celular	Concentración del extracto	Viabilidad celular
<i>Piper peltatum</i> (P.P)	0 ug/ml	100,0 \pm 19,30	0 ug/ml	100,0 \pm 5,367
	160 ug/ml	25,58 \pm 4,395	160 ug/ml	43,85 \pm 4,502
	80 ug/ml	39,42 \pm 4,153	80 ug/ml	42,63 \pm 9,201
	40 ug/ml	70,48 \pm 13,50	40 ug/ml	35,86 \pm 4,717
	20 ug/ml	93,83 \pm 9,933	20 ug/ml	47,60 \pm 10,27
	10 ug/ml	112,6 \pm 15,21	10 ug/ml	61,00 \pm 6,854
<i>Piper krukoffi</i> (P.K)	0 ug/ml	100,0 \pm 9,064	0 ug/ml	100,0 \pm 4,286
	160 ug/ml	53,04 \pm 5,371	160 ug/ml	46,58 \pm 4,213
	80 ug/ml	62,08 \pm 8,270	80 ug/ml	62,05 \pm 6,560
	40 ug/ml	82,59 \pm 4,634	40 ug/ml	65,82 \pm 3,549
	20 ug/ml	97,39 \pm 9,090	20 ug/ml	72,83 \pm 2,996
	10 ug/ml	98,19 \pm 8,191	10 ug/ml	80,22 \pm 5,204
<i>Piper tuberculatum</i> (P.T)	0 ug/ml	100,0 \pm 9,064	0 ug/ml	100,0 \pm 4,286
	160 ug/ml	44,12 \pm 5,099	160 ug/ml	54,29 \pm 9,032
	80 ug/ml	46,56 \pm 2,042	80 ug/ml	49,07 \pm 1,876
	40 ug/ml	56,36 \pm 1,900	40 ug/ml	73,54 \pm 5,575
	20 ug/ml	69,36 \pm 5,934	20 ug/ml	85,48 \pm 4,141
	10 ug/ml	76,64 \pm 8,277	10 ug/ml	94,48 \pm 5,337
<i>Piper arboreum</i> (P.A)	0 ug/ml	100,0 \pm 9,064	0 ug/ml	100,0 \pm 11,83
	160 ug/ml	78,47 \pm 7,378	160 ug/ml	63,16 \pm 12,84
	80 ug/ml	101,8 \pm 7,394	80 ug/ml	91,75 \pm 5,155
	40 ug/ml	103,0 \pm 10,33	40 ug/ml	106,3 \pm 12,45
	20 ug/ml	114,5 \pm 11,41	20 ug/ml	86,45 \pm 6,508
	10 ug/ml	114,6 \pm 6,878	10 ug/ml	85,32 \pm 5,211
<i>Achalipha diversifolia</i> (A.D)	0 ug/ml	100,0 \pm 19,30	0 ug/ml	100,0 \pm 5,367
	160 ug/ml	61,18 \pm 3,854	160 ug/ml	61,45 \pm 3,391
	80 ug/ml	77,79 \pm 5,930	80 ug/ml	81,07 \pm 18,36
	40 ug/ml	88,42 \pm 12,08	40 ug/ml	74,65 \pm 12,77
	20 ug/ml	99,11 \pm 13,09	20 ug/ml	66,15 \pm 6,342
	10 ug/ml	97,92 \pm 11,33	10 ug/ml	63,87 \pm 3,958
<i>Alchornea calophylla</i> (A.C)	0 ug/ml	100,0 \pm 9,064	0 ug/ml	100,0 \pm 11,93
	160 ug/ml	101,9 \pm 13,49	160 ug/ml	61,10 \pm 4,535
	80 ug/ml	104,5 \pm 13,04	80 ug/ml	54,95 \pm 1,707
	40 ug/ml	118,9 \pm 11,14	40 ug/ml	61,30 \pm 1,675
	20 ug/ml	103,8 \pm 12,47	20 ug/ml	66,69 \pm 4,220
	10 ug/ml	127,2 \pm 6,855	10 ug/ml	73,30 \pm 2,461

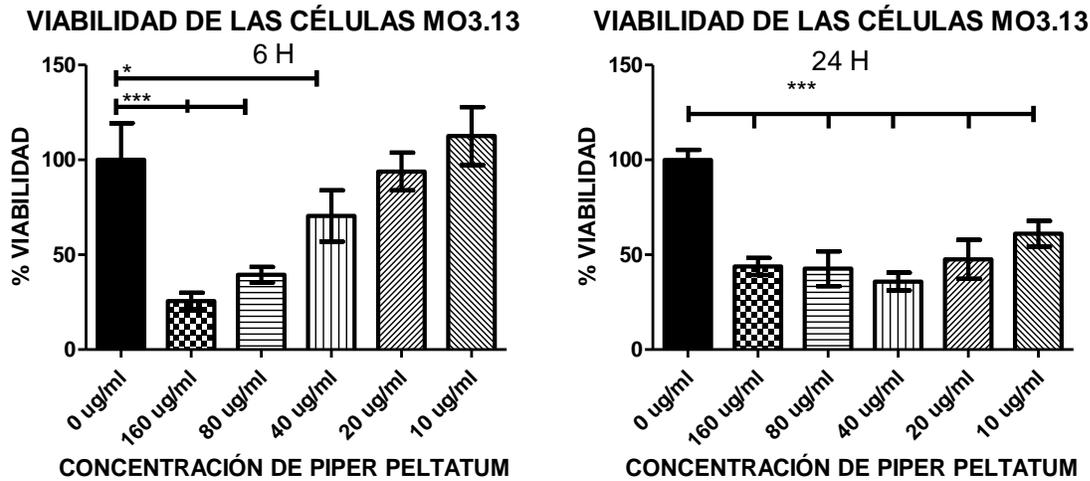


Figura 14. Toxicidad del Piper peltatum en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

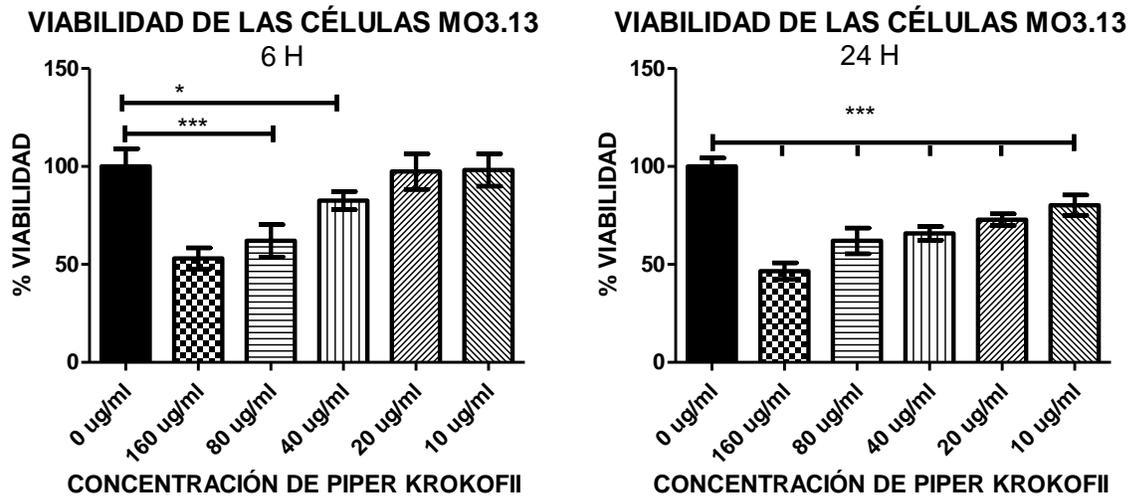


Figura 15. Toxicidad del Piper krukofii en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

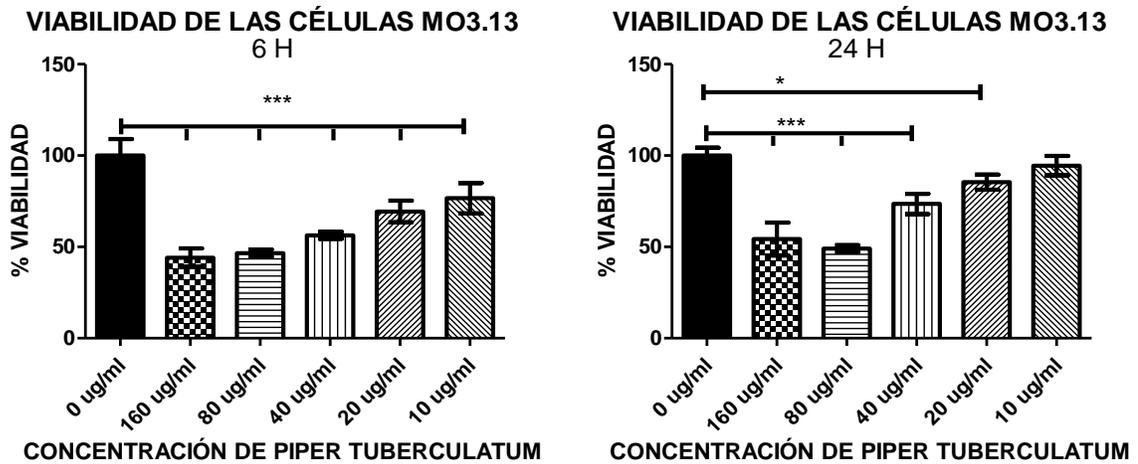


Figura 16. Toxicidad del *Piper tuberculatum* en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

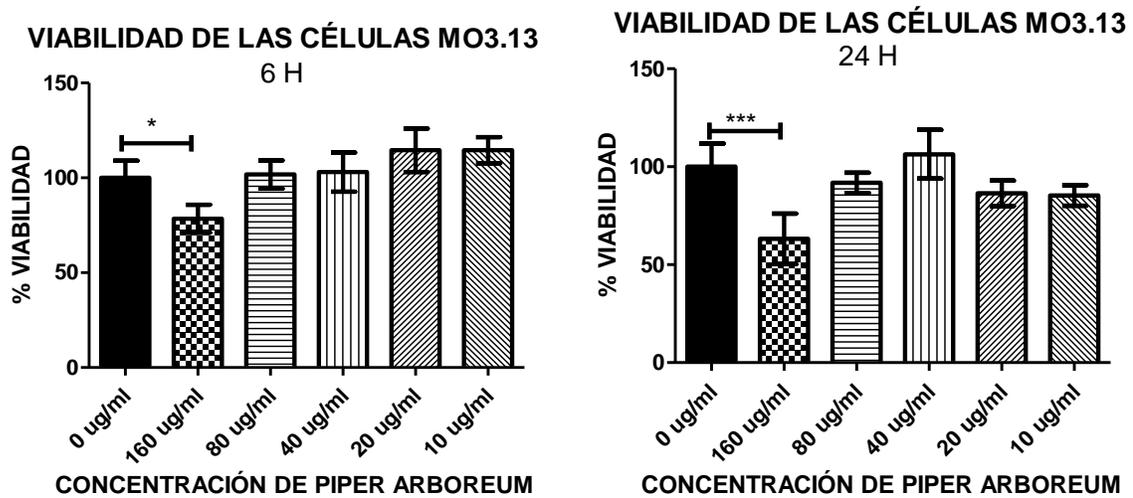


Figura 17. Toxicidad del *Piper arboreum* en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

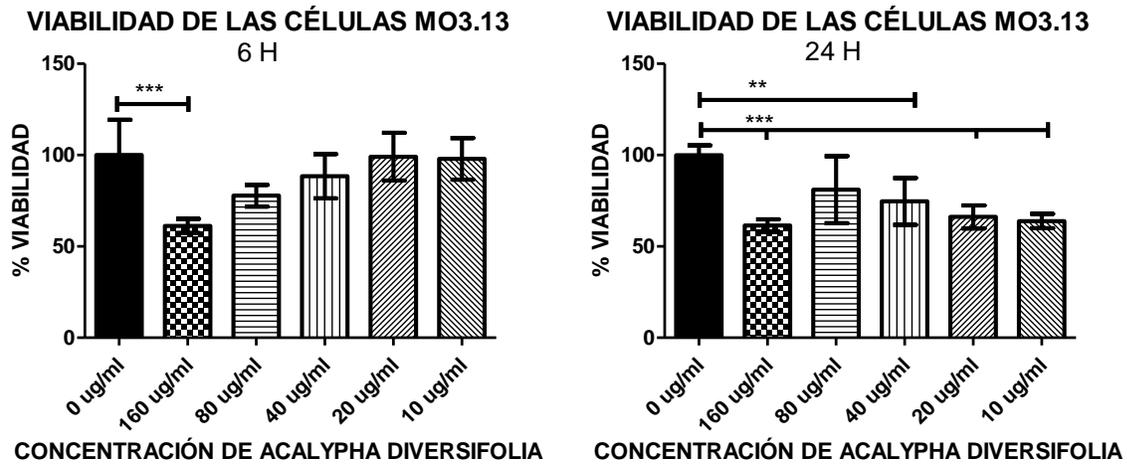


Figura 18. Toxicidad del *Acalypha diversifolia* en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

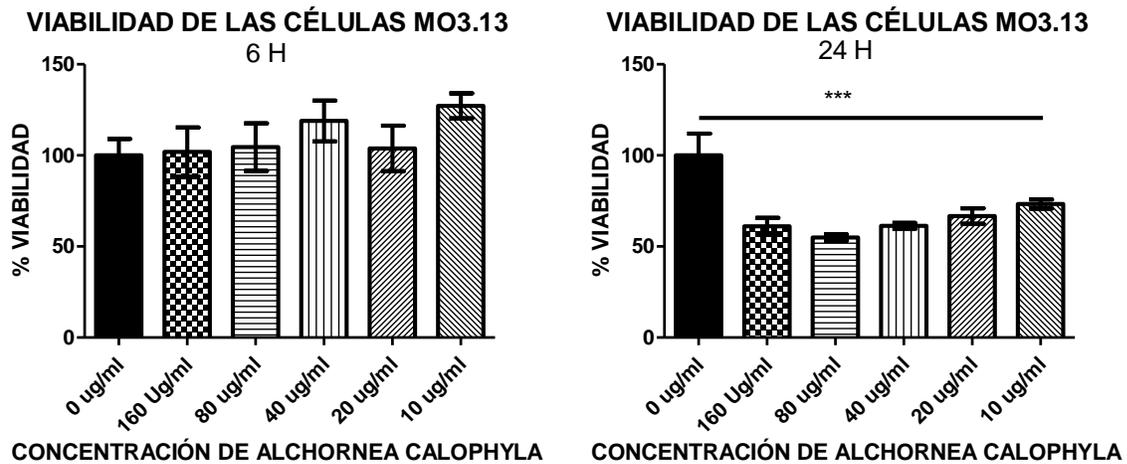


Figura 19. Toxicidad del *Alchornea calophylla* en células MO3.13 diferenciadas por 120 horas. Los valores representan el promedio +/- DE (Desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con 5 réplicas. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$. Comparaciones realizadas respecto a las células no tratadas con el extracto (barra negra).

5.2 Ensayo de neuroprotección de los extractos alcohólicos en células CAD y MO3.13

5.2.1 Ensayo de dosis L50 de C2-ceramida en las células CAD y MO3.13

Para este ensayo se estandarizo la concentración de C2-ceramida necesaria para provocar la muerte celular comprendida entre el 40-65% en las células de las líneas celulares CAD y MO3.13 , la concentración de este neurotóxico en las células CAD se determinó mediante un estudio rápido teniendo en cuenta lo reportado por el grupo de Muerte Celular de la Universidad Nacional de Colombia dirigido por el docente Gonzalo Humberto Arboleda Bustos y modificado levemente (Figura 4.1). Para las células MO3.13 se realizaron los ensayos respectivos para determinar la dosis L₅₀ de C2-ceramida (Figura 4.2).

Para este ensayo se tuvo en cuenta los datos arrojados en el ensayo de toxicidad de los extractos etanólicos del capítulo anterior. Se trabajó con tres concentraciones del extracto en dos tiempos distintos (6 y 24H).

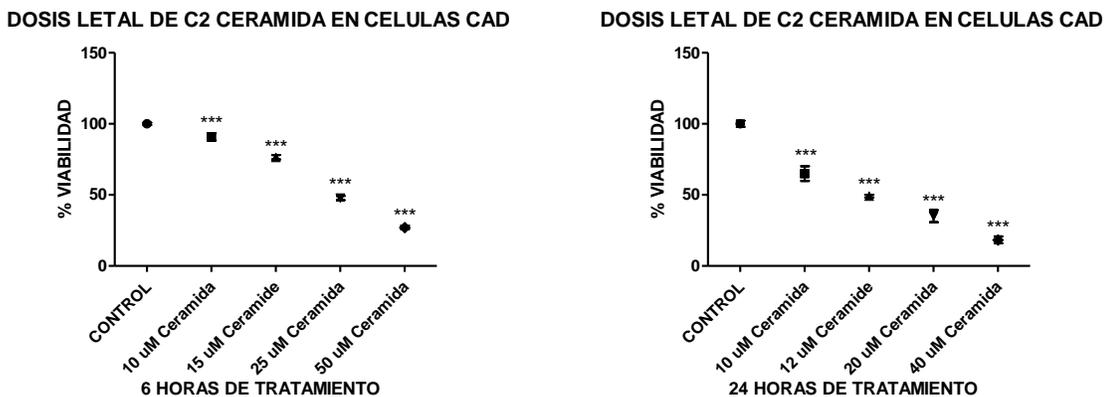


Figura 20. Dosis letal 50 de ceramida en células CAD. Las CAD fueron diferenciadas por 48 horas y sometidas a una concentración creciente de C2-ceramida por un periodo de 6 y 24 horas. La viabilidad fue calculada por el método de MTT. Los resultados representan la media \pm D.E de dos experimentos independientes con 5 réplicas, los datos fueron analizados por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de una prueba de comparación de media de Dunnett, utilizando el programa informático GraphPadPrism versión 5.0. Se consideró $P \leq 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

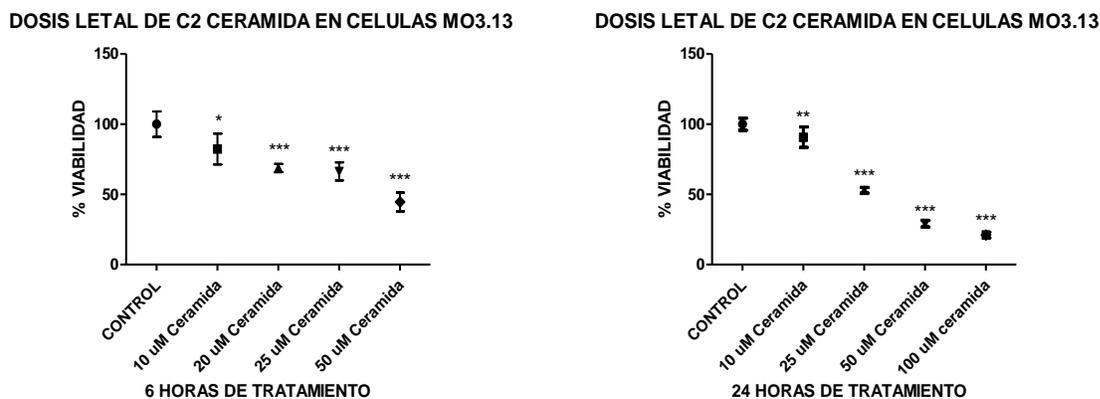


Figura 21. Dosis letal 50 de ceramida en células MO3.13. Las MO3.13 fueron diferenciadas por 120 horas y sometidas a una concentración creciente de C2-ceramida por un periodo de 6 y 24 horas. La viabilidad fue calculada por el método de MTT. Los resultados representan la media \pm D.E de dos experimentos independientes con 5 réplicas, los datos fueron analizados por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de una prueba de comparación de media de Dunnett, utilizando el programa informático GraphPadPrism versión 5.0. Se consideró $p \leq 0.05$ como valor estadísticamente significativo.

5.2.2 Viabilidad mitocondrial de las células CAD

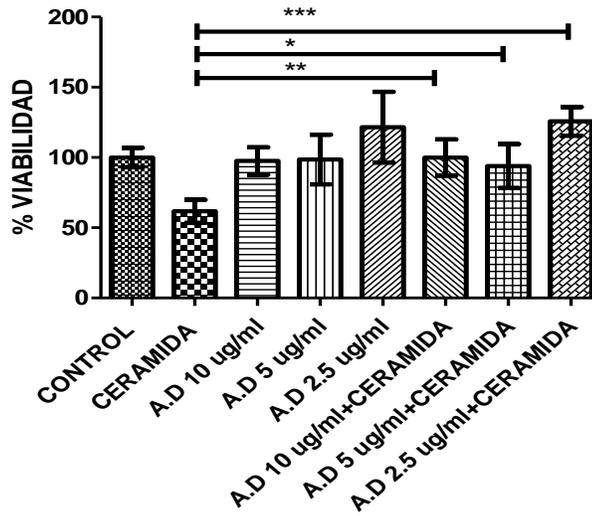
Las células CAD fueron diferenciadas por 48 horas, pretratadas con los extractos alcohólicos con tres concentraciones considerados no tóxicas, luego de una hora a las células se les agregó la concentración de C2-ceramida para causar el daño en la viabilidad mitocondrial.

En la Tabla 5.3 se relacionan el efecto de los extractos etanólicos sobre la viabilidad de las células CAD tratadas con C2 ceramida (25µM) y (12µM), en 6 y 24 horas de tratamientos respectivamente.

Tabla 8.Efecto de los extractos alcohólicos en células CAD sometidas al neurotóxico. Las células CAD fueron diferenciadas por 48 horas. Se realizó un pretratamiento con los extractos alcohólicos con 3 concentraciones decrecientes durante 6 y 24 horas respectivamente. La viabilidad celular se calculó mediante el reactivo de MTT continuando con un periodo de incubación de dos horas. La fluorescencia fue medida a una D.O de 492nm. Los valores representan la media \pm D.E de mínimo 3 experimentos independientes cada uno con 4 réplicas de cada uno de los tratamientos. La comparación .se realizó para cada uno de los tratamientos vs Tratamientos ceramida $p \geq 0.05$.

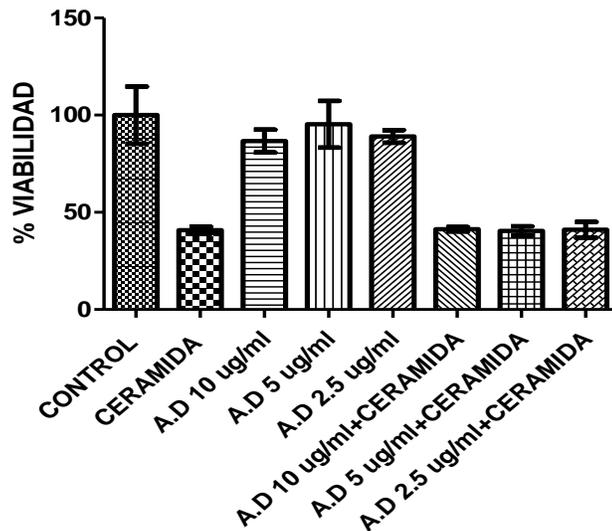
Extracto etanólico	6 HORAS		24 HORAS	
	Tratamientos	Viabilidad celular	Tratamientos	Viabilidad celular
<i>Achalapha diversifolia</i> (A.D)	CONTROL	100,0 \pm 6,857	CONTROL	100,0 \pm 14,67
	CERAMIDA	61,67 \pm 8,169	CERAMIDA	40,82 \pm 1,731
	A.D 10 ug/ml	97,54 \pm 9,769	A.D 10 ug/ml	86,70 \pm 5,918
	A.D 5 ug/ml	98,62 \pm 17,65	A.D 5 ug/ml	95,32 \pm 12,05
	A.D 2.5 ug/ml	121,6 \pm 25,22	A.D 2.5 ug/ml	89,10 \pm 3,233
	A.D 10 ug/ml+CERAMIDA	99,97 \pm 12,87	A.D 10 ug/ml+CERAMIDA	41,33 \pm 1,090
	A.D 5 ug/ml+CERAMIDA	93,94 \pm 15,67	A.D 5 ug/ml+CERAMIDA	40,48 \pm 2,391
	A.D 2.5 ug/ml+CERAMIDA	125,7 \pm 10,14	A.D 2.5 ug/ml+CERAMIDA	41,01 \pm 4,031
<i>Piper peltatum</i> (P.P)	CONTROL	100,0 \pm 6,857	CONTROL	100,0 \pm 14,67
	CERAMIDA	61,67 \pm 8,169	CERAMIDA	40,82 \pm 1,731
	P.P 5 ug/ml	137,5 \pm 25,46	P.P 5 ug/ml	87,71 \pm 2,261
	P.P 2.5 ug/ml	113,4 \pm 16,98	P.P 2.5 ug/ml	94,15 \pm 12,43
	P.P 1.25 ug/ml	109,5 \pm 8,524	P.P 1.25 ug/ml	92,07 \pm 10,33
	P.P 5 ug/ml+CERAMIDA	124,7 \pm 31,40	P.P 5 ug/ml+CERAMIDA	39,84 \pm 1,740
	P.P 2.5 ug/ml+CERAMIDA	103,1 \pm 25,12	P.P 2.5 ug/ml+CERAMIDA	41,70 \pm 0,6018
	P.P1.25ug/ml+CERAMIDA	82,24 \pm 11,89	P.P1.25ug/ml+CERAMIDA	40,32 \pm 1,438
<i>Alchornea calophylla</i> (A.C)	CONTROL	100,0 \pm 4,844	CONTROL	100,0 \pm 13,22
	CERAMIDA	66,11 \pm 6,919	CERAMIDA	62,21 \pm 8,265
	A.C 40 ug/ml	111,7 \pm 7,480	A.C 40 ug/ml	97,06 \pm 11,29
	A.C 20 ug/ml	103,7 \pm 8,302	A.C 20 ug/ml	93,15 \pm 17,43
	A.C 10 ug/ml	112,0 \pm 6,730	A.C 10 ug/ml	92,37 \pm 13,14
	A.C 40 ug/ml+CERAMIDA	90,11 \pm 9,361	A.C 40 ug/ml+CERAMIDA	61,52 \pm 4,848
	A.C 20 ug/ml+CERAMIDA	90,82 \pm 5,146	A.C 20 ug/ml+CERAMIDA	72,18 \pm 2,831
	A.C 10 ug/ml+CERAMIDA	88,73 \pm 8,437	A.C 10 ug/ml+CERAMIDA	69,07 \pm 10,39
<i>Piper tuberculatum</i> (P.T)	CONTROL	100,0 \pm 4,844	CONTROL	100,0 \pm 13,22
	CERAMIDA	66,11 \pm 6,919	CERAMIDA	62,21 \pm 8,265
	P.T 20 ug/ml	110,4 \pm 5,494	P.T 10 ug/ml	98,47 \pm 10,74
	P.T 10 ug/ml	108,4 \pm 4,784	P.T 5 ug/ml	106,0 \pm 8,842
	P.T 5 ug/ml	106,8 \pm 5,450	P.T 2,5 ug/ml	103,2 \pm 8,950
	P.T 20 ug/ml+CERAMIDA	93,51 \pm 4,376	P.T 10 ug/ml+CERAMIDA	71,08 \pm 9,031
	P.T 10 ug/ml+CERAMIDA	85,81 \pm 6,608	P.T 5 ug/ml+CERAMIDA	71,28 \pm 8,160
	P.T 5 ug/ml+CERAMIDA	83,92 \pm 12,37	P.T 2,5 ug/ml+CERAMIDA	61,72 \pm 8,416
<i>Piper arboreum</i> (P.A)	CONTROL	100,0 \pm 15,72	CONTROL	100,0 \pm 11,63
	CERAMIDA	51,06 \pm 5,933	CERAMIDA	63,14 \pm 10,24
	P.A 40 ug/ml	86,48 \pm 10,64	P.A 20 ug/ml	105,2 \pm 7,820
	P.A 20 ug/ml	86,82 \pm 9,669	P.A 10 ug/ml	92,78 \pm 8,252
	P.A 10 ug/ml	89,22 \pm 1,813	P.A 5 ug/ml	100,0 \pm 9,842
	P.A 40 ug/ml+CERAMIDA	45,47 \pm 3,852	P.A 20 ug/ml+CERAMIDA	61,85 \pm 16,33
	P.A 20 ug/ml+CERAMIDA	48,85 \pm 2,266	P.A 10 ug/ml+CERAMIDA	57,63 \pm 7,850
	P.A 10 ug/ml+CERAMIDA	86,67 \pm 11,38	P.A 5 ug/ml+CERAMIDA	52,77 \pm 4,552
<i>Piper krukoffi</i> (P.K)	CONTROL	100,0 \pm 15,72	CONTROL	100,0 \pm 11,63
	CERAMIDA	51,06 \pm 5,933	CERAMIDA	63,14 \pm 10,24
	P.K 20 ug/ml	83,93 \pm 6,253	P.K 20 ug/ml	92,48 \pm 6,834
	P.K 10 ug/ml	88,00 \pm 7,884	P.K 10 ug/ml	92,60 \pm 3,832
	P.K 5 ug/ml	95,48 \pm 12,88	P.K 5 ug/ml	103,3 \pm 5,244
	P.K 20 ug/ml+CERAMIDA	61,16 \pm 13,85	P.K 20 ug/ml+CERAMIDA	61,73 \pm 12,29
	P.K 10 ug/ml+CERAMIDA	92,23 \pm 2,773	P.K 10 ug/ml+CERAMIDA	57,58 \pm 4,113
	P.K 5 ug/ml+CERAMIDA	99,85 \pm 6,286	P.K 5 ug/ml+CERAMIDA	57,93 \pm 6,377

EVALUACIÓN DE LA ACHALIPHA DIVERSIFOLIA A 6 H



(a)

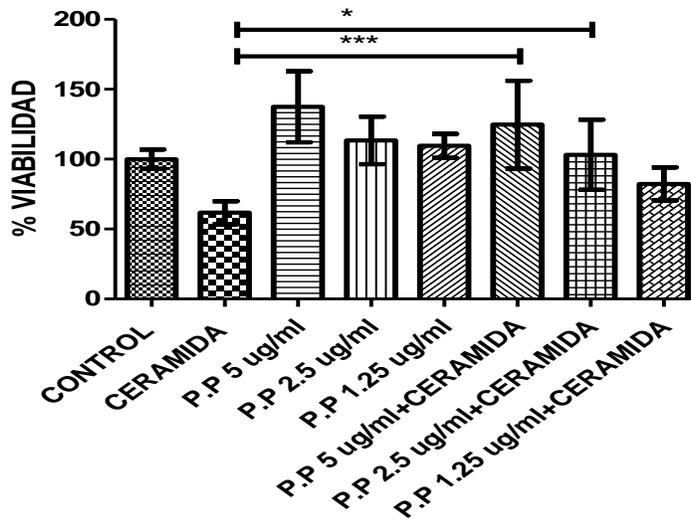
EVALUACIÓN DE LA ACHALIPHA DIVERSIFOLIA A 24 H



(b)

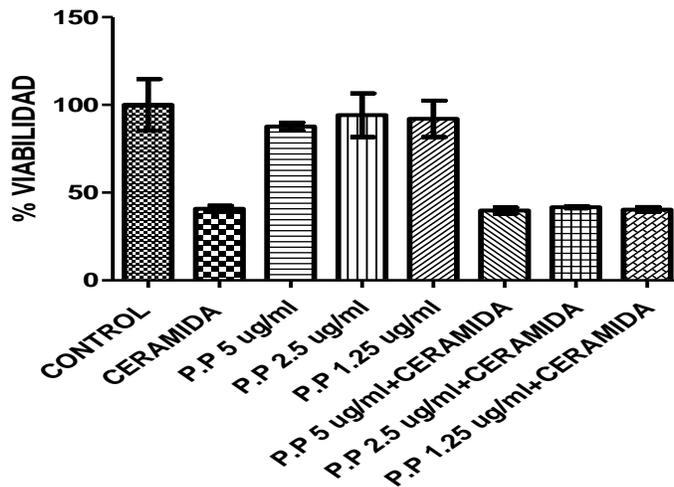
Figura 22. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de *Achalipha diversifolia* y ceramida. El extracto de *Achalipha diversifolia* fue agregada a las células CAD en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 25 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 12 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de MTT. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" *** $p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

EVALUACIÓN DEL PIPER PELTATUM A 6 H



(a)

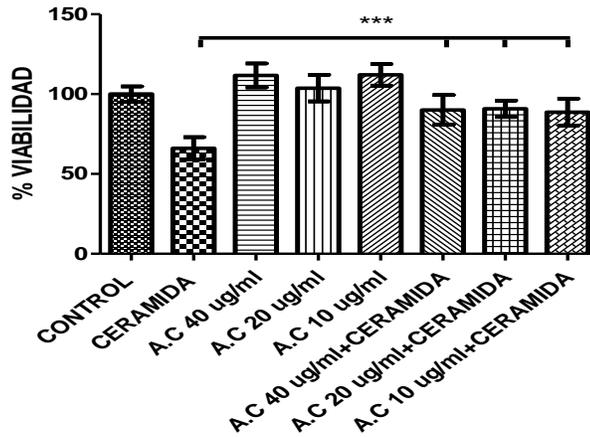
EVALUACIÓN DEL PIPER PELTATUM A 24 H



(b)

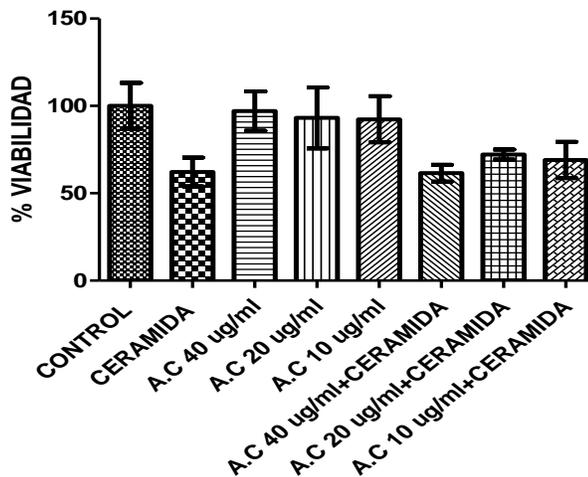
Figura 23. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de *Piper peltatum* y ceramida. El extracto de *Piper peltatum* fue agregada a las células CAD en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 25 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 12 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de MTT. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

EVALUACIÓN DE LA ALCHORNEA CALOPHYLA A 6 H



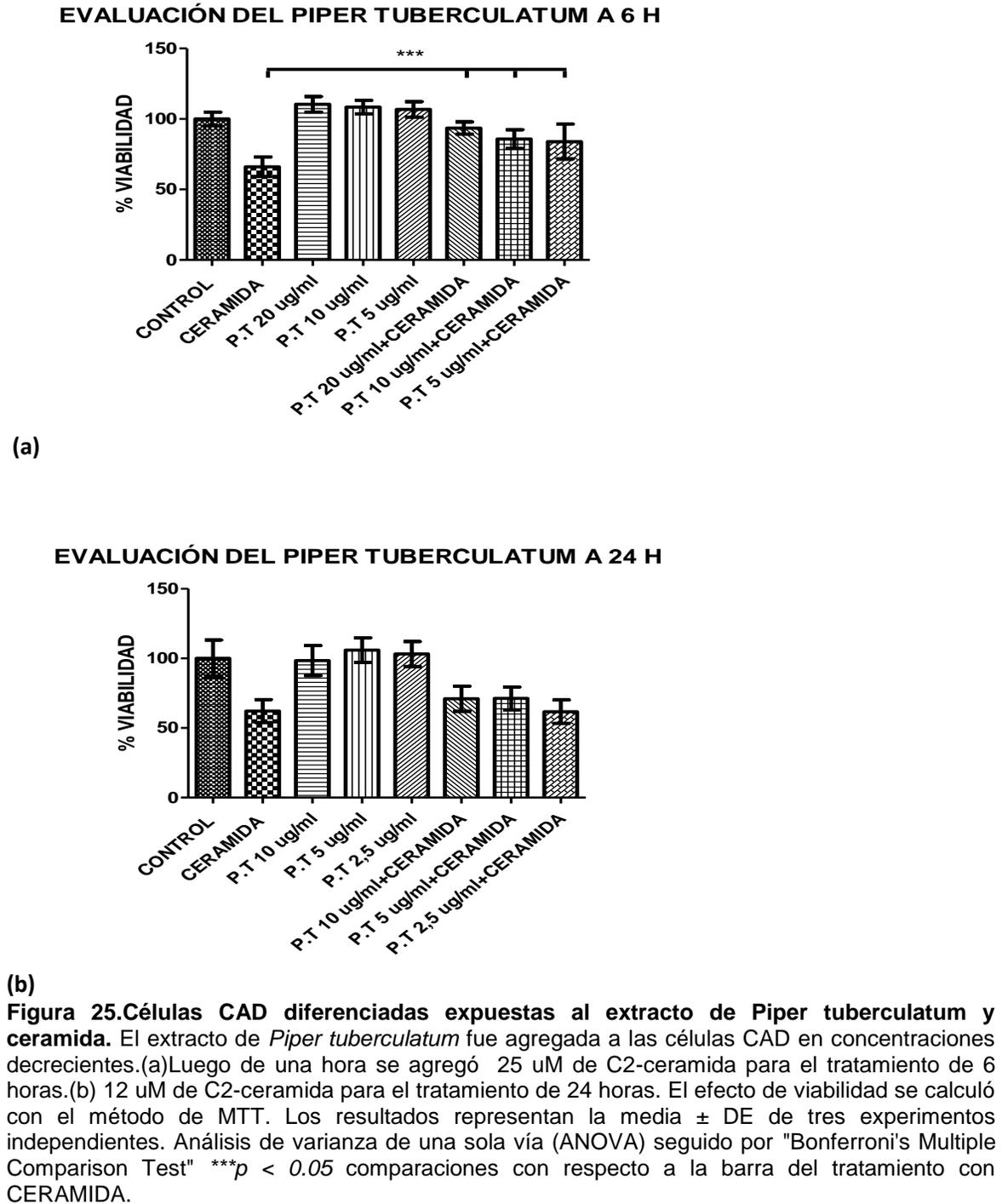
(a)

EVALUACIÓN DE LA ALCHORNEA CALOPHYLA A 24 H

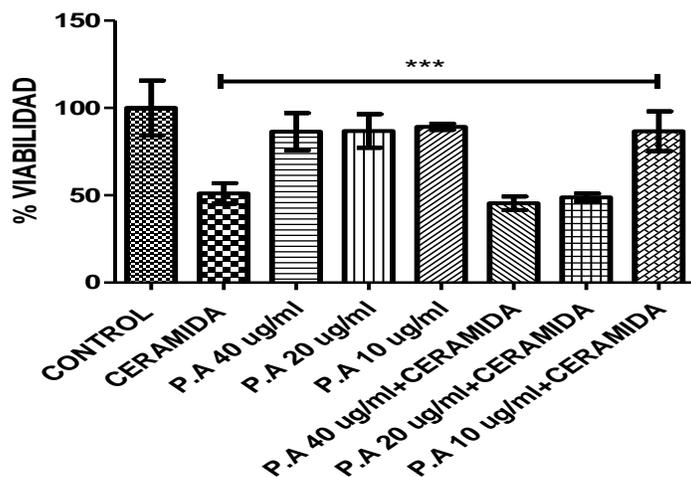


(b)

Figura 24. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de *Alchornea calophylla* y ceramida. El extracto de *Alchornea calophylla* fue agregada a las células CAD en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 25 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 12 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de MTT. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

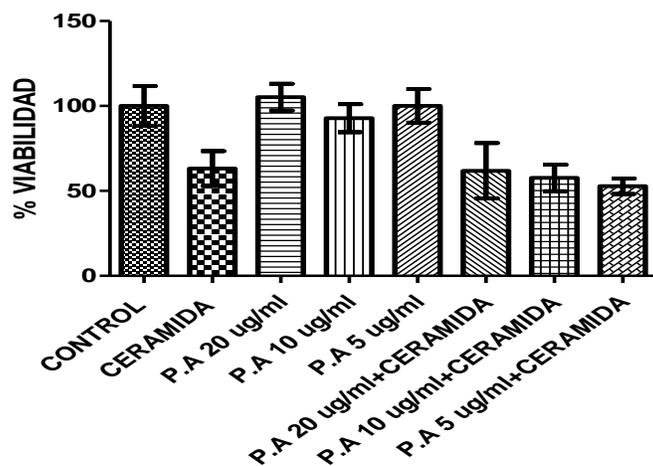


EVALUACIÓN DEL PIPER ARBOREUM A 6 H



(a)

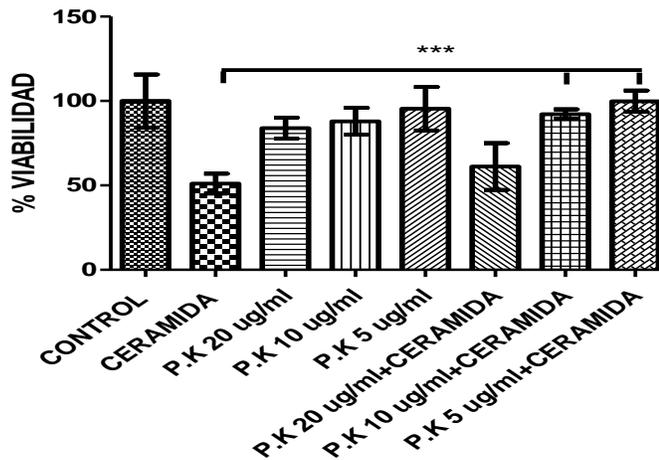
EVALUACIÓN DEL PIPER ARBOREUM A 24 H



(b)

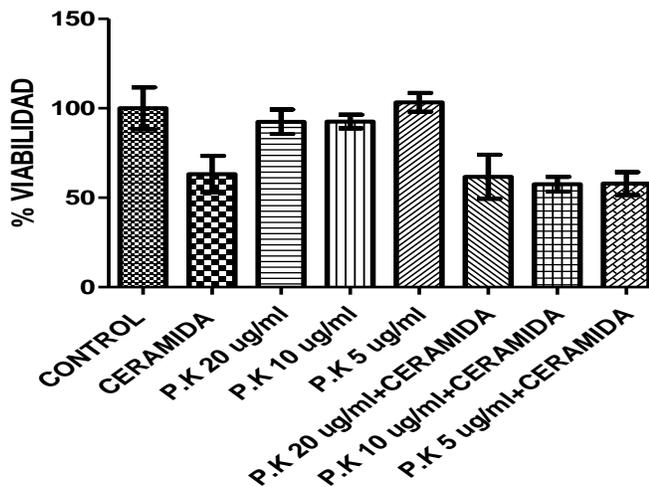
Figura 26. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de *Piper arboreum* y ceramida. El extracto de *Piper arboreum* fue agregado a las células CAD en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 25 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 12 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de MTT. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

EVALUACIÓN DEL PIPER KRUKOFFI A 6 H



(a)

EVALUACIÓN DEL PIPER KRUKOFFI A 24 H



(b)

Figura 27. Células CAD diferenciadas expuestas al extracto de *Piper krukoffi* y ceramida. El extracto de *Piper krukoffi* fue agregada a las células CAD en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 25 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 12 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de MTT. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

5.2.3 Viabilidad mitocondrial de las células MO3.13

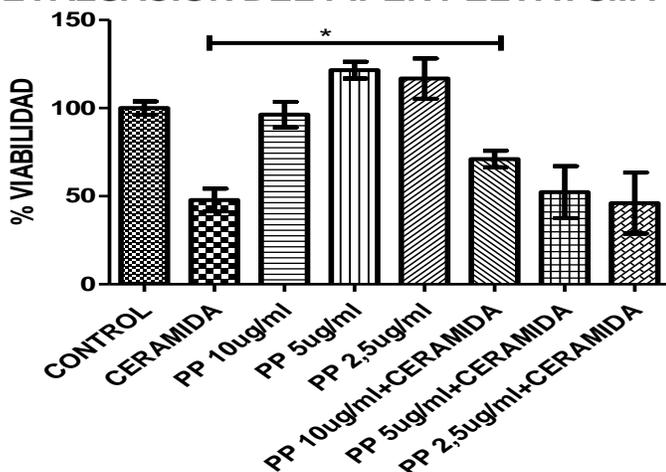
Las células MO3.13 fueron diferenciadas por 120 horas, pretratadas con los extractos alcohólicos con tres concentraciones considerados no tóxicas, luego de una hora a las células MO3.13 se les agrego la concentración de C2-ceramida para causar el daño en la viabilidad mitocondrial.

En la Tabla 5.4 se relacionan el efecto de los extractos etanólicos sobre la viabilidad de las células MO3.13 tratadas con C2 ceramida (25uM) y (12um), en 6 y 24 horas de tratamientos respectivamente.

Tabla 9. Efecto de los extractos alcohólicos en células MO3.13 sometidas al neurotóxico. Las células CAD fueron diferenciadas por 120 horas. Se realizó un pretratamiento con los extractos alcohólicos con 3 concentraciones decrecientes durante 6 y 24 horas respectivamente. La viabilidad celular se calculó mediante el reactivo de MTT continuando con un periodo de incubación de dos horas. La fluorescencia fue medida a una D.O de 492nm. Los valores representan la media \pm D.E de mínimo 3 experimentos independientes cada uno con 4 réplicas de cada uno de los tratamientos. La comparación se realizó para cada uno de los tratamientos vs Tratamientos ceramida $p \geq 0.05$.

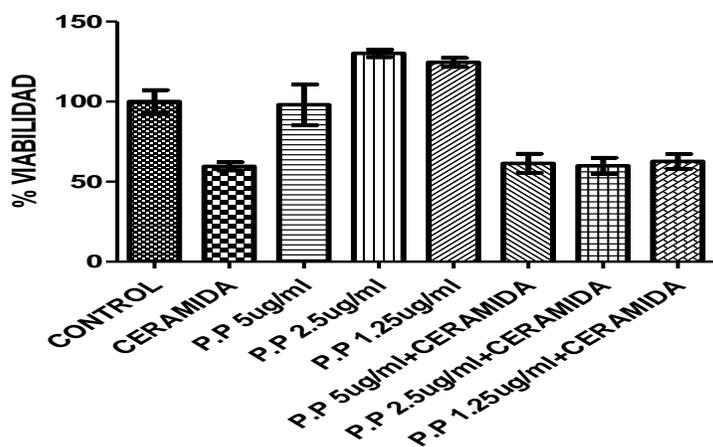
Extracto etanólico	6 HORAS		24 HORAS	
	Tratamientos	Viabilidad celular	Tratamientos	Viabilidad celular
<i>Piper peltatum</i> (P.P)	CONTROL	100,0 \pm 3,755	CONTROL	100,0 \pm 7,200
	CERAMIDA	47,83 \pm 6,440	CERAMIDA	59,61 \pm 2,602
	P.P 10 ug/ml	96,28 \pm 7,260	P.P 5 ug/ml	98,03 \pm 12,67
	P.P 5 ug/ml	121,5 \pm 4,778	P.P 2.5 ug/ml	130,1 \pm 2,333
	P.P 2,5 ug/ml	116,8 \pm 11,45	P.P 1.25 ug/ml	124,5 \pm 2,846
	P.P 10 ug/ml+CERAMIDA	71,12 \pm 4,744	P.P 5 ug/ml+CERAMIDA	61,48 \pm 6,002
	P.P 5 ug/ml+CERAMIDA	52,33 \pm 14,73	P.P 2.5 ug/ml+CERAMIDA	59,88 \pm 5,036
	P.P 2,5 ug/ml+CERAMIDA	46,12 \pm 17,33	P.P 1.25ug/ml+CERAMIDA	62,64 \pm 4,675
<i>Piper arboreum</i> (P.A)	CONTROL	100,0 \pm 9,951	CONTROL	100,0 \pm 3,586
	CERAMIDA	60,86 \pm 8,434	CERAMIDA	60,88 \pm 9,406
	P.A 40 ug/ml	114,7 \pm 4,211	P.A 20 ug/ml	99,32 \pm 20,24
	P.A 20 ug/ml	110,4 \pm 1,068	P.A 10 ug/ml	141,7 \pm 4,550
	P.A 10 ug/ml	113,5 \pm 6,738	P.A 5 ug/ml	150,4 \pm 3,550
	P.A 40 ug/ml+CERAMIDA	85,57 \pm 4,773	P.A 20 ug/ml+CERAMIDA	48,87 \pm 2,543
	P.A 20 ug/ml+CERAMIDA	82,55 \pm 3,360	P.A 10 ug/ml+CERAMIDA	57,79 \pm 10,92
	P.A 10 ug/ml+CERAMIDA	78,00 \pm 3,185	P.A 5 ug/ml+CERAMIDA	56,93 \pm 11,68
<i>Piper krukoffi</i> (P.K)	CONTROL	100,0 \pm 7,631	CONTROL	100,0 \pm 13,56
	CERAMIDA	67,20 \pm 6,869	CERAMIDA	46,39 \pm 4,372
	P.K 20 ug/ml	118,0 \pm 3,287	P.K 10 ug/ml	114,7 \pm 9,585
	P.K 10 ug/ml	115,2 \pm 2,767	P.K 5 ug/ml	114,5 \pm 2,080
	P.K 5 ug/ml	115,3 \pm 6,105	P.K 2,5 ug/ml	113,1 \pm 2,798
	P.K 20 ug/ml+CERAMIDA	79,72 \pm 9,117	P.K 10 ug/ml+CERAMIDA	26,29 \pm 4,485
	P.K 10 ug/ml+CERAMIDA	77,02 \pm 13,17	P.K 5 ug/ml+CERAMIDA	30,31 \pm 4,820
	P.K 5 ug/ml+CERAMIDA	74,95 \pm 6,855	P.K 2,5 ug/ml+CERAMIDA	28,81 \pm 2,288
<i>Piper tuberculatum</i> (P.T)	CONTROL	100,0 \pm 7,631	CONTROL	100,0 \pm 13,56
	CERAMIDA	67,20 \pm 6,869	CERAMIDA	46,39 \pm 4,372
	P.T 10 ug/ml	105,4 \pm 11,54	P.T 10 ug/ml	95,82 \pm 7,656
	P.T 5 ug/ml	106,1 \pm 11,20	P.T 5 ug/ml	110,6 \pm 3,195
	P.T 2,5 ug/ml	107,2 \pm 3,713	P.T 2,5 ug/ml	113,0 \pm 1,960
	P.T 10 ug/ml+CERAMIDA	71,60 \pm 8,637	P.T 10 ug/ml+CERAMIDA	44,49 \pm 10,00
	P.T 5 ug/ml+CERAMIDA	60,31 \pm 12,94	P.T 5 ug/ml+CERAMIDA	34,18 \pm 1,634
	P.T 2,5 ug/ml+CERAMIDA	66,06 \pm 11,87	P.T 2,5 ug/ml+CERAMIDA	34,18 \pm 3,628
<i>Achalipha diversifolia</i> (A.D)	CONTROL	100,0 \pm 9,951	CONTROL	100,0 \pm 3,586
	CERAMIDA	60,86 \pm 8,434	CERAMIDA	60,88 \pm 9,406
	A.D 20 ug/ml	113,1 \pm 4,016	A.D 20 ug/ml	95,22 \pm 5,048
	A.D 10 ug/ml	123,0 \pm 1,921	A.D 10 ug/ml	111,3 \pm 14,20
	A.D 5 ug/ml	117,4 \pm 5,782	A.D 5 ug/ml	100,5 \pm 4,215
	A.D 20 ug/ml+CERAMIDA	90,63 \pm 9,882	A.D 20 ug/ml+CERAMIDA	51,11 \pm 8,794
	A.D 10 ug/ml+CERAMIDA	78,98 \pm 5,864	A.D 10 ug/ml+CERAMIDA	61,64 \pm 13,96
	A.D 5 ug/ml+CERAMIDA	75,61 \pm 6,121	A.D 5 ug/ml+CERAMIDA	42,48 \pm 11,82
<i>Alchornea calophylla</i> (A.C)	CONTROL	100,0 \pm 3,755	CONTROL	100,0 \pm 7,200
	CERAMIDA	47,83 \pm 6,440	CERAMIDA	59,61 \pm 2,602
	A.C 20 ug/ml	87,75 \pm 2,917	A.C 10 ug/ml	97,86 \pm 2,457
	A.C 10 ug/ml	100,0 \pm 9,107	A.C 5 ug/ml	100,2 \pm 6,304
	A.C 5 ug/ml	87,74 \pm 1,974	A.C 2,5 ug/ml	99,86 \pm 0,7719
	A.C 20 ug/ml+CERAMIDA	52,66 \pm 8,928	A.C 10 ug/ml+CERAMIDA	57,53 \pm 10,29
	A.C 10 ug/ml+CERAMIDA	54,96 \pm 9,452	A.C 5 ug/ml+CERAMIDA	67,03 \pm 3,038
	A.C 5 ug/ml+CERAMIDA	69,50 \pm 11,52	A.C 2,5 ug/ml+CERAMIDA	62,31 \pm 7,065

EVALUACIÓN DEL PIPER PELTATUM A 6 H



(a)

EVALUACIÓN DEL PIPER PELTATUM A 24 H



(b)

Figura 28. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de *Piper peltatum* y ceramida. El extracto de *Piper peltatum* fue agregado a las células MO3.13 en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 50 uM de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 25 uM de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de WST-1. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

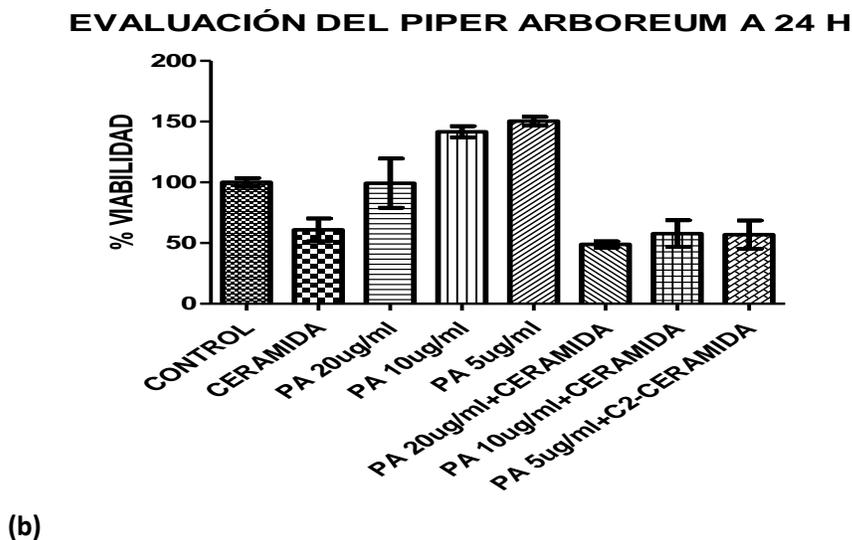
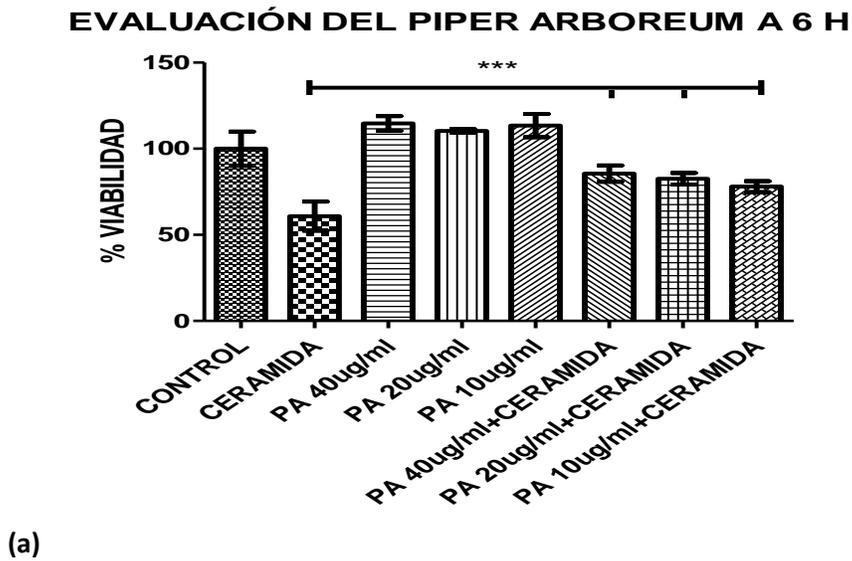
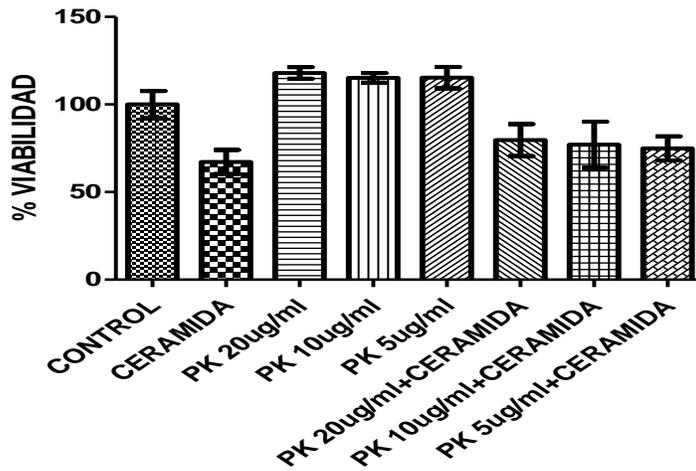


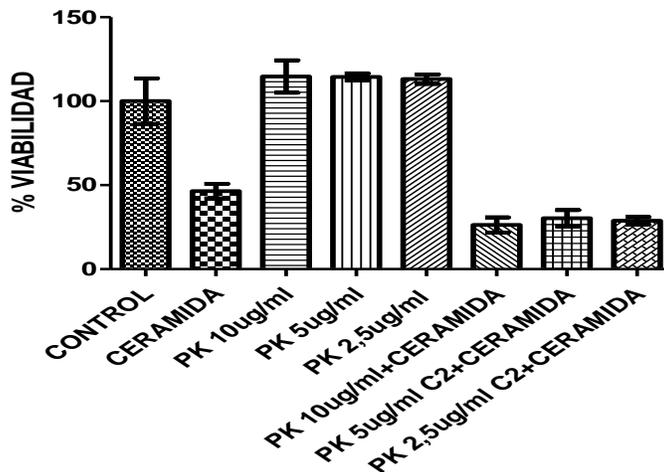
Figura 29. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de *Piper arboreum* y ceramida. El extracto de *Piper arboreum* fue agregado a las células MO3.13 en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 50 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 25 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de WST-1. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

EVALUACIÓN DEL PIPER KRUKOFFI A 6 H



(a)

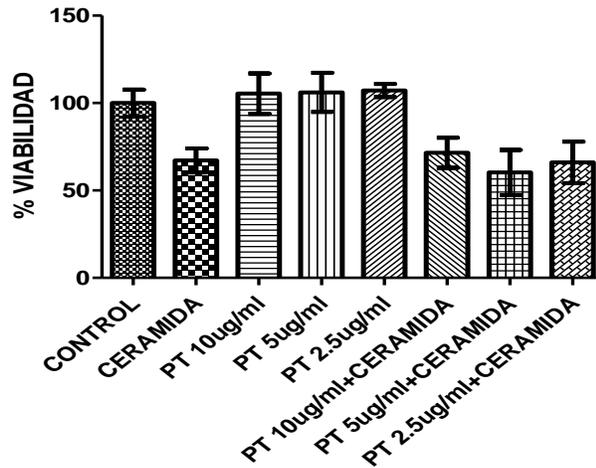
EVALUACIÓN DEL PIPER KRUKOFFI A 24 H



(b)

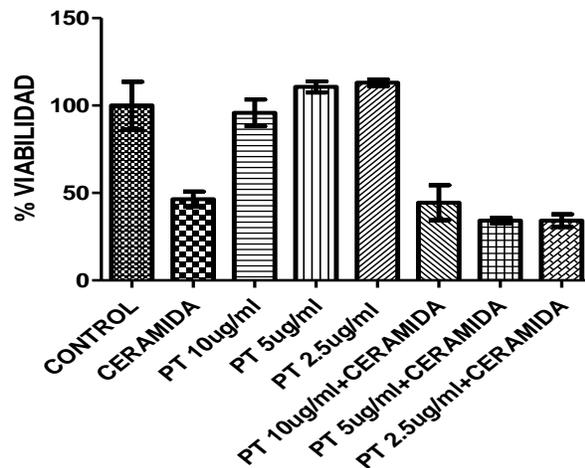
Figura 30. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de *Piper krukoffi* y ceramida. El extracto de *Piper krukoffi* fue agregado a las células MO3.13 en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 50 uM de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 25 uM de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de WST-1. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" *** $p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

EVALUACIÓN DEL PIPER TUBERCULATUM A 6 H



(a)

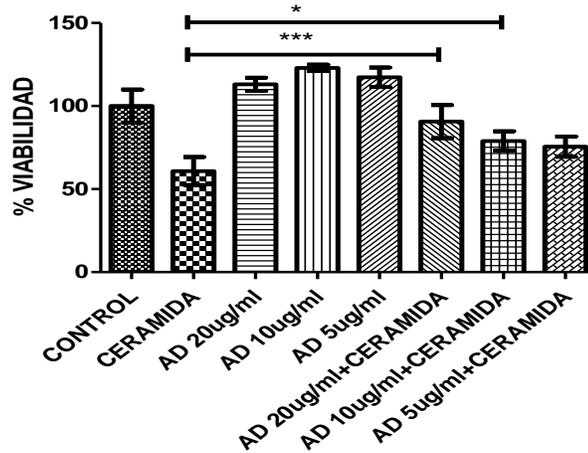
EVALUACIÓN DEL PIPER TUBERCULATUM A 24 H



(b)

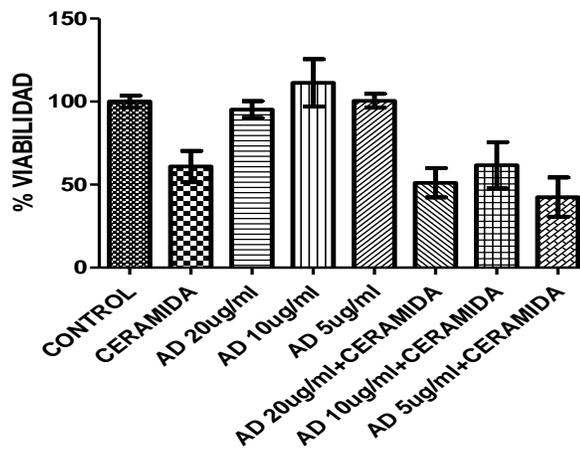
Figura 31. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de *Piper tuberculatum* y ceramida. El extracto de *Piper tuberculatum* fue agregado a las células MO3.13 en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 50 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 25 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de WST-1. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" *** $p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

EVALUACIÓN DE LA ACHALIPHA DIVERSIFOLIA A 6 H



(a)

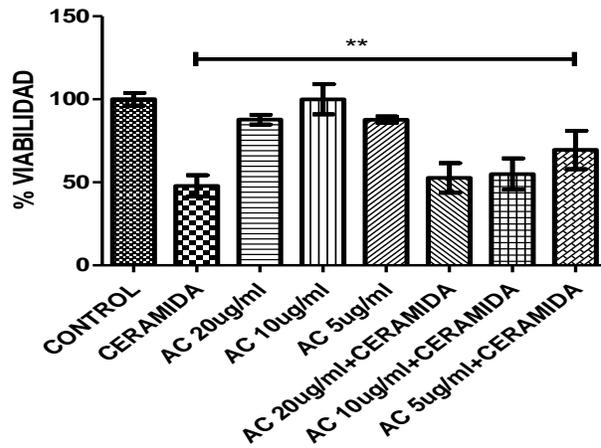
EVALUACIÓN DE LA ACHALIPHA DIVERSIFOLIA A 24 H



(b)

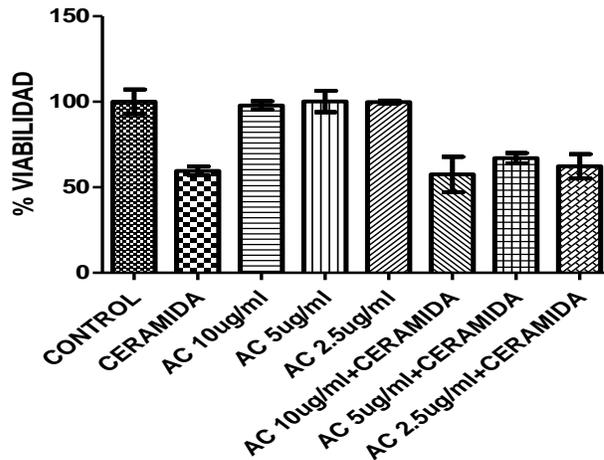
Figura 32. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de *Achalipha diversifolia* y ceramida. El extracto de *Achalipha diversifolia* fue agregado a las células MO3.13 en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 50 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 25 μ M de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de WST-1. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

EVALUACIÓN DE LA ALCHORNEA CALOPHYLA A 6 H



(a)

EVALUACIÓN DE LA ALCHORNEA CALOPHYLA A 24 H



(b)

Figura 33. Células MO3.13 diferenciadas expuestas al extracto de *Alchornea calophylla* y ceramida. El extracto de *Alchornea calophylla* fue agregado a las células MO3.13 en concentraciones decrecientes. (a) Luego de una hora se agregó 50 uM de C2-ceramida para el tratamiento de 6 horas. (b) 25 uM de C2-ceramida para el tratamiento de 24 horas. El efecto de viabilidad se calculó con el método de WST-1. Los resultados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por "Bonferroni's Multiple Comparison Test" $***p < 0.05$ comparaciones con respecto a la barra del tratamiento con CERAMIDA.

5.3 Discusión

La oferta como el consumo de productos naturales para tratar enfermedades en los humanos ha representado un incremento en las últimas décadas, que se traducen en millonarias ventas. Sin embargo existe un concepto equivocado; “Todo lo natural es bueno”. Por lo contrario, se ha comprobado que muchos compuestos activos de productos naturales a base de plantas son tóxicos debido a sobredosis o ante una equivocada preparación, causando enfermedades graves, lesiones o incluso la muerte. Ejemplo de estos compuestos activos se encuentran los alcaloides, glucósidos, terpenos etc. Obligando al sometimiento de estos extractos, compuestos o derivados de plantas a análisis de sus efectos negativos, mediante ensayos celulares y clínicos [107, 108].

Alrededor del mundo las dietas ricas en flavonoides y polifenoles han aumentado considerablemente, llevando incluso a incidir a un nocivo nivel de estos compuestos, catalogándolos como pro-oxidativos.[109] No obstante las plantas y productos vegetales poseen potencial terapéutico, y su potencial es debido a una posible sinergia de sus constituyentes químicos. Sin embargo este perfil de compuestos se puede alterar por factores que rodean el desarrollo de la planta, su procesamiento y extracción de compuestos [110]. Las discusiones sobre la seguridad en los medicamento a partir de hierbas se están basando en estudios de genotoxicidad y la cantidad de publicaciones que existan sobre este tema o conocimientos previos de las plantas y ensayos celulares.[111]

Sin embargo las Piperaceae ha despertado profundamente el interés de la comunidad científica debido al alto uso etnobotánico para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo las que afectan el sistema nervioso central, pero no existe claridad sobre los efectos tóxicos de los extractos en el comportamiento de los individuos ante una posible sobredosis o consecuencias negativas a mediano o largo plazo.[112] Aunque cabe destacar otros estudios donde demuestran la actividad citotóxica del (e)-nerolidol compuesto de aceite esencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth en células de *Saccharomyces cerevisiae* sin consecuencias genotóxicas.[113] Otras investigaciones destacan la función de la piperina, un compuesto de origen alcaloide que se encuentra en el *Piper nigrum*, al igual que otros compuestos del mismo tipo con propiedades

insecticidas, anti cáncer, antiinflamatorio etc. estas apreciaciones demuestran que los metabolitos tienen sus contras y pro.[114,115]

Al igual que las *Piperaceae* las especies de plantas de la familia Euphorbiaceae en Colombia han sido ampliamente estudiadas. Su uso abarca lo medicinal, lo alimenticio, maderables e industrial. Algunas investigaciones han demostrado la presencia de metabolitos secundarios como el Fucan, flavonoides, lignanos, fitoestrógenos, alcaloides, terpenos. Dentro de algunos usos etnobotánicos registrados y más importantes está el antiofídico, otras investigaciones realizadas en laboratorio de extractos crudos de alcaloides o alcohólicos evidenciaron actividad antimalárica, antivirales.[116,117,21,118,119]

De otro modo algunos estudios revelan la genotóxicidad y potencial mutagénico de algunas especies de la familia Euphorbiaceae, un ejemplo es una serie de compuestos como ésteres de forbol y curcuma encontrados en la *Jatropha curcas* L. que producen diarrea, lesiones en la piel e incluso en el hígado y riñón en humanos y ratas. Al igual que dosis altas de extracto acuoso de *Euphorbia prostrata* Aiton para el tratamiento de salmonelosis en ratas, produciendo lesiones en el hígado y riñón.[120,121] No obstante la alta toxicidad de algunas especies son utilizadas para llevar a cabo investigaciones para tratar el *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) vector biológico de enfermedades tropicales.¹²² Otras especies como la *Jatropha multifida* L. *Euphorbia helioscopia*, demostraron que el látex y la sabia son seguros para uso farmacéuticos y su extracto metanólico no es perjudicial a menos de 10 ug/ml.[123,124]

Para nuestro caso las especies de plantas que pertenecen a la familia Piperaceae, y las especies de la familia Euphorbiaceae demostraron un alto porcentaje de toxicidad en las líneas celulares CAD y MO3.13, incluso a bajas concentraciones como la de 10 ug/ml en 24 horas de evaluación, esta toxicidad se estableció teniendo en cuenta la capacidad de la mitocondria para producir sal de formazán y posteriormente cuantificada (Ensayo de MTT). La previa caracterización de los metabolitos secundarios en las *Piper* se estableció que la alta toxicidad no se debió a los alcaloides, ya que los extractos alcohólicos mostraron presencia negativa para este tipo de metabolitos secundarios. Es de añadir que varios investigadores concuerdan con la presencia de amidas, flavonoides, kavapironas, lignanos, neolignanos, piperolidas, propenilfenoles, alcanidas, chalconas,

benzopironas, cromenos, lactonas, terpenos y negativo para alcaloides en especies de *Piper* y, similar a la caracterizado en este trabajo de investigación [125, 126, 127].

Los datos de toxicidad evidenciaron una tendencia positiva entre la concentración del extracto vs el tiempo de exposición (6 y 24 H), tanto en las CAD como el MO3.13. A pesar de la alta toxicidad registrada, se pudo llegar a concentraciones tolerables del extracto en las células. Se revisó en detalle que la población celular tratadas con los extractos alcohólicos no presentara diferencias significativas en comparación con las células no tratadas con el compuesto. De este modo los extractos alcohólicos que a dosis de 10 ug/ml mostraron diferencias significativas $*P < 0.05$ en comparación con el tratamiento sin extracto, sería descartada esa concentración para el ensayo de neuroprotección, sin embargo los extractos que presentaron este comportamiento fueron llevados a una dilución seriada obteniendo concentraciones de 5, 2.5 y 1.25 ug/ml. En general es de considerar la importancia que desencadena que un extracto alcohólico a tan baja concentración como 10ug/ml tenga la capacidad de mostrar actividad biológica, ocasionando parada del metabolismo celular en células inmortales, como son las CAD y MO3.13.

No obstante la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes para contrarrestar el EO celular ha sido una apuesta de la comunidad médica, en este campo los nutracéuticos, tienen la capacidad de potenciar la salud, prevenir la enfermedad y actuar en la recuperación del individuo. Algunos alimentos dada la variedad de metabolitos secundarios han demostrado una amplia gama de actividades biológicas. En general, estos metabolitos tienen baja potencia como compuestos bioactivos en comparación con las drogas farmacéuticas, pero su ingesta con regularidad y en cantidades significativas en la dieta, pueden tener efectos fisiológicos positivos a largo plazo.[128,129,130,131]

Sin embargo existe otra línea bautizada etnobotánica, en este campo se encuentran plantas que derivan del Neotrópico y que han sido utilizadas por milenios por comunidades indígenas para el tratamiento y prevención de enfermedades. En este estudio se contaron con elementos para realizar un acercamiento a la patología de la EP y EM, se utilizó la línea celular CAD y MO3.13 diferenciadas y un neurotóxico endógeno como la C2-ceramida. Un modelo que permitió evaluar la neuroprotección de extractos

alcohólicos de plantas endémicas de la geografía colombiana. Las especies de plantas que se evaluaron pertenecen a la familia Piperaceae y Euphorbiaceae. Estas familias de plantas cuentan con una amplia gama de usos dentro de ello la medicinal, lo que ha despertado el interés de la comunidad científica con el fin de determinar los compuestos que actúan en la detención de hemorragias que provocan las mordeduras de serpientes, compuestos capaces de detener el ciclo celular de tumores, suspender vías de señalización inflamatorias NF-kB (Factor nuclear kappa β), antiparasitaria, antimicóticas, antibacteriana, acción analgésica, ansiolíticos, y en especial la antioxidante, actividad que posiblemente esté actuando en la actividad neuroprotectora demostrada en este trabajo de investigación. [66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87]

En esta investigación se trabajó con un neurotóxico de origen endógeno, que actuara sobre la mitocondria. Según investigaciones recientes indican que la ceramida para inducir apoptosis actúa a través de un efecto directo sobre la mitocondria [132, 133]. La mitocondria posee enzimas capaces de generar ceramida (ceramida sintasa y ceramida reversa) [134,135] y varios estímulos de apoptosis han demostrado inducir apoptosis mediante el incremento de niveles de ceramida mitocondrial.[127, 136, 137, 138] Se ha reportado que la ceramida tiene numerosos efectos sobre la mitocondria, incluyendo mayor producción de especies reactivas de oxígeno, alteración de la homeostasis del calcio en la mitocondria y retículo endoplasmático, depleción de ATP, colapso del potencial de membrana mitocondrial, inhibición y/o activación de las actividades de varios componentes de la cadena transportadora de electrones y liberación de proteínas del espacio intermembrana. [128, 130, 139, 140] Con este antecedente era válido la evaluación de la actividad mitocondrial para concluir una neuroprotección en las células CAD y MO3.13 al ser sometidas a los extractos alcohólicos y posteriormente al neurotóxico. La bibliografía igualmente reporta que en cultivos celulares y mitocondrias aisladas, se ha visto que C2-Ceramida induce la liberación de citocromo c y apoptosis. Demostrando que la C2-ceramida estaría actuando de manera intrínseca en el camino de la apoptosis. [133, 134] Por ende la C2-ceramida empleada en este estudio es totalmente válida tanto para la línea celular CAD y MO3.13.

En la investigación se controló la variable de la concentración del extracto alcohólico vs dosis letal en las líneas celulares CAD y MO3.13. En el capítulo anterior se establecieron las dosis letales de cada uno de los extractos alcohólicos en las líneas celulares CAD y MO3.13 en los dos tiempos empleados (6 y 24 horas), sin embargo en cada ensayo realizado y mostrado en este capítulo se corroboró que las dosis empleadas de extractos alcohólicos no fueran tóxicas en las líneas celulares dentro de los márgenes de tiempos empleados (6 y 24 horas). Esta investigación demostró una recuperación de la actividad mitocondrial la cual fue evaluada mediante el ensayo de MTT en las células CAD y WST-1 en las células MO3.13, esta recuperación se evidenció a las 6 horas de tratamiento, un común denominador en los extractos alcohólicos, ninguno demostró actividad neuroprotectora a las 24 horas de tratamiento en las dos líneas celulares (CAD y MO3.13). Lo que significa que el tiempo de acción de un compuesto que deriva de un extracto alcohólico está determinado por el tiempo (oxidación) o por la ausencia de la renovación del mismo con respecto al tiempo. Este es un problema que ocurre en la actualidad con respecto a los fármacos que actúan como neuroprotectores utilizados en una isquemia cerebral.¹⁴¹

Las especies que mostraron actividad neuroprotectora a las 6 horas de tratamiento de manera significativa ($***p \geq 0.05$) CERAMIDA vs CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO+CERAMIDA en la línea celular CAD fueron *Achalipha diversifolia* a 2,5ug/ml de concentración, *Piper peltatum* a 5ug/ml, *Alchornea calophylla* a 40, 20, 10ug/ml, *Piper tuberculatum* a 20, 10, 5ug/ml, *Piper arboreum* a 10ug/ml, *Piper krukoffi* a 10 y 5 ug/ml. Para este caso todos los extractos mostraron tener propiedades que evitaron que la ceramida actuara de manera negativa en la mitocondria. Para el caso de la línea celular MO3.13 los extractos alcohólicos que mostraron actividad neuroprotectora significativa ($***p \geq 0.05$) a las 6 horas de tratamiento fueron, *Piper arboreum* a 40, 20, 10ug/ml, *Achalipha diversifolia* a 20ug/ml.

Aunque los análisis con MTT demostró una recuperación significativa de las células CAD y WST-1 en las células MO3.13, no se puede afirmar con certeza el o los compuestos que estarían actuando en la recuperación o protección de la mitocondria ante el ataque de la ceramida, debido al conjunto de compuestos que se puede albergar en un extracto general como los alcohólicos, sin embargo la caracterización de los metabolitos

secundarios de los extractos alcohólicos de las especies de Piperaceae arrojó positivo para compuestos fenólicos y flavonoides. Esta clase de compuestos son capaces de evitar la proliferación de RL, mediante la captura y construcción de compuestos más estables, por inhibición de enzimas productoras de RL o inhibición NF-kB [142].

Hoy la ciencia ha determinado el procesamiento, tráfico y almacenamiento celular de flavonoides en las plantas, debido al interés por los compuestos fenólicos y flavonoides dada sus funciones biológicas para el tratamiento o prevención de enfermedades en humanos.[143] Como el cáncer, melanomas y demás tipos de tumores que se forman a partir de mutaciones [144,145]. Se ha demostrado la acción de los flavonoides en actividades epigenéticas para contrarrestar la progresión en enfermedades neurodegenerativas, el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas de tipo esófago (KYSE-150), colon (HT-29), próstata (PC-3), y mama (MCF7 y MDA-MB-231) [146,147], en procesos neuroinflamatorios que desencadenan trastornos cognitivos a partir de una sobreexpresión de interleuquinas (IL) generados por la microglía [148].

Los compuestos fenólicos están ampliamente descritos y abundan en las plantas, de manera directa o indirecta en nuestra dieta, por ende su actividad biológica ha sido registrada en el tratamiento y prevención de enfermedades de tipo neuronal, en consecuencia es acertado afirmar que los compuestos fenólicos son los que están causando la neuroprotección obtenida en las líneas celulares CAD y MO3.13, además las especies de plantas que hicieron parte de esta investigación pertenecen a la familia Piperaceae y Euphorbiaceae, ampliamente distribuidas en el Neotrópico [149] contando con un registro detallado de sus actividades biológicas y usos por parte de comunidades indígenas y ancestrales.

Aunque se pudo evidenciar el efecto neuroprotector de las extractos alcohólicos, existe una clara diferencia entre la neuroprotección presentada en las líneas CAD con respecto a la MO3.13. La línea celular CAD es de origen murino y catecolaminérgica con la capacidad de producir NT-3 de manera autocrina [60], una neurotrofina que se produce en la diferenciación celular de las CAD. Sin embargo el objetivo final de las células CAD no es producir ceramida ni productos de naturaleza lipídica. De otro modo la línea celular MO3.13 es de origen humano compartiendo características morfológicas y bioquímicas

con cultivos primarios, sin embargo los oligodendrocitos en estado maduro son células formadoras de vainas de mielina, estas vainas principalmente están formadas por lípidos, algo que no ocurre con la línea celular MO3.13, aunque durante su diferenciación celular presentan marcadores de oligodendrocitos maduros [150].

Continuando, al revisar la concentración de C2-ceramida (50 y 25 μ M a las 6 y 24 horas respectivamente) utilizada para generar dosis L_{50} en las células MO3.13 se utilizó el doble de lo empleado con las células CAD. Este fenómeno de tolerancia se puede deber a la similitud en las características lipídicas de la ceramida y la mielina, a su origen endógeno, y la función que pueden cumplir en la célula. No obstante el incremento de la ceramida en las MO3.13 y la afectación en la viabilidad mitocondrial demuestra que las concentraciones altas o acumulación de ceramida a nivel intracelular desencadenan una orden de muerte, que para el caso de esta investigación los extractos alcohólicos de las especies *Piper arboreum* y *Achalipha diversifolia* mostraron capacidad neuroprotectora representada en la recuperación de la viabilidad mitocondrial.

6. Conclusiones, recomendaciones y perspectivas.

6.1 Conclusiones

1. Los metabolitos secundarios caracterizados a partir de los extractos alcohólicos del género *Piper* mostraron presencia positiva para: Amidas, cumarinas, esteroides y/o saponinas esteroidales, esteroles, fenoles y/o taninos hidrolizables, flavonoides y quinonas.
2. Las líneas celulares CAD de tipo murino, catecolaminérgicas al producir NT-3 en estado de diferenciación y la MO3.13 de tipo humano y presentar marcadores molecular de oligos maduros, son un buen modelo para los ensayos en búsqueda de neuroprotectores como acercamiento en el tratamiento de la EP y EM.
3. La concentración de DMSO utilizada para disolver los extractos alcohólicos en los medios de suspensión para el mantenimiento y diferenciación de las células CAD y MO3.13 no causa proceso de toxicidad.
4. Se estableció que la dosis L_{50} de la C2-ceramida en las células CAD a las 6 horas de tratamiento fue de 25 μ M, a las 24 horas de tratamiento 12 μ M. Para las células MO3.13 en el tratamiento de 6 horas fue de 50 μ M y para el tratamiento de 24 horas una concentración de 25 μ M.

5. El extracto alcohólico de *Piper peltatum* mostró actividad tóxica significativa de $***p < 0.05$ a una concentración de 10ug/ml en 24 horas de tratamiento en comparación a las células no tratadas con el extracto en las líneas celulares CAD y MO3.13. Los extractos de *Piper krukoffi*, *Acalypha diversifolia*, *Alchornea calophylla*, mostraron actividad tóxica en la línea celular MO3.13 a las 24 horas de tratamiento. El extracto del *Piper tuberculatum* tuvo efectos de toxicidad A 10 μ m en la línea celular MO3.13 a las 6 horas de tratamiento.

6. Los extractos alcohólicos mostraron la capacidad de recuperar la viabilidad mitocondrial en las células CAD tratadas con el neurotóxico (C2-ceramida) de manera significativa $***p < 0.05$ con respecto al grupo de células CAD+C2-ceramida.

7. El extracto alcohólico de *Piper arboreum* y *Acalypha diversifolia* mostraron la capacidad de recuperar la viabilidad mitocondrial en las células MO3.13 tratadas con la neurotóxina (C2-ceramida) de manera significativa $***P < 0.05$ con respecto al grupo de células MO3.13+C2-ceramida.

6.2 Recomendaciones y Perspectivas

1. Realizar fraccionamiento a los extractos alcohólicos para la búsqueda de los compuestos que están relacionado con la actividad neuroprotectora evidenciada en esta investigación.
2. Efectuar con los extractos alcohólicos el trabajo de toxicidad y recuperación de la viabilidad mitocondrial en cultivos primarios.
3. Analizar por western blot la vía de supervivencia PI3K/AKT en el contexto neurotóxico planteado en este trabajo de investigación en las células CAD y MO3.13.
4. Continuar con la búsqueda de compuestos a partir de extractos generales o alcohólicos de plantas de la biogeografía colombiana que puedan mostrar una capacidad neuroprotectora a concentraciones bajas.

7. Anexos

ANEXO 1. RECOLECCIÓN DE LOS ESPECIES DEL GÉNERO PIPER EN EL PIDEMONTE DEL CAQUETÁ Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.



Piedemonte del Caquetá. Zona ubicada al sur de Colombia, donde se extrajeron las plantas del género *Piper*.

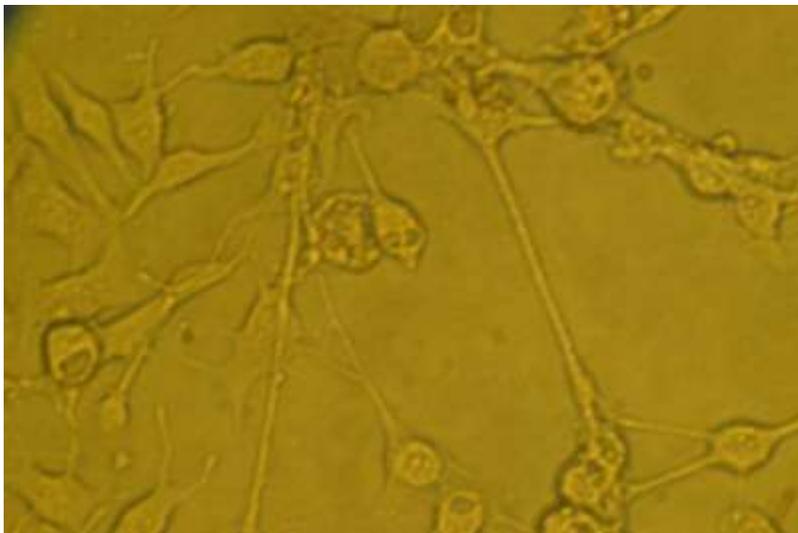


Procesamiento de las muestras de plantas del género Piper. Las plantas fueron identificadas, rotulados y almacenadas para ser llevada al herbario Nacional de Colombia.

ANEXO 2. CELULAS CAD

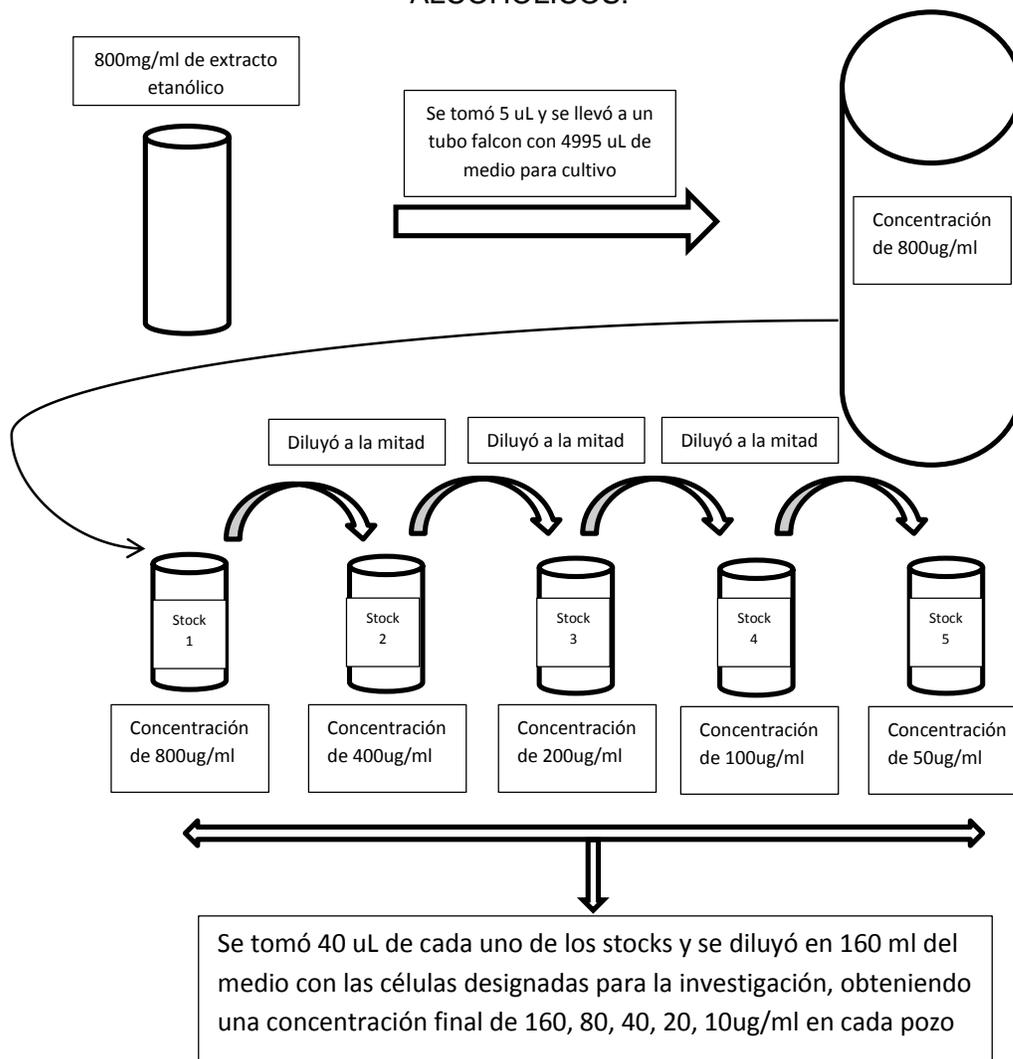


CÉLULAS CAD EN DIVISIÓN CELULAR .(100X)



CELULAS CAD DIFERENCIADAS EN 48 HORAS. (100 X)

ANEXO 3. PREPARACIÓN DE LOS STOCK A PARTIR DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS.



8. Referencias

-
- ¹ Gaki G.S., Papavassiliou A.G. Oxidative Stress-Induced Signaling Pathways Implicated in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Neuromol Med.* DOI: 10.1007/S12017-014-8294-X . 1-14
- ² Bulic B, Ness J, Hahn S, Rennhack A, Jumpertz T, Weggen S. Chemical biology, molecular mechanism and clinical perspective of γ -secretase modulators in Alzheimer's disease. *C Neurophar.* 2011; 125(9) : 598-622
- ³ Block M, Hong J. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. P in *Neurobio.*2005; 187(76); 77–98
- ⁴ Long-Smith C, Sullivan A, Nolan Y. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. P in *Neurobio.* 2009; 115(89); 277–87.
- ⁵ Rideout H, Stefanis L. The neurobiology of LRRK2 and its role in the pathogenesis of parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2014; 113(39); 576–92.
- ⁶ Simonse CS, Edland A, Berg-Hansen P, Celius EG. High Prevalence and increasing incidence of multiple sclerosis in the Norwegian county of Buskerud. *Acta Neurol Scand.*2016; 1–7. doi: [10.1111/ane.12615](https://doi.org/10.1111/ane.12615)
- ⁷ Estudio neuroepidemiológico nacional (EPI-NEURO). *Colombia Med.* 1999 30,002:74-81
- ⁸ Sorrentino P, Iuliano A, Polverino A, Jacini F, Sorrentino G. The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. *FEBS Letters.* 2014;588(5):641-52.
- ⁹ Palop JJ., Mucke L. Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Reviews Nature Neuroscience.* 2010; V13/(7).812-818.
- ¹⁰ Shulman, J.M., De Jager, P.L., Feany, M.B. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* 2011; 6, 193–222.
- ¹¹ Baltazar M.T. D-ORJ, Bastos M., Tsatsakis A.M., Duarte J.A., Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—A mechanistic approach. 2014.
- ¹² Bekris L. Mata I. Zabetian C. The Genetic of Parkinson Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.*2010;23(4):228-242
- ¹³ Coppedè F. Genetics and Epigenetics of Parkinson's Disease. *Scientific world Journal.*2012;1-

12

- ¹⁴ Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*2012;2:1-15.
- ¹⁵ Sawcer S., Franklin R JM.,Ban M.Multiple sclerosis genetcs. *Lancet Neurol.*2014;13;700–09.
- ¹⁶ Haugen M.,Frederiksen JI.,Degn M. B cell follicle-like structures in multiple sclerosis—With focus on the role of B cell activating factor. *Journal of Neuroimmunology.* 2014;273 1–7
- ¹⁷ Gomes N, Campos M, Órfão J, Ribeiro C. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. P in *Neuro-Psychophar & Biologi Psychia.* 2009; 33(3); 1372–89.
- ¹⁸ Calvo M, Cavero R. Medicinal plants used for neurological and mental disorders in Navarra and their validation from official sources. *J of Ethnophar.* 2015; 16(9); 263–68.
- ¹⁹ Retta D, Dellacassa E, Villamil J, Suárez S, Bandoni AL. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *I Crops and Products.* 2012; 38(8); 27– 38.
- ²⁰ Adams M, Gmünder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literatura. *J of Ethnophar.* 2007; 113 (13); 363–81.
- ²¹ Torres R, Isla MI, Ríos JL, Giner RM, Alberto MR. Anti-inflammatory properties of hydroalcoholic extracts of Argentine Puna plants. *F Research Internatio.* 2015; 67(7) 230–37.
- ²² Gonzalez J. Medicinal plants in Colombia. *J of Ethnopharmacology.* 1980; 2(1); 43–47.
- ²³ Parra JE, Patiño OJ, Prieto JA, Delgado WA, Cuca LE. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytoche Lett.* 2013;6(2-3);590-92
- ²⁴ Avila L, Perez M, Sanchez-Duffhues G, Hernández-Galán R, Muñoz E, Cabezas F, Quiñones W, Torres F, Echeverri F. Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lacteal* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. *Phytochemistry.* 2010;71:243-8
- ²⁵ Maia de Moraes S, Alves V, Medeiros L, Barreira E, Francisco dos Anjos J, Aparecida S, Sousa de Brito E, Alves de Souza M. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Bioche Systema and Ecolo.* 2007; 35(5); 670-75.
- ²⁶ Correa E, Sterner O, Echeverri F. Prenylhydroxybenzoic acid compounds with pungent activity from *Piper arieianum* (CDC) leaves. Phytoche. 2011; 72(2–3);238-41.
- ²⁷ Kondo T., Kitano T., Iwai K., Watanabe M., Taguchi Y., Yabu T., Umehara H., Domae H., Uchiyama T., Okazaki T. Control of ceramide-induced apoptosis by IGF-: Involvement of PI3-Kinase, caspase-3 and catalase. *C Death and Differen.* 2002; 113(9); 682 – 92.
- ²⁸ Haefen C., Wieder T., Gillissen B., Stärck L., Graupner V., Dörken B., Daniel P.T. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene.* 2002; 112(21); 4009 – 19.
- ²⁹ Muller AP., Haas CB., Camacho-Pereira J., Wigner A., Gnoatto J., Zimmer R., Onofre de Souza D., Galina A., Portela LV. 2013. Insulin prevents mitochondrial generation of H2O2 in rat brain. *Experimental Neurology* 247. 66–72

- ³⁰ Choudhary S., Kumar P. Malik J. Plants and phytochemicals for Huntington's disease. *Pharmacognosy Review*. 2013 Jul-Dec; 7(14): 81–91
- ³¹ Kim R., Emi M., Tanabe K., Murakami S., Uchida Y., Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and no-apoptotic cell death. *The Journal of Pathology*. (2006) (3) 319-326.
- ³² Ugartondo V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis Doctoral. 2009
- ³³ Bolaños JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61(14):1299-315.
- ³⁴ Busija D.W. GT, Domoki F., Katakam P.V., Bari F. Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: Mitochondrial targeted preconditioning. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60(Issues 13–14):1471–7
- ³⁵ Busija D.W. GT, Domoki F., Katakam P.V., Bari F. Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: Mitochondrial targeted.
- ³⁶ Cloonan SM., Choi A MK. Mitochondria: commanders of innate immunity and disease? 2012;24(1):32–40.
- ³⁷ Navarro A., Boveris A. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants . 2008;60(Issues 13–14):1534–44.
- ³⁸ Mei-Jie Jou. Pathophysiological and pharmacological implications of mitochondria-targeted reactive oxygen species generation in astrocytes . 2008;60(Issues 13–14):1512–26.
- ³⁹ Cordell GA. Phytochemistry and traditional medicine-The revolution continues. *Phytoche Lett*. 2014; 10: 28-40.
- ⁴⁰ Leonard CM, Viljoen AM. Warburgia: A comprehensive review of the botany, traditional uses and phytochemistry. *J of Ethnopharma*. 2015;165:260-85.
- ⁴¹ Zhou G, Tang L, Zhou X, Wang T, Kou Z, Wang Z. A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux. *J of Ethnopharma*. 2015;160:173-93.
- ⁴² Avalo García A, Pérez-Urria E. Metabolismo secundario en plantas. *Serie Fisiología Vegetal*. 2009 2(3):119-145.
- ⁴³ Peng W, Liu YJ, Wu N, Sun T, He XY, Gao YX. *Areca catechu* L. (Arecaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *J of Ethnopharma*. 2015;164:340-56.
- ⁴⁴ Lin L, Ni B, Lin H, Zhang M, Li X, Yin X, Qu C, Ni J. Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.: A review. 2015;159:158-83.

- ⁴⁵ Suri C, Fung BP, Tischler AS, Chikaraishi DM. Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigen transgenic mice. *J Neurosci.*1993; 13:1280-1291.
- ⁴⁶ Qi Y, Wang JK, McMillian M, Chikaraishi DM. Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *J Neurosci.*1997; 17:1217-1225.
- ⁴⁷ Hashemi SH, Li JY, Faigle R, Dahlstrom A. Adrenergic differentiation and SSR2a receptor expression in CAD-cells cultured in serum-free medium. *Neurochem Int.* 2003;42(1):9-17
- ⁴⁸ Horton CD, Qi Y, Chikaraishi D, Wang JK. Neurotrophin-3 mediates the autocrine survival of the catecholaminergic CAD CNS neuronal cell line. *J Neurochem.*2001;76(1):201-9.
- ⁴⁹ McLaurin J., Trudel GC., Shaw IT, Antel J., Cashman NR. A Human Glial Hybrid Cell Line Differentially Expressing Genes Serving Oligodendrocyte and Astrocyte Phenotype *Journal of Neurobiology*, 1995; 26, No. 2, pp. 283-293.
- ⁵⁰ Ursell MRM, McLaurin J, Wood DD, Ackerley CA, Moscarello MA. Localization and partial characterization of a 60 kDa Citrulline-Containing Transport form of myelin basic protein from MO3.13 cells and human white matter. *J Neurosci Res.* 1995; 42(1):41-53
- ⁵¹ Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*1998; 60:643–65.
- ⁵² Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal Transduction Of Stress Via Ceramide. *Biochem. J.*1998; 335:465–80.
- ⁵³ Hannun, Y.A., Luberto, C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.*2000; 10, 73–80
- ⁵⁴ Spiegel S., Foster D., Kolesnick R. Signal transduction through lipid second messengers. *Current Opinion in cell Biology.*1996; 8: 159-167.
- ⁵⁵ Van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J.*2003; 369:199–211
- ⁵⁶ Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol.*2000;184:285-300.
- ⁵⁷ Venkataraman K, Futerman AH. Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol.*2000;10: 408–412.
- ⁵⁸ Luberto C, Carolina MUoS, Kravaka JM, Carolina MUoS, Hannun YA, Carolina MUoS, et al. Ceramide Regulation of Apoptosis versus Differentiation: A Walk on a Fine Line. *Lessons from Neurobiology. Neurochemical Research.* 2002;27(7-8):609-17.
- ⁵⁹ Obeid L. M., Linardic C. M., Karolak L. A., and Hannun Y. A. Programmed cell death induced by ceramide. *Science.*1993; 259, 1769—1771.
- ⁶⁰ Brunet A., Datta SR., Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of

neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.*2001. 11 (3): 297-305.

⁶¹ Arboleda G, Huang TJ, Waters C, Verkhatsky A, Fernyhough P, Gibson RM. Insulin-like growth factor-1-dependent maintenance of neuronal metabolism through the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway is inhibited by C2-ceramide in CAD cells. *Eur J Neurosci.*2007;25:3030-3038

⁶² France-Lanord V., Brugg B., Michel PP., Agid Y., Ruberg M. Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *Journal Neurochem.* 1997;69(4):1612-21.

⁶³ Zundel W., Swiersz LM., Giaccia A. Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(5):1507-14.

⁶⁴ Goswami R., Singh D., Phillips G., Kilkus J., Dawson G. Ceramide regulation of the tumor suppressor phosphatase PTEN in rafts isolated from neurotumor cell lines. *Journal Neuroscience Research.* 2005;81(4): 541-550.

⁶⁵ Celestino J. Flora de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada. Ediciones Cultura Hispánica. Madrid (1997).

⁶⁶ Mohagheghzadeh A, Faridi P, Shams-Ardakani M, Ghasemi Y. Medicinal smokes. *J of Ethnophar.* 2006; 108; 161-84.

⁶⁷ Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Núñez V, Evans N, Alzate SP, García ME, Saldarriaga M, Del Valle G, Osorio RG. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part I: Traditional use of plants. *J of Ethnophar.* 2000;71; 493–04

⁶⁸ Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez SL, Osorio RG, Saldarriaga M, Díaz A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J of Ethnophar.* 2000;73; 233–41.

⁶⁹ Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J of Ethnophar.* 2002;82; 155-58.

⁷⁰ Dias PR, De Lima D, Guimarães E, Coelho MA. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytoche.* 2001;58; 547-51.

⁷¹ Cícero F, Sousa JT, Oliveira LE, Alexandre J, Andrade DE, Rocha E, Loiola OD, Barros GS. Piplartine, an amide alkaloid *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. *Phytome.* 2007;14; 605–12.

⁷² Pereira D, Gadelha GC, Castro FO, Pessoa C, Moraes MO, Rocha E, Sousa MA, Martins FJ, Costa-Lotufo LC. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxico in vitro.* 2007; 21;1-8.

⁷³ Araujo-Junior J, Da-Cunha E, Chaves M, Gray A. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytoche.* 1997; 44 (3); 559-61.

- ⁷⁴ Bezerra D, Vasconcellos M, Machado M, Villela I, Rosa R, Moura D, Pessoa C, Moraes M, Silveira E, Lima M, Aquino N, Henriques J, Saffi J, Costa-Lotufo L. Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems.. *Mutation Res.* 2009; 677; 8–13.
- ⁷⁵ Moraes J, Nascimento C, Lopes P, Nakano E, Yamaguchi L, Kato M, Kawano T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. *Exp Parasito.* 2011; 127; 357-64.
- ⁷⁶ Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzolia M, Andreotti E, Tognolini M, Maldonado M, Bruni R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Envi Toxico and Pharma.* 2009;27; 39–48.
- ⁷⁷ Valdivia C, Marquez N, Eriksson J, Vilaseca A, Muñoz E, Sterner O. Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. *Bioorga & Medi Chemis.* 2008;16; 4120-26.
- ⁷⁸ Vasques R, Debonisi H, Kato M, Bolzani V, Méda C, Young M, Furlan M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytoche.* 2002;59; 521-27.
- ⁷⁹ Nuñez V, Castro V, Murillo R, Ponce-Soto M, Merfort I, Lomonte B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytoche.* 2005; 66; 1017-25.
- ⁸⁰ Ishola IO, Agbaje EO, Akinleye MO, Ibeh CO, Adeyemi OO. Antidepressant-like effect of the hydroethanolic leaf extract of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) in mice: Involvement of monoaminergic system. *J of Ethnophar.* 2014;115;364–72
- ⁸¹ Setzer WN, Shen X, Bates RB, Burns JR, McClure KJ, Zhang P, Moriarity DM, Lawton RO. A Phytochemical investigation of *Alchornea Latifolia*. *Fitote.* 2000;106; 195-98.
- ⁸² Kouakou K, Schepetkin IA, Yapi A, Kirpotina LN, Jutil MA, Quinn MT. Immuno modulatory activity of polysaccharides isolated from *Alchornea cordifolia*. *J of Ethnophar.* 2013;124; 232–42.
- ⁸³ Noundou XS, Krause RWM, van Vuuren SF, Ndinteh DT, Olivier DK. Antibacterial activity of the roots, stems and leaves of *Alchornea floribunda*. *J of Ethnophar.* 2014;151; 1023–27.
- ⁸⁴ Ogundipe OO, Moody JO, Houghton PJ, Odelola HA. Bioactive chemical constituents from *Alchornea laxiflora* (benth) pax and hoffman. *J of Ethnophar.* 2001;74; 275–80.
- ⁸⁵ Seebaluck R, Gurib-Fakim A, Mahomoodally F. Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)—A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. *J of Ethnophar.* 2015;159;137–57
- ⁸⁶ Siems K, Jakupovic J, Castro V, Poveda L. Constituents of two *Acalypha* Species. *Phytoche.* 1996; 41(3);851-53.
- ⁸⁷ Auwal-Ibrahim M, Mohammed A, Bindawa-Isah M, Babando-Aliyu A. Review Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: A review update. *J of Ethnophar.* 2014;154; 26–54
- ⁸⁸ Wagner H. *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas.* 1996; 2a Edition Springer-Verlag, Berlin, Germany.

- ⁸⁹ Ruiz J, Cárdenas W, Baquero C. Cambio de la cobertura boscosa como sucedáneo de la dinámica colonizadora en el departamento del Caquetá. Revista de Inv. Univ Salle. Bogotá D.C. Colombia.2000;7(1):1-96.
- ⁹⁰ Sepúlveda Jiménez G., Porta Ducoing H., Rocha Sosa M. La Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 2003 Vol 21. 003 pp355-363
- ⁹¹ Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Scien. 2001;161;839-51.
- ⁹² Lokajová V, Backorová M, Backor M. Allelopathic effects of lichen secondary metabolites and their naturally occurring mixtures on cultures of aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). South African J of Botany. 2014;93:86-1.
- ⁹³ Rogerio AP, Sá-Nunes A, Faccioli LH. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. Pharmaco R. 2010; 62:298-07.
- ⁹⁴ Pavarini DP, Pavarini SP, Niehues M, Lopes NP. Exogenous influences on plant secondary metabolite level. Animal Feed Scien and Techno. 2012;176:5-16.
- ⁹⁵ Shen J., Yu Q. Gambogic amide selectively upregulates TrkA expression and triggers its activation. Pharmacological Reports. 67 (2015) 217–223.
- ⁹⁶ Jung YS, Kang TS, Yoon JH, Joe BY, Lim HJ, Seong CM, Park WK, Kong JY, Cho J, Park NS. Synthesis and evaluation of 4-Hydroxyphenylacetic acid amides and 4-hydroxycinnamamides as Antioxidants. Bioorga & Medi Chemis L. 2002;12;2599-02.
- ⁹⁷ Keppel-Hesselink JM, Kopsky DJ, Witkamp RF. Palmitoylethanolamide (PAE)-“Promiscuous” anti-inflammatory and analgesic molecule at the interface between nutrition and pharma. Pharmanutrition. 2014;2;19-5.
- ⁹⁸ Bruneton J. Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales 2 edición. Editorial Acribia. S.A. (1993)
- ⁹⁹ Wen YS, Ni W, Qin XJ, Yan H, Chen CX, Hua Y, Cheng YC, He L, Liu HY. Steroidal saponins with cytotoxic activity from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. yunnanensis. Phytoche Lett. 2015;12:31-34.
- ¹⁰⁰ Viera Júnior GM, Quintino da Rocha C, Souza Rodriguez T, Hiruma-Lima CA, Vilegas W. New steroidal saponins and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* K L. F Chemis.2015;186:160-67.
- ¹⁰¹ El-Najjar N., Gali-Muhtasib., Ketola R.A., Vourela Pia., Urtti A., Vourela H. The chemical and biological activities of quinones: overwie and implications in analytical detection. Phytochemistry Review. (2001) 10: 353-370.
- ¹⁰² Ugartondo Casadevall. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Universidad de Barcelona. Tesis Doctoral. (2009).

- ¹⁰³ Hertong M.G.L., Hollman P.C.H., Van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic Flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal Agricultural food Chemistry*. (1993) 41. 1242-1246
- ¹⁰⁴ Yin D D, Yuan RY, Wu Q, Li SS, Shuai S, Xu YJ, Hao XH, Wang LS. Assesment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. *Food Chemis*. 2015;187: 20-8.
- ¹⁰⁵ Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free radical Biology & Medicine*. (1995) 19(4):481-486.
- ¹⁰⁶ Testai L. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Scien*. 2015;135:68-76.
- ¹⁰⁷ Zeng Y, Quek YL, Kee CL, Low MY, Bloodworth BS, Ge . Analysis of 32 toxic natural substances in herbal products by liquidchromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J of pharmaceu and Biome Ana*.2015; 115:169-73.
- ¹⁰⁸ Pferschy-Wenzig EM, Bauer R. The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products. *Epilep & Beha*. 2015.
- ¹⁰⁹ Margina D, Ilie M, Gradinaru D, Androutsopoulos VP, Kouretas D, Tsatsakis AM. Natural products-friends or foes?. *Toxicology L*. 2015. 236:154-67.
- ¹¹⁰ Dhami N, Mishra AD. Phytochemical variation: How to resolve the quality controversies of herbal medicinal products?. *J of Herbal Medici*. 2015. 5:118-27.
- ¹¹¹ Kelber O, Steinhoff B, Kraft K. Assessment of genotoxicity of herbal medicinal products: A co-ordinated approach. *Phytomedicine*. 2012;19;472-76.
- ¹¹² Lopes JJ, Marx C, Ingrassia R, Picada JN, Pereira P, Falcao F. AB. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. *E and Toxi Patholo*. 2012;64;9-4.
- ¹¹³ Sperotto ARM, Moura DJ, Péres VF, Damasceno FC, Caramao EB, Henriques JAP, Saffi J. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunt essential oil and its major compound nerolidol. *F and Chemi Toxicol*. 2013;53:57-68.
- ¹¹⁴ Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha M, Tyagi OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. Phytochemistry of genus Piper. 1997;46(4);597-673.
- ¹¹⁵ Shi Q, Hui S, Ai-Hua Z, Hong-Ying X, Guang-Li Y, Ying H, Xi-Jun W. Natural alkaloids:basic aspects, biological roles, and future perspectives. 2014;12(6):401-6.
- ¹¹⁶ Charris J, Domínguez J, de la Rosa C, Caro C. (-)-Amuronine from the leaves of *Croton flavens* L. (Euphorbiaceae). *Bio Systema and Ecolo*. 2000;28:795-97.
- ¹¹⁷ Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Núñez V, Evans N, Alzate SP, García ME, Saldarriaga M, Del Valle G, Osorio RG, Díaz A, Valderrama R, Duque A, Vélez HN. Snakebites and ethnobotany in the northwest región of Colombia Part I: Traditional use of plants. 2000;71:493-04.

- ¹¹⁸ Garavito G, Rincón J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Gimenez A, Pinzón R, Deharo E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. 2005; 107:460-2.
- ¹¹⁹ Forero JE, Avila L, Taborda N, Tabares P, López A, Torres F, Quiñones W, Bucio MA, Mora-Pérez Y, Rugeles MT, Joseph-Nathan P, Echeverri F. In vitro anti-influenza screening of several Euphorbiaceae species. Structure of a bioactive Cyanoglucoside from *Codiaeum variegatum*. 2008; 69:2875-9.
- ¹²⁰ Abdelgadir HA, Van Staden J. Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. 2013;88:204-18.
- ¹²¹ Tala DS, Gatsing D, Fodouop SPC, Fokunang C, Kengni F, Djimeli MN. In vivo anti-salmonella activity of aqueous extract of *Euphorbia prostrata* Aiton (Euphorbiaceae) and its toxicological evaluation. Asian Pac J Trop Biomed. 2015;5(4):310-8.
- ¹²² Kamalakannam S, Murugan K, Barnard DR. Toxicity of *Acalypha indica* (Euphorbiaceae) and *Achyranthes aspera* (Amaranthaceae) leaf extracts to *Aedes aegypti*(Diptera:Culicidae). J of Asian-Pac Entom.2011;14:41-5.
- ¹²³ Victorien DT, Robert KJ, Jacques DT, Julien S, Jean-MarcA, Aléodjrodo EP, Olufunke S, Ferdinand D, Carlos D, Frédéric L, Karim D. Hemostatic activity screening and skin toxicity of sap of *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae) used in traditional medicine (Benin). Asian Pac J Trop Biomed Dis. 2012;s927-32.
- ¹²⁴ Saleem U, Mahmood S, Ahmad B, Saleem M, Anjum AA. Estimation of genotoxic and mutagenic potential of latex and methanolic leaves extract of *Euphorbia helioscopia* by comet assay and Ames test. Asian Pac J Trop Dis. 2015; 5(Suppl 1): S145-0.
- ¹²⁵ Parra JE, Delgado WA, Cuca LE. Cumanensic acid, a new chromene isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). 2011;4:280-82.
- ¹²⁶ Bezerra DP, Moura DJ, Rosa MR, Carvalho de Vasconcellos M, Romano e Silva AC, Odorico de Moraes M, Silveira ER, Sousa L. MA, Pegas H. JA, Costa-Lotufo LV, Saffi J. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. 2008: 652; 164-74.
- ¹²⁷ Péres VF, Moura DJ, Sperotto ARM, Damasceno FC, Caramão EB, Zini CA, Saff J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. 2009;47;2389-95.
- ¹²⁸ Mahabir S. Methodological challenges conducting epidemiological research on nutraceuticals in health and disease. PharmaNutri. 2013;2;120-25.
- ¹²⁹ Marín FR, Frutos MJ, Pérez-Alvarez JA, Martínez-Sánchez F, Del Rio JA. Flavonoids as nutraceuticals: Structural related antioxidants properties and their role on ascorbic acid preservation. Stud in Natu Produc Chemis. 2002;26;741-77.
- ¹³⁰ Bernal J, Mendiola JA, Ibáñez E, Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. J of Pharmaceu and Biome Analy. 2011; 55;758-74.
- ¹³¹ Ting Y, Jiang Y, Ho C, Huang Q. Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. J of Fuctio Foods 2014;7;112-28.

- ¹³² Birbes H, El Bawab S., Hannum YA., Obeid L. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J.* 2001;14:2669-79
- ¹³³ Birbes H., Luberto CH., Hsu Y., El Bawab S., Hannum YA., Obeid L. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *Biochem J.* 2005;386:445-1.
- ¹³⁴ Bawab S., Mao C., Obeid LM., Hannum YA. Ceramidases in the Regulation of Ceramide Levels and Function . *Subcell Biochem.* 2002;36;187-205.
- ¹³⁵ Shimeno H, Soeda S, Sakamoto M, Kouchi T, Kowakame T, Kihara T. Partial purification and characterization of sphingosine N-acyltransferase (ceramide synthase) from bovine liver mitochondrion-rich fraction. *Lipids.* 1998;33:601-06.
- ¹³⁶ Matsko CM, Hunter OC, Rabinowich H, Lotze MT, Amoscato AA. Mitochondrial lipid alterations during Fas- and radiation-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287: 1112-20.
- ¹³⁷ Garcia, R. C., Colell, A., Mari, M., Morales, A., and Fernandez-Chica, J. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* 1997. 272, 11369-11377
- ¹³⁸ Da-Silva WS, Gomez-Puyou A, de Gomez-Puyou MT, Moreno-Sanchez R, De Felice FG, de Meis L., Oliveira MF., Gallina A. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem.* 2004;279:39846-55
- ¹³⁹ Ghafourifar P., Klein SD., Schucht O., Schenk U., Pruschy M., Rocha S., Richter C. Ceramide Induces Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999. 274(10): 6080-6084.
- ¹⁴⁰ Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 1995;182:367-77.
- ¹⁴¹ Sacchetti ML. Time of action of neuroprotectors plays a role?. *Trends in Pharmacol Sci.* 2012;33;9.
- ¹⁴² Silva BJC, Seca AML, Barreto MdC, Pinto DGCA. Recent Breakthroughs in the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Morella* and *Myrica* Species. *Int J Mol Sci.* 2015;16:17160-80.
- ¹⁴³ Zhao J. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends Plant Sci.* 2015;20(9):576-85.
- ¹⁴⁴ Sak k, Everaus H. Multi-Target Cytotoxic Actions of Flavonoids in Blood Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(12):4843-7
- ¹⁴⁵ Jantan I, Ahmad W, Abbas-Bukhari SN. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Front Plant Sci.* 2015;25;6:655-73.
- ¹⁴⁶ Busch C, Burkard M, Leischner C, Lauer UM, Frank J, Venturelli S. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clin Epigenetics.* 2015; 10;7(1):64

¹⁴⁷ Rendeiro C, Rhodes JS, Spencer JPE. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochem Int.*2015;89:126-39.

¹⁴⁸ Vauzour D, Martinsen A, Layé S. Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects?. 2015; 89:63-74.

¹⁴⁹ Celestino J. Flora de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada. Ediciones Cultura Hispánica. Madrid (1997).

¹⁵⁰ Buntinx M¹, Vanderlocht J, Hellings N, Vandenameele F, Lambrichts I, Raus J, Ameloot M, Stinissen P, Steels P.Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *J Neurocytol.*2002;32(1):25-38.