

**Estudio del potencial protector de compuestos vegetales frente al daño genético inducido
por la uvb en bacterias y células humanas**

Adriana García Forero

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en Biología

Director

Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Doctor en Ciencias Agrícolas

Co-directora

Dra. Elena Stashenko.

Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Maestría en Biología

Bucaramanga

2017

Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Antecedentes	15
1.1 Efecto biológico de la radiación ultravioleta	15
1.2 Reparación por escisión de nucleótidos	16
1.3 Cáncer de piel	17
1.4 los flavonoides y la R-UVB	18
1.5 Sistemas biológicos.....	20
1.5.1 Celulas bacterianas.....	20
1.5.2 Células humanas hek-293	22
2. Materiales y métodos	24
2.1 Compuestos químicos, buffer, enzimas y medios de cultivo.....	24
2.2 Estirpes celulares	25
2.3 Condiciones de cultivos celulares.....	27
2.4 Irradiación de las estirpes celulares	27
2.5 Citotoxicidad de los compuestos y su antigenotoxicidad frente a UVB en <i>Escherichia coli</i> PQ37	28
2.6 Citotoxicidad de la UVB en la estirpe celular HEK-293	31
2.7 Genotoxicidad de la UVB en la estirpe celular HEK-293	31

2.8 Citotoxicidad de los compuestos y su antigenotoxicidad frente a UVB en células humanas HEK-293	34
2.9 Análisis estadístico.....	35
3. Resultados.....	36
3.1 Citotoxicidad de los compuestos y su antigenotoxicidad frente a UVB en células de <i>Escherichia coli</i> PQ37.	36
3.2 Citotoxicidad y genotoxicidad de la UVB en la estirpe celular HEK-293	38
3.3 Citotoxicidad de los compuestos y su antigenotoxicidad frente a UVB en células humanas HEK-293	42
4. Discusión.....	45
5. Conclusiones	51
6. Recomendaciones	52
Referemcoas Bibliográficas	54
Apéndices.....	68

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Principio del ensayo SOS Chromotest (modificado de Díaz-Duran et al. 2012).	21
Figura 2. Diseño experimental implementado para estudiar el efecto fotoprotectos de compuestos vegetales frente al daño inducido por radiación UVB.	25

Figura 3. Efecto antigenotóxico de los compuestos contra la UVB expresado como %IG.....	37
Figura 4. Efecto de la radiación UVB sobre la viabilidad de las células HEK-293.	39
Figura 5. Clasificación visual de los Cometas de las células Hek-293 en cinco (5) categorías (0–4) de acuerdo a la propuesta de Collins et al. (1997b).....	40
Figura 6. Efecto genotóxico de la UVB en células HEK-293 evaluado mediante el ensayo Cometa en ausencia (○) y presencia (●) de la EndoV–T4.	41
Figura 7. Citotoxicidad de los compuestos apigenina, EGCG, naringenina y pinocembrina en el modelo celular HEK-293.	43
Figura 8. Efecto antigenotóxico en células HEK-293 de los compuestos apigenina, naringenina, pinocembrina y EGCG frente a UVB expresado como GDI.	44

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Valores de CAPSI y CGI de los compuestos estudiados obtenidos con el ensayo SOS Chromotest.	37

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Compuestos polifenólicos de plantas que muestran actividad protectora frente a la radiación ultravioleta.....	68
Apéndice B. Condiciones de lisis celular usada en diferentes estudios para detectar daño en el ADN inducido por luz ultravioleta a través del ensayo cometa.....	71
Apéndice C. Efecto antioxidante de los compuestos estudiados obtenidos mediante el método ORAC.	73
Apéndice D. Plantas del género <i>Lippia</i> con alto contenidos de los flavonoides apigenina, naringenina y pinocembrina (Stashenko <i>et al.</i> 2013).....	74
Apéndice E. Genotoxicidad de los compuestos vegetales evaluados a través del SOS Chromotest.....	75

Tabla de Abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
βG	Actividad β -galactosidasa	FA	Actividad fosfatasa alcalina
CAPSI	Mínima concentración que produce significativa inhibición de la actividad fosfatasa alcalina	CGI	Mínima concentración que produce significativa inhibición de la genotoxicidad
%IG	Porcentaje de Inhibición de la Genotoxicidad	%VC	Porcentaje de viabilidad celular
GDI	Índice de Daño Genético	ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
CPD	Dímero de Pirimidina Ciclobutano	NER	Reparación por escisión de nucleótidos
UV	Radiación ultravioleta	UVA	Radiación Ultravioleta tipo A
UVB	Radiación Ultravioleta tipo B	UVC	Radiación Ultravioleta tipo C
DO	Densidad Óptica	DMEM	Medio de cultivo Eagle de Dubelco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGCG	Epigallocatequina-3-galato	EndoV-T4	Endonucleasa V del bacteriofago T4
PK	Proteinasa K	FBS:	Suero Fetal Bovino
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani	LD	Dosis Letal
PNPP	4-nitrofenilfosfato	ONPG	2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
LD50	Dosis Letal Media	4NQO:	4-nitroquinolina-1-óxido

Resumen

Título: Estudio del potencial protector de compuestos vegetales frente al daño genético inducido por la UVB en bacterias y células humanas*.

Autor: Adriana García Forero**

Palabras Clave: Antigenotoxicidad, SOS Chromotest, ensayo Cometa, UVB, compuestos flavonoides.

Descripción

La radiación ultravioleta tipo B (UVB) tiene alta relevancia biológica debido a que causa mutaciones; las cuales pueden conducir a respuestas inflamatorias, inmunosupresión y cáncer de piel. Las plantas producen compuestos polifenólicos que pueden contrarrestar los efectos nocivos de la UVB. El presente trabajo evaluó la actividad antigenotóxica frente a la UVB, de compuestos polifenoles (apigenina, curcumina, escualeno, naringenina, pinocembrina y quercetina) presentes en plantas colombianas, usando los ensayos SOS Chromotest en *Escherichia coli* y una variante del ensayo Cometa en células humanas HEK-293. De acuerdo a los resultados obtenidos en el modelo bacteriano, el potencial antigenotóxico de los compuestos fue: apigenina > pinocembrina > quercetina > curcumina > naringenina > escualeno. Adicionalmente, los compuestos apigenina, naringenina y pinocembrina reducen el daño genético inducido por la UVB en células humanas. La protección de estos compuestos se manifiesta como una significativa reducción en los co-tratamientos, del daño genético (fotoproductos) que puede ser hidrolizado por actividad endonucleasa de la enzima EndoV-T4. De acuerdo a los resultados obtenidos, estos compuestos pueden impedir la formación de fotoproductos en células irradiadas y/o fortalecer la capacidad de reparación de estos tipos de lesiones en el ADN. Los resultados son discutidos considerando el potencial de estos compuestos para el desarrollo de protectores solares de amplio espectro.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Maestría en Biología. Director: Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Co-director: Dra. Elena Stashenko

Abstract

Title: Study of the protective potential of plant compounds against uvb radiation - induced genetic damage in bacteria and human cells.*

Author: Adriana García Forero**

Keywords: Antigenotoxicity, SOS chromotest, Comet assay, UVB, flavonoids compounds.

Description

Ultraviolet radiation type B (UVB) has high biological relevance because it causes mutations; which can lead to inflammatory responses, immunosuppression and skin cancer. Plants produce polyphenolic compounds like flavonoids, that help them tolerate the harmful effects of UVB. The present work evaluated the antigenotoxic activity against UVB of polyphenol compounds (apigenin, curcumin, squalene, naringenin, pinocembrin and quercetin) present in colombian plants, using the SOS Chromotest assay in *Escherichia coli* and a variant of the Cometa test in human cells HEK-293. According to the results obtained in the bacterial model, the antigenotoxic potential of the compounds was: apigenin > pinocembrina > quercetina > curcumina > naringenina > squalene. In addition, the compounds apigenin, naringenin and pinocembrina reduce the genetic damage induced by UVB in human cells. The protection of these compounds is manifested as a significant reduction in co-treatments of genetic damage (photoproducts mainly cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine (6 4) pyrimidone photoproducts) that can be hydrolyzed by endonuclease activity of the enzyme EndoV-T4. According to the results obtained, these compounds can prevent the formation of photoproducts in irradiated cells and/or strengthen the ability to repair these types of lesions in the DNA. The results are discussed considering the potential of these compounds for the development of broad spectrum sunscreens.

* Research work

** Science Faculty. Biology School. Master in Biology. Director: Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Codirector: Dra. Elena Stashenko

Introducción

La sobreexposición de la piel a la radiación solar ha sido una de las principales preocupaciones de salud pública debido su efecto carcinogénico (Gandini *et al.* 2005; Purdue *et al.* 2008; Lino *et al.* 2009). La radiación ultravioleta (UV) induce daños en el ADN (Mitchell 1988; Pfeifer 1997; Mouret *et al.* 2006), principalmente fotoproductos como el ciclobutano de pirimidina (CPD) y la (6-4) pirimidina pirimidona (6-4PP); los cuales causan mutaciones (Ikehata & Ono 2011) que pueden conducir a respuestas inflamatorias, inmunosupresión y cáncer de piel en humanos (Ichihashi *et al.* 2003; Wikonkal & Douglas 1999; Vink & Roza 2001; Zaidi *et al.* 2008). En tal sentido, las estrategias de protección preventiva que utilizan agentes fotoprotectores son importantes para contrarrestar el efecto nocivo de la radiación solar (Gilaberte & González 2010).

El cáncer de piel es una problemática de creciente preocupación dado que presenta una de las incidencias más alta entre los tumores malignos en seres humanos (Zaidy *et al.* 2008; Rogers *et al.* 2010). En Colombia, la incidencia de este tipo de cáncer aumentó de 23 casos/100000 habitantes en 2003 a 41 casos/100000 habitantes en 2007. Para el año 2020, se estima una incidencia de 102 casos/100000 habitantes (Sánchez *et al.* 2011). Colombia presenta una serie de condiciones geográficas y sociales que hacen a la población especialmente vulnerable a la exposición por radiación ultravioleta. Estas son: *i*) su ubicación sobre la zona ecuatorial donde no existen estaciones y la radiación solar alcanza máximos durante casi todo el año; *ii*) un alto porcentaje de habitantes viviendo por encima de los 2400 m.s.n.m.; *iii*) condiciones laborales de diferentes grupos poblacionales como los vendedores ambulantes, campesinos y los miembros de

la fuerza pública, los cuales están expuestos a la radiación solar durante parte importante del día y; *iv*) los obstáculos burocráticos del sistema de salud que dificultan el diagnóstico y tratamiento a tiempo del cáncer de piel (Nova-Villanueva *et al.* 2007; Sánchez *et al.* 2011; Sanchez-Vanegas *et al.* 2013).

Los compuestos fitoquímicos son considerados como una clase de agentes protectores menos tóxicos que los compuestos fotoprotectores sintéticos (Afaq 2011). Las plantas tienen vías metabólicas que producen naturalmente compuestos protectores cuando son expuestas a la radiación UV (Zhang & Björn 2009). Por lo tanto, ellas pueden ser fuentes de compuestos que inhiben las mutaciones celulares involucradas en la génesis del cáncer de piel y el envejecimiento (Nichols & Katiyar 2010; Afaq 2011; Afaq & Katiyar 2011). Esta clase de compuestos vegetales operan por diferentes mecanismos tales como: *i*) absorción directa de fotones; *ii*) actuando como pantalla dispersante de la UV; *iii*) fortalecimiento del sistema antioxidante endógeno y el sistema inmune, *iv*) inhibiendo los procesos inflamatorios, *v*) modulando las rutas de señales para la transducción de genes críticos; *vi*) inhibiendo la reparación propensa a error; *vii*) estimulando los mecanismos de reparación del daño en el ADN y; *viii*) estimulando la melanogénesis (Gilaberte & González 2010; Nichols & Katiyar 2010; Afaq 2011; Afaq & Katiyar 2011; Jansen *et al.* 2013; Saewan & Jimtaisong 2013).

Entre los compuestos fitoquímicos de mayor potencial como fotoprotectores se encuentran los polifenoles, especialmente los flavonoides. Estos son metabolitos secundarios que generalmente proporcionan colores atractivos a las flores para atraer polinizadores y que protegen a la planta de infecciones fúngicas y la sobreexposición a la luz solar (Winkel-Shirley 2002; Cushnie & Lamb 2005). Entre otras bioactividades, los compuestos flavonoides poseen efectos antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antialérgica, antitumoral y anticancerígena (Nijveldt *et al.*

2001; Le Marchand 2002; Agrawal 2011; Kumar & Pandey 2013; Saewan & Jimtaisong 2013); muchas de ellas relacionadas con su potencial quimiopreventivo. Colombia presenta una amplia diversidad vegetal rica en flavonoides bioactivos (Martínez Valderrama 2000; Johnson *et al.* 2002; Garzón *et al.* 2010; Stashenko *et al.* 2013). Recientemente, se han identificado plantas cuyos constituyentes polifenólicos presentan propiedades fotoprotectoras (Mejía-Giraldo *et al.* 2016; Quintero *et al.* 2017).

El objetivo de la presente tesis fue estudiar el potencial protector del daño genético de un grupo de compuestos polifenólicos presentes en plantas de la diversidad Colombiana (Stashenko *et al.* 2013) como son: apigenina, curcumina; escualeno; naringenina, pinocembrina y quercetina. A tales fines, fueron usados ensayos celulares bacterianos y humanos. El ensayo bacteriano fue el SOS Chromotest, el cual se fundamenta en una respuesta inducible por daño genético (respuesta SOS), estrechamente conectada con la inhibición de la división celular en *Escherichia coli* (Huisman & D'Ari 1981). Cuando las células de *E. coli* son expuestas a UVB, se producen CPD y 6-4PP que distorsionan estructuralmente el ADN (Rosenberg & Echols 1990). Dado que estos fotoproductos son un obstáculo para la replicación del cromosoma (Courcelle *et al.* 2003), se induce la respuesta SOS (Huisman & D'Ari 1981). Por lo tanto, el SOS Chromotest es altamente sensible a la radiación ultravioleta (Quillardet & Hofnung 1984). Adicionalmente, se uso el ensayo Cometa en células humanas HEK-293. Este ensayo permite medir roturas en el ADN de células nucleadas (eucariotas). Brevemente, las células son enbebidas en agarosa sobre una lámina de microscopio, lisadas con detergentes y alta concentración salina; formando nucleoides que contienen bucles superenrollados de ADN unidos a la matriz nuclear. Si el ADN es fragmentado, una electroforesis a pH alcalino da como resultado estructuras parecidas a cometas que son teñidas y observadas por microscopía de fluorescencia. La intensidad de la cola

del cometa en relación con la cabeza refleja el número de roturas del ADN. El fundamento que explica los cometas es que los bucles que contienen una rotura pierden su superenrollado, relajándose y migrando hacia el ánodo electroforético (Fairbairn *et al.* 1995; Collins 2004). Dado que la UVB no produce niveles relevantes de roturas en el ADN, sino fotoproductos CBD y 6-4PP (Mitchell 1988; Pfeifer 1997; Mouret *et al.* 2006); el ensayo cometa en su forma original no es sensible a este agente (Collins *et al.* 1997a). Por ello, se usó un ensayo modificado que produce hidrólisis enzimática de los fotoproductos para hacerlo sensible a la UVB.

Dado que, las plantas tienen vías metabólicas que producen naturalmente compuestos protectores cuando son expuestas a la radiación UV (Zhang & Björn 2009), en la presente tesis nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Pueden los metabolitos secundarios vegetales encargados de modular el daño producido por UV, disminuir el daño causado por la radiación UVB en bacterias y células humanas?. Los objetivos específicos para resolver esta pregunta fueron los siguientes:

- 1) Identificar compuestos polifenólicos con propiedades protectoras del daño genético producido por la UVB usando modelos celulares bacterianos y humanos.
- 2) Determinar si existe relación entre los indicadores de daño genético medidos por el ensayo Cometa y la inducción de fotoproductos (CPD y 6-4PP) por UVB, en el modelo de células humanas.
- 3) Postular un potencial mecanismo de acción fotoprotectora para los compuestos que resulten promisorios en el estudio.

1. Antecedentes

2.1 Efecto biológico de la radiación ultravioleta

La UV es uno de los agentes genotóxicos ambientales que causan mayor inestabilidad genética y constituye el principal factor de riesgo del cáncer de piel (Narayanan *et al.* 2010). El espectro de luz ultravioleta comprende los rayos UVA (onda larga, 400–315 nm), UVB (onda media, 315–280 nm) y UVC (onda corta, 280–100 nm); siendo la energía de estos inversamente proporcional a la longitud de onda (Nichols & Katiyar 2010; Afaq & Katiyar 2011; Jansen *et al.* 2013).

Tras su paso por la atmósfera, un 5% de UVB alcanza la superficie terrestre con una variedad de efectos en los seres vivos. En humanos, la luz UVB atraviesa la epidermis hasta llegar a la parte superficial de la dermis (Nichols & Katiyar 2010). A nivel celular, es absorbida directamente por las bases nitrogenadas del ADN, produciendo enlaces covalentes entre bases adyacentes, que dan lugar principalmente a lesiones mutagénicas denominadas Dímeros de Pirimidina Ciclobutano (CPDs) y 6,4 fotoproductos de pirimidina-pirimidona (6,4 PPs) (Ravanat *et al.* 2001; Trautinger 2001; Zaidy *et al.* 2008). Otros fotoproductos formados son los dímeros de purina y los monoadductos de pirimidina (Ravanat *et al.* 2001; Pfeifer *et al.* 2005). Indirectamente la luz UVB causa especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño oxidativo en las bases nitrogenadas (Katiyar *et al.* 2011). En su conjunto, estas lesiones llevan a la activación de vías de señalización celular con efectos agudos como quemaduras, eritema, inflamación, pigmentación y formación de radicales libres; también a efectos crónicos como fotodermatosis, inmunosupresión, envejecimiento prematuro y carcinogénesis (Jansen *et al.* 2013).

La formación de fotoproductos bloquea la replicación y la división celular con participación de la proteína p53, la cual cumple tres funciones principales: i) induce señales para detener el ciclo celular en la fase G1, dando espacio a la célula de remover y reparar los daños en el ADN; ii) en células con daño intermedio promueve la rápida reparación del daño mediante la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER); iii) en queratinocitos con excesivo daño activa la apoptosis abortando la formación de tumores (Trautinger 2001; Latonen & Laiho 2005). Si el daño persiste hasta la fase S del ciclo celular, una polimerasa propensa a error, como la polimerasa η , puede sobrepasar los daños producidos en el ADN por la UVB causando transiciones (C→T) y sustituciones de dobles pares de bases (CC→TT), conocidas como las huellas genéticas de la RUV (Pfeifer *et al.* 2005; Brenner & Hearing 2008; Zaidy *et al.* 2008; Saewan & Jimtaisong 2013). Cuando estas mutaciones se producen en oncogenes y genes supresores de tumores, las células entran en un estado de inestabilidad genómica y se tornan incapaces de experimentar apoptosis, dando lugar a procesos de expansión clonal de células mutantes que originan cáncer de piel (de Gruijl *et al.* 2001; Agar & Young 2005; Latonen & Laiho 2005).

1.2 Reparación por escisión de nucleótidos

La NER es la principal defensa de los seres vivos ante los daños causados por la radiación UVB y se encarga de remover los CPDs y los 6,4 PPs (Wood 1997; Morita *et al.* 2012). El principio de funcionamiento general de la NER es altamente conservado en los tres dominios de la vida (Aravind *et al.* 1999; de Boer & Hoeijmakers 2000; Morita *et al.* 2012). El proceso se puede resumir en 4 pasos: i) reconocimiento del daño; ii) incisión dual en la cadena dañada para

remover el segmento de hebra sencilla; iii) llenado del hueco por síntesis de nucleótidos libres de error usando la cadena complementaria intacta como molde; iv) ligación del nuevo fragmento para restaurar los enlaces fosfodiéster (Wood 1997; de Boer & Hoeijmakers, 2000; Iyama & Wilson, 2013). Aunque la formación de CPDs se da a una tasa muy baja, si estos no son reparados correctamente, unos pocos pueden desencadenar mutagénesis, y carcinogénesis (Katiyar *et al.* 2011).

1.3 Cáncer de piel

El cáncer de piel, es el tipo de cáncer humano que ha mostrado mayor incremento al nivel mundial en las últimas décadas (Zaidy *et al.* 2008). Puede clasificarse en dos tipos principales: melanómico y no melanómico. El melanoma se desarrolla a partir de los melanocitos y tiene la mortalidad más alta entre los tipos de cáncer cutáneos (Gilchrest *et al.* 1999); se suele presentar por sobreexposición del tronco, piernas y espalda (Narayanan *et al.* 2010). El cáncer no melanómico muestra los niveles de incidencias más altas. Surge a partir de los queratinocitos y se desarrolla en áreas expuestas permanentemente al sol, relacionándose con una exposición diaria (Gilchrest *et al.* 1999; Leiter & Garbe 2008).

Aunque hay varios factores que desencadenan el cáncer cutáneo, se considera que la RUV es su principal contribuyente (Narayanan *et al.* 2010). El papel de la RUV es multifactorial produciendo: *i*) daños en el ADN que conlleva producción de mutaciones y tumores a largo plazo; *ii*) debilitamiento del sistema inmune con pérdida de eficacia para enfrentar la formación de tumores; *iii*) sistema inmune con mayor susceptibilidad al virus del papiloma humano; *iv*) estrés oxidativo y envejecimiento prematuro (Leiter & Garbe 2008).

1.4 los flavonoides y la R-UVB

La UV afecta a todos los seres vivos en diferente medida. En plantas, inhibe procesos vitales como la fotosíntesis y reduce el crecimiento (Zlatev *et al.* 2012). Aunque la principal función de los flavonoides es colaborar en la reproducción aportando colores vistosos que atraigan polinizadores y dispersores de semillas (Winkel-Shirley 2002), hay evidencias que muestran que también están relacionados con la modulación de los efectos nocivos de la UVB:

1- La resistencia de las plantas a UVB suele ser mayor que la de células de mamíferos y microbios, los cuales no poseen flavonoides (Landry *et al.* 1995).

2- El espectro de absorción de los flavonoides se da en la zona UVB (280-315 nm) lo que impide la llegada de fotones a la célula (Ryan *et al.* 2009).

3- Los flavonoides suelen estar presentes en las capas epidérmicas de las hojas y en tejidos susceptibles a la UV como el polen y el meristemo apical (Winkel-Shirley 2002).

4- Los flavonoides son conocidos como componentes de las plantas regulados por la UVB; de hecho, las enzimas de la vía biosintética flavonoide, fenilalanina amonio liasa y chalcona sintasa son inducidas con UVB (Zhang & Björn 2009).

5- Se ha encontrado una relación entre la altitud y la producción de metabolitos secundarios en plantas superiores. A medida que aumenta la altitud; y por lo tanto la incidencia de R- UVB, hay una acumulación mayor de compuestos fenólicos en las hojas (Jaakola & Hohtola 2010).

6- Plantas de zonas polares donde ha aumentado la incidencia de la R-UVB, como consecuencia del daño en la capa de ozono, muestran un incremento en la biosíntesis de flavonoides (Dormann & Woodin 2002; Ryan *et al.* 2009).

7- Plantas de *Arabidopsis thaliana* con mutaciones que alteran la capacidad de sintetizar flavonoides y ésteres sinapato, exhiben hipersensibilidad a UVB (Landry *et al.* 1995).

8- Plantas con altos contenidos de flavonoides suelen ser tolerantes a la UVB. Por ejemplo, Bieza & Lois (2001) aislaron una planta mutante de *Arabidopsis* con tolerancia a dosis letales de UVB, la cual a su vez presentaba constitutivamente una producción alta de flavonoides en sus pigmentos presuntamente responsable de su resistencia.

9- Muchas plantas tienden a acumular flavonoides como apigenina, quercetina, luteolina y kaempferol, así como otros metabolitos secundarios, rápidamente después de la exposición a UVB (Markham *et al.* 1998; Wilson *et al.* 1998). Hipotéticamente, estos flavonoides protegen blancos moleculares en el mesófilo y otorgan una mayor capacidad de absorción de este tipo de radiación (Wilson & Greenberg 1993). La inducción de flavonoides por irradiación con UVB ha sido reportado para un número de especies incluyendo, *Secale cereale* L. var. Kustro (Tevini *et al.* 1991), *Brassica napus* (Wilson & Greenberg 1993), *Zea mays* L. (Santos *et al.* 1993), *Mentha x piperita* L., (Dolzhenko *et al.* 2010) y *Hordeum vulgare* L. cv. Alfa (Fedina *et al.* 2007).

No obstante, hay algunas investigaciones donde no hay una correlación clara entre la producción de flavonoides y la resistencia a UVB; de modo que esta puede ser una respuesta a estrés especie específica, incluso específica de cada variedad (Fedina *et al.* 2007). Algunos autores, han indicado que el incremento de flavonoides aumenta la capacidad antioxidante y el potencial para disipar energía, pero no la capacidad de captar fotones de la UVB (Markham *et al.* 1998; Zlatev *et al.* 2012).

1.5 Sistemas biológicos

1.5.1 Celulas bacterianas. Las bacterias son usadas como ensayos para determinar la antigenotoxicidad y/o antimutagenicidad de una sustancia durante sus primeras fases de evaluación, bajo la premisa que todas las formas de vida comparten mecanismos de mutagénesis similares (Kada & Shimoi 1987). Las bacterias son sistemas muy sensibles a los agentes mutagénicos que dañan el ADN y presentan múltiples ventajas como son: su simplicidad, facilidad de cultivo, bajo costo y flexibilidad a diferentes escenarios experimentales (Quillardet & Hofnung, 1985; Słoczyńska *et al.* 2014). Sin embargo, los resultados con antimutágenos probados en líneas celulares de mamíferos pueden ser diferentes de los obtenidos con cepas bacterianas; especialmente en casos donde el mutágeno interactúa con blancos específicos eucariotas, o de promutágenos que requieren activación metabólica para su transformación (Kuroda *et al.* 1992; Słoczyńska *et al.* 2014).

1.5.1.1 Ensayo Sos Chromotest. La respuesta de emergencia celular SOS es un mecanismo bacteriano de reparación inducible en el que participan aproximadamente 40 proteínas (Eller *et al.* 2008). Este mecanismo se activa ante agentes como la UV que dañan el ADN, detienen su replicación y la división celular, conduciendo a la acumulación en el ADN de regiones de cadena sencilla. Para más detalles de esta respuesta celular ver revisión de Janion (2008).

Se han desarrollado varios procedimientos experimentales basados en la inducción de la respuesta SOS en bacterias, con el fin de medir el potencial genotóxico de un mutágeno determinado sobre el ADN. Entre estos ensayos, se encuentra el SOS Chromotest desarrollado en *E. coli* (Quillardet *et al.* 1982); el cual es un ensayo colorimétrico que permite medir la

genotoxicidad de un agente con base en la inducción de un gen reportero *lacZ* (Quillardet & Hofnung 1985). Las cepas usadas, tienen una fusión *sfiA::lacZ*, de modo que el gen estructural de la β -galactosidasa queda bajo el control del gen *sfiA*, implicado en la inhibición de la división celular (Quillardet *et al.* 1982; Quillardet & Hofnung 1985). Debido a las varias mutaciones desarrolladas en cepas de *E. coli*, este ensayo permite dilucidar diferentes tipos de daño en el ADN (Quillardet *et al.* 1982; Quillardet & Hofnung 1985; Goerlich *et al.* 1989; Serment-Guerrero *et al.* 2008). La Figura 1 resume el principio de funcionamiento del ensayo.

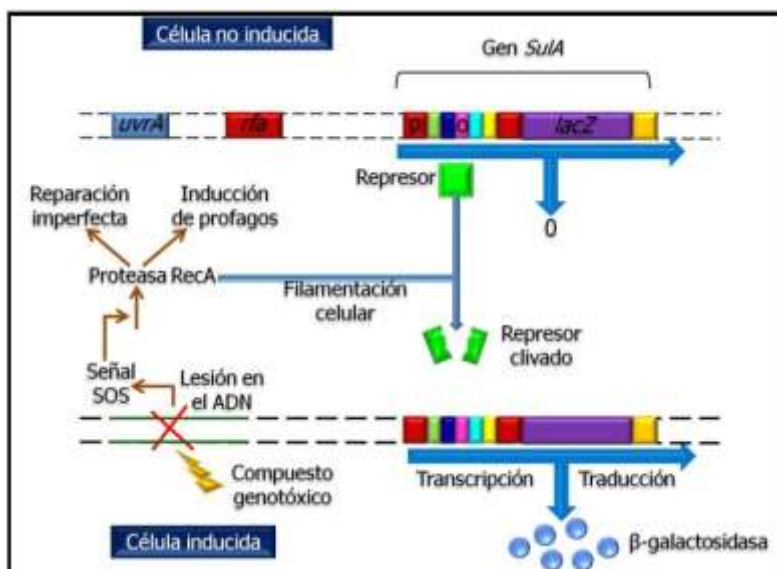


Figura 1. Principio del ensayo SOS Chromotest (modificado de Díaz-Duran *et al.* 2012).

En la parte superior una célula no inducida, el represor *lexA* previene la expresión de la fusión *sfiA::lacZ*. En la parte inferior una célula inducida. Daños en el ADN han provocado la activación de la proteína *RecA*. El represor *LexA* se ha escindido por la proteína *RecA* activada, lo que resulta en la inducción de la expresión de la fusión *sfiA::LacZ*.

1.5.2 Células humanas hek-293 Las líneas celulares eucariotas son un instrumento con creciente utilización para entender la biología de los mamíferos y para la evaluación de fármacos. Hasta mediados del siglo XX hubo siempre gran dificultad para transformar células humanas cultivadas con adenovirus humanos, quizás debido a que la exposición de las células a los virus siempre culminaba con infección lítica y producción de infección vírica (Graham *et al.* 1977; Shaw *et al.* 2002). Graham *et al.* (1997) describieron la transfección de cultivos primarios de células embrionarias de riñón humano (HEK) con solo fragmentos de ADN del adenovirus 5, dando origen a las células HEK-293. El ADN insertado tenía 4343 nucleótidos que incluyen los genes de las proteínas E1A y E1B; las cuales interfieren en el control ciclo celular y la inhibición de la apoptosis, respectivamente (Berk 2005; Lin *et al.* 2014). La proteína E1A es una proteína inmortalizadora que lleva a las células de fase G₀ a S; mientras que la proteína E1B inhibe a P₅₃ bloqueando la inducción a apoptosis. E1A y E1B además interactúan con otras proteínas para la defensa contra las respuestas a infecciones virales y de la regulación del ciclo celular (Berk 2005).

Adicionalmente, en las células HEK-293 se expresa fuertemente el gen ERCC1, perteneciente al sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) (Shaw *et al.* 2002). A pesar del origen por transfección de la línea celular HEK-293, esta posee una muy baja capacidad de transformación tumoral (Graham *et al.* 1977). Shaw *et al.* (2002), encontraron que la línea HEK-293 y otras líneas HEK transformadas por adenovirus presentan un patrón de expresión de mRNA típico de una neurona en diferenciación temprana o de una célula madre neuronal; así como, actividad eléctrica. Por lo tanto, las células HEK-293 no son células renales típicas debido al universo embrional del que surgieron.

1.5.2.1 El ensayo cometa y la UVB La técnica estándar del ensayo cometa permite cuantificar rompimientos de doble y simple cadena, así como sitios álcali-lábiles. Debido a que la luz UVB produce mayormente fotoproductos (ej: CPDs), estos no pueden ser detectados por el procedimiento estándar del ensayo (Sastre *et al.* 2001). Aunque en los tratamientos con UVB la reparación NER causa rompimientos intermedios durante el proceso de remoción de CPDs; tales roturas son de muy corta duración y de difícil detección (Gedik *et al.* 1992).

Varios tipos de fotoproductos pueden convertirse en rompimientos de cadena sencilla de ADN por inducción enzimática para aumentar la sensibilidad del ensayo cometa (Collins 2004). Gedik *et al.* (1992) fueron pioneros en la introducción de la T4 endo-V en el ensayo cometa para detección de daños por UVC. La T4 endo-V, cataliza el primer paso de la Reparación por Escisión de Bases para remover CPDs en el bacteriófago T4 mediante un mecanismo diferente a los encontrados en *E. coli* y en seres humanos (Vassylyev *et al.* 1995). La reacción se produce cuando la enzima identifica los CPDs, se une al ADN y escinde el enlace glucosídico de la base pirimidina 5' del CPD. Finalmente, produce un corte en el enlace fosfodiéster 3' del sitio abásico (Vassylyev *et al.* 1995).

Otra vía para aumentar la sensibilidad del ensayo Cometa frente a la UVB, es llevar a cabo la lisis celular con Proteinasa K antes del tratamiento con T4 endo-V. La Proteinasa K causa la digestión de proteínas asociadas al ADN, permitiendo que las endonucleasas tengan acceso a la estructura azúcar-fosfato relajada y a mayor número de sitios blanco (Sauvaigo *et al.* 1998; Valencia *et al.* 2011).

2. Materiales y métodos

2.1 Compuestos químicos, buffer, enzimas y medios de cultivo

El mutágeno 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) y los compuestos apigenina (95%), naringenina (95%), pinocembrina (95%), quercetina (95%), curcumina (65%), escualeno (98%), epigallocatequina-3-galato, EGCG (95%), y el colorante azul de tripano (0.4%), la agarosa de bajo punto de fusión y la agarosa grado molecular se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA). El medio de cultivo Eagle de Dubelco modificado (DMEM), la mezcla de nutrientes F-12 (F-12), el Suero Fetal Bovino (FBS), el buffer Fosfato Salino (PBS), la enzima tripsina-EDTA, y la mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina, se adquirieron de la casa comercial Gibco® (Grand Island, NY, USA). La enzima endonucleasa V del bacteriofago T4-PDG (EndoV—T4), fue adquirida de la casa comercial New England Biolabs (Beverly, MA, USA). El medio Luria-Bertani (LB) y los sustratos para las enzimas β -galactosidasa (2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, ONPG) y fosfatasa alcalina (4-nitrofenilfosfato, PNPP), fueron adquiridos de la casa comercial Amresco (Solon, Ohio, USA). La enzima proteinasa K fue obtenida de la casa comercial Promega (Madison, WI, USA). Los demás reactivos usados en el trabajo fueron obtenidos de las casas comerciales J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE.UU) y Merck (Kenilworth, NJ, EE.UU). Los compuestos apigenina, naringenina, quercetina y curcumina, fueron disueltos en metanol; mientras que, la pinocembrina y el EGCG

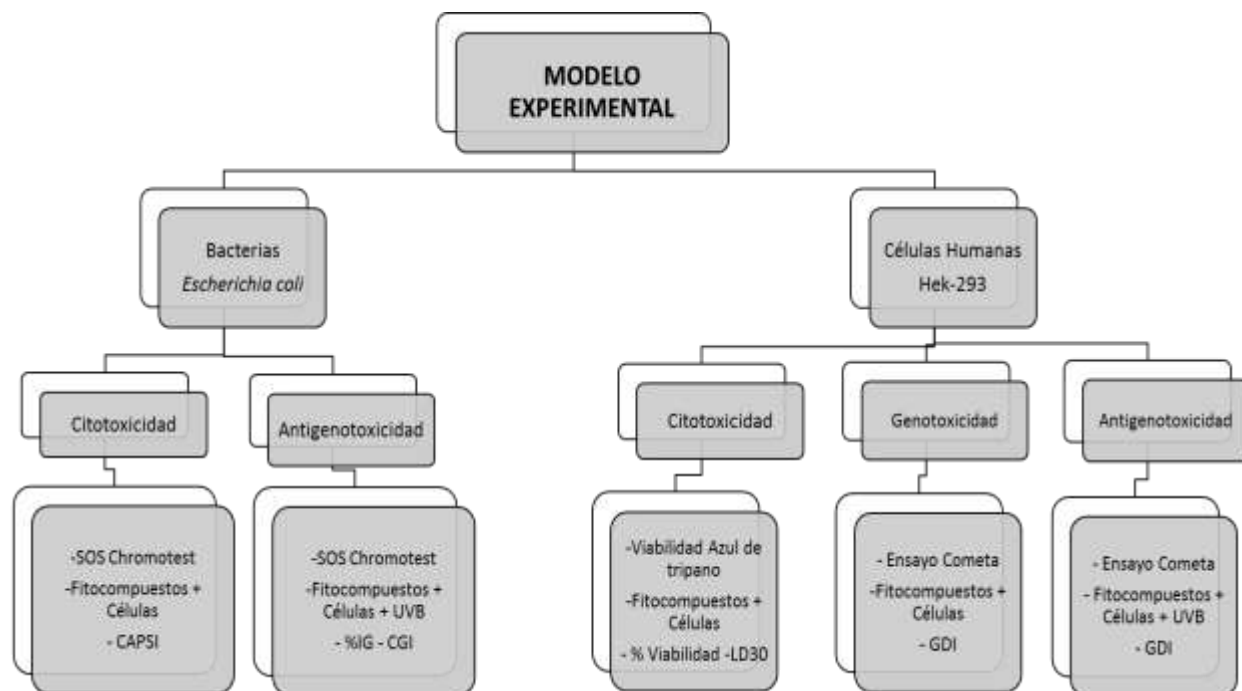


Figura 2. Diseño experimental implementado para estudiar el efecto fotoprotector de compuestos vegetales frente al daño inducido por radiación UVB.

Se prepararon en etanol. Por último, el escualeno fue disuelto en DMSO. La concentración a la que fue preparado cada compuesto estuvo relacionada con su solubilidad en los solventes usados.

2.2 Estirpes celulares

La cepa PQ37 de *E. coli*, usada en el SOS Chromotest, tiene el siguiente genotipo: F^- , *thr*, *leu*, *his-4*, *pyrD*, *thi*, *galE*, *galK* o *galT*, *lac* Δ U169, *srl300::Tn10*, *rpoB*, *rpsL*, *rfa*, *trp::Muc+* *sfiA::Mud(Ap, lac)cts* (Quillardet *et al.* 1982). En dicha cepa, la fusión transcripcional *sfiA::lacZ*, permite monitorear la inducción de daño primario en el ADN mediante la expresión de la actividad β -galactosidasa. La estirpe presenta la mutación *lac* en su cromosoma; por tanto, toda la actividad β -galactosidasa de las células ocurre a partir del promotor *sfiA* de la fusión (Quillardet

& Hofnung 1985). Adicionalmente, ésta cepa es deficiente en la reparación por escisión de nucleótidos (NER de sus siglas en inglés) incrementando su susceptibilidad a la luz UV. Esta cepa cuenta con la mutación *rfa* que modifica los lipopolisacáridos de membrana permitiendo una mejor difusión de compuestos a través de ella. Por último, cuenta con la mutación PHO^C ; la cual produce una expresión constitutiva de la enzima fosfatasa alcalina. Dicho fenotipo nos permite identificar cuando un compuesto produce inhibición de síntesis de proteínas (Quillardet & Hofnung 1985).

La estirpe celular HEK-293 (ATCC® CRL-1573™), fue aislada a partir de células del riñón de un embrión humano que fueron transformadas con el adenovirus 5 (Graham *et al.* 1977). Dicha estirpe celular, posee las siguientes características: células epiteliales alargadas, crecen adheriéndose a un sustrato, muestran variación de tamaño celular y tienden a seguir dividiéndose una vez alcanzan la confluencia. Estudios más recientes, mostraron que el patrón de expresión de mRNA de esta estirpe celular es muy similar al de una neurona con patrones de actividad eléctrica. Por ello, se ha planteado que la estirpe HEK-293 derivó de células de un linaje adrenal que se encuentra adyacente al riñón; específicamente, de la cresta neural ectodermal de la médula adrenal (Shaw *et al.* 2002; Lin *et al.* 2014). Las células de la estirpe HEK-293 fueron donadas por el laboratorio de Actividad Biológica y Cultivo de células del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

2.3 Condiciones de cultivos celulares

Las células de *E. coli* se cultivaron en medio líquido LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g /L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 7.4), suplementado con ampicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (17 µg/mL). Para la obtención de cultivos en fase exponencial, se incubó una dilución 1:10 de un cultivo crecido durante toda la noche (16 h, 37°C, 170 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,4 a 600 nm. Las células se colocaron a 4 °C hasta que estas fueron irradiadas.

Las células HEK-293 se mantuvieron en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% de FBS inactivado por calor, en una incubadora de CO₂ modelo Midi 40 (Thermo Scientific, OH, USA), bajo condiciones de CO₂ (5%) y a una temperatura de 37°C. Se realizó el pase cada 3 días una vez las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente 80%.

2.4 Irradiación de las estirpes celulares

Los cultivos celulares fueron dispensados en cajas de Petri de 50 x 10 mm (~ 1.1 mm de profundidad) y luego estos fueron irradiados usando una cabina de irradiación BS-02 (Opystel Dr Gröbel, Alemania) equipada con cuatro lámparas de R-UVB y con un controlador de irradiación tipo UV-MAT (Opystel Dr Gröbel, Alemania). Este controlador regula el tiempo de irradiación de manera que se asegura una dosis absorbida precisa en una región espectral de UVB. La dosis de irradiación usada dependió del tipo de experimento a desarrollar. En el caso de los estudios de antigenotoxicidad con bacterias, se usó un cultivo en fase exponencial ($DO_{600nm} = 0,4$) de la estirpe PQ37 y se irradió a una dosis de 10 J/m² de UVB. Se conoce, que dicha dosis induce eficientemente la respuesta SOS en dicha cepa (Prada-Medina *et al.* 2016). Durante los

estudios de citotoxicidad de la UVB en las células HEK-293, células disueltas en buffer PBS fueron irradiadas en un rango de dosis entre 10 y 1000 J/m². Se determinaron las células viables mediante la técnica de viabilidad por exclusión del colorante azul de tripano (ver abajo). Por último, en los estudios de determinación de la dosis a usar en el ensayo cometa usando células HEK-293, las células disueltas en buffer PBS fueron irradiadas a las dosis 194, 297 y 408 J/m². Las condiciones de irradiación para células HEK-293, fueron las mismas usadas en bacteria.

2.5 Citotoxicidad de los compuestos y su antigenotoxicidad frente a UVB en *Escherichia coli* PQ37

La citotoxicidad de un compuesto puede producir resultados de antigenotoxicidad falsos positivos con ensayos *in vitro* como el SOS Chromotest (Zeiger 2007). El SOS Chromotest es un ensayo colorimétrico basado en la activación del gen de la β -galactosidasa, lo cual se evidencia en la inducción de la enzima codificada por ese gen. Algunos compuestos que inhiban la síntesis de proteínas podrían inhibir la acción de la β -galactosidasa, causando una interpretación equivocada. Por lo tanto, se usa en paralelo un ensayo con la enzima fosfatasa alcalina, cuya actividad de hace constitutiva en la cepa PQ37 por una mutación. De esta manera, se puede evaluar cuando un compuesto es realmente antigenotóxico y cuando su antigenotoxicidad se asocia a su citotoxicidad en determinado modelo. Para superar esta limitación se consideró la inhibición de la actividad fosfatasa alcalina (ver abajo) como criterio de citotoxicidad durante el ensayo. Para cada compuesto estudiado (apigenina, naringenina, pinocembrina, curcumina, quercetina, escualeno) y el control usado para comparación (EGCG); se estimó la mínima concentración que produce significativa ($p \leq 0,05$) inhibición de la actividad fosfatasa alcalina

(CAPSI, de sus siglas en inglés) en la estirpe PQ37. Los valores de CAPSI $\leq 25 \mu\text{M}$, se consideraron concentraciones citotóxicas biológicamente relevantes para los compuestos ensayados (Cos *et al.* 2006). Se realizó un mínimo de tres experimentos independientes por tratamiento con cuatro repeticiones.

El potencial antigenotóxico frente a UV de los compuestos estudiados fue evaluado mediante el ensayo SOS Chromotest (Quillardet *et al.* 1985) y usando un diseño de co-incubación según lo descrito por Fuentes *et al.* (2006). Básicamente, el cultivo fresco de la estirpe *E. coli* PQ37 a una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.4$, se diluyó cinco veces en medio LB 2X, se mezcló en una proporción 1:1 con cada una de las concentraciones a evaluar del compuesto, y finalmente fue irradiado según se indicó en el acápite 2.4. Luego de la irradiación, las células fueron recuperadas en tubos de microcentrífuga e incubadas por 2 horas a 37°C . En cada experimento, se incluyó un control negativo (agua destilada) y uno positivo (10 J/m^2 de UVB). Se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.

Los ensayos enzimáticos β -galactosidasa y la Fosfatasa alcalina se desarrollaron en microplacas Brand de 96 pozos (Wertheim, Alemania) según lo descrito por Quintero *et al.* (2012). Básicamente estos consistieron en lo siguiente. *Ensayo enzimático de β -galactosidasa (βG):* En las microplacas se mezclaron $135 \mu\text{l}$ de buffer Z y $15 \mu\text{l}$ de células de los tratamientos y controles, para facilitar la lisis celular. Posterior a 20 min, la reacción enzimática inició al adicionar $30 \mu\text{l}$ de solución stock de orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) preparada a 4 mg/ml de buffer fosfato (0.1 M , $\text{pH } 7.0$) y se dejó en incubación durante 40 min. La reacción se detuvo añadiendo $100 \mu\text{l}$ de solución $1 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$. *Ensayo enzimático fosfatasa alcalina (FA):* En las microplacas se dispensaron $135 \mu\text{l}$ de buffer T (1 M Tris HCl , $\text{pH } 8.8$) y $15 \mu\text{l}$ de células de los tratamientos y controles, para facilitar la lisis celular. Posterior a 20 min se adicionó $30 \mu\text{l}$

de la solución stock de p-nitrofenilfosfato (PNPP) preparada a 4 mg/ml de buffer T y se incubo durante 40 minutos para desarrollar la reacción enzimática. La reacción se detuvo añadiendo 50 μ l de la solución 2,5 M HCl y cinco minutos después se agregó 50 μ l de solución 2 M TRIS. Las lecturas espectrofotométrica se realizaron a una DO_{420nm} en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific, MA, USA).

El criterio de genotoxicidad utilizado fue el factor de inducción SOS (I) según se describe a continuación: $I = R_t/R_{nt}$; donde R es la relación entre las unidades de la β G y FA ($R = \frac{\text{Unidades } \beta G}{\text{Unidades FA}}$) en las células tratadas (t) y no tratadas (nt) del ensayo. Finalmente, para cada tratamiento se calculó el Porcentaje de Inhibición de la Genotoxicidad (%IG) según se indica en la siguiente fórmula:

$$\%IG = 1 - \frac{I_{CO} - I_{Basal}}{I_{UVB} - I_{Basal}} \times 100$$

donde I_{CO} es el factor de inducción SOS en células del co-tratamiento (compuesto + UVB), I_{Basal} es el factor de inducción SOS basal (control negativo) e I_{UVB} es el factor de inducción SOS de las células tratadas solo con UVB (control positivo). De esta manera, el %IG representa la capacidad de la sustancia ensayada para proteger el material genético del efecto genotóxico de la UVB. Además, se estimó la mínima concentración que produce significativa ($p \leq 0,05$) inhibición de la genotoxicidad (CGI) en la estirpe PQ37. Se realizó un mínimo de tres experimentos independientes por tratamiento con cuatro repeticiones.

2.6 Citotoxicidad de la UVB en la estirpe celular HEK-293

Después de 24 horas de incubación post-irradiación en CO₂ (5%) a una temperatura de 37 °C, las células fueron tratadas con tripsina-EDTA y luego colectadas para centrifugación a 1800 rpm durante 3 minutos. El pellet celular colectado fue disuelto con 100 µL de buffer PBS. La suspensión celular fue mezclada con idéntico volumen de azul de tripano (0,4%), para determinar el número de células viables (Freshney 2005). Las células vivas que tienen sus membranas celulares intacta, no permiten el paso del colorante; por el contrario, las células muertas con algún grado de deterioro en sus membranas permiten el ingreso del azul de tripano al citoplasma y se observan azules al microscopio. El conteo de células vivas y muertas se desarrolló manualmente con la ayuda de una cámara de Neubauer usando un microscopio óptico modelo Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc. NY, USA).

Se determinó la Dosis Letal Media (LD₅₀) o aquella dosis que destruye el 50% de la población celular usando el método gráfico (Ara *et al.* 2009): Este método grafica la mortalidad de los individuos en forma de viabilidad (logaritmo del porcentaje de viabilidad), en función lineal de la dosis. Usando esta escala lineal se puede estimar el LD₅₀ y sus límites de confianza por interpolación. Para los estudios de citotoxicidad, se desarrollaron un total de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno.

2.7 Genotoxicidad de la UVB en la estirpe celular HEK-293

En los estudios de genotoxicidad de la UVB en células HEK-293, se consideraron dosis inferiores al LD₃₀; es decir, dosis donde la sobrevivencia celular fue superior al 70% (ver acápite

2.4). Para determinar si existía relación entre los indicadores de daño genético medidos por el ensayo Cometa y la inducción de fotoproductos (CPD y 6-4PP) en la estirpe celular HEK-293, se usó en un principio el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con las modificaciones propuestas por Díaz *et al.* (2009) y Valencia *et al.* (2011) para la tinción y la lisis respectivamente. Resumiendo, en este procedimiento se utiliza la enzima pK para la lisis, y el colorante nitrato de plata para la tinción. Asimismo, este protocolo no añade ningún paso adicional para la detección de fotoproductos. Después se implementó el ensayo Cometa según lo descrito por Collins *et al.* (1997a), que incluye el uso de una enzima para hacer el ensayo sensible a medición de daños por UVB. Este ensayo fue el que finalmente se realizó para las pruebas de genotoxicidad. El procedimiento se resume a continuación. Después de 24 horas de incubación post-irradiación en CO₂ (5%) a una temperatura de 37 °C, las células HEK-293 fueron tratadas con tripsina-EDTA y luego colectadas para centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos. El pellet celular colectado, fue disuelto en 20 µL de Proteínasa K (0.19 mg/mL) preparada en Buffer PK (50mM Tris-HCl, 10mM CaCl, pH 8) y mantenidas a temperatura ambiente por una hora para permitir la lisis celular. Se llevó a cabo una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones, pero el pellet obtenido fue disuelto en 100 µL de NaCl 0.85% (para los experimentos sin EndoV—T4), o en 100 µL (5u) de la enzima EndoV—T4 preparada en buffer de la enzima (Na₂PO₄ 25 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Ditiotreitól 1 mM, pH 7.2), y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Esta enzima endonucleasa reconoce los CPDs y 6-4PP producidos por la UVB por ambos extremos y corta el ADN dañado; produciendo fragmentación del cromosoma celular (Schuch *et al.* 2009). Las muestras fueron nuevamente centrifugadas y el pellet fue disuelto en 10 µL de una solución de NaCl (0.85%). Estas muestras se mezclaron con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión preparada al 1% y se dispensaron sobre láminas

portaobjetos que contenían una capa de agarosa de grado molecular preparada al 1.3%. Por último, las láminas se cubrieron con cubreobjetos y se dejó solidificar la agarosa por 15 minutos a una temperatura de 8 °C.

Posterior a la polimerización de la agarosa, los cubreobjetos fueron removidos y las láminas colocadas en una cubeta de electroforesis horizontal para Ensayo Cometa (Cleaver Scientific Ltda, Warwickshire, UK). La electroforesis se desarrolló en buffer alcalino (0.3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH 13), con 300 mA y 25V, a una temperatura de 4 °C durante 25 minutos para permitir la desnaturalización y migración del ADN. Los portaobjetos fueron lavados durante 5 minutos con un tampón de neutralización (0,4 M Tris, pH 7,5) con el fin de eliminar los restos de álcali. La tinción se realizó con nitrato de plata según lo indicado por Díaz *et al.* (2009).

El nivel de daño en el ADN observado en los cometas obtenidos, fue determinado visualmente usando un microscopio óptico Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc. NY, USA). La tipificación de los núcleos en cinco categorías de daño, se desarrolló según lo indicado por Collins *et al.* (1997b). Las categorías consideradas fueron las siguientes: N₀, células no dañadas; N₁, células con daño bajo; N₂, células con daño medio; N₃, células con daño alto; N₄, células con daño severo. El nivel de daños en el ADN se expresó de acuerdo al Índice de Daño Genético (GDI) como sigue: $GDI = (N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4) / n$; donde N_i es el número de núcleos en cada categoría, y *n* es el número de células contadas por lámina (Pitarque *et al.* 1999). El GDI por tratamiento se promedió y el criterio de daño fue el siguiente: *i*) no hay daño (entre 0-1 GDI), *ii*) poco daño (entre 1-2 GDI), *iii*) daño moderado (entre 2-3 GDI) y, *iv*) daño severo (entre 3-4 GDI). Se desarrollaron al menos tres ensayos independientes para cada tratamiento (dosis UVB) y se usaron dos láminas por tratamiento. Se contaron un total de 200 células por cada lámina. En todos los ensayos, siempre se incluyeron controles de células no irradiadas.

2.8 Citotoxicidad de los compuestos y su antigenotoxicidad frente a UVB en células humanas HEK-293

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos estudiados en las células HEK-293, se usó el ensayo de exclusión con azul de tripano. Las células fueron mezcladas con el compuesto a evaluar en proporción 1:1 e incubadas por 24 horas bajo condiciones de CO₂ (5%) y a una temperatura de 37°C. Para cada compuesto, se evaluaron las 5 concentraciones más altas usadas en los estudios con bacterias. Las células fueron desprendidas y centrifugadas para el desarrollo de la tinción con azul de tripano; la cual se desarrolló según lo indicado en el acápite 3.6.

El conteo de células vivas y muertas se desarrolló manualmente con la ayuda de una cámara de Neubauer usando un microscopio óptico modelo Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc. NY, USA). Se desarrollaron un total de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno. Los resultados se expresaron como porcentajes de viabilidad celular (% VC) cómo indicó Strober (2015):

$$\% VC = \frac{\text{Células Vivas}}{\text{Células Totales}} * 100.$$

Para los estudios de antigenotoxicidad de los compuestos frente a la UVB usando el modelo celular HEK-293, se usó siempre una dosis de 408 J/m² de UVB; la cual mostró niveles importantes de daño genético en el citado modelo (ver acápite de resultados). La antigenotoxicidad de los compuestos frente a la UVB en la estirpe celular HEK-293, se evaluó usando el ensayo Cometa modificado descrito en el acápite 3.7. Dado que la enzima endoV—T4 reconoce y corta de manera específica los CPDs y 6-4PP producidos por la UVB (Schuch *et al.* 2009); cualquier reducción del daño detectado significa que el compuesto en cuestión reduce los niveles de fotoproductos en el ADN. La preparación de las láminas portaobjetos, electroforesis,

lavados y determinación del daño genético en cada uno de los co-tratamientos, fue desarrollado según lo descrito en el acápite 3.7. Se desarrollaron al menos tres ensayos independientes para cada co-tratamiento (compuesto + UVB) y se usaron dos láminas por tratamiento. Se contaron un total de 200 células por cada lámina. En todos los ensayos, siempre se incluyeron controles negativos (células no irradiadas mantenidas en buffer PBS) y controles positivos (células irradiadas a 408 J/m^2 de UVB). Se consideró que una molécula fue antigenotóxica frente a la UVB cuando el índice GDI mostró una significativa reducción respecto al control positivo.

2.9 Análisis estadístico

Se calcularon valores promedios (CAPSI, %GI, %VC y GDI) y sus correspondientes errores estándar. Se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para probar la normalidad de los datos y una prueba de F-máxima para probar la homogeneidad de varianza. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas aplicando una prueba *posteriori* de Tukey. Para todos los análisis estadísticos, se consideró una $p < 0,05$. La totalidad de los análisis fueron llevados a cabo en el programa R (R-Core-Team 2013).

3. Resultados

3.1 Citotoxicidad de los compuestos y su antigenotoxicidad frente a UVB en células de *Escherichia coli* PQ37.

En la Tabla 1 se presentan los estimados de citotoxicidad (valores de CAPSI) en el SOS chromotest, para los compuestos apigenina, curcumina, naringenina, pinocembrina, quercetina, escualeno y para el compuesto EGCG usado como control de fotoprotección. Solo los compuestos con valores CAPSI $\leq 25 \mu\text{M}$ son considerados con citotoxicidad biológicamente relevante (Cos *et al.* 2006); por tanto, en el presente estudio ninguno de los compuestos evaluados resultó prominentemente citotóxico en el SOS Chromotest. Basado en los valores CAPSI de cada compuesto, su citotoxicidad relativa fue como sigue: naringenina ($37,7 \mu\text{M}$) > pinocembrina ($61,0 \mu\text{M}$) > EGCG ($107,5 \mu\text{M}$). Los restantes compuestos no inhibieron la actividad constitutiva de fosfatasa alcalina en este modelo. Complementariamente, en el anexo 5 se pueden observar los datos netos de genotoxicidad obtenidos para cada compuesto, de los cuales se concluye que ningún compuesto evidenció actividad genotóxica bajo las condiciones estudiadas.

Tabla 1. Valores de CAPSI y CGI de los compuestos estudiados obtenidos con el ensayo SOS Chromotest.

Compuestos	CAPSI (μM)	CGI (μM)
Apigenina	NI	$7,2 \pm 0$
Curcumina	NI	$33,1 \pm 0$
Naringenina	$37,7 \pm 0$	$37,7 \pm 0$
Pinocembrina	$61,0 \pm 0$	$15,0 \pm 0$
Quercetina	NI	$25,8 \pm 0$
Escualeno	NI	$3215,0 \pm 0$
EGCG	$107,5 \pm 0$	$107,5 \pm 0$

NI: No inhibición. CAPSI: Inhibición de la actividad fosfatasa alcalina. CGI: Inhibición de la genotoxicidad

En la Figura 1, se muestran los valores de %IG obtenidos en las curvas dosis respuesta de cada compuesto. Estos indican que los compuestos inhibieron la genotoxicidad inducida por la UVB con al menos una de las concentraciones evaluadas.

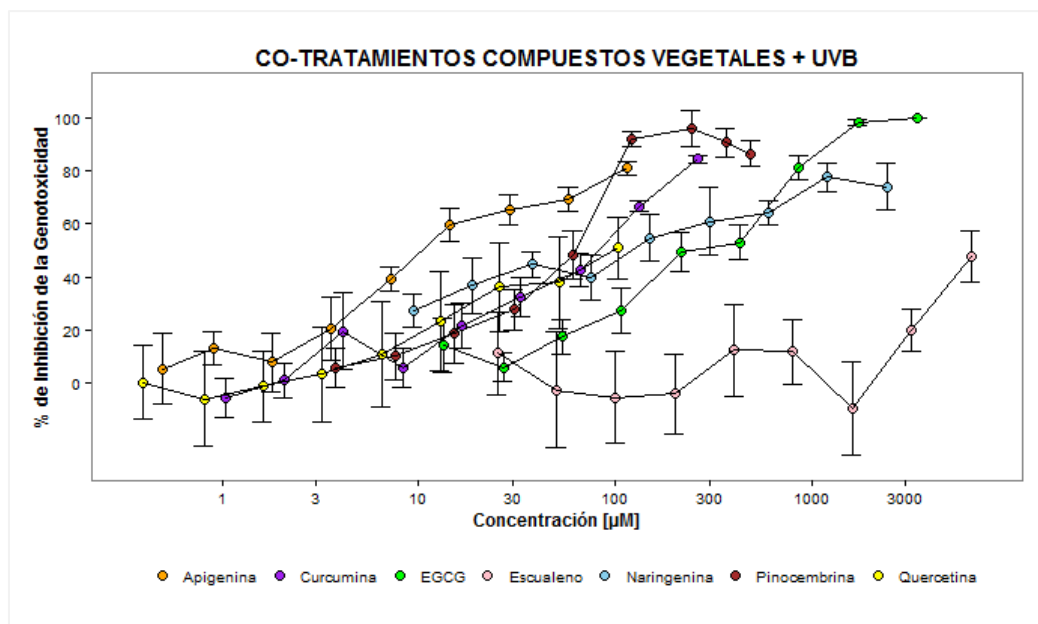


Figura 3. Efecto antigénotoxicico de los compuestos contra la UVB expresado como %IG.

La barra de error indica el error estándar de la media calculada a partir de cuatro (4) experimentos independientes con tres (3) replicas cada uno. Eje x logaritmizado.

Basado en los valores CIG de cada compuesto (Tabla 1), el potencial antígeno tóxico frente a UVB fue como sigue: apigenina (7,2 μM) > pinocembrina (15,3 μM) > quercetina (25,8 μM) > curcumina (33,1 μM) > naringenina (37,7 μM) > EGCG (107,5 μM) > escualeno (6430 μM). Como se puede constatar, cinco (5) compuestos (apigenina, pinocembrina, quercetina, curcumina y naringenina) mostraron un significativo efecto antígeno tóxico a concentraciones menores a la requerida en el caso del EGCG; compuesto usado como control de fotoprotección. Los compuestos naringenina y EGCG mostraron valores de CAPSI idénticos a su valor CIG, sugiriendo que su antígeno toxicidad fue posiblemente asociada a su citotoxicidad en este modelo.

3.2 Citotoxicidad y genotoxicidad de la UVB en la estirpe celular HEK-293

Para estudiar el efecto citotóxico de la UVB en el modelo celular HEK-293 se evaluó la viabilidad celular tiñendo con el colorante azul de tripano. A tales fines, se irradiaron las células en un rango de dosis UVB entre 10 y 1000 J/m^2 . En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos de la curva dosis respuesta, evidenciando la existencia de una significativa correlación entre dosis de radiación y viabilidad celular ($R = -0.97$, $p < 0.05$).

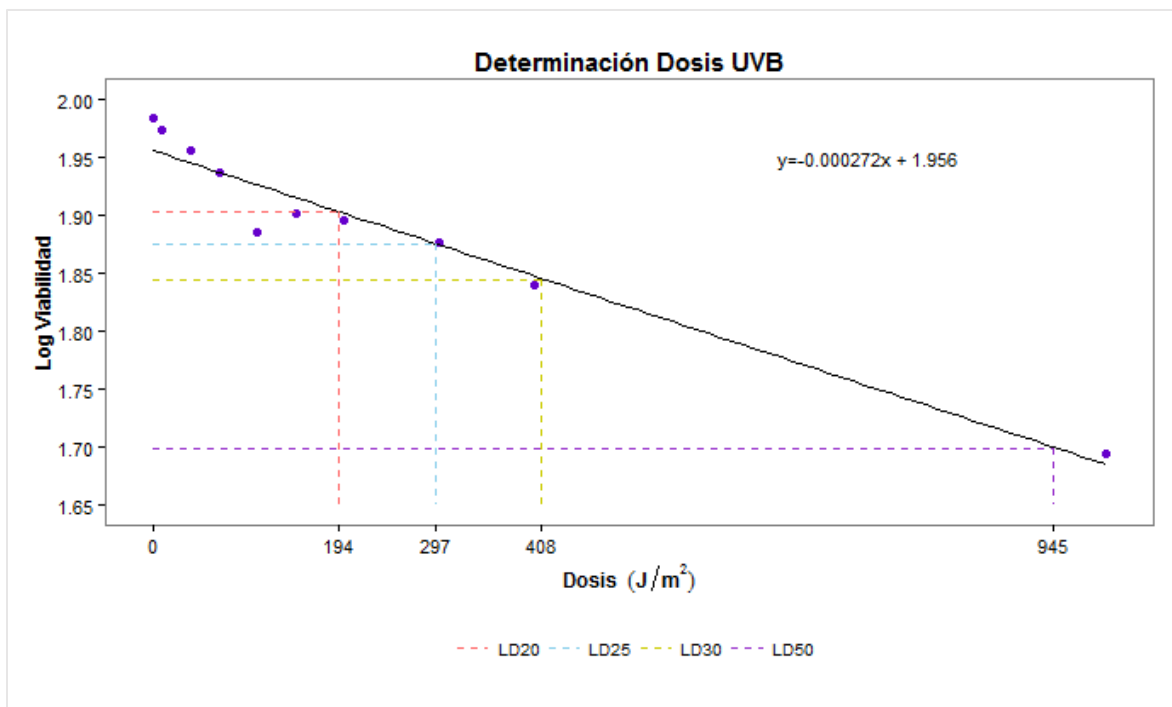


Figura 4. Efecto de la radiación UVB sobre la viabilidad de las células HEK-293.

Por tanto, a medida que aumenta la dosis de radiación UVB disminuye la viabilidad celular del modelo HEK-293. Usando el método gráfico, los valores DL₅₀, DL₃₀, DL₂₅ y DL₂₀ fueron calculados en 945, 408, 297 y 194 J/m², respectivamente. Estos resultados mostraron que el modelo celular HEK-293 resultó menos sensible a la UV que la cepa *E. coli* PQ37; posiblemente porque esta última es deficiente para la NER (*uvrA*). Considerando los eventos mutagénicos medibles ocurren generalmente a dosis sub-tóxicas de UVB (ej: DL₃₀ donde sobreviven más del 70 % de las células irradiadas), se escogieron las dosis DL₃₀, DL₂₅ y DL₂₀ para evaluar el efecto genotóxico de la UVB en el modelo de estudio.

El daño genotóxico causado por la UVB en células HEK-293 se midió mediante el ensayo Cometa. Como indicamos en el acápite de materiales los métodos, el ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por Collins *et al.* (1997a), con modificaciones. La modificación principal fue desarrollar una lisis enzimática con Proteinasa K, en lugar de una lisis química en

condiciones alcalinas; seguida de una segunda hidrólisis enzimática con la enzima EndoV–T4. Esta última enzima, reconoce específicamente los CPDs y 6-4PP producidos por la UVB (Schuch *et al.* 2009).

En la Figura 5 se muestran las diferentes categorías de daño obtenidas en las células HEK-293 usando el protocolo modificado. Los resultados obtenidos muestran que la combinación de dos pasos consecutivos de lisis enzimática con Proteinasa K y EndoV–T4, permitió evidenciar la existencia de núcleos desnudos con muy bajo nivel de daño genético en el control no irradiado. Por el contrario, en las muestras irradiadas a diferentes dosis se evidenciaron diferentes niveles de roturas del ADN asociadas con la hidrólisis enzimática de CPD y 6-4PP producidos por la UVB.

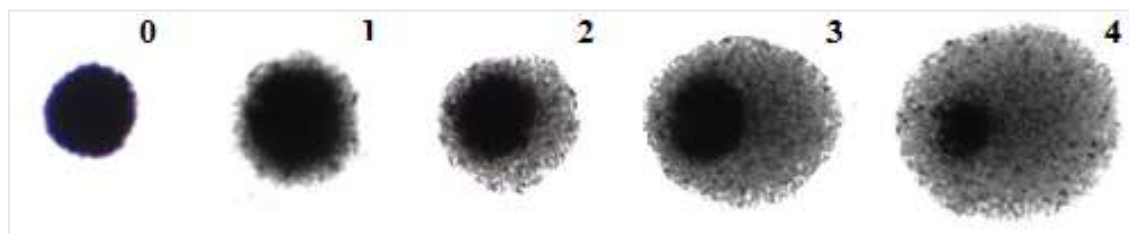


Figura 5. Clasificación visual de los Cometas de las células Hek-293 en cinco (5) categorías (0–4) de acuerdo a la propuesta de Collins *et al.* (1997b).

Los Cometas fueron teñidos con nitrato de plata como indicado por Díaz *et al.* (2009). El número de núcleos en las diferentes categorías fueron como sigue: N_0 , células no dañadas; N_1 , células con daño bajo; N_2 , células con daño medio; N_3 , células con daño alto; N_4 , células con daño severo.

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de la curva dosis respuesta, evidenciando que en ausencia de EndoV–T4 no se producen incrementos significativos del GDI respecto al control no irradiado. Tampoco se evidenció una relación dosis respuesta para estas dosis ($R =$

0.04, $p = 0.96$ n.s.). Esto nos indica que, bajo tales condiciones experimentales el ensayo cometa no detectó los daños producidos en el ADN por la UVB. Por el contrario, en presencia de EndoV—T4 los valores de GDI fueron significativos a partir de la dosis 194 J/m^2 . Adicionalmente, se evidenció una clara relación dosis respuesta en el rango de dosis estudiado ($R = 0.99$, $p < 0.05$). Con base en tales ensayos, se escogió una dosis de 408 J/m^2 para desarrollar los ensayos de antigenotoxicidad; la cual produjo el valor de GDI más alto ($\text{GDI} = 2.94 \pm 0.08$).

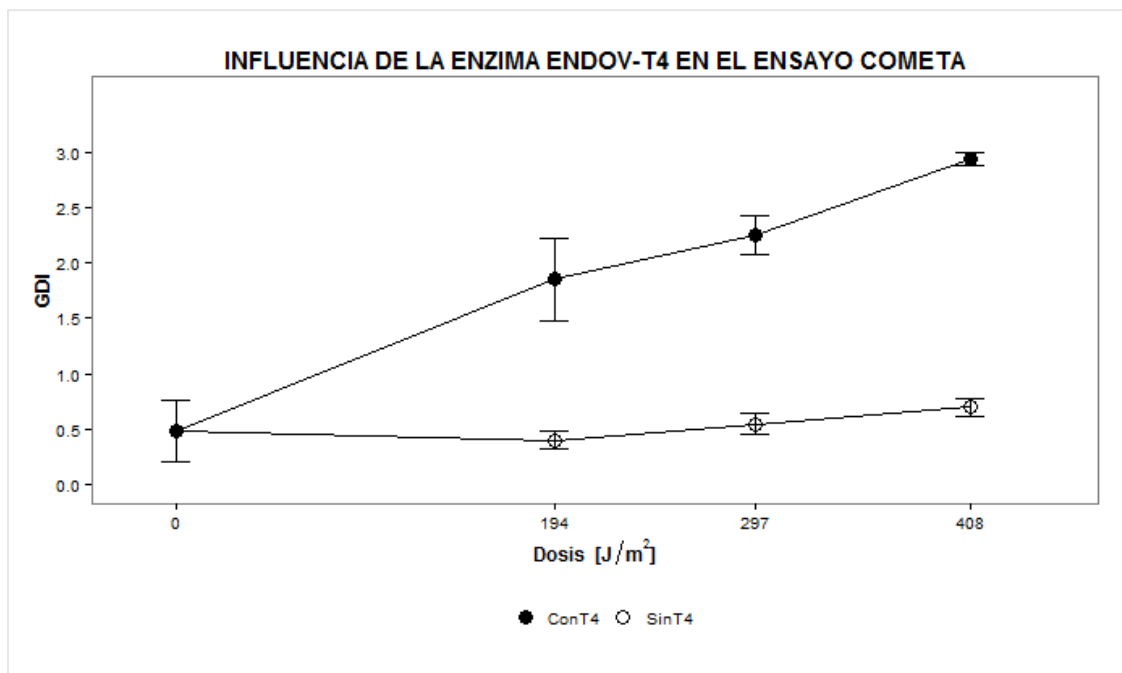


Figura 6. Efecto genotóxico de la UVB en células HEK-293 evaluado mediante el ensayo Cometa en ausencia (○) y presencia (●) de la EndoV—T4.

Se presentan los valores de GDI y sus correspondientes errores estándar calculados a partir de tres experimentos independientes con dos replicas cada uno. **GDI:** Índice de daño genético.

3.3 Citotoxicidad de los compuestos y su antigenotoxicidad frente a UVB en células humanas HEK-293

Para estos ensayos de citotoxicidad y antigenotoxicidad frente a la UVB se escogieron los flavonoides apigenina, naringenina y pinocembrina; los cuales han sido identificados como compuestos mayoritarios promisorios en extractos de especies del género *Lippia* (Stashenko *et al.* 2013) (Anexo 4). Adicionalmente, se incluyó como control el compuesto EGCG; el cual ha mostrado propiedades fotoprotectoras (ver acápite 3.1)

Previo a estudiar el efecto antigenotóxico frente a UVB de los compuestos, se evaluó su citotoxicidad en el modelo HEK-293. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de la curva dosis respuesta, evidenciándose que solo las concentraciones más altas de los compuestos apigenina (116 μM), naringenina (2410 μM), pinocembrina (488 μM) y EGCG (3440 μM), resultaron significativamente citotóxicas ($p < 0.05$) al ser comparadas con el control no tratado.

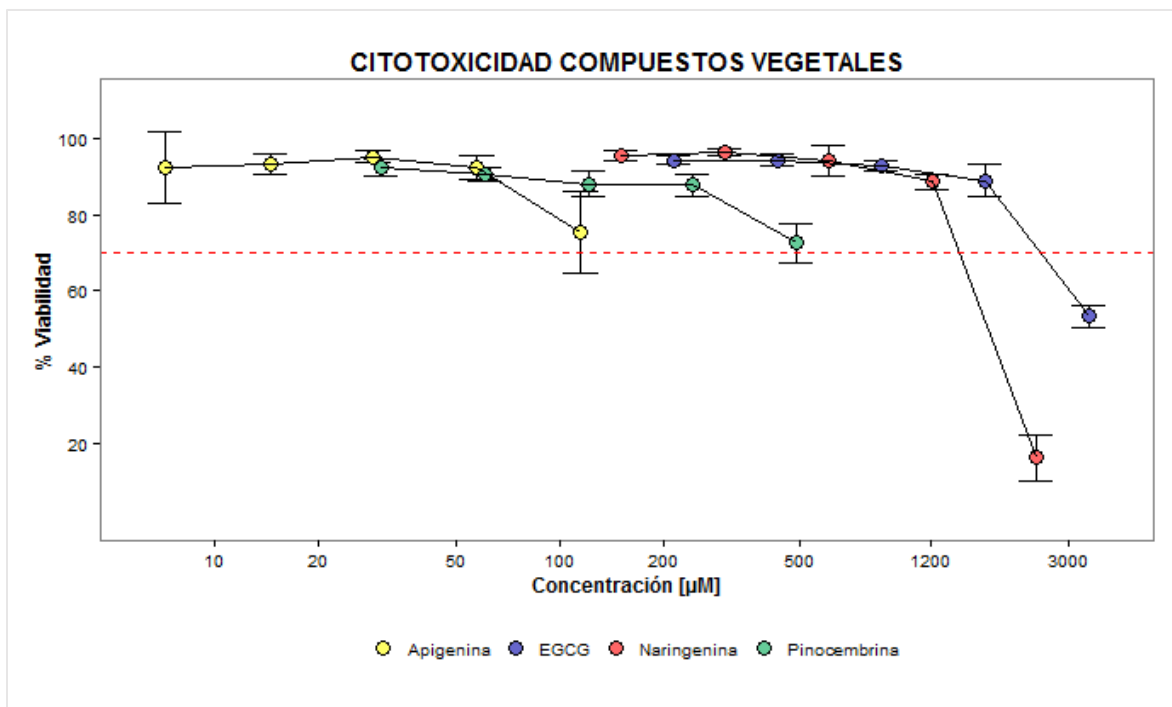


Figura 7. Citotoxicidad de los compuestos apigenina, EGCG, naringenina y pinocembrina en el modelo celular HEK-293.

Se presentan los valores de % de viabilidad y sus correspondientes errores estándar calculados a partir de al menos tres experimentos independientes con dos replicas cada uno. Los tratamientos con valores de viabilidad inferior al 70 % (línea discontinua) son considerados citotóxicos.

Como promedio, concentraciones menores a las aquí indicada para cada compuesto resultaron en porcentajes de viabilidad superior al 70% (Línea discontinua en la Figura 5). Con base en tales ensayos, se escogieron las siguientes concentraciones de compuestos para los estudios de antigenotoxicidad: Apigenina (14, 29 y 58 µM), naringenina (151, 301 y 602 µM), pinocembrina (61, 122 y 244 µM) y EGCG (430, 860 y 1720 µM).

En la Figura 7, se muestran los resultados obtenidos de los ensayos de antigenotoxicidad de los compuestos apigenina, naringenina, pinocembrina y el compuesto fotoprotector EGCG, usado como control para comparación.

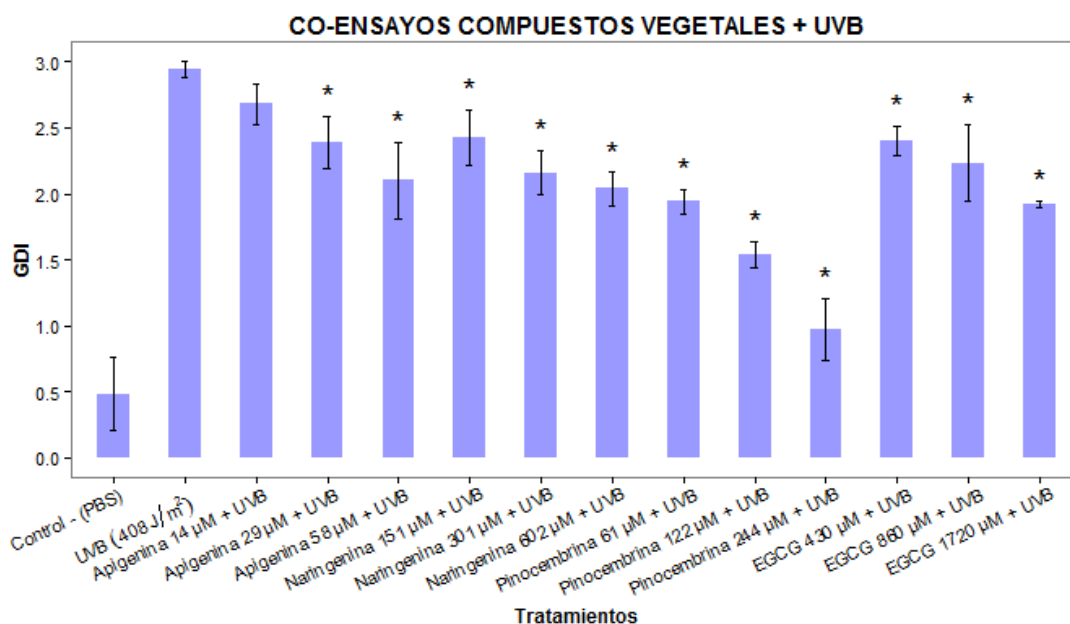


Figura 8. Efecto antigenotóxico en células HEK-293 de los compuestos apigenina, naringenina, pinocembrina y EGCG frente a UVB expresado como GDI.

Las barras de error representan el error estándar calculada a partir de tres (3) experimentos independientes con dos (2) replicas cada uno. Los asteriscos sobre las barras, indican los tratamientos que reducen significativamente ($p \leq 0.05$) la genotoxicidad de la UVB.

El compuesto apigenina mostró una significativa reducción del índice GDI a las concentraciones 29 y 58 µM; con porcentajes de reducción de daños en el ADN de 19% y 29%, respectivamente. La naringenina mostró reducción significativa del daño genético a las tres concentraciones ensayadas (151, 301 y 602 µM); con porcentajes de reducción de daños en el ADN de 17%, 27% y 31%, respectivamente. Por último, el compuesto pinocembrina mostró una

significativa reducción del índice GDI a las tres concentraciones ensayadas (61, 122 y 244 μM); con porcentajes de reducción de daños en el ADN de 34%, 48% y 67%, respectivamente). Comparando con los resultados obtenidos con el EGCG, el cual mostró una reducción del daño genético del 34% a la mayor concentración ensayada (1720 μM), los tres flavonoides estudiados mostraron efectos antígenotóxicos con reducción de daño genético a concentraciones relativamente más bajas. En especial, el compuesto pinocembrina resultó muy promisorio por su potencial antígenotóxico frente a la UVB y debe ser un candidato objeto de nuevos estudios para perfilar sus mecanismos de acción fotoprotectora.

4. Discusión

En la presente investigación se demostró que compuestos polifenólicos presentes en plantas de la diversidad colombiana (ver Stashenko *et al.* 2013), poseen propiedades antígenotóxicas contra la UVB, tanto en bacterias como en células humanas. Así, los compuestos antes mencionados podrían ser un complemento útil para la formulación de protectores solar.

Los compuestos apigenina, curcumina, naringenina, pinocembrina y quercetina, disminuyen el daño genético causado por la radiación UVB en el ensayo SOS Chromotest a concentraciones menores que el EGCG, un compuesto con conocidas propiedades fotoprotectoras (Elmets *et al.* 2001; Morley *et al.* 2005; Schwarz *et al.* 2008; Meeran *et al.* 2006, 2009; Afaq & Katiyar 2011; Katiyar 2011). Como indicamos en la introducción, el SOS Chromotest es un ensayo altamente sensible a la radiación ultravioleta (Quillardet & Hofnung 1984). Cuando las células de *E. coli*

PQ37 son expuestas a UVB, los CPD y 6-4PP producidos inducen la respuesta SOS (Huisman & D'Ari 1981). Por lo tanto, una reducción en la respuesta SOS, cuando las células son irradiadas en presencia de los compuestos antes mencionados, puede ser interpretada como: *i*) una reducción en la producción de daños genéticos, *ii*) un incremento en los eventos de reparación o eliminación de las lesiones en el ADN, *iii*) que ocurrió la restauración de la división celular, o, *iv*) la combinación de algunas de las anteriores. Como se indica en el Anexo No. 1, varios compuestos polifenólicos pueden producir tales efectos celulares a través de diferentes modos de acción fotoprotectora.

Previos estudios que usaron modelos bacterianos, han mostrado el potencial antígenotóxico o antimutagénico frente a la UV de los polifenoles de plantas. Por ejemplo, el compuesto carotenoide norbixina presente en las semillas de la especie *Bixa Orellana*, inhibe la inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli* (Júnior *et al.* 2005). Adicionalmente, los compuestos terpenos tujona, cineol y alcanfor, presentes en el aceite esencial de la especie *Salvia officinalis*; protegen el ADN del efecto mutagénico de la UV en *E. coli* y *S. typhimurium* (Simić *et al.* 1998; Knežević-Vukčević *et al.* 2005; Vuković-Gačić *et al.* 2006; Nikolić *et al.* 2011).

Dado que en este estudio se usó la cepa PQ37, la cual es defectuosa para la reparación por escisión de nucleótidos (*uvrA*) y que mantiene inducido el gen *sulA* aún después de 240 minutos pos-irradiación (Prada-Medina *et al.* 2016); se asume que la reducción de la respuesta SOS en los co-tratamientos de varios compuestos estudiados es consecuencia de una reducción en la producción de CPD o 6-4PP; dado por su capacidad de absorción de fotones de luz UV (Stevanato *et al.* 2014). Estos autores mostraron que los compuestos apigenina, naringenina, pinocembrina y quercetina; presentan sus picos de absorción máxima (λ_{\max}) a los 330, 290, 290 y 375 nm; respectivamente. Esto indica, que la naringenina y la pinocembrina absorben

mayormente la energía de fotones en el rango UVB (280 – 320 nm) usado en este estudio; mientras que la apigenina y la quercetina lo hacen mayormente en el rango espectral de la UVA (320 – 400 nm). Así, estos dos últimos compuestos podrían ejercer su acción antígenotóxica por mecanismos diferentes a la absorción de energía de fotones de la UVB.

Prada-Medina *et al.* (2016) mostró que la cepa isogénica *E. coli* IN602 (*recB*); la cual es deficiente para la helicasa/nucleasa RecBCD, presenta una alta sensibilidad a la UVB comparable con la PQ37. Adicionalmente, Estevez-Castro (2017) mostró que compuestos polifenoles como el carvacrol, p-cimeno, pinocembrina, apigenina y resveratrol pueden modular los procesos de reparación de daños genéticos y de restauración de la división celular. Por lo tanto, la estimulación de los mecanismos de reparación de estas lesiones vía recombinación homóloga en *E. coli* PQ37, no puede descartarse como un posible mecanismo de protección del ADN de estos compuestos. Cualquiera sea el mecanismo de acción antígenotóxica de estos compuestos su combinación nos permitiría el desarrollo de protectores solares de amplio espectro; los cuales absorben energía en un rango de la luz solar de relevancia en humanos (UVA – UVB).

En esta tesis además se usó, un modelo celular humano (HEK-293) para profundizar en los mecanismos de acción antígenotóxica de compuestos polifenoles como la apigenina, naringenina y pinocembrina; los cuales son compuestos mayoritarios de extractos de especies del género *Lippia* que tienen un alto potencial farmacológico (ver Stashenko *et al.* 2013). En este caso, se usó una variante del ensayo Cometa para medir el efecto genotóxico de la UVB. En dicha variante, se modificó el paso de lisis celular usando detergente y sales bajo condiciones alcalinas descrito por Singh *et al.* (1988); por dos pasos consecutivos de lisis enzimática usando Proteínasa K y EndoV–T4 bajo condiciones de pH neutro.

La lisis enzimática con Proteinasa K se usó dado que esta permite desarrollar la lisis celular bajo condiciones neutras de pH donde se minimiza la producción de sitios alcalinos lábiles en el ADN (ver anexo No. 2). Los resultados en la Figura 1 revelaron que la lisis enzimática con Proteinasa K fue adecuada para obtener núcleos desnudos con niveles basales de roturas de ADN consistentemente bajos. Como se conoce (Merk *et al.* 2000; Singh 2000), la Proteinasa K digiere proteínas asociadas con núcleos; acción que facilita el desenrollamiento del ADN tal como ocurre en los tratamientos alcalinos.

Adicionalmente, la hidrólisis enzimática de sitios CPD y 6-4PP usando la EndoV-T4, produjo roturas en el ADN dependiente de la dosis de UVB. Por el contrario, las células irradiadas con UVB pero no hidrolizadas con EndoV-T4, no mostraron un aumento significativo de roturas en el ADN. Estos resultados indican que los fotoproductos inducidos por UVB son solo aquellos sensibles a la EndoV-T4; es decir los CPD y 6-4PP, como se ha indicado previamente (Mitchell 1988; Pfeifer 1997; Mouret *et al.* 2006). Igualmente, los resultados son indicativos de que bajo las condiciones experimentales y de irradiación aquí usadas, los niveles de daños oxidativos inducidos por la UVB son mínimos e imperceptibles al ensayo de Cometa. En resumen, los resultados descritos en la Figura 4 muestran que la versión del ensayo Cometa aquí descrita proporciona una buena estimación de los niveles de CPD y 6-4PP inducidos por la UVB.

Previos estudios han desarrollado modificaciones del ensayo Cometa para hacerlo sensible a los tipos de daños producidos por la UV (ver Anexo No. 2). Por ejemplo, Gedik *et al.* (1992) usaron un inhibidor de la síntesis de ADN (afidicolina) para producir acumulación de rupturas de ADN en sitios de reparación incompletos en células de epitelio humano (HeLa); los cuales fuesen detectables por el ensayo de Cometa. Collins *et al.* (1997a) fueron los primeros en utilizar

la EndoV—T4 para producir roturas de ADN en células de ovario de hamster chino (CHO-AA8, UV5, UV61 y UV231), añadiendo al ensayo Cometa una etapa adicional de lisis enzimática. Esta modificación aumentó la sensibilidad del ensayo para la detección de dímeros ($2-2,5 \times 10^9$ daltons) a dosis tan bajas como $0,1 \text{ J/m}^2$ de UVC. Este protocolo, con pequeñas modificaciones, fue usado con éxito por Sauvaigo *et al.* (1998) para la detección de CPD en fibroblastos humanos; quienes además usaron un paso de inmunodetección con anticuerpos específicos para CPD posterior al ensayo Cometa para su comparación. Por último, Lemay & Wood (1999) usaron el paso adicional de inmunodetección con anticuerpos específicos para 6-4PP posterior al ensayo Cometa en células de linfoma de ratón (WEHI 7.1 BALB/c). La variante del ensayo desarrollada en la presente tesis, fue reproducible y lo suficientemente sensible para detectar roturas de ADN a dosis no citotóxicas de UVB en células HEK-293 humanas. Estos resultados fueron comparables con los obtenidos previamente para células de fibroblastos humanos (Sauvaigo *et al.* 1998).

El presente trabajo evidenció que los compuestos apigenina, naringenina y pinocembrina protegen las células HEK-293 humanas del efecto genotóxico de la UVB, reduciendo el nivel de fotoproductos (CPD y 6-4PP) inducidos por este agente. El poder protector de estos compuestos fue superior al mostrado por el EGCG, un conocido compuestos fotoprotector.

Previos estudios han mostrado que la apigenina y la naringenina tienen efecto fotoprotector frente a la UVB (El-Mahdy *et al.* 2008; Das *et al.* 2013). La apigenina, inhibe la inducción de CPD y ROS en queratinocitos humanos irradiados y estimula la reparación por escisión de nucleótidos. Por su parte, la naringenina inhibe la apoptosis inducida por la UVB y estimula la eliminación de CPD inducidos por UVC. De acuerdo a nuestro conocimiento, no existen reportes previos sobre el efecto fotoprotector de la pinocembrina; aunque los extractos de propolio (bee

glue) y de *Lippia graveolens* que muestran alto contenido de pinocembrina tienen propiedades fotoprotectoras (Gregoris *et al.* 2011; García-Bores *et al.* 2017). Nuestros resultados soportan la hipótesis que la antigenotoxicidad de estos tres compuestos se debe a su capacidad de absorción de fotones UV (Stevanato *et al.* 2014); inhibiendo así la formación de fotoproductos en el ADN. Además, estos compuestos podrían estimular las vías celulares de reparación de fotoproductos como se ha evidenciado para otros polifenoles (Anexo No. 1).

Como se indica en el Anexo No. 1, los compuestos polifenólicos pueden proteger las células humanas mediante otros mecanismos diferentes a los dos indicados arriba, entre estos: *i)* el fortalecimiento del sistema de defensa antioxidante celular, *ii)* la inhibición de los eventos de mutagénesis celular, *iii)* la inhibiendo los procesos inflamatorios, *iv)* modulando las rutas de señales para la transducción de genes críticos y, *v)* estimulando el sistema inmune. Los compuestos apigenina, naringenina y pinocembrina, muestran un potente efecto antioxidante (Anexo No. 3). Por tanto, ellos podrían ejercer su efecto fotoprotector mediante un mecanismo de secuestro de ROS, los cuales son también inducidos por la UVB (Feng *et al.* 2006). Así, los compuestos antes mencionados podrían actuar simultáneamente por diferentes mecanismos y en conjunto producir efectos sinérgicos y/o complementarios como ha sido recientemente mostrado para mezclas de compuestos terpenos (Quintero *et al.* 2017).

En resumen, el presente trabajo de tesis presenta claras evidencias del potencial protector del ADN de compuestos polifenólicos presentes en plantas de la diversidad colombiana. Estos compuestos, en particular la apigenina, naringenina y pinocembrina, reducen la genotoxicidad de la UVB tanto en bacterias como en células humanas. Ellos protegen al ADN celular de la UVB inhibiendo la formación fotoproductos detectables con la enzima EndoV—T4 (CPD y 6-4PP); posiblemente como una consecuencia de su capacidad de absorber fotones de la luz UV o de

fortalecer la capacidad de reparación celular de estos tipos de lesiones en el ADN. Dado que estos compuestos muestran además actividad antioxidante, ellos también podrían reducir el estrés oxidativo producido por la UVB. El trabajo aporta nuevo conocimiento sobre los posibles mecanismos de acción fotoprotectora de los mencionados compuestos y presenta al compuesto pinocembrina como un novedoso y útil candidato para el desarrollo de cremas o protectores solares. Sin embargo, el trabajo fue desarrollado en modelos celulares no blancos para la fotoprotección en humanos; por tanto, para usar estos compuestos en cremas fotoprotectoras se requerirá estudiar sus mecanismos de acción en células de la piel humana; así como, conocer sobre su permeabilidad, potencia alérgica y toxicidad en modelos de animales.

5. Conclusiones

a) Los compuestos apigenina, naringenina y pinocembrina, a concentraciones no tóxicas, inhiben el daño genético inducido por la UVB en modelos celulares bacteriano y humano. La quercetina y curcumina mostraron su antigenotoxicidad en el modelo bacteriano.

b) La variante desarrollada en este estudio del ensayo Cometa usando Proteinasa K y EndoV—T4, permite la detección fotoproductos (CPD y 6-4PP) inducidos por la UVB; por tanto, esta técnica puede ser usada para estudiar compuestos fotoprotectores que impidan la formación de este tipo de lesiones o que estimulen su eliminación del genoma.

c) Los compuestos apigenina, naringenina y pinocembrina protegen al ADN celular de la UVB inhibiendo la formación fotoproductos detectables con la enzima EndoV—T4 (CPD y 6-

4PP) o fortaleciendo la capacidad de reparación celular de estos tipos de lesiones en el ADN. Dado que, los compuestos naringenina y la pinocembrina absorben mayormente la energía solar en el rango espectral de UVB (280 – 320 nm); ellos deben actuar inhibiendo la formación de fotoproductos. Por su parte, la apigenina absorbe mayormente en el rango espectral de la UVA (320 – 400 nm); así, este compuesto debe fortalecer la capacidad de reparación de estos tipos de lesiones en el ADN más que absorber la energía solar en el rango UVB. El uso combinado de estos compuestos permitiría el desarrollo de protectores solares de amplio espectro.

d) Los compuestos apigenina, naringenina y pinocembrina tienen la capacidad de inhibir la formación de fotoproductos y/o fortalecer la capacidad de reparar estas lesiones; soportando su potencial como quimiopreventivo en la formulación de protectores solares.

6. Recomendaciones

a) Profundizar en los mecanismos de acción de los compuestos promisorio del presente trabajo, usando modelos celulares de piel humana como queratinocitos y melanocitos y las técnicas de inmuno-detección de CBD y 6-4PP; con el fin de complementar los resultados del presente trabajo.

b) Estudiar si existen genes de reparación de daños genéticos y de respuestas antioxidantes en las células humanas, implicados en la protección del ADN por los compuestos promisorios.

c) Estudiar la toxicidad y genotoxicidad de los compuestos promisorios en modelos *in vivo*; que permita llegar a conclusiones acerca de la inocuidad y seguridad de estos compuestos en humanos.

Referemcoas Bibliográficas

- Afaq, F. (2011). Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(2), 144-151.
- Afaq, F., & K Katiyar, S. (2011). Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(14), 1200-1215.
- Agar, N., & Young, A. R. (2005). Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1), 121-132.
- Agrawal, A. D. (2011). Pharmacological activities of flavonoids: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 4, 1394-1398.
- Ara, N., Nur, M.H., Amran, M.S., Wahid, M.I.I., Ahmed, M. (2009). In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(1), 87-90.
- Aravind, L., Walker, D. R., & Koonin, E. V. (1999). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic acids research*, 27(5), 1223-1242.
- Berk, A. J. (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*, 24(52), 7673-7685.
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochemistry and photobiology*, 84(3), 539-549.
- de Boer, J., & Hoeijmakers, J. H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21(3), 453-460.

- Bieza, K., & Lois, R. (2001). An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiology*, 126(3), 1105-1115.
- Collins, A. R., Mitchell, D. L., Zunino, A., Wit, J. D., & Busch, D. (1997). UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. *Environmental and molecular mutagenesis*, 29(2), 152-160.
- Collins, A., *et al.*, (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and molecular mutagenesis*, 30(2), 139-146.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249-261.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- Courcelle, J., Donaldson, J. R., Chow, K. H., & Courcelle, C. T. (2003). DNA damage-induced replication fork regression and processing in Escherichia coli. *Science*, 299(5609), 1064-1067.
- Cushnie, T. P., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
- Das, S., Das, J., Paul, A., Samadder, A., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2013). Apigenin, a bioactive flavonoid from Lycopodium clavatum, stimulates nucleotide excision repair genes to protect skin keratinocytes from ultraviolet B-induced reactive oxygen species and DNA damage. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 6(5), 252-262.
- Díaz, A., Carro, S., Santiago, L., Estévez, J., Guevara, C., Blanco, M., Sánchez, L., Sánchez, L., López, N., Cruz, D., López, R., Cuetara, E.B., Fuentes, J.L. (2009). Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA Diffusion assays. *Genetics and Molecular Biology* 32(2), 367-372.
- Díaz-Duran (2012). Evaluación de la genotoxicidad de una serie de quinolinas sustuidas en el ensayo SOS Chromotest. Tesis de grado en Biología, Escuela de Biología, Facultad de

- Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Dolzhenko, Y., Berteau, C. M., Occhipinti, A., Bossi, S., & Maffei, M. E. (2010). UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha× piperita* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *100*(2), 67-75.
- Dormann, C. F., & Woodin, S. J. (2002). Climate change in the Arctic: using plant functional types in a meta-analysis of field experiments. *Functional Ecology*, *16*(1), 4-17.
- Elmets, C. A., Singh, D., Tubesing, K., Matsui, M., Katiyar, S., & Mukhtar, H. (2001). Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *44*(3), 425-432.
- Estevez-Castro, C. F. (2017). Influencia de las mutaciones en los genes UvrA, RecJ y RecN sobre la restauración de la división celular en células de *Escherichia coli* tratadas con radiación ultravioleta. Tesis de grado en Biología, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Eller, M. S., Asarch, A., & Gilchrest, B. A. (2008). Photoprotection in Human Skin- A Multifaceted SOS Response. *Photochemistry and photobiology*, *84*(2), 339-349.
- El-Mahdy, M. A., Zhu, Q., Wang, Q. E., Wani, G., Patnaik, S., Zhao, Q., ... & Wani, A. A. (2008). Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. *Photochemistry and photobiology*, *84*(2), 307-316.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, *339*(1), 37-59.
- Fedina, I., Velitchkova, M., Georgieva, K., Demirevska, K., & Simova, L. (2007). UV-B response of green and etiolated barley seedlings. *Biologia Plantarum*, *51*(4), 699-706.
- Feng, Z., Hu, W., Marnett, L. J., & Tang, M. S. (2006). Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV-and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *601*(1), 125-136.

- Freshney, R.I. (2005) Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5th Edition, Wiley, New York.
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., Melchi, C.H. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European Journal of Cancer* 41(1), 45-60.
- García-Bores, A. M., Espinosa-González, A. M., Reyna-Campos, A., Cruz-Toscano, S., Benítez-Flores, J. C., Hernández-Delgado, C. T., ... & Avila-Acevedo, J. G. (2016). *Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 167: 72-81.
- Garzón, G. A., Narváez, C. E., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2010). Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chemistry*, 122(4), 980-986.
- Gedik, C. M., Ewen, S. W. B., & Collins, A. R. (1992). Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International journal of radiation biology*, 62(3), 313-320.
- Gilaberte, Y., & González, S. (2010). Update on photoprotection. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 101(8), 659-672.
- Gilchrest, B. A., Eller, M. S., Geller, A. C., & Yaar, M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *New England Journal of Medicine*, 340(17), 1341-1348.
- Goerlich, O., Quillardet, P., & Hofnung, M. (1989). Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *Journal of bacteriology*, 171(11), 6141-6147.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), 59-72.
- Gregoris, E., Fabris, S., Bertelle, M., Grassato, L., & Stevanato, R. (2011). Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International journal of pharmaceutics*, 405(1), 97-101.

- de Gruijl, F. R., van Kranen, H. J., & Mullenders, L. H. (2001). UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1), 19-27.
- Huisman, O., & D'Ari, R. (1981). An inducible DNA replication–cell division coupling mechanism in *E. coli*. *Nature*, 290(5809), 797–799.
- Ikehata, H & Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of radiation research*, 52(2), 115-125.
- Iyama, T., & Wilson, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA repair*, 12(8), 620-636.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., ... & Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1), 21-39.
- Jansen, R., Wang, S. Q., Burnett, M., Osterwalder, U., & Lim, H. W. (2013). Photoprotection: Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69(6), 853-e1.
- Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*, 4(6), 338.
- Júnior, A. C., Asad, L. M., Oliveira, E. B., Kovary, K., Asad, N. R., & Felzenszwalb, I. (2005). Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genetics and Molecular Research*, 4(1), 94-99.
- Kada, T., & Shimoi, K. (1987). Desmutagens and bio-antimutagens—their modes of action. *Bioessays*, 7(3), 113-116.
- Katiyar, S. K. (2011). Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(2), 152-158.
- Katiyar, S. K., Mantena, S. K., & Meeran, S. M. (2011). Silymarin protects epidermal keratinocytes from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *PLoS One*, 6(6), e21410.

- Knežević-Vukčević, J. B., Vuković-Gačić, B. S., Stević, T., Stanojević, J., Nikolić, B., & Simić, D. (2005). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its fractions against UV-induced mutations in bacterial and yeast cells. *Archives of Biological Sciences*, 57(3), 163-172.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Kuroda, Y., Jain, A. K., Tezuka, H., & Kada, T. (1992). Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 267(2), 201-209.
- Jaakola, L., & Hohtola, A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, cell & environment*, 33(8), 1239-1247.
- Johnson, E. L., Schmidt, W. F., & Cooper, D. (2002). Flavonoids as chemotaxonomic markers for cultivated Amazonian coca. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(1), 89-95.
- Landry, L. G., Chapple, C. C., & Last, R. L. (1995). Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology*, 109(4), 1159-1166.
- Latonen, L., & Laiho, M. (2005). Cellular UV damage responses—functions of tumor suppressor p53. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1755(2), 71-89.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(6), 296-301.
- Lemay, M., & Wood, K. A. (1999). Detection of DNA damage and identification of UV-induced photoproducts using the CometAssay [TM] kit. *BioTechniques*, 27, 846-848.
- Leiter, U., & Garbe, C. (2008). Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight. In *Sunlight, vitamin D and skin cancer* (pp. 89-103). Springer New York.

- Lin, Y. C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., ... & Chen, J. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature communications*, 5.
- Linos, E., Swetter, S. M., Cockburn, M. G., Colditz, G. A., & Clarke, C. A. (2009). Increasing burden of melanoma in the United States. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(7), 1666-1674.
- Markham, K. R., Ryan, K. G., Bloor, S. J., & Mitchell, K. A. (1998). An increase in the luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry*, 48(5), 791-794.
- Meeran, S. M., Mantena, S. K., Elmets, C. A., & Katiyar, S. K. (2006). (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Prevents Photocarcinogenesis in Mice through Interleukin-12-Dependent DNA Repair. *Cancer research*, 66(10), 5512-5520.
- Meeran, S. M., Akhtar, S., & Katiyar, S. K. (2009). Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(5), 1258-1270.
- Mejía-Giraldo, J. C., Henao-Zuluaga, K., Gallardo, C., Atehortúa, L., & Puertas-Mejía, M. A. (2016). Novel In Vitro Antioxidant and Photoprotection Capacity of Plants from High Altitude Ecosystems of Colombia. *Photochemistry and photobiology*, 92(1), 150-157.
- Merk, O., Reiser, K., & Speit, G. (2000). Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 471(1), 71-80.
- Mitchell, D. L. (1988). The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochemistry and Photobiology*, 48(1): 51-57.
- Montes de Oca, M. K., Pearlman, R. L., McClees, S. F., Strickland, R., & Afaq, F. (2017). Phytochemicals for the Prevention of Photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*.

- Morita R, Nakane S, Shimada A, Inoue M, Iino H, Wakamatsu T, Fukui K, Nakagawa N, Masui R & Kuramitsu S.M (2010). Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *Journal of nucleic acids*, 2010: 179594.
- Morley, N., Clifford, T., Salter, L., Campbell, S., Gould, D., & Curnow, A. (2005). The green tea polyphenol (-) -epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 21(1), 15-22.
- Moore, J. O., Wang, Y., Stebbins, W. G., Gao, D., Zhou, X., Phelps, R., ... & Wei, H. (2006). Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 27(8), 1627-1635.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., & Douki, T. (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13765-13770.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International journal of dermatology*, 49(9), 978-986.
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research*, 302(2), 71-83.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nikolić, B., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., & Knežević-Vukčević, J. (2011). Modulation of genotoxicity and DNA repair by plant monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Food and chemical toxicology*, 49(9), 2035-2045.
- Nova-Villanueva, J., Sánchez-Vanegas, G., & de Quintana, L. P. (2007). Cáncer de Piel: Perfil Epidemiológico de un Centro de Referencia en Colombia. *Revista de Salud Pública*, 9, 4.

- Pfeifer, G. P. (1997). Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochemistry and photobiology*, 65(2), 270-283.
- Pfeifer, G. P., You, Y. H., & Besaratinia, A. (2005). Mutations induced by ultraviolet light. *Mutation Research*, 571(1), 19-31.
- Prada Medina, C. A., Aristizabal Tessmer, E. T., Quintero Ruiz, N., Serment-Guerrero, J., & Fuentes, J. L. (2016). Survival and SOS response induction in ultraviolet B irradiated *Escherichia coli* cells with defective repair mechanisms. *International journal of radiation biology*, 92(6), 321-328.
- Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J. A., & Anderson, D. (1999). Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 440(2), 195-204.
- Pratheeshkumar, P., Son, Y. O., Wang, X., Divya, S. P., Joseph, B., Hitron, J. A., ... & Lu, J. (2014). Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF- κ B signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin. *Toxicology and applied pharmacology*, 280(1), 127-137.
- Psotova, J., Svobodova, A., Kolarova, H., & Walterova, D. (2006). Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(3), 167-174.
- Purdue, M. P., Freeman, L. B., Anderson, W. F., & Tucker, M. A. (2008). Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US Caucasian young adults. *The Journal of investigative dermatology*, 128(12), 2905.
- Quillardet, P. & Hofnung M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation research* 147:65-78.
- Quillardet, P., Huisman, O., D'ari, R., & Hofnung, M. (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(19), 5971-5975.

- Quillardet, P., & Hofnung, M., (1984). Induction by UV light of the SOS function *sfiA* in *Escherichia coli* strains deficient or proficient in excision repair. *Journal of bacteriology*, 157(1), 35-38.
- Quintero, N., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2012). The influence of organic solvents on estimates of genotoxicity and antigenotoxicity in the SOS chromotest. *Genetics and molecular biology*, 35(2), 503-514.
- Quintero Ruiz, N., Cordoba Campo, Y., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2017). Antigenotoxic Effect Against Ultraviolet Radiation Induced DNA Damage of the Essential Oils from *Lippia* Species. *Photochemistry and Photobiology*.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (<http://www.R-project.org>).
- Ravanat, J. L., Douki, T., & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1), 88-102.
- Rogers, H. W., Weinstock, M. A., Harris, A. R., Hinckley, M. R., Feldman, S. R., Fleischer, A. B., & Coldiron, B. M. (2010). Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Archives of dermatology*, 146(3), 283-287.
- Rosenberg, M., & Echols, H. (1990). Differential recognition of ultraviolet lesions by RecA protein. Possible mechanism for preferential targeting of SOS mutagenesis to (6-4) dipyrimidine sites. *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20641-20645.
- Ryan, K. G., Burne, A., & Seppelt, R. D. (2009). Historical ozone concentrations and flavonoid levels in herbarium specimens of the Antarctic moss *Bryum argenteum*. *Global change biology*, 15(7), 1694-1702.
- Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2013). Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(09), 129-141.
- Sánchez, G., Nova, J., de la Hoz, F., & Castañeda, C. (2011). Incidencia de cáncer de piel en Colombia, años 2003-2007. *Piel*, 26(4), 171-177.

- Sánchez-Vanegas, G., Abadía-Barrero, C. E., De la Hoz, F., Nova, J., & López, E. (2013). Cáncer de piel: Barreras de acceso e itinerario burocrático. Una experiencia colombiana. *Revista de Salud Pública*, 15(5), 671-683.
- Santos, I., Almeida, J. M., & Salema, R. (1993). Plants of *Zea mays* L. developed under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. *Journal of Plant Physiology*, 141(4), 450-456.
- Sastre, M. P., Vernet, M., & Steinert, S. (2001). Single-cell Gel/Comet Assay Applied to the Analysis of UV Radiation-induced DNA Damage in *Rhodomonas* sp.(Cryptophyta). *Photochemistry and photobiology*, 74(1), 55-60.
- Sauvaigo, S., Serres, C., Signorini, N., Emonet, N., Richard, M. J., & Cadet, J. (1998). Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical biochemistry*, 259(1), 1-7.
- Schwarz, A., Maeda, A., Gan, D., Mammone, T., Matsui, M. S., & Schwarz, T. (2008). Green Tea Phenol Extracts Reduce UVB-induced DNA Damage in Human Cells via Interleukin-12. *Photochemistry and photobiology*, 84(2), 350-355.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., & Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB journal*, 16(8), 869-871.
- Schuch, A. P., da Silva Galhardo, R., de Lima-Bessa, K. M., Schuch, N. J., & Menck, C. F. M. (2009). Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(1), 111-120.
- Serment-Guerrero, J., Breña-Valle, M., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2008). In vivo role of *Escherichia coli* single-strand exonucleases in SOS induction by gamma radiation. *Mutagenesis*, 23(4), 317-323.
- Simić, D., Vuković-Gačić, B., & Knežević-Vukčević, J. (1998). Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutation Research*, 402(1), 51-57.

- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- Singh, N. P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 111-127.
- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., & Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of applied genetics*, 55(2), 273-285.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cala, M. P., Durán, D. C., & Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from Lippia (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of separation science*, 36(1), 192-202.
- Stevanato, R., Bertelle, M., & Fabris, S. (2014). Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1), 71-77.
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 111:A3.B.1-A3.B.3.
- Trautinger, F. (2001). Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clinical and experimental dermatology*, 26(7), 573-577.
- Tevini, M., Braun, J., & Fieser, G. (1991). The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 53(3), 329-333.
- Valderrama, J. C. M. (2000). Distribution of flavonoids in the Myristicaceae. *Phytochemistry*, 55(6), 505-511.
- Valencia, L. C., García, A., Ramírez-Pinilla, M. P., & Fuentes, J. L. (2011). Estimates of DNA damage by the comet assay in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura, Eleutherodactylidae). *Genetics and molecular biology*, 34(4), 681-688.

- Vassilyev, D. G., Kashiwagi, T., Mikami, Y., Ariyoshi, M., Iwai, S., Ohtsuka, E., & Morikawa, K. (1995). Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: structural basis for damaged DNA recognition. *Cell*, 83(5), 773-782.
- Vink, A. A., & Roza, L. (2001). Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 65(2), 101-104.
- Vuković-Gačić, B., Nikčević, S., Berić-Bjedov, T., Knežević-Vukčević, J., & Simić, D. (2006). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and chemical toxicology*, 44(10), 1730-1738.
- Wei, H., Saladi, R., Lu, Y., Wang, Y., Palep, S. R., Moore, J., ... & Lebwohl, M. G. (2003). Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *The Journal of nutrition*, 133(11), 3811S-3819S.
- Wikonkal, N. M., & Brash, D. E. (1999). Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 4(1), 6-10.
- Wilson, M. I., & Greenberg, B. M. (1993). Protection of the D1 photosystem II reaction center protein from degradation in ultraviolet radiation following adaptation of *Brassica napus* L. to growth in ultraviolet-B. *Photochemistry and Photobiology*, 57(3), 556-563.
- Wilson, K. E., Wilson, M. I., & Greenberg, B. M. (1998). Identification of the flavonoid glycosides that accumulate in *Brassica napus* L. cv. Topas specifically in response to ultraviolet B radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 67(5), 547-553.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 218-223.
- Wood, R. D. (1997). Nucleotide excision repair in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23465-23468.
- Zaidi, M. R., Day, C. P., & Merlino, G. (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2381-239.

Zhang, W. J., & Björn, L. O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80(4), 207-218.

Zhou, B. R., Luo, D., Wei, F. D., Chen, X. E., & Gao, J. (2008). Baicalin protects human fibroblasts against ultraviolet B-induced cyclobutane pyrimidine dimers formation. *Archives of dermatological research*, 300(6), 331-334.

Zeiger, E. (2007). What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1), 1-3.

Zlatev, Z. S., Lidon, F. J., & Kaimakanova, M. (2012). Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6), 481-501.

Apéndices

Apéndice A. Compuestos polifenólicos de plantas que muestran actividad protectora frente a la radiación ultravioleta.

Compuestos Polifenoles	Modelos (Ensayos usados)	Efectos detectados	Fuentes
Apigenina	Queratinocitos humanos (ensayo cometa). Ratón (ensayo de micronúcleos y ensayo de aberraciones cromosómicas). Células de piel de ratón (análisis de expresión de reparación de ADN por qPCR).	Inhibición de CPD y ROS inducidos por UVB, y estimulación de la reparación por escisión de nucleótidos.	Das <i>et al.</i> (2013)
Baicalina	Fibroblastos humanos (inmunodetección CPD).	Inhibición de CPD inducidos por UVB y acumulación de la proteína p53.	Zhou <i>et al.</i> (2008)
Alcanfor	<i>E. coli</i> (ensayo de reversión y ensayo de recombinación). <i>S. cerevisiae</i> (ensayo de reversión).	Inhibición de mutagenesis UV y estimulación de la reparación recombinacional.	Simić <i>et al.</i> (1998) Vuković-Gačić <i>et al.</i> (2006)
Cineol	<i>E. coli</i> (ensayo de reversión). <i>S. cerevisiae</i> (ensayo de reversión).	Inhibición de la mutagenesis causada por UV.	Vuković-Gačić <i>et al.</i> (2006)
3-glucósido de cianidina	Ratón sin pelo SKH-1 (cuantificación de glutatión, peroxidación lipídica y	Inhibición de CPD, y respuestas inflamatorias y oxidativas,	Pratheeshkumar <i>et al.</i> (2014)

Compuestos Polifenoles	Modelos (Ensayos usados)	Efectos detectados	Fuentes
	mieloperoxidasa. Análisis de expresión de las proteínas TNF- α , PCNA y ciclina D1. Inmunodetección de NF- κ B/p65, TNF- α , IL-6, PCNA, ciclina D1, COX-2 y CPD).	inducidas por UVB.	
EGCG	ADN de células de piel humana (técnica de post-marcaje con 32 P). Ratón (inmunodetección de CPD y IL-12). Células de piel humanas (inmunodetección de CPD).	Inhibición de ROS, CPD e inmunosupresión inducida por UVA y UVB. Estimulación de la reparación por escisión de nucleótidos vía interleucina (IL)-12 con subsecuente reducción en la inflamación de la piel.	Elmets <i>et al.</i> (2001) Morley <i>et al.</i> (2005) Meeran <i>et al.</i> (2006) Meeran <i>et al.</i> (2009) Afaq & Katiyar (2011) Katiyar (2011)
Genisteína	Ratón sin pelo SKH-1 (detección de 8-OHdG por HPLC). Queratinocitos humanos (inmunodetección de CPD).	Inhibición de CPD y 8-OHdG inducidos por UVB.	Wei <i>et al.</i> (2002) Moore <i>et al.</i> (2006)
Limoneno	<i>S. cerevisiae</i> (Ensayo de reversión).	Inhibición de la mutagenesis causada por UV.	Vuković-Gačić <i>et al.</i> (2006)
Naringenina	Queratinocitos humanos HaCat mutantes en p53 (análisis de citometría de flujo, análisis de la expresión de la proteína Bax/Bcl2 y de la	Inhibición de apoptosis inducida por UVB, e incremento en la remoción de CPD	El-Mahdy <i>et al.</i> (2008)

Compuestos Polifenoles	Modelos (Ensayos usados)	Efectos detectados	Fuentes
	activación de caspasa, inmunodetección de CPD).	inducidos por UVC.	
Norbixina	<i>E. coli</i> (SOS Chromotest).	Inhibición de las funciones SOS.	Júnior <i>et al.</i> (2005)
Ácido rosmarínico	Queratinocitos humanos (ensayo cometa).	Inhibición de ROS inducidos por UVA.	Psotova <i>et al.</i> (2006)
Silimarina	Queratinocitos y fibroblastos humanos (ensayo cometa, inmunodetección de CPD, reparación de ADN y análisis de la expresión por qPCR).	Inhibición de la formación de CPD inducidos por UVB y estimulación del proceso de reparación de ADN.	Katiyar <i>et al.</i> (2011)
Tujona	<i>E. coli</i> (ensayo de reversión). <i>S. cerevisiae</i> (ensayo de reversión)	Inhibición de la mutagénesis inducida por UV.	Vuković-Gačić <i>et al.</i> (2006)

CPD: Dímeros de pirimidina ciclobutano. **ROS:** Especies reactivas de oxígeno. **8-**

OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina. **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia.

Apéndice B. Condiciones de lisis celular usada en diferentes estudios para detectar daño en el ADN inducido por luz ultravioleta a través del ensayo cometa.

Modelo genético	Composicion buffer de Lisis	Condiciones de Lisis			Referencias
		pH	Temperatura	Tiempo	
Linfocitos humanos	Paso 1: NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Sarcosinato de sodio 1%, Triton X-100 1%.	Alcalino (pH 10)	Ambiente	1 h	Singh <i>et al.</i> (1988)
Células humanas HeLa	Paso 1: Tratamiento con afidicolina de las células irradiadas con UVC. Paso 2: NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Sarcosinato de sodio 1%, Triton X-100 1%.	Neutral (pH 8) Alcalino (pH 10)	37 °C 4 °C	5 min. 1 h	Gedik <i>et al.</i> (1992)
Células de linfoma de ratón L5178Y.	Paso 1: NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 1%.	Alcalino (pH 10)	4 °C 37 °C	1 h 15 min.	Collins <i>et al.</i> (1997)
Células silvestres y mutantes CHO AA8	Paso 2: Tris-HCl 10 mM, Na ₂ EDTA 10 mM, NaCl 75 mM, T4 endonuclease V 4 µg/mL.	Neutral (pH 8)			
Fibroblastos humanos	Paso 1: NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Sarcosinato de sodio 1%,	Alcalino (pH 10) Neutral	4 °C 37 °C	1 night 2 h	Sauvaigo <i>et al.</i> (1998)

Modelo genético	Composicion buffer de Lisis	Condiciones de Lisis			Referencias
		pH	Temperatura	Tiempo	
	Triton X-100 1%. Paso 2: Tris-HCl 50 mM, Na ₂ EDTA 5 mM, T4 endonucleasa V 20 u (Epicentre Technologies, TEBU, Le Perray-en-Yvelines, France).	(pH 7.5)			
Células de linfoma de ratón BALB/c	Paso 1: NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Sarcosinato de sodio 1%, Triton X-100 0.01%. Paso 2: NaOH 0.3 M, Na ₂ EDTA 1 mM.	Neutral (pH 8)	4 °C	30 min.	Lemay and Wood (1999)
		Alcalino (pH 10)	Ambiente	30 min.	
Células humanas HEK-293.	Paso 1: Tris-HCl 50 mM, 10 mM CaCl ₂ , proteinasa K 0.19 mg/mL. Paso 2: Na ₂ PO ₄ 25 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, ditiotritol 1 mM, T4 endonuclease V 5 u (New England Biolabs, MA, USA).	Neutral (pH 8)	Ambiente (25 °C)	1 h 30 min.	Presente trabajo.
		Neutral (pH 7.2)	37 °C		

CHO: Células derivadas de ovario de hámster chino.

Apéndice C. Efecto antioxidante de los compuestos estudiados obtenidos mediante el método ORAC.

Compuestos	Valores ORAC[†]
	($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g sustancia)
Apigenina	24500 \pm 615
Curcumina	4350 \pm 77
Naringenina	27600 \pm 429
Pinocembrina	20500 \pm 128
Quercetina	34000 \pm 1531
Escualeno	0 \pm 0
EGCG	13200 \pm 531

[†], Los valores ORAC fueron suministrados por la Dra. Elena Stashenko, co-directora de la tesis.

Apéndice D. Plantas del género *Lippia* con alto contenidos de los flavonoides apigenina, naringenina y pinocembrina (Stashenko *et al.* 2013).

Especie	Tipo de Extracto	Flavonoides predominantes
<i>Lippia origanoides</i>	Extracto supercrítico-CO2	Naringenina y Pinocembrina
<i>Lippia graveolens</i>	Extracto supercrítico-CO2	Naringenina y Pinocembrina
<i>Lippia micromera</i>	Extracto etanólico	Apigenina

Apéndice E. Genotoxicidad de los compuestos vegetales evaluados a través del SOS

Chromotest.

Compuesto Vegetal	Tratamiento	FI	Compuesto Vegetal	Tratamiento	FI
Apigenina	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	Naringenina	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0
	C+ 4NQO	13.9 ± 1.1		C+ 4NQO	12.2 ± 0.7
	115.6 µM	1.3 ± 0.1 n.s.		2410.0 µM	3.1 ± 0.5 *
	57.8 µM	1.0 ± 0.1 n.s.		1205.0 µM	1.7 ± 0.2 n.s.
	28.9 µM	0.7 ± 0.0 n.s.		602.5 µM	1.1 ± 0.1 n.s.
	14.5 µM	0.7 ± 0.0 n.s.		301.3 µM	0.7 ± 0.1 n.s.
	7.2 µM	0.7 ± 0.0 n.s.		150.6 µM	0.5 ± 0.0 n.s.
	3.6 µM	0.7 ± 0.0 n.s.		75.3 µM	0.5 ± 0.0 n.s.
	1.8 µM	0.8 ± 0.0 n.s.		37.7 µM	0.5 ± 0.0 n.s.
	0.9 µM	0.9 ± 0.1 n.s.		18.8 µM	0.5 ± 0.0 n.s.
0.5 µM	1.0 ± 0.1 n.s.	9.4 µM	0.7 ± 0.1 n.s.		

Compuesto Vegetal	Tratamiento	FI	Compuesto Vegetal	Tratamiento	FI
Pinocembrina	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	Quercetina	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0
	C+ 4NQO	8.4 ± 0.5		C+ 4NQO	4.6 ± 0.1
	488.0 µM	0.9 ± 0.1 n.s.		103.39 µM	1.6 ± 0.1 n.s.
	366.0 µM	1.0 ± 0.2 n.s.		51.70 µM	0.9 ± 0.0 n.s.
	244.0 µM	1.1 ± 0.2 n.s.		25.85 µM	0.9 ± 0.1 n.s.
	122.0 µM	1.1 ± 0.3 n.s.		12.92 µM	0.9 ± 0.0 n.s.
	61.0 µM	1.2 ± 0.3 n.s.		6.46 µM	1.0 ± 0.0 n.s.
	30.5 µM	1.3 ± 0.3 n.s.		3.23 µM	0.9 ± 0.0 n.s.
	15.3 µM	1.2 ± 0.2 n.s.		1.62 µM	1.0 ± 0.0 n.s.
	7.6 µM	1.4 ± 0.3 n.s.		0.81 µM	1.0 ± 0.0 n.s.
3.8 µM	1.5 ± 0.3 n.s.	0.40 µM	1.0 ± 0.0 n.s.		

Compuesto Vegetal	Tratamiento	FI	Compuesto Vegetal	Tratamiento	FI
-------------------	-------------	----	-------------------	-------------	----

Curcumina	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0	Escualeno	C- H ₂ O	1.0 ± 0.0
	C+ 4NQO	4.5 ± 0.3		C+ 4NQO	4.6 ± 0.3
265.0 μM	1.9 ± 0.2 *	6430.0 μM	0.8 ± 0.1 n.s.		
132.5 μM	1.2 ± 0.1 n.s.	3215.0 μM	0.9 ± 0.0 n.s.		
66.25 μM	0.9 ± 0.0 n.s.	1607.5 μM	1.0 ± 0.0 n.s.		
33.13 μM	0.9 ± 0.0 n.s.	803.8 μM	1.0 ± 0.0 n.s.		
16.56 μM	0.8 ± 0.0 n.s.	401.9 μM	1.0 ± 0.1 n.s.		
8.28 μM	0.8 ± 0.1 n.s.	200.9 μM	1.0 ± 0.1 n.s.		
4.14 μM	1.0 ± 0.1 n.s.	100.5 μM	1.0 ± 0.0 n.s.		
2.07 μM	0.9 ± 0.1 n.s.	50.2 μM	1.0 ± 0.1 n.s.		
1.04 μM	0.9 ± 0.1 n.s.	25.1 μM	1.2 ± 0.1 n.s.		

FI: Factor de Inducción. Los asteriscos indican $P \leq 0.05$.