



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO DE MORTIÑO RICO EN POLIFENOLES
PARA DISMINUIR LA GLUCONEOGÉNESIS EN CÉLULAS HEPÁTICAS DE
RATA

AUTORA

Alejandra Vanessa Guzmán Quesada

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO DE MORTIÑO RICO EN POLIFENOLES PARA
DISMINUIR LA GLUCONEOGÉNESIS EN CÉLULAS HEPÁTICAS DE RATA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para
optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Andrea Paola Cordero Arroyo

Autora

Alejandra Vanessa Guzmán Quesada

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Andrea Paola Cordero Arroyo

Magíster en Células Madre y Medicina Regenerativa

C.C.: 1714669825

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Alina Aguirre Quevedo

Doctora en Ciencias Biológicas

C.C.: 1756594600

DECLARACION DEL DIRECTOR CIENTIFICO

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Patricio Rojas Silva

Doctor en Farmacognosía

CC. 1714991062

DECLARACION DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Alejandra Vanessa Guzmán Quesada

C.C.: 172405811-8

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por brindarme la sabiduría y paciencia en toda mi carrera universitaria. A mi familia, en especial a mis padres por brindarme el apoyo, tanto emocional como económico, para culminar con mi carrera. Al Dr. Patricio Rojas Silva por guiarme a través del desarrollo de este proyecto con su conocimiento, paciencia, dedicación y sobre todo por la amistad y confianza que supo brindarme. Al Dr. Manuel Baldeón por permitirme desarrollar mi proyecto de titulación en el Centro de Investigación Traslacional. A M.Sc Andrea Cordero por la guía que me brindo en el desarrollo de este proyecto. A la Dra. Alina Aguirre por las correcciones pertinentes en mi proyecto de titulación

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a mis padres Hileana y Manolo que supieron inculcar en mí la responsabilidad, la perseverancia, el respeto, además de agradecerles por todo el amor y la dedicación que me brindan. A mis hermanos Andy y José por su apoyo. A Sugey y Misael que son parte importante en mi vida por el amor que me demuestran. A mis amigos Gus, Gaby, Liz, Shary y Jhos por brindarme tantos años de amistad. Dedicado a todas las personas que hicieron posible mi formación profesional.

RESUMEN

La gluconeogénesis es un proceso metabólico que se produce en el hígado y cumple la función de mantener los niveles de glucosa estables en procesos de ayuno o inanición. A lo largo de esta ruta se pueden identificar las enzimas fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), y su transcripción se inhibe por la acción de la insulina. En enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2, la gluconeogénesis actúa de manera deletérea, debido a que los hepatocitos no responden de manera adecuada a la insulina, lo que se denomina como resistencia a la insulina. Esto provoca el aumento en la expresión y actividad de PEPCK y G6P, lo que da como resultado una producción endógena descontrolada de glucosa hepática. En el presente trabajo de titulación se planteó la elaboración de un extracto con alto contenido polifenólico de bayas de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) usando agua o etanol. Los polifenoles actúan como antioxidantes en el organismo, dicha característica le confiere la capacidad de disminuir significativamente la gluconeogénesis. Las células hepáticas de rata (H4IIE) se cultivaron en presencia del extracto de etanol a pH3 y el extracto de etanol a pH5 y mediante RT-PCR se analizó la expresión de los genes *PEPCK* y *G6P*. Los polifenoles de los extractos de mortiño actuaron negativamente en la transcripción del gen *G6P*, mientras que no existió acción sobre el gen *PEPCK*, sin embargo, la alteración en la transcripción de uno de estos dos genes afectó de manera directa la regulación de la gluconeogénesis, específicamente disminuyéndola.

ABSTRACT

Gluconeogenesis is a metabolic process that occurs in the liver and serves to maintain stable blood glucose levels in fasting or starvation processes. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) enzymes can be identified along this pathway, and their transcription is inhibited by the action of insulin. In metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus, gluconeogenesis acts deleteriously, because hepatocytes do not respond adequately to insulin, which is referred to as insulin resistance. This causes increased expression and activity of PEPCK and G6P, resulting in uncontrolled endogenous production of hepatic glucose. In the present titration work the elaboration of an extract with high polyphenolic content of berries of *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) was proposed using water or ethanol. Polyphenols act as antioxidants in the body, this feature confers the ability to significantly decrease gluconeogenesis. Ethanol extract was applied with pH3 and ethanol extract with pH5 in rat hepatic cells (H4IIE) and by RT-PCR the expression of the PEPCK and G6P genes were analyzed. The polyphenols from the mortiño extracts acted negatively on the transcription of the G6P gene, whereas there was no action on the PEPCK gene. However, altered transcription of one of these two genes directly affected the decline in gluconeogenesis.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 1 |
| 1.2 Planteamiento del problema | 4 |
| 1.3 Objetivos..... | 5 |
| 1.3.1 Objetivo General | 5 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 5 |
| 1.4 Justificación | 6 |
| CAPITULO II. MARCO TEÓRICO | 7 |
| 2.1 <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth | 7 |
| 2.2 Polifenoles | 10 |
| 2.3 Gluconeogénesis | 13 |
| 2.4 Genes fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (<i>PEPCK</i>) y Glucosa 6 fosfatasa (<i>G6P</i>) | 14 |
| 2.4.1 Fosfoenolpiruvato carboxicinaasa (<i>PEPCK</i>) | 16 |
| 2.4.2 Glucosa-6-fosfatasa (<i>G6P</i>)..... | 16 |
| 2.5 Gluconeogénesis y diabetes mellitus tipo 2 | 17 |
| CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL..... | 18 |
| CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS | 20 |
| 4.1 Población y muestra | 20 |
| 4.1.1 Recolección de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) | 20 |
| 4.1.2 Tratamiento al mortiño | 20 |
| 4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos..... | 20 |
| 4.2.1 Elaboración de extracto de mortiño con solventes orgánicos | 20 |

| | |
|---|----|
| 4.2.1.1 Extracción de polifenoles | 20 |
| 4.2.2 Elaboración de extracto de mortiño con agua y etanol..... | 21 |
| 4.2.2.1 Extracción de polifenoles | 21 |
| 4.2.3 Cuantificación de polifenoles mediante protocolo de Folin-Ciocalteu.... | 22 |
| 4.2.3.1 Elaboración de curva estándar para la cuantificación | 22 |
| 4.2.3.2 Cuantificación de polifenoles en los extractos..... | 22 |
| 4.2.4 Cultivo de células H4IIE | 24 |
| 4.2.5 Determinación de citotoxicidad de los extractos de mortiño (extracto con solventes orgánicos, extractos con agua y extractos con etanol)..... | 24 |
| 4.2.5.1 Preparación de extractos | 24 |
| 4.2.5.2 Ensayo de citotoxicidad mediante la prueba de metil tiazol tetrazolio (MTT)..... | 24 |
| 4.2.6 Expresión de genes PEPCK y G6P..... | 27 |
| 4.2.6.1 Preparación de Extractos | 27 |
| 4.2.6.2 Extracción de ARN | 27 |
| 4.2.6.3 RT-PCR (expresión de genes)..... | 30 |
| 4.2.7 Producción de glucosa | 32 |
| 4.2.7.1 Eliminación de azúcares en los extractos | 32 |
| 4.2.7.2 Cuantificación de glucosa producida por células H4IIE..... | 32 |
| 4.3 Evaluación estadística de los datos..... | 35 |
| CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 36 |
| 5.1 Recolección de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i>) y tratamiento | 36 |
| 5.2 Elaboración de extractos | 37 |
| 5.3 Cuantificación de polifenoles en los extractos | 40 |

| | |
|--|----|
| 5.4 Determinación de citotoxicidad de los extractos de mortiño (extracto con solventes orgánicos, extractos con agua y extractos con etanol) | 43 |
| 5.5 Expresión de los genes <i>PEPCK</i> y <i>G6P</i> | 46 |
| 5.5.1 Extracción de ARN..... | 46 |
| 5.5.2 RT-PCR..... | 48 |
| 5.6 Producción de glucosa..... | 51 |
| 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 53 |
| 6.1 Conclusiones | 53 |
| 6.2 Recomendaciones | 53 |
| REFERENCIAS..... | 54 |
| ANEXOS | 61 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1.</i> Provincias del Ecuador en las que se distribuye el mortiño. | 7 |
| <i>Figura 2.</i> <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (Mortiño) | 9 |
| <i>Figura 3.</i> Estructura básica de los flavonoides. | 10 |
| <i>Figura 4.</i> Principales grupos de polifenoles presentes en los alimentos. | 12 |
| <i>Figura 5.</i> Proceso bioquímico de la gluconeogénesis. | 15 |
| <i>Figura 6.</i> Diagrama de flujo del diseño experimental | 19 |
| <i>Figura 7.</i> Gráfica de cuantificación de polifenoles y comparación de los tres distintos extractos..... | 42 |
| <i>Figura 8.</i> Citotoxicidad de extractos de mortiño en células hepáticas (línea celular H4IIE)..... | 45 |
| <i>Figura 9.</i> Efecto del tratamiento con los extractos del mortiño sobre la expresión del gen <i>G6P</i> frente al tratamiento con los extractos del mortiño..... | 49 |
| <i>Figura 10.</i> Expresión del gen <i>PEPCK</i> frente al tratamiento con los extractos del mortiño..... | 50 |

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Desde la antigüedad, las plantas han sido una fuente accesible de remedios, gracias a sus principios activos puros. En los países que poseen una abundante biodiversidad es conveniente la identificación de plantas con potencial medicinal y realizar análisis de sus extractos, lo que permitiría la obtención de productos naturales de uso medicinal (Famsworth, et al., 1989, p. 314). En la actualidad existe una amplia evidencia de los efectos positivos de los alimentos de origen vegetal en la salud, especialmente en la prevención de algunas enfermedades crónicas relacionadas con procesos oxidativos (Vasco, et al., 2009, p. 8274).

En los vegetales se pueden encontrar compuestos bioactivos como los polifenoles, que son un conjunto de moléculas cuya principal característica es la presencia de anillos bencénicos en su estructura (Hernández y Prieto, 1999, p.12). Los polifenoles poseen la capacidad de captar los radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante (Barberán, 2003, p. 41). Debido a su estructura, los polifenoles se dividen en dos grandes subgrupos: no flavonoides y flavonoides. Del subgrupo flavonoide, se han determinado más de 5.000 compuestos en la naturaleza (Barberán, 2003, p. 42).

Hay estudios sobre compuestos polifenólicos aislados de plantas que han demostrado poseer actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antialérgica. Existen evidencias que sugiere que puede ser beneficiosos incorporarlos en la dieta diaria por el efecto que podrían tener en la prevención de varias enfermedades cardiovasculares, cancerígenas, neurológicas y metabólicas como la diabetes tipo 2 (Kuskoski, et al., 2004, p.1-2).

Las plantas pertenecientes al género *Vaccinium* son de gran atractivo alimenticio y medicinal debido a su alto contenido de flavonoides, especialmente antocianinas, y otros antioxidantes con potencial uso nutracéutico y farmacéutico. Estos

compuestos representan una alternativa de terapia preventiva o coadyuvante al tratamiento de enfermedades, en especial las enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, el cáncer y enfermedades metabólicas. (Schreckinger, et al., 2010, p. 233).

Los compuestos fenólicos y polifenólicos se encuentran en altas concentraciones en las bayas de este género y los que se han identificado son: ácidos gálico y elágico, elagitaninos, flavan-3-oles, proantocianidinas, glucósidos de flavonoles, ácido hidroxicinámico, antocianinas, entre otros. En estas plantas se han realizado estudios sobre el contenido total fenólico y antioxidante, así como la forma en la que las concentraciones de los polifenoles se ven influenciada por la variedad, madurez y ubicación de la planta. (Schreckinger, et al., 2010, p. 236-238).

Una de las especies vegetales más representativas del género *Vaccinium* en el Ecuador es *Vaccinium floribundum* Kunth conocido como mortiño o uva del monte. Es una planta nativa de los páramos andinos ecuatorianos y se localiza a una altura entre 3400 y 3800 m sobre el nivel del mar. Su fruto es una baya que contiene potasio, calcio, fósforo, antioxidantes, carbohidratos y vitaminas (complejo B y C). Posee colores intensos desde el morado hasta el negro, debido a la presencia de polifenoles en su composición. En el estudio realizado por Vasco et al. (2009), se caracterizó por primera vez la composición química de esta baya, estableciendo un perfil antioxidante con un alto contenido en compuestos polifenólicos (Vasco, et al., 2009, p. 8274). Esta característica antioxidante le proporciona la capacidad para reducir la glicemia, como ya se ha evidenciado en estudios previos con los polifenoles provenientes de otras plantas de la misma especie como los blueberries y cranberries (arándanos azules y rojos), los cuales han logrado disminuir significativamente la gluconeogénesis. Así mismo, debido a su bajo contenido calórico, su uso es muy favorable en varias dietas (Govorko, et al., 2007, p.1503).

Diversos estudios muestran una correlación entre las bajas concentraciones de antioxidantes en la sangre y procesos inflamatorios crónicos degenerativos, además de estar relacionados con el desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas entre otras, debido a que presentaron elevados marcadores de daño oxidativo y bajas concentraciones de antioxidantes (Avello, Suwalsky, 2006, p. 162,168).

En lo referente a las enfermedades metabólicas como la diabetes, los polifenoles podrían actuar de la siguiente manera en el organismo: disminuyen el estrés oxidativo, protegen las células β del páncreas, actúan inhibiendo la ruta de la gluconeogénesis (disminuyéndola) e inhiben la α -glucosidasa (Estévez, 2016, p. 24)

La gluconeogénesis es un proceso metabólico que tiene lugar en el hígado, mediante el cual se produce la síntesis de glucosa a partir de compuestos que no son carbohidratos. Esta ruta metabólica se activa durante procesos de ayuno o inanición para cumplir la función de mantener los niveles estables de glucosa en sangre. Otros factores que activan esta ruta metabólica son el ejercicio prolongado y el estrés. (Lieberman y Marks, 2013, p.562)

En la ruta bioquímica de la gluconeogénesis intervienen varias enzimas, entre las cuales se destacan: la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), ambas enzimas representan puntos claves para la síntesis de glucosa y regulación de esta ruta y, ya que inducen el gen fosfoenolpirutavo carboxicinasa (*PEPCK*) y glucosa-6-fosfatasa (*G6P*), respectivamente (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 11).

La expresión de los genes PEPCK y G6P controla la activación de la gluconeogénesis. La regulación negativa de la transcripción de los genes se produce por la acción de la insulina (Govorko, et al., 2007, p.1503).

Sin embargo, en enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2, estos genes no responden a la regulación de la insulina debido a la resistencia a esta hormona en los tejidos. Por lo que, la producción de glucosa hepática puede llegar a representar hasta un 25% de la glicemia en estos pacientes (Rovayo, 2006, p.1).

Recientes estudios han demostrado que varios compuestos polifenólicos aislados del género *Artemisa* poseen la capacidad de disminuir la expresión de los genes *PEPCK* y *G6P* *in vitro*. Ensayos con compuestos polifenólicos extraídos de *Artemisia dracuncululus* L. (estragón ruso) en células de hígado de rata (H4IIE) han arrojado resultados positivos en la disminución de la expresión de los genes *PEPCK* y *G6P* (Govorko, et al., 2007, p.1503).

1.2 Planteamiento del problema

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por la presencia de hiperglucemia en ayunas y tras la ingesta calórica. Los altos niveles de glucosa sanguínea a pesar de no haber ingerido alimentos es el resultado de un aumento en la frecuencia de la gluconeogénesis hepática. En las personas con diabetes mellitus tipo 2 el páncreas que es el encargado de la producción de insulina, produce una cantidad mayor de insulina debido a que las células musculares estriadas, hepatocitos y adipocitos no responden de manera adecuada a esta hormona, lo que se denomina como resistencia a la insulina. Esto provoca el aumento en los niveles de *PEPCK* y *G6P*, lo que da como resultado una producción endógena descontrolada de glucosa hepática (Nakae, et al., 2001, p.1360-1361).

La glucosa producida en la gluconeogénesis en la diabetes tipo 2 es innecesaria y perjudicial en personas que padecen esta enfermedad, es así que la gluconeogénesis afecta de manera negativa a los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Magnusson, et al., 1992, p.1323-1324).

El uso de fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 puede tener efectos secundarios como náuseas o malestar gástrico. Además el uso de insulina en algunos pacientes puede producir sobrepeso u otras afecciones por el uso prolongado (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2013, p. 10-18).

Las personas que presentan niveles altos de glucosa en la sangre, pero que aún no presentan diabetes toman como primera opción los medicamentos para disminuir la grasa corporal o bajar de peso, cuando es recomendable la planificación de los alimentos y ejercicio (American Diabetes Association, 2016).

Estudios previos realizados con las bayas del arándano rojo (cranberry) y azul (blueberry), miembros del género *Vaccinium* han demostrado que presentan la capacidad de disminuir la gluconeogénesis. Aunque Vasco et al. (2009) realizó la caracterización química del mortiño, aún se desconoce si los polifenoles de este fruto tienen la capacidad para reducir la actividad de los genes *PEPCK* y *G6P* y por lo tanto controlar la gluconeogénesis.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad hipoglicemiante del extracto de mortiño rico en polifenoles.

1.3.2 Objetivos específicos

Estandarizar un protocolo para obtención de un extracto acuoso y etanólico de mortiño enriquecido en polifenoles.

Medir los niveles de expresión de los genes fosfoenolpiruvato carboxinasasa (*PEPCK*) y glucosa 6 fosfatasa (*G6P*) en células de hígado de rata.

Medir los niveles de glucosa producidos *in vitro*.

1.4 Justificación

En estudios previos se han usado otras plantas del género *Vaccinium* como los blueberries y cranberries (arándanos azules y rojos) y se demostró que tienen capacidad de reducir la gluconeogénesis por la alta cantidad de polifenoles que presenta. Sin embargo, a pesar de que el mortiño pertenece a este género y presenta características similares, no se han realizado estudios para comprobar su efecto para disminuir la gluconeogénesis. Se ha tomado en consideración esta fruta, debido a que es una planta nativa de los páramos andinos del Ecuador, lo que convierte al mortiño en una baya de alto consumo dentro de la población ecuatoriana, además es de fácil acceso y bajo costo (Trujillo, 2008, p.9-10).

En la ruta de la gluconeogénesis se encuentran varias enzimas, sin embargo existen dos que destacan por considerarse puntos clave: la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). Por este motivo es importante conocer el comportamiento de los genes *PEPCK* y *G6P* frente al tratamiento con un extracto rico en polifenoles, con cuyo uso se persigue una acción similar a la de la insulina en los pacientes diabéticos (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p.12-13).

Teniendo en cuenta las propiedades beneficiosas para la salud de los polifenoles, un estudio sobre los extractos de *V. floribundum* puede ser útil tanto para esclarecer su papel en la dieta humana como para recopilar información sobre su uso potencial en suplementos alimenticios y fitoterapia (Prencipe, et al., 2014, p. 258).

Los resultados obtenidos de este proyecto de titulación servirán como base para futuros estudios *in vivo* en los que se podría evaluar los niveles de glucosa en la sangre durante periodos de ayuno o inanición en la diabetes tipo II usando modelos animales al incluir el mortiño en su dieta diaria.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Vaccinium floribundum* Kunth

Vaccinium floribundum Kunth, llamado comúnmente mortiño o arándano andino o uva de monte, pertenece a la familia Ericaceae. Esta planta se encuentra en los páramos del Ecuador desde El Ángel en la provincia de Carchi al norte, hasta Tambo en la provincia de Cañar al sur, a una altitud de 3400 y 3800 m sobre el nivel del mar (ver figura 1). La cosecha del mortiño se desarrolla en climas fríos y templados, en temperaturas entre los 8 y 16 °C, en los bosques húmedo montano, suelos húmedos y en bosques secos montano bajo (Coba, et al., 2012, p. 7).



Figura 1. Provincias del Ecuador en las que se distribuye el mortiño.

Tomado de Roldán, 2012, p. 2.

La planta del mortiño es un arbusto con ramificaciones de aproximadamente 2,5 m, tienen hojas pequeñas hasta 1 cm. Su fruto es comestible, redondo y de color morado oscuro (casi negro) por fuera y por dentro la pulpa es de color verde con muchas semillas casi indetectables. Su tamaño varía entre los 7 y 8 milímetros de diámetro (ver figura 2) (Vasco, et al., 2009, p. 8274).

El interés en el mortiño ha aumentado en los últimos años por sus posibles beneficios para la salud, debido a que se ha demostrado que las especies comestibles relacionadas tienen un impacto positivo en condiciones patológicas como el síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, diabetes y procesos inflamatorios crónicos. Estas propiedades biológicas se han atribuido en gran parte a los altos niveles de diversos compuestos polifenólicos que posee (Schreckinger, et al., 2010, p. 8966).

Las bayas del mortiño tienen alta cantidad de minerales como fósforo, calcio y potasio, vitaminas del complejo B y C y antioxidantes. La composición química y el perfil polifenólico de *V. floribundum*, reveló la presencia predominantemente de quercetina, los ácidos hidroxicinámicos y cianidin-3-glucósidos (Schreckinger, et al., 2010, p. 8966).

Estas bayas pueden ser refrigeradas y congeladas sin alterar sus propiedades nutricionales y organolépticas, lo que permite mantener su comercialización a pesar de no encontrarse en temporada de cosecha. La baya fresca de mortiño presenta un 80% de agua, 1% de grasa, 16,9% carbohidratos totales, 0,7% proteínas, 7,6% fibra total, 0,4% ceniza y 84 kcal/100g. La fruta madura presenta altos contenido de polifenoles, consumir el fruto crudo podría permitir restablecer los niveles normales de glucosa en la sangre, mientras que el consumo del fruto cocido sirve para tratar la diabetes, hipoglicemia, gripe, problemas vasculares y digestivos, entre otros (Coba, et al., 2012, p. 7).

El mortiño es ampliamente consumido como producto procesado, fruta fresca, mermelada o jugo. Además de su uso en la alimentación, las comunidades locales

usan las bayas para la elaboración de extractos y tratar varias afecciones médicas como la diabetes o varios tipos de inflamación. A pesar del amplio uso del mortiño por las comunidades en los páramos, solo se han realizado dos estudios sobre la caracterización de esta planta y uno sobre sus productos derivados de ella (Prencipe, et al., 2014, p. 258).

Las bayas de mortiño se recolectan de los arbustos dos veces al año, entre octubre – diciembre y febrero – abril y se comercializan en los mercados de las localidades. En Ecuador, el mortiño se usa como ingrediente en un plato especial llamado "colada morada" preparado cada año para el 2 de noviembre, el Día de Todos los Santos o el "Día de los Muertos" (Vasco, et al., 2009, p. 8274).



Figura 2. Vaccinium floribundum Kunth (Mortiño)

2.2 Polifenoles

Los polifenoles son moléculas que contienen dos o más anillos bencénicos en su estructura, a los cuales al menos dos grupos hidroxilo se encuentran unidos.

Desde el punto de vista estructural, los polifenoles se clasifican en dos grandes grupos, los flavonoides y los no flavonoides, constando cada uno de estos subgrupos de 6 clases diferentes.

Flavonoides: Flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y antocianidinas (ver figura 3).

No flavonoides: alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, cumarina y chalconas (Sandoval, Ferreira y Speisky, 2014, p. 3).

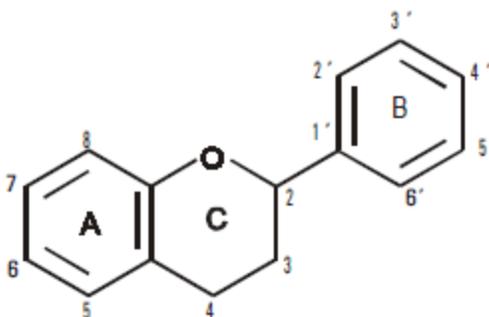


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.

Tomado de Pérez, 2003, p. 49.

Entre las bioactividades más estudiadas de los polifenoles se encuentra la capacidad anti-inflamatoria, vasodilatadora, anti-mutagénicas, anticancerígenas, antialérgico, antiviral, inmunomoduladora, insulina-potenciador, entre otras (Sandoval, Ferreira y Speisky, 2014, p. 2).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran principalmente en frutas tipo bayas y otros vegetales como los arándanos, moras, el té negro, el café, la cocoa, entre otros. Estos compuestos han sido estudiados a nivel clínico y

han demostrado inhibir enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomeras (ver figura 4) (Pérez, 2003, p.48).

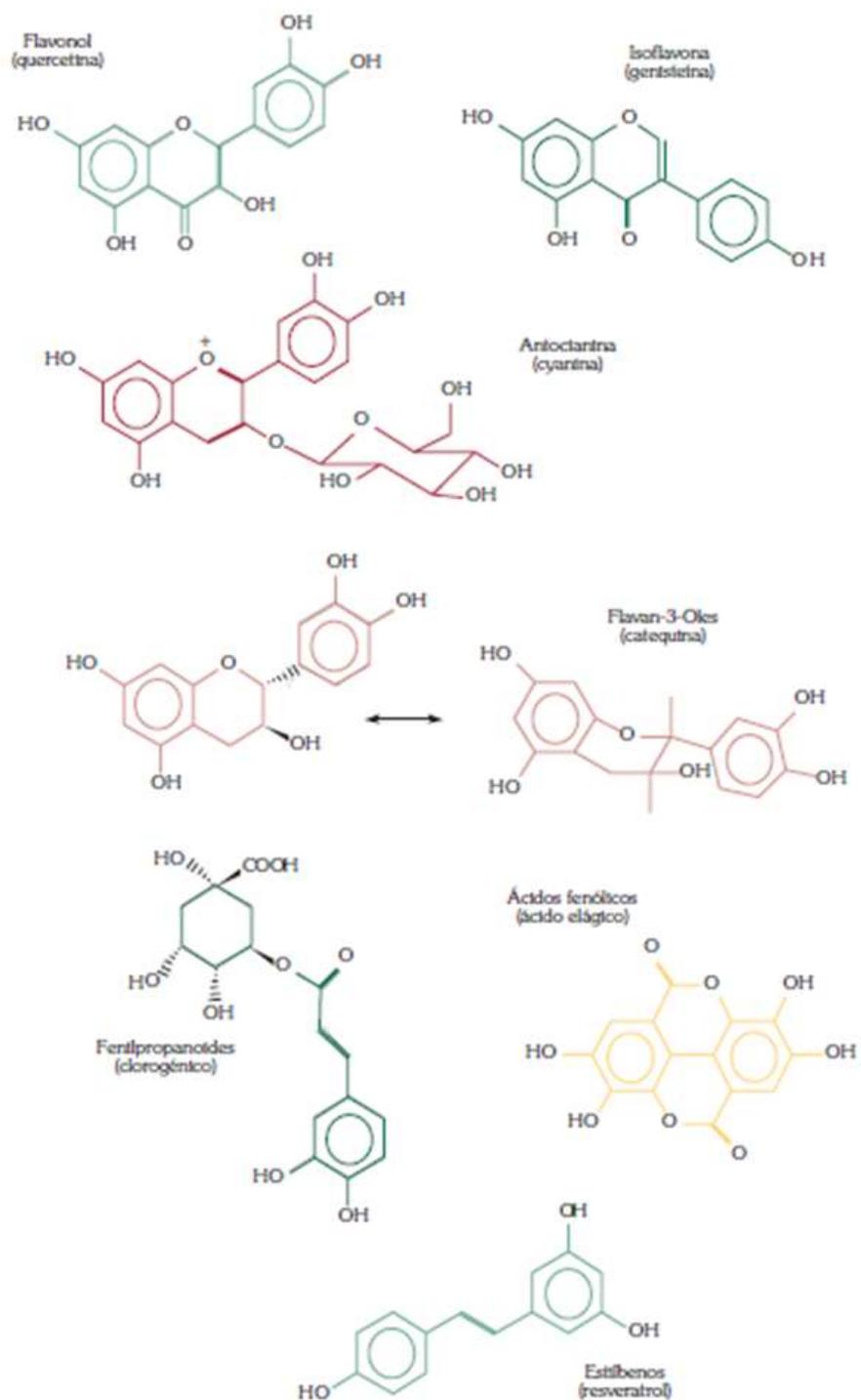


Figura 4. Principales grupos de polifenoles presentes en los alimentos.
Tomado de Barberán, 2003, p. 43.

Entre todas las propiedades biológicas que presentan los flavonoides, la que genera mayor interés es el efecto antioxidante que poseen, y se ha estudiado en el ámbito nutricional y clínico. Su capacidad antioxidante se debe a una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradora de radicales libres. Además, que pueden inhibir enzimas involucradas directamente en los procesos oxidativos. De esta manera los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de los radicales libres (Pérez, 2003, p.49).

2.3 Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es un proceso metabólico catabólico, que se realiza en el hígado y cumple la función de sintetizar glucosa a partir de sustratos no glúcidos (Lieberman y Marks, 2013, p.562).

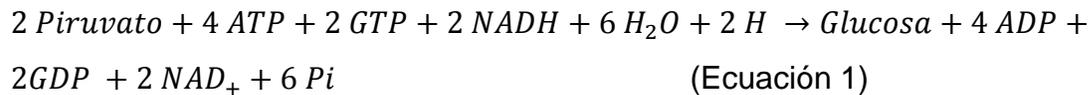
En los organismos vertebrados, esta ruta se activa como respuesta al ayuno prolongado y a la inanición, constituyendo una pieza clave para mantener los niveles de glucosa estables. En la gluconeogénesis, algunas reacciones de la glucólisis se revierten para favorecer la producción de glucosa y mantener su concentración estable en la sangre (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 10).

La gluconeogénesis se compone de una serie de reacciones enzimáticas que dan como resultado la síntesis neta de glucosa. Tiene como precursores más importantes al lactato, los aminoácidos y el glicerol. El glicerol se libera del tejido adiposo cuando los valores de insulina bajan y los de glucagón aumentan. El lactato es producido por los eritrocitos y por los músculos cuando se realiza ejercicio y los aminoácidos se liberan de los músculos estriados cuando la insulina concentración de insulina baja y en la ingestión elevada de proteínas y bajas de carbohidratos (Lieberman y Marks, 2013, p.563).

La importancia de la gluconeogénesis radica en que durante periodos de ayuno e inanición puede generar glucosa para el cerebro, eritrocitos, testículos y la médula renal, debido a que estos órganos dependen de la glucosa para obtener energía.

El proceso de la gluconeogénesis se produce en gran medida en el hígado, aunque también ocurre en menor grado en el intestino y el riñón (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 10-11).

La ecuación general de la gluconeogénesis es la siguiente:



(Ecuación 1)

(Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 11)

2.4 Genes fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*PEPCK*) y Glucosa 6 fosfatasa (*G6P*)

La gluconeogénesis se encuentra relacionada y coordinada con el ciclo de la urea, el ciclo de Krebs y la glucólisis. La glucólisis y la gluconeogénesis comparten reacciones ya que estas se pueden revertir al no existir impedimento termodinámico. Sin embargo 4 enzimas no participan en la glucólisis: piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxicinaasa, fructuosa 1,6-bisfosfatasa, glucosa 6-fosfatasa (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 12).

De estas enzimas, fosfoenolpiruvato carboxicinaasa (*PEPCK*) y glucosa-6-fosfatasa (*G6Pasa*) que se encuentra al inicio y final de la ruta respectivamente. Ambas enzimas representan puntos claves para la síntesis de glucosa y regulación de esta ruta (ver figura 5) (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 12).

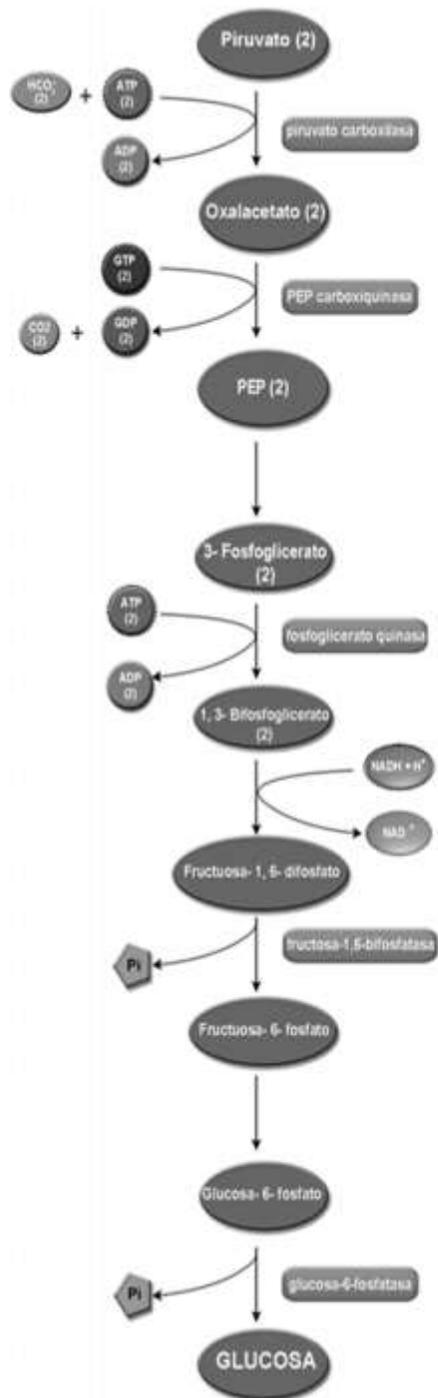


Figura 5. Proceso bioquímico de la gluconeogénesis.

Tomado de Pérez, 2012, p. 11.

La enzima PEPCCK presenta dos isoformas una enzima mitocondrial y citoplasmática, encargada de catalizar la conversión del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato. Esta actividad se ve afectada por la regulación hormonal a nivel de la transcripción, sin embargo no se conocen modificadores alostéricos (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 11-12). Por otro lado, la enzima G6Pasa es intrínseca de membrana y se encuentra en el retículo endoplasmático, participa en la formación de glucosa libre partiendo de glucosa-6-fosfato (Gomis, et al., 2003, p.9740).

La regulación positiva de la expresión genética de estas dos enzimas está controlada por hormonas como los glucocorticoides que provienen de la corteza renal (estas dos hormonas se secretan cuando en ayuno prolongado), el glucagón que proviene del páncreas, las hormonas tiroideas y el ácido retinoico. En contraste, la expresión de los genes se ve afectada por la insulina que es liberada por las células β pancreáticas cuando se ingieren alimentos (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 12).

2.4.1 Fosfoenolpiruvato carboxicinasa (*PEPCCK*)

La transcripción de este gen se encuentra regulada por varios factores como coactivadores o correpresores que se juntan a la región promotora y son activados y reclutados por la acción secuencial y coordinada de las hormonas implicadas. Entre los coactivadores se encuentran: el coactivador del PPAR γ y tipo 1 α (PGC-1 α), el coactivador del receptor de esteroides tipo 1 (SRC-1), la proteína de unión al CREB (CBP) (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 12-13).

2.4.2 Glucosa-6-fosfatasa (*G6P*)

Este gen posee regiones promotoras que inducen su expresión en respuesta a múltiples factores: elementos de respuesta a glucocorticoides, al AMPc estimulado por glucagón, y la misma glucosa, los ácidos grasos libres. La insulina, que disminuye la transcripción del gen (Pérez, De Ita y Díaz, 2012, p. 14).

2.5 Gluconeogénesis y diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por presentar hiperglucemia, y es el resultado de defectos de la acción de la insulina (diabetes mellitus tipo 2), la secreción de la insulina (diabetes mellitus tipo 1) o ambas. La causa de esta enfermedad responde a factores genéticos y ambientales (Lazo de la Vega y Mejia, 2013, p. 209).

A la diabetes mellitus tipo 2, se la considera como una enfermedad metabólica producida por la insensibilidad a la insulina y sus efectos en órganos diana como el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado. Esta enfermedad presenta elevados niveles de glucosa en la sangre que trae consigo varias complicaciones renales, cardiovasculares, nerviosas, oculares, entre otras. Este tipo de diabetes presenta mayor prevalencia en la población comparada con la diabetes tipo 1 (Mata, et al., 2002, p. 511-512).

En enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, existe una desregulación de la gluconeogénesis, provocando la producción excesiva de glucosa hepática en ayuno o inanición. En las personas con diabetes mellitus tipo 2 se presenta insensibilidad a la insulina, por lo que la gluconeogénesis permanece activa todo el tiempo. (Yoon, et al., 2001, p. 131)

En pacientes sanos, después de la ingestión de glucosa, la insulina se secreta, actuando de manera inhibitoria en la expresión de los genes PEPCCK y G6P encargados de permitir que la gluconeogénesis funcione. De manera general, la insulina provoca que el hígado suprima la producción de glucosa hepática. En pacientes con diabetes tipo 2 el hígado no percibe la señal de la insulina y mantiene la producción de glucosa hepática. El hígado de un individuo diabético añade aproximadamente 35 g adicionales de glucosa a la circulación sistémica. Una tasa excesiva de producción de glucosa hepática es la principal anomalía responsable de la elevada concentración de glucosa en plasma en pacientes diabéticos durante ayuno (Cersosimo, et al., 2000, p.2-3).

CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

Se realizaron cinco experimentos en el presente trabajo. En la elaboración de los extractos las variables fueron los diferentes pH (2, 3, 4 y 5) y el tipo de solvente: agua, etanol o solventes orgánicos: metanol acidificado y acetato de etilo. La cuantificación de polifenoles de los diferentes extractos tuvo como control el extracto elaborado con solventes orgánicos y las variables que se evaluaron fueron el agua y el etanol que se usaron como disolventes. La prueba para determinar la viabilidad celular tuvo como control negativo las células sin tratamiento, como control de muerte la emetina y como variables los tres tipos de extractos (solventes orgánicos, agua y etanol). En el experimento para determinar la expresión génica se empleó como control negativo las células sin tratamiento, como controles positivo las células inducidas a realizar gluconeogénesis y células tratadas con insulina. Como variables se plantearon los tres extractos con los que se trataron las células. La prueba de glucosa tuvo los mismos controles que el experimento de expresión de genes y las mismas variables.

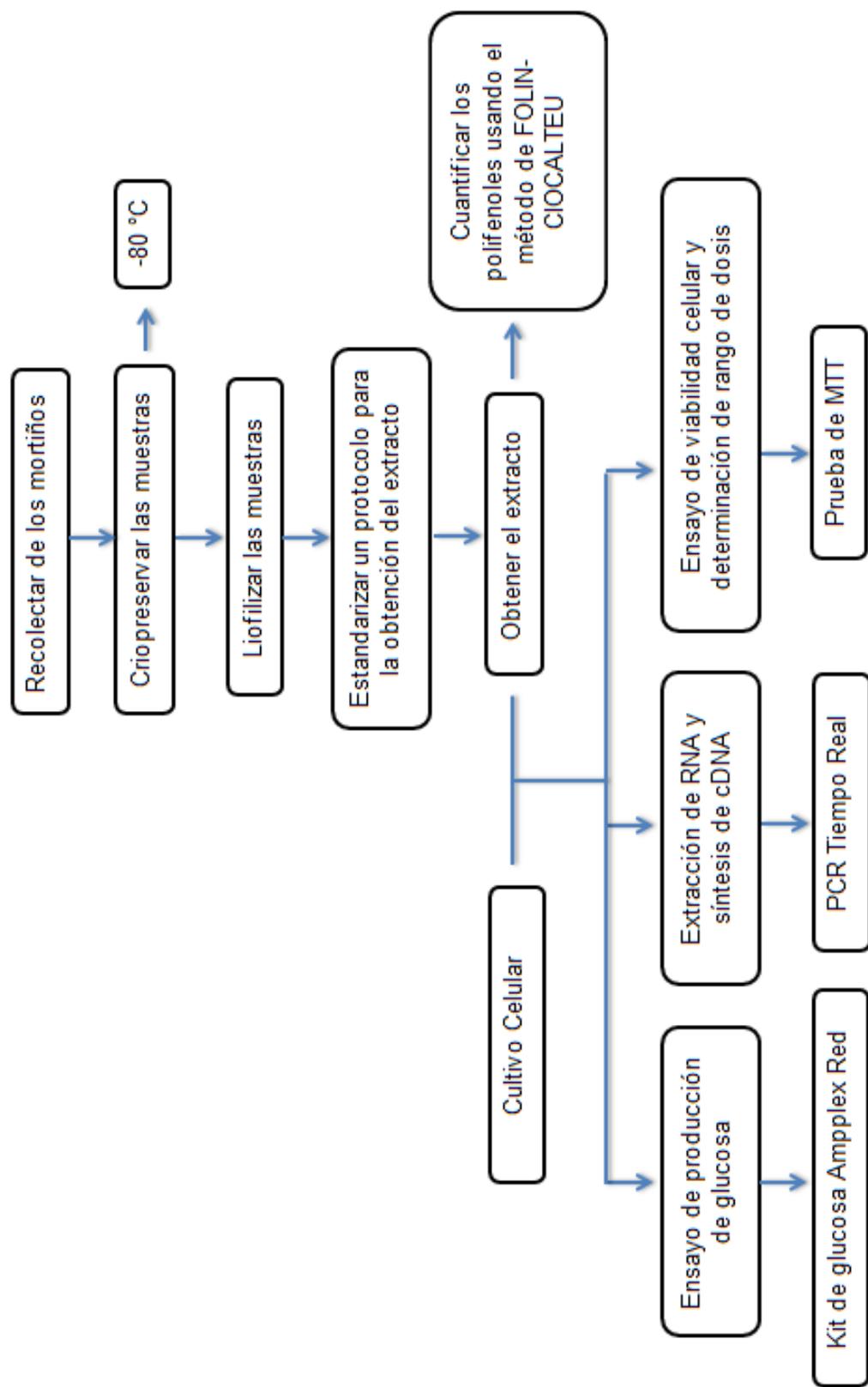


Figura 6. Diagrama de flujo del diseño experimental

CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS

4.1 Población y muestra

4.1.1 Recolección de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

El material vegetal (bayas) se recolectó en noviembre del 2015 y marzo del 2016 en el páramo andino de Lloa ubicado en la parroquia del mismo nombre, cuya latitud es -0.25 y longitud es -78.5833, localizado en la provincia de Pichincha al suroeste de la ciudad de Quito (Mafla, et al., 2012, pp. 35). Las bayas se colectaron directamente del arbusto de forma manual y se transportaron en hieleras a una temperatura de 2 - 8°C hasta las instalaciones del Centro de Investigación Traslacional donde se pesó todo el mortiño colectado en las dos ocasiones antes descritas.

4.1.2 Tratamiento al mortiño

En el Centro de Investigación Traslacional se conservaron las muestras a -80°C y posteriormente se liofilizaron en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Las Américas. Tras la liofilización se pulverizaron las bayas usando una licuadora Oster. Se realizó una segunda liofilización del material vegetal pulverizado; Previo al pesaje se determinó el peso de los balones que se usaron en la segunda liofilización, para determinar el peso seco del material vegetal obtenido al finalizar el tratamiento. El producto liofilizado se conservó en botellas ámbar de vidrio dentro de un desecador al vacío a temperatura ambiente.

4.2 Materiales y métodos para la obtención de datos

4.2.1 Elaboración de extracto de mortiño con solventes orgánicos

4.2.1.1 Extracción de polifenoles

Se añadieron 20 mL de acetato de etilo (EtOAc) (Sigma-Aldrich, EEUU) a 2,2 g del mortiño liofilizado y pulverizado. Se realizó una maceración dinámica en un matraz protegido de la luz (cubierto con papel aluminio) sobre una plancha a 350

rpm a temperatura ambiente por 20 minutos. Se filtró la extracción en balones de 250 mL usando papel filtro (Whatman, 110mm Ø). Se repitió este procedimiento por tres ocasiones usando el residuo del papel filtro obtenido de cada filtración.

Luego se tomó el residuo del papel filtro de las extracciones anteriores realizando un raspado, además se cortó el papel filtro en fragmentos pequeños y se colocaron dentro del matraz usado en las extracciones anteriores junto con 20 mL de metanol acidificado (0,6 M HCl en MeOH). Se realizó la maceración dinámica usando los parámetros detallados anteriormente. Se filtró la extracción en el mismo balón donde se encontraba la extracción de ácidos fenólicos y flavonoides. Los 4 extractos unidos se concentraron a 40 °C en un balón de 100 mL bajo vacío usando un rota vapor (Büchi, Alemania). El extracto se liofilizó por tres días. (Prencipe et al, 2014, pp. 258).

4.2.2 Elaboración de extracto de mortiño con agua y etanol

4.2.2.1 Extracción de polifenoles

Se realizaron dos extractos, uno etanólico y otro acuoso. Se tomaron 10 g de mortiño liofilizado y pulverizado, y se colocaron dentro de una licuadora Oster junto con 100 mL de etanol al 50% (proporción 10:1, volumen: peso). Se realizó el mismo procedimiento con 100 mL de agua. El producto licuado tanto con agua como con etanol al 50% se dividió en 4 alícuotas de 25 mL usando tubos falcon de 50 mL. El pH se ajustó a 2, 3, 4 y 5 tanto en los extractos etanólicos como acuosos usando ácido clorhídrico (HCl 3,7%) o hidróxido de sodio (NaOH 1N). El extracto acuoso se colocó en un baño de María a 80°C durante dos horas, mientras que el extracto etanólico se colocó en balones y se calentaron en un sistema de reflujo durante dos horas. Los extractos se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm colectando la parte líquida en tubos falcon de 50 mL pesados con anterioridad. Se liofilizaron los 8 tubos con los extractos (4 con agua, pH: 2, 3, 4 y 5 y 4 con etanol 50%, pH 2, 3, 4 y 5). Los 8 extractos (4 de etanol y 4 con agua) se liofilizaron por 3 días. (Roopchand et al., 2013, pp. 3665).

4.2.3 Cuantificación de polifenoles mediante protocolo de Folin-Ciocalteu

4.2.3.1 Elaboración de curva estándar para la cuantificación

Para realizar la cuantificación se elaboraron dos curvas estándar, una usando como solvente al EtOH 50%, para los extractos con agua y etanol y otra usando como solvente el dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck, Alemania), para el extracto con solventes orgánicos. Como control se preparó una solución stock de ácido gálico (Sigma-Aldrich, EEUU) a 2500 μM y se realizaron diluciones seriadas usando etanol al 50% y DMSO. Para realizar la curva estándar se tomaron las siguientes concentraciones: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 100 μM . Se tomaron 100 μL de ácido gálico de cada una de las concentraciones y se colocaron en microtubos de 1.5 mL, obteniéndose un total de siete tubos más uno del blanco (EtOH 50% y DMSO). A cada tubo se le añadieron 200 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania) (dilución 1:10, usando agua como disolvente) y posteriormente se procedió a agitar mediante vortex por 1 min. El reactivo de Folin-Ciocalteu se preparó en el momento de su uso. Se añadió a cada tubo 800 μL de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3 a 700 μM) (Sigma-Aldrich, EEUU). Se incubaron los tubos a temperatura ambiente cubiertos con papel de aluminio por dos horas. Posteriormente se transfirieron 200 μL de muestra (estándar y blanco) a una microplaca de 96 pocillos y se realizó la lectura en el espectrofotómetro (BioTek, EEUU) a una absorbancia de 765 nm (Ainsworth y Gillespie, 2007, pp. 876).

4.2.3.2 Cuantificación de polifenoles en los extractos

Se pesó 1 mg de mortiño liofilizado y pulverizado de los distintos extractos y se disolvieron en 1 mL de etanol al 50% o DMSO, como se detalla en la Tabla 1. Se colocó en el ultra sonicador (Fisher Scientific) por 40 min y vortex por 1 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 30 seg. Se tomaron 100 μL de cada uno de los extractos y se colocaron en microtubos de 1.5 mL. A cada tubo se le añadieron 200 μL de Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania) (dilución 1:10, usando agua como disolvente) y posterior a esto se agitó en vortex por un

minuto. El reactivo de Folin-Ciocalteu se preparó al instante. Se añadió a cada tubo 800 μL de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3 a 700 μM) (Sigma-Aldrich, EEUU). Se incubaron los tubos a temperatura ambiente cubiertos con papel de aluminio por dos horas. Se transfirieron 200 μL de muestra a una microplaca de 96 pocillos y se realizó la lectura a una absorbancia de 765 nm (Ainsworth y Gillespie, 2007, pp. 876). Este procedimiento se realizó simultáneamente con la curva estándar y en cada cuantificación se preparó una curva estándar como está mencionado en la sección 3.2.3.1

Para calcular la concentración de polifenoles se usó la ecuación de la pendiente obtenida a partir de la curva estándar:

$$y = m * x + b$$

(Ecuación 2)

(Ainsworth y Gillespie, 2007, p. 876)

Tabla 1.

Diferentes extractos con sus disolventes

| Extracto con solventes orgánicos | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL DMSO |
|---|--|
| Extracto con Agua pH2 | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL EtOH 50% |
| Extracto con Agua pH3 | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL EtOH 50% |
| Extracto con Agua pH4 | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL EtOH 50% |
| Extracto con Agua pH5 | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL EtOH 50% |
| Extracto con Etanol pH2 | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL EtOH 50% |
| Extracto con Etanol pH3 | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL EtOH 50% |
| Extracto con Etanol pH4 | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL EtOH 50% |
| Extracto con Etanol pH5 | 1 mg de mortiño liofilizado + 1 mL EtOH 50% |

4.2.4 Cultivo de células H4IIE

Se cultivaron células hepáticas de rata H4IIE donadas por la Dra. Ilya Raskin (Rutgers University), que se encontraban en pase 9. Las células se mantuvieron en cultivo realizando un cambio de medio cada tres días y el pase de células cada 5 días en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 21063029) modificado con alto contenido de glucosa, L-glutamina y HEPES. El medio se suplementó con 10% de suero fetal bovino con sus siglas en inglés FBS inactivado (Thermofisher Scientific, EE.UU) y 1% de solución de penicilina-estreptomicina. Los pases se realizaron a una dilución de 0,5:10 (células:medio). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C con 18% de O₂ y 5% de CO₂ en frascos de cultivo de 175 cm² (Rojo et al, 2012, pp. 388).

4.2.5 Determinación de citotoxicidad de los extractos de mortiño (extracto con solventes orgánicos, extractos con agua y extractos con etanol)

4.2.5.1 Preparación de extractos

Se pesó 1 mg del extracto en solventes orgánicos y de los extractos en agua a pH 5 y etanol pH 3 que fueron los que presentaron mayor cantidad de polifenoles. Los extractos se disolvieron en 1 mL de etanol al 100%. Se realizaron diluciones seriadas con etanol 50% a distintas concentraciones: 50000, 5000, 500 y 50 µg/mL.

4.2.5.2 Ensayo de citotoxicidad mediante la prueba de metil tiazol tetrazolio (MTT)

Para realizar el experimento, las células se mantuvieron en cultivo durante cinco días. Se colectaron las células aspirando el medio, lavando las células dos veces con 1mL de PBS y colocando 3mL de Trypsin-EDTA (Thermo fiser Scientific, EEUU). Se contaron las células teñidas con Trypan Blue (Sigma-Aldrich, EE.UU, 93595) usando la cámara de Neubauer, para discriminar las vivas de las muertas.

Se ajustó la densidad a 5×10^4 células/ mL con medio DMEM (el mismo que se usó para cultivo celular). Para el tratamiento se usó una micro placa de 96 pocillos de fondo plano, en la cual se colocó un volumen final de 100 μ L de células por pocillo. El control negativo fueron las células sin ningún tratamiento, el control de muerte fue la emetina (Sigma-Aldrich, EE.UU) y los tratamientos con extractos se colocaron a diferentes concentraciones como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2.

Tratamientos y sus concentraciones

| TRATAMIENTOS | VOLUMEN TRATAMIENTOS | CONCENTRACIÓN FINAL EN POCILLO |
|--|-----------------------------|---------------------------------------|
| Control crecimiento (negativo) | - | - |
| Control vehículo (EtOH 100%) | 2 μ L | EtOH 100% (concentración final 2%) |
| Control positivo (Emetina) | 2 μ L | Emetina 100 μ M |
| Extracto Solventes 50 μg/ml | 2 μ L | 1 μ g/mL |
| Extracto Solventes 500 μg/mL | 2 μ L | 10 μ g/mL |
| Extracto Solventes 5000 μg/mL | 2 μ L | 100 μ g/mL |
| Extracto Solventes 50000 μg/mL | 2 μ L | 1000 μ g/mL |
| Extracto Agua 50 μg/mL | 2 μ L | 1 μ g/mL |
| Extracto Agua 500 μg/mL | 2 μ L | 10 μ g/mL |
| Extracto Agua 5000 μg/mL | 2 μ L | 100 μ g/mL |
| Extracto Agua 50000 μg/mL | 2 μ L | 1000 μ g/mL |
| Extracto Etanol 50 μg/mL | 2 μ L | 1 μ g/mL |
| Extracto Etanol 500 μg/mL | 2 μ L | 10 μ g/mL |
| Extracto Etanol 5000 μg/mL | 2 μ L | 100 μ g/mL |
| Extracto Etanol 50000 μg/mL | 2 μ L | 1000 μ g/mL |

Las células se mantuvieron en la incubadora por 24 horas a 37°C con 18% de O₂ y 5% de CO₂. Transcurridas las 24 horas de incubación se realizó la prueba

de citotoxicidad empleando la sal de tetrazolium conocida como MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich, EEUU). El ensayo consiste en una prueba colorimétrica mediante la cual se puede determinar la viabilidad celular (Mosmann, 1983, pp. 56-57). Para la preparación del MTT se disolvieron 5 mg en 1 mL de Phosphate Buffered Saline (Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 10010-023) por sus siglas en inglés *PBS* estéril. Una vez disuelto en PBS, la solución de MTT se esterilizó con un filtro de polipropileno de poro 0,22 μ M (Nikzad, Baradaran, y Nasri, 2014, pp. 432). Se añadieron 10 μ L de la solución, teniendo como volumen final en cada pocillo 5% de MTT. Las células se incubaron por 2 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se aspiró el medio de cultivo usando un succionador y se añadieron 100 μ L de DMSO. Se realizó la lectura de la micro placa en el espectrofotómetro (BioTek, EEUU) a absorbancias de 570 y 630 nm. Los datos se procesaron con el software Gen5™.

4.2.6 Expresión de genes PEPCK y G6P

4.2.6.1 Preparación de Extractos

Se pesaron 10 mg del extracto con solventes orgánicos, extractos de agua y etanol (se usaron los mismos extractos que en la prueba de citotoxicidad). Los extractos se disolvieron en 1 mL de etanol al 100%.

4.2.6.2 Extracción de ARN

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de células hepáticas H4IIE con pase 15, que se encontraban en su quinto día de crecimiento. Las células se colectaron y contaron en la cámara de Neubauer teñidas con Trypan Blue. Se ajustó la densidad a 5×10^5 células/ mL con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 21063029) modificado con alto contenido de glucosa, L-glutamina y HEPES. El medio se suplementó con 10% de FBS inactivado y 1% de penicilina-estreptomina. Para el tratamiento se

usó una placa de 24 pocillos de fondo plano, en la cual se colocó un volumen final de 1000 μL de suspensión celular, que se incubaron por 24 horas a 37°C con 18% de O_2 y 5% de CO_2 (Rojo et al, 2012, pp. 388). Posteriormente, se aspiró el medio, se lavaron las células dos veces con PBS y se agregó 1 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 21063029) modificado con alto contenido de glucosa, que contiene L-glutamina y HEPES. El medio se suplementó con 5% de FBS inactivado y 1% de penicilina-estreptomina e inmediatamente se aplicaron los tratamientos. En este ensayo se usó como control negativo células sin ningún tratamiento y como controles positivos células inducidas a realizar gluconeogénesis con el reactivo 8-CTP-cAMP (Sigma-Aldrich, EE.UU) y dexamtasona (Sigma-Aldrich, EE.UU) y células tratadas con insulina cristalina (HumulinR, Lilly, México), como se detalla en la tabla 3 (Govorko, et al., 2007, p.1503).

Tabla 3.

Tratamientos y concentraciones

| TRATAMIENTOS | VOLUMEN TRATAMIENTOS | CONCENTRACIÓN FINAL EN POCILLOS |
|---------------------------------------|--|---|
| Control crecimiento (negativo) | - | - |
| Control inducido | 10 μL Dex + 10 μL cAMP | Dex 500nM y 10 μL cAMP 0,1mM |
| Control positivo (Insulina) | 10 μL | HumulinR 10nM |
| Control vehículo (EtOH 100%) | 10 μL | EtOH 100% (concentración final 10%) |
| Extracto Solventes | 10 μL | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Extracto Agua | 10 μL | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| Extracto Etanol | 10 μL | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

Tras aplicar los tratamientos, la placa se incubó por 8 horas. Una vez transcurrida la incubación se aspiró el medio y se lavó dos veces con 1 mL de PBS. Se colocó 1 mL de TRI Reagent® Solution (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y con movimientos circulares usando la punta de la pipeta se desprendieron las células del pocillo. Para realizar la extracción de ARN se empleó el kit PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EEUU). En microtubos de 1,5 µL se recolectaron las muestras y se añadieron 200 µL de cloroformo. Se agitó manualmente por 15 seg y se incubó de 2 – 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 12000 rfc por 15 min a 4°C y se tomaron 400 µL del sobrenadante, sin tocar el límite entre las dos fases formadas, y se colocaron las muestras en microtubos de 1,5 µL libres de RNAsas. A cada tubo se añadió 400 µL de etanol al 70% y este volumen se transfirió a las columnas. Se centrifugaron los tubos a 12000 rfc por 15 seg a temperatura ambiente, posterior a esto se eliminó el líquido del tubo colector. Se colocaron 350 µL de Wash Buffer I y se centrifugó a 12000 rfc por 15 seg a temperatura ambiente. Se descartó el líquido con el tubo colector y se transfirieron las muestras a nuevos microtubos. Se realizó un tratamiento con PureLink™ DNase (Invitrogen, EEUU). Se añadió 80 µL de DNasa directamente a la membrana; para dicho tratamiento se preparó la DNasa tomando en cuenta el número de muestras a tratar. Se incubaron las muestras por 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rfc por 15 seg a temperatura ambiente y se añadieron 350 µL de Wash Buffer I. Las muestras se centrifugaron a 12000 rfc por 15 seg a temperatura ambiente, descartándose el líquido y el tubo colector. Se colocaron las muestras en nuevos microtubos. Se añadieron 500 µL de Wash Buffer II y se centrifugó a 12000 rfc por 15 seg a temperatura ambiente descartando posteriormente el líquido (repetir el paso con el Wash Buffer II). Las muestras se centrifugaron a 12000 rfc por 1 min a temperatura ambiente, se descartó el líquido y se añadieron 65 µL de RNase Free Water. Se incubaron las muestras por 1 min, se eliminaron las columnas y se conservó el ARN en los tubos colectores. El ARN obtenido de la extracción se cuantificó y se verificó la calidad usando el espectrofotómetro, para lo cual se

realizó lecturas de la densidad óptica a 260 y 280 nm. Los datos se procesaron con el software Gen5™, tomando 2,3 µL de la muestra de ARN y aplicándola en la plataforma Take3 (BioTek Instruments Inc) (Díaz-Alonso et al, 2015, pp. 301).

4.2.6.3 RT-PCR (expresión de genes)

Para realizar la reacción de RT-PCR y determinar la expresión de los genes *PEPCK* y *G6P* se usó el kit TaqMan® RNA-to-C_T™ (Applied Biosystems, EEUU). Además, se emplearon tres sondas TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, EEUU), como se detalla en la tabla 4:

Tabla 4.

Sondas y fluoróforos

| SONDA | FLUORÓFORO |
|--|--------------------|
| Beta actina (Actb) | VIC™/JOE |
| Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (Pck1) | FAM™/SYBR® Green 1 |
| Glucosa 6 fosfatasa (G6pc3) | FAM™/SYBR® Green 1 |

Cada muestra junto con la mix se colocó en tiras de tubos de 0,2 mL (Bio-Rad, EEUU). Se centrifugaron las muestras por 30 seg a 12000rcf y se colocaron dentro del termociclador. Las condiciones de reacción en las que se realizó el ensayo fueron las siguientes (Tabla 5 y 6):

Tabla 5.

Reactivos y volúmenes para el tratamiento de las muestras

| REACTIVOS | CONCENTRACIÓN(1X) | VOLUMEN |
|------------------------------|--------------------------|----------------|
| TaqMan RT-PCR Mix | 2x | 5,0 µL |
| TaqMan Gene Expression Assay | 20x | 0,5 µL |
| TaqMan RT Enzyme Mix | 40x | 0,25 µL |
| ARN molde | - | 4,25 µL |
| Volumen final | - | 10,0 µL |

Tabla 6.

Condiciones de reacción de la RT-PCR

| PERFIL TÉRMICO | |
|--|---------------|
| Transcripción Reversa | 48°C x 15 min |
| Activación de AMpliTaq Gold® DNA Polimerasa (Ultra Pure) | 95°C x 10 min |
| 40 Ciclos | |
| Desnaturalización | 95°C x 15 seg |
| Extensión | 60°C x 1 min |

Para el análisis de los resultados de la RT-PCR usó el software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, EEUU).

4.2.7 Producción de glucosa

4.2.7.1 Eliminación de azúcares en los extractos

Para realizar los lavados en los tres extractos se usaron cartuchos C18 (Sep-Pak®, Irlanda). Se pesaron 20 mg de cada uno de los extractos (se usaron los extractos con los mismos pH que en la prueba de MTT y extracción de ARN) y se disolvieron en 20 mL de etanol al 50%. Antes de proceder con el lavado de los extractos, se adecuaron los cartuchos agregando 70 mL de acetato de etilo, 70 mL de ácido acético glacial 1% (Merck, EEUU) y 70 mL de metanol acidificado con (Sigma-Aldrich, EE.UU) con 1% de ácido acético glacial. Después de adecuar el cartucho, se colocaron 20 mL del extracto con solventes orgánicos, 105 mL de ácido acético glacial 1% para eliminar los azúcares, se desechó el líquido. Posterior a esto se agregaron 105 mL de metanol con 1% de ácido acético. Obteniendo de esta manera los extractos libres de azúcares. Se realizó el mismo procedimiento con los extractos de agua y etanol, adecuando la columna antes del lavado de cada extracto. Los extractos recolectados libres de azúcares se colocaron en el rotavapor y posteriormente se pesaron y se disolvieron en etanol 100% (Roopchand, et al., 2013, pp. 61).

4.2.7.2 Cuantificación de glucosa producida por células H4IIE

Las células se colectaron y contaron en la cámara de Neubauer teñidas con Trypan Blue. Se ajustó la densidad a 5×10^5 células/ mL con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 21063029) modificado con alto contenido de glucosa, que contiene L-glutamina y HEPES. El medio se suplementó con 10% de FBS inactivado y 1% de penicilina-estreptomicina. Para el tratamiento se usó una placa de 24 pocillos de fondo plano, en el cual se colocó un volumen final de 1000 μ L de células. Las células se incubaron por 24 horas a 37°C con 18% de O₂ y 5% de CO₂ en frascos de cultivo de 175 cm² (Rojo *et al*, 2012, pp. 388). Posterior a esto, se aspiró el medio, se lavaron las células dos veces con PBS y se agregó 1mL de DMEM (Dulbecco's

Modified Eagle Medium; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU) modificado libre de glucosa, sin L-glutamina ni rojo fenol. El medio se suplementó con 2 mM de piruvato de sodio (Gibco, EEUU®), 20 mM de lactato de sodio (Sigma-Aldrich, EE.UU) y 1% de penicilina-estreptomicina y se dejó incubar por 16 horas (usando las mismas condiciones anteriormente descritas). Posterior a esto se indujo la gluconeogénesis con 8-CTP-cAMP (Sigma-Aldrich, EE.UU) y dexametasona (Sigma-Aldrich, EE.UU) y se aplicaron los tratamientos. Se incubó la placa por 8 horas. En este ensayo se usó como control negativo células sin ningún tratamiento y como controles positivos células tratadas con HumulinR (Lilly, México) y células tratadas con Quercetina (Sigma-Aldrich, EE.UU), como se detalla en la tabla 7. Se tomó el medio, se colocó en microtubos de 1,5 mL y se conservó en -20°C. La placa se lavó dos veces con PBS y se conservó a -20°C. (Roopchand, et al., 2013, pp. 61).

Tabla 7.

Tratamientos y concentraciones

| TRATAMIENTOS | VOLUMEN TRATAMIENTOS | CONCENTRACIÓN FINAL EN POCILLOS |
|---------------------------------------|----------------------------------|--|
| Control crecimiento (negativo) | - | - |
| Control inducido | 10 μ L Dex + 10 μ L cAMP | Dex 500nM y 10 μ L cAMP 0,1mM |
| Control positivo (Insulina) | 10 μ L | HumulinR 10nM |
| Control positivo (Quercetina) | 10 μ L | Quercetina 100 μ M |
| Control vehículo (EtOH 100%) | 10 μ L | EtOH 100% (concentración final 10%) |
| Extracto Solventes | 10 μ L | 100 μ g/mL |
| Extracto Agua | 10 μ L | 100 μ g/mL |
| Extracto Etanol | 10 μ L | 100 μ g/mL |

Para el ensayo de medición de glucosa se usó el kit comercial Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit (Thermo Fisher, EEUU). Se elaboró una curva estándar de glucosa partiendo de una solución madre de 400 mM. Se realizaron diluciones seriadas usando como solvente el tampón de reacción 1x. Para realizar la curva estándar se tomaron las siguientes concentraciones: 200, 100, 50, 20, 10 μ M y un control sin glucosa. Se cargaron las muestras en una placa de 96 pocillos, colocando 50 μ L de cada una de las diluciones y el blanco, además de 50 μ L de la mix. La mezcla se preparó como se detalla en la tabla 8:

Tabla 8.

Elaboración de la mix

| REACTIVOS | VOLUMEN AÑADIDO | CONCENTRACIÓN FINAL |
|---------------------------------------|-----------------|---------------------|
| Reactivo Amplex® Red | 50 µL | 10 mM |
| Solución madre de la peroxidasa (HRP) | 100 µL | 10 U/mL |
| Solución de glucosa oxidase | 100 µL | 100 U/mL |
| Tampón de reacción 1X | 4,75 mL | 1x |

Se tomaron 25 µL del medio y se disolvieron en 25 µL de tampón de reacción 1x (dilución 1:2). Se colocó en la placa de 96 pocillos y se añadió 50 µL de la mix preparada anteriormente. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, protegido de la luz. La lectura de la microplaca se realizó en un espectrofotómetro (BioTek, EEUU) a absorbancias de 530, 545 y 560 nm. Los datos se procesaron con el software Gen5™.

4.3 Evaluación estadística de los datos

Se realizaron tres experimentos independientes para cada análisis y cada tratamiento se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software GraphPad v.6. Para determinar si existió diferencia estadísticamente significativa se usó la prueba ANOVA con corrección de Dunnett o Tukey según se indica en cada experimento.

CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Recolección de mortiño (*Vaccinium floribundum*) y tratamiento

La cantidad de bayas de mortiño colectadas en las dos salidas fueron:

Noviembre del 2015: 5.000 g

Marzo del 2016: 2.000 g

Después de la liofilización se obtuvieron los siguientes valores: (tabla 9):

Tabla 9.

Datos de recolección del mortiño en el páramo de Lloa

| PRIMERA SALIDA DE CAMPO | | |
|--------------------------------|--------------------|------------------|
| Liofilizaciones | Peso Fresco | Peso Seco |
| Primera Liofilización | 880 g | 165 g |
| Segunda Liofilización | 600 g | 149 g |
| Tercera Liofilización | 900 g | 184 g |
| Cuarta Liofilización | 550 g | 127 g |
| Total 1 | 2930 g | 625 g |
| SEGUNDA SALIDA DE CAMPO | | |
| Primera Liofilización | 700 g | 167 g |
| Segunda Liofilización | 700 g | 170 g |
| Tercera Liofilización | 800 g | 218 g |
| Cuarta Liofilización | 300 g | 69 g |
| Total 2 | 1137 g | 624 g |
| Peso Total | 4067 g | 1249 g |

Debido a problemas con el equipo de liofilización, existió una pérdida de 3000 g de mortiño fresco. Se tomó como referencia a Vasco y sus colaboradores (2009, p. 8275) para tratar las bayas recolectadas sin embargo se realizaron algunas

modificaciones como la recolección del material biológico en una zona específica y directamente de los arbustos para garantizar que las muestras tuvieran una misma procedencia. Además, Vasco manifestó que liofilizó las bayas solo una vez usando platos, mientras que en este trabajo se liofilizaron dos veces. La segunda liofilización se realizó después de pulverizar las bayas que habían sido previamente liofilizadas. En la primera liofilización se usaron balones, mientras que en la segunda se usaron platos, por esta razón se necesitó realizar la segunda liofilización. En los balones las bayas no se liofilizaban de manera uniforme. El material vegetal liofilizado se conservó en disecador usando frascos de vidrio ámbar y no fundas plásticas como manifestaba Vasco, ya que al colocar las muestras en $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, estas capturaban la humedad del ambiente.

5.2 Elaboración de extractos

La elaboración del extracto con solventes orgánicos se repitió tres veces en tres días distintos basándose en el protocolo de Prencipe y colaboradores (2014, p. 258), pero se adicionó un paso de liofilización al finalizar las extracciones para poder pesar con mayor facilidad y exactitud los extractos. Los extractos elaborados con agua y etanol se repitieron tres veces en tres días distintos basándose en el protocolo Roopchand y colaboradores (2013, p. 3665) con algunas modificaciones. Los extractos con etanol al 50% a pH 2, 3, 4 y 5 no se colocaron a baño María porque el etanol tiene menor punto de ebullición que el agua, por lo tanto los extractos se derramaban ocasionando pérdida de los mismos, por esto se usó un sistema de reflujo. Los extractos con agua a pH 2, 3, 4 y 5 si se colocaron en el baño María. Los extractos elaborados con solventes orgánicos, con agua y con etanol a distintos pH se liofilizaron por tres días obteniéndose extractos en polvo. Después de pesar los extractos se compararon entre ellos. Los extracto con solventes orgánicos en los que se usaron 2,2 g de mortiño liofilizado rendían más cantidad que los elaborados con agua y etanol, en los que se usaron 10 g de mortiño liofilizado. A pesar de que Roopchand y colaboradores no detallan la cantidad de extracto final obtenido en su

investigación. En este trabajo experimental los métodos de extracción aplicados resultaron eficaces ya que se obtuvo una cantidad de extracto suficiente de una misma extracción que fueron usados en todos los ensayos (tabla 10).

Tabla 10.

Cantidad de extractos obtenidos empleando solventes orgánicos, agua y etanol

| EXTRACTOS CON SOLVENTES ORGÁNICOS | | |
|--|----------|----------|
| Primer día | 2,4211 g | |
| Segundo día | 2,1024 g | |
| Tercer día | 2,0551 g | |
| EXTRACTOS CON AGUA | | |
| Primer día | pH 2 | 1,4211 g |
| | pH 3 | 1,1024 g |
| | pH 4 | 1,0551 g |
| | pH 5 | 1,2282 g |
| Segundo día | pH 2 | 1,8462 g |
| | pH 3 | 1,7445 g |
| | pH 4 | 1,7059 g |
| | pH 5 | 1,8201 g |
| Tercer día | pH 2 | 1,2521 g |
| | pH 3 | 1,2448 g |
| | pH 4 | 1,2542 g |
| | pH 5 | 1,2488 g |
| EXTRACTOS CON ETANOL AL 50% | | |
| Primer día | pH 2 | 1,9275 g |
| | pH 3 | 1,7540 g |
| | pH 4 | 1,8384 g |
| | pH 5 | 1,7013 g |
| Segundo día | pH 2 | 1,3691 g |
| | pH 3 | 1,4350 g |
| | pH 4 | 1,1500 g |
| | pH 5 | 1,8232 g |

| | | |
|-------------------|------|----------|
| Tercer día | pH 2 | 1,2458 g |
| | pH 3 | 1,2562 g |
| | pH 4 | 1,2468 g |
| | pH 5 | 1,2087 g |

5.3 Cuantificación de polifenoles en los extractos

La medición de la cantidad de polifenoles presente en cada uno de los extractos se realizó por duplicado, repitiéndose el experimento en tres días diferentes. Se hizo curvas estándar con los distintos solventes para cada uno de los días. Para la medición de los extractos con solventes orgánicos se usó DMSO como disolvente, por lo que se elaboró una curva estándar usando este disolvente. Para la medición de los extractos con agua y etanol, se usó etanol al 50% y para medir estos extractos se elaboró una curva con etanol al 50% como disolvente. A simple vista, en los extractos obtenidos, se evidenció que existía una diferencia de color ya que los extractos con solventes orgánicos presentaron un color morado oscuro, el extracto elaborado con agua un color morado claro, mientras que el extracto elaborado con etanol un color morado-rojo. Al analizar espectrofotométricamente los tres extractos a sus diferentes pH se obtuvieron los datos que se encuentran en la tabla 11.

Tabla 11.

Cuantificación de polifenoles en los extractos de mortiño

| Dias | 1 | 2 | 3 |
|--------------------------------|----------|----------|----------|
| Extracto Solventes (mg) | 835.3 | 567.4 | 426.7 |
| Agua pH2 (mg) | 415.9 | 517.95 | 403.29 |
| Agua pH3 (mg) | 377.8 | 408.19 | 407.88 |
| Agua pH4 (mg) | 460.1 | 443.9 | 411 |
| Agua pH5 (mg) | 539 | 538.9 | 501.83 |
| Etanol pH2 (mg) | 759.5 | 716.99 | 598.29 |
| Etanol pH3 (mg) | 726.1 | 872.24 | 654.54 |
| Etanol pH4 (mg) | 505.7 | 738.9 | 703.5 |
| Etanol pH5 (mg) | 585.7 | 672.48 | 607.45 |

Se intentó usar un mismo solvente para los tres extractos, sin embargo los extractos con solventes orgánicos no se disolvían en etanol al 50%, por este motivo se usó DMSO. Según Martín y sus colaboradores (1967, p.318) el DMSO es un disolvente aprótico dipolar que posee la capacidad de formar puentes de hidrógeno, lo que le proporciona la característica de servir como solvente para muchos compuestos inorgánicos y orgánicos por lo que es considerado un solvente universal.

Para la elaboración de los extractos con solventes orgánicos se usaron 2,2 g de mortiño liofilizado y para la elaboración de los extractos con agua y etanol se

usaron 10 g de mortiño liofilizado. Realizando una comparación entre los promedios obtenidos a partir de los tres extractos a los diferentes pH se observó que los extractos de agua a pH 5 y el de etanol a pH 3 presentaron los valores más elevados. A los promedios obtenidos de las tres repeticiones de los distintos solventes a diferentes pH y se les aplicó la prueba de ANOVA con corrección de Tuckey y se obtuvieron los siguientes resultados (ver figura 7):

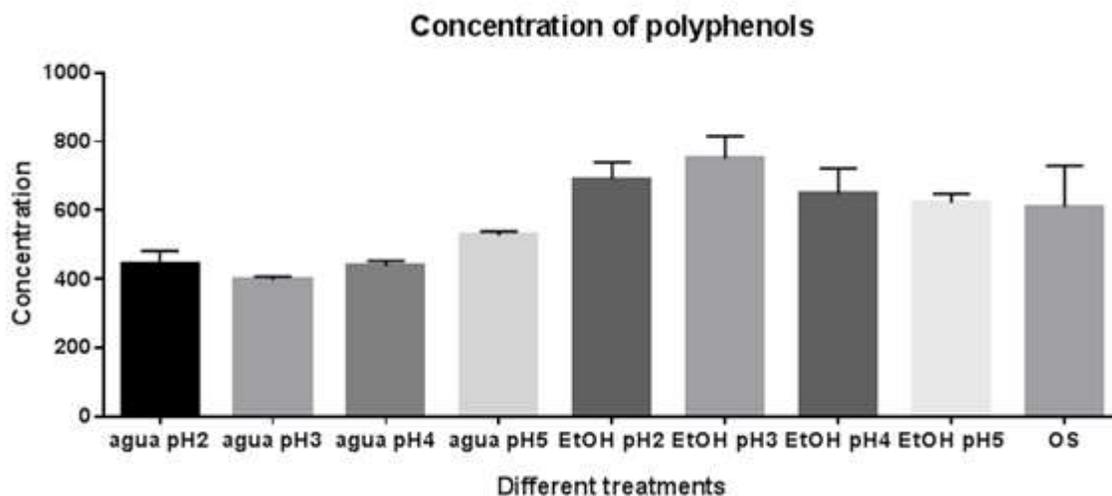


Figura 7. Gráfica de cuantificación de polifenoles y comparación de los tres distintos extractos.

Se usó la prueba ANOVA con corrección de Tukey para realizar una comparación entre el extracto elaborado con agua y el extracto elaborado con solventes orgánicos (control), así mismo entre el extracto elaborado con etanol y el extracto con solventes orgánicos (control). El análisis estadístico arrojó que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tres extractos. Además, los resultados de la prueba muestran que no existe diferencia significativa en relación con el pH tanto para los extractos elaborados con etanol como para los elaborados con agua.

5.4 Determinación de citotoxicidad de los extractos de mortiño (extracto con solventes orgánicos, extractos con agua y extractos con etanol)

Arencibida y sus colaboradores (2003, p.43) realizaron un estudio comparativo entre algunas pruebas de citotoxicidad como el ensayo de enlazamiento al azul de kenacid, la prueba de captación del rojo neutro y el ensayo de reducción del MTT, llegando a la conclusión que la prueba de MTT presenta mayor eficacia y rapidez al momento de la obtención de resultados. En los ensayos de enlazamiento al azul de kenacid y captación del rojo neutro, el reactivo tiene un periodo de acción de 72 horas, mientras que en la prueba de MTT es cuestión de pocas horas (1 a 4). Sin embargo también depende de la línea celular con la que se esté trabajando. Además que es ampliamente usada en este tipo de estudios (Rojo, Roopchand), es por ello que se tomó a la prueba de MTT para determinar citotoxicidad en este trabajo experimental.

Según Mosmann (1983, p. 55-56) la prueba de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), es un ensayo rápido y cuantitativo capaz de manejar cantidades moderadamente grandes de muestras. A través de este ensayo se puede medir la actividad de diversas deshidrogenasas mitocondriales. El anillo de tetrazolio rompe e ingresa en las mitocondrias activas, por lo que la reacción se produce sólo en células vivas y estas emiten un color morado intenso que puede ser medido por espectrofotometría.

Para la prueba de citotoxicidad se realizaron tres experimentos independientes con tres repeticiones para cada muestra. Basándose en los resultados obtenidos de la cuantificación de polifenoles, se seleccionaron para tratar las células el extracto de agua a pH 5, el de etanol a pH 3 y uno de los extractos con solventes orgánicos (usado como control) para tratar las células. A pesar que la prueba ANOVA determinó que no existe diferencia significativa entre los extractos de agua y etanol a distintos pH, se seleccionaron los extractos anteriormente mencionados porque presentaban los promedios más elevados (ver tabla 11). Se

tomó como control de muerte celular al compuesto emetina, ya que según Moller y Wink (2007, p. 1390) en su investigación manifestaron que este compuesto inhibe la biosíntesis de las proteínas eucarióticas. Además posee la capacidad de inducir apoptosis en células humanas que proliferan de manera descontrolada (células tumorales humanas) y en células sanas. Al evaluar los resultados de citotoxicidad, a simple vista se determinó que únicamente existía muerte celular en los pocillos que habían sido tratados con emetina ya que las células de esos pocillos no presentaron coloración.

Se observó coloración en los pocillos de las células tratadas con el vehículo (etanol 100%), lo que indicaba que el etanol usado como solvente para los extractos no es tóxico para las células. Además ninguno de los tres tipos de extractos ensayados afectó de manera negativa a las células. Posterior a la lectura realizada con el espectrofotómetro (absorbancia de 260 y 280nm), se obtuvieron los promedios de los tres experimentos realizados y se aplicó la prueba de ANOVA usando el software GraphPad obteniéndose los siguientes resultados (ver figura 8):

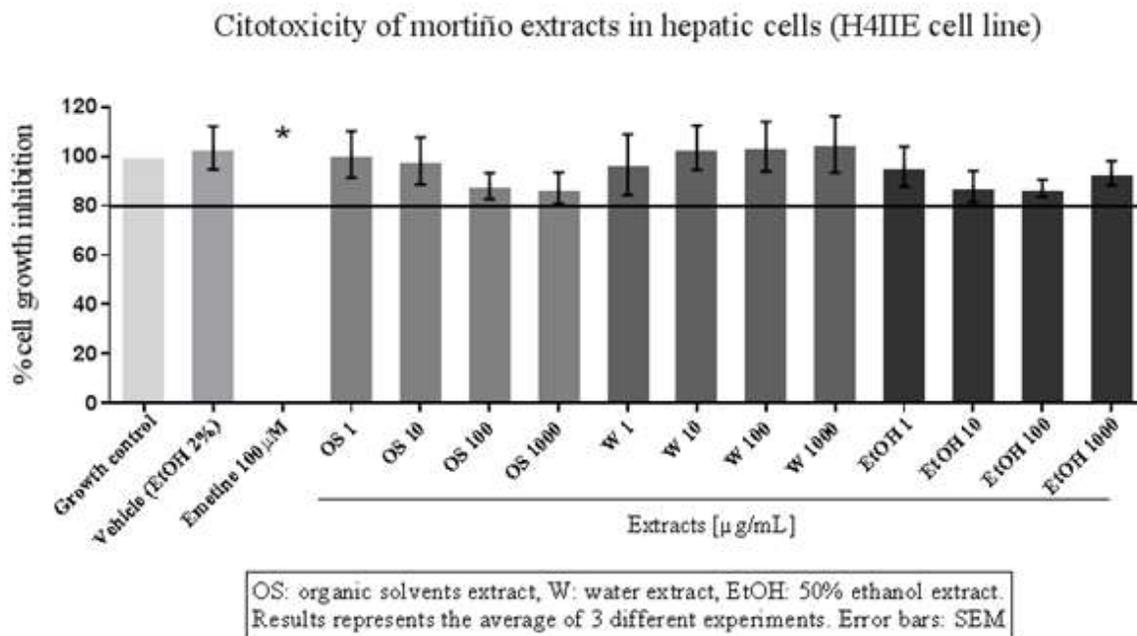


Figura 8. Citotoxicidad de extractos de mortiño en células hepáticas (línea celular H4IIE).

Se aplicó la prueba ANOVA con corrección de Dunnett (figura 8) para realizar una comparación entre las células tratadas con los extractos y el control de muerte (emetina). Se observó que ningún extracto causaba el mismo efecto o un efecto similar a la emetina. Además se realizó una comparación entre las células tratadas (extractos de mortiño), las células no tratadas (con el control negativo) y se observó que el crecimiento era similar. El ANOVA determinó que los extractos a las cuatro concentraciones ensayadas (1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) no resultaron tóxicos para las células. La dosis de 1000 $\mu\text{g/mL}$ no afectó de manera negativa a las células, por lo que se considera que la dosis tóxica debe ser a una concentración mayor.

5.5 Expresión de los genes *PEPCK* y *G6P*

5.5.1 Extracción de ARN

El ensayo para la expresión de los genes *PEPCK* y *G6P* se realizó tres veces y en cada ensayo las muestras se realizaron por duplicado.

Una vez extraído el ARN se evaluó la concentración y calidad de l mismo usando el espectrofotómetro. (tabla 12):

Tabla 12.

Cocentración y calidad de RNA extraído

| PRIMER ENSAYO | | |
|--------------------------------|---|---|
| Muestras | Concentración (ng/μL) | Relación de la absorbancia 260/280 |
| Control crecimiento (negativo) | 244,16 | 2,09 |
| Control inducido | 215,66 | 2,11 |
| Control positivo (Insulina) | 154,57 | 2,16 |
| Control vehículo (EtOH 100%) | 218,41 | 2,12 |
| Extracto Solventes | 216,15 | 2,10 |
| Extracto Agua | 211,39 | 2,11 |
| Extracto Etanol | 189,67 | 2,09 |
| SEGUNDO ENSAYO | | |
| Control crecimiento (negativo) | 191,62 | 2,06 |
| Control inducido | 253,50 | 2,10 |
| Control positivo (Insulina) | 222,05 | 2,11 |
| Control vehículo (EtOH 100%) | 195,58 | 2,11 |
| Extracto Solventes | 224,74 | 2,10 |
| Extracto Agua | 176,97 | 2,11 |
| Extracto Etanol | 143,78 | 2,06 |
| TERCER ENSAYO | | |
| Control crecimiento (negativo) | 297,56 | 2,10 |
| Control inducido | 273,38 | 2,09 |
| Control positivo (Insulina) | 318,40 | 2,11 |
| Control vehículo (EtOH 100%) | 258,74 | 2,10 |
| Extracto Solventes | 243,16 | 2,11 |
| Extracto Agua | 213,00 | 2,09 |
| Extracto Etanol | 177,37 | 2,08 |

Para realizar la extracción se usó el reactivo TRI Reagent® (Trizol), según Hernández y Guzmán (2013, p. 75-76), la manera más efectiva para realizar una extracción es usando Trizol ya que en su estudio realizaron una comparación de este método con el uso del detergente y cloroformo. En este estudio se determinó que el uso de Trizol resultaba en una mayor cantidad de ARN en menor tiempo. Teniendo en cuenta las lecturas espectrofotométricas, el uso del Trizol resultó en un ARN con valores de pureza entre 1,80 y 2,1. En el presente trabajo experimental el uso de Trizol dio como resultado altas concentraciones de ARN, que oscilaron entre 170 y 300 ng/ μ L. De acuerdo a la pureza, se obtuvieron valores de 2 y 2,1 demostrando que el ARN presentaba baja contaminación de proteínas. Por lo tanto el ARN era el adecuado para realizar los experimentos siguientes ya que el rendimiento, integridad y calidad eran óptimos.

5.5.2 RT-PCR

Para el análisis de la expresión de los genes seleccionados se realizaron tres experimentos con tres repeticiones para cada muestra. En los experimentos se utilizó a β -actina como control de expresión constitutiva. Según Thellin y sus colaboradores (1999, p. 292), la β -actina es considerada un gen control porque se expresa continuamente en todas las células y es indispensable para la supervivencia de las mismas, debido a que es esencial para la estructura del citoesqueleto. En las gráficas de RT-PCR (ver anexos 1-7) se pueden observar las curvas como resultado de la amplificación de β -actina (Sonda VIC, curvas color verde) y las curvas de *PEPCK* y *G6P* (Sonda FAM, curvas de color azul).

De las tres repeticiones realizadas, únicamente se usaron los resultados del tercer experimento, ya que los otros presentaban. A los promedios obtenidos a partir del tercer experimento se aplicó la prueba ANOVA con corrección de Dunnett obteniendo los siguientes resultados (figura 9 y 10):

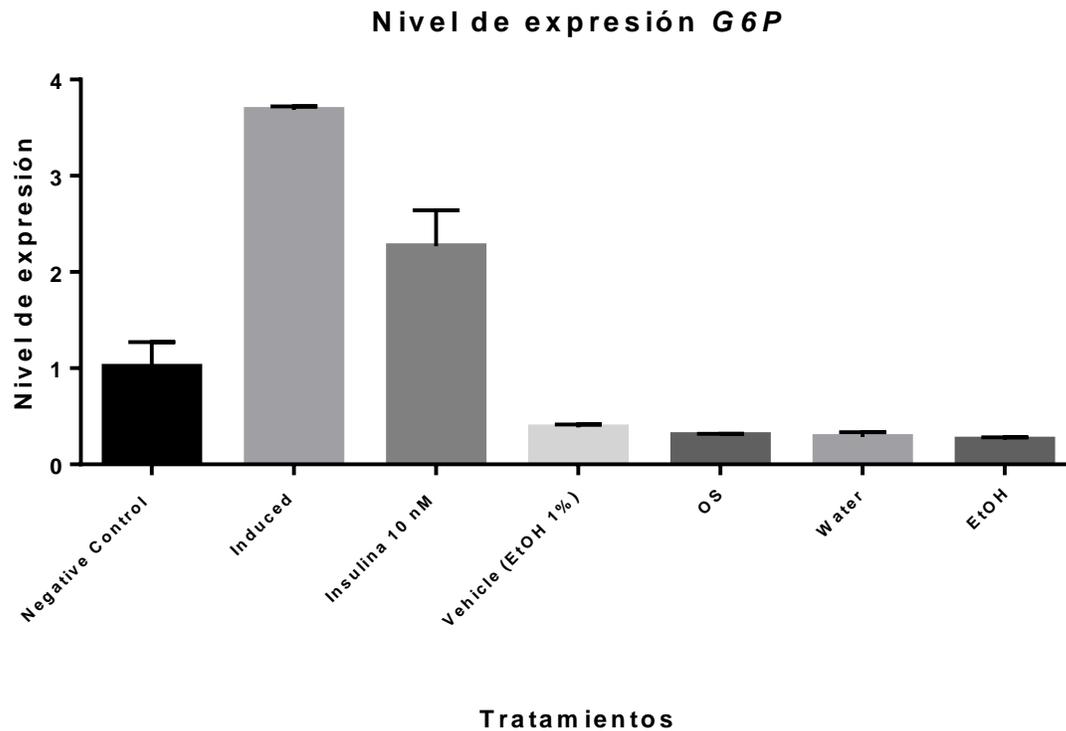


Figura 9. Efecto del tratamiento con los extractos del mortiño sobre la expresión del gen *G6P* frente al tratamiento con los extractos del mortiño.

Rojo y sus colaboradores (2012, p. 8) en su estudio realizado sobre la diabetes y la expresión del gen *G6P*, midieron la actividad que este presenta al ser tratado con extractos provenientes de *Aristotelia chilensis*, (maqui berry), que es una fruta con alto contenido polifenólico. Estos autores demostraron disminución en la expresión de este gen, lo que evidencia que los polifenoles afectan de manera negativa la expresión del mismo. Dicha teoría fue comprobada con los resultados obtenidos donde se evidenció por medio de la prueba estadística ANOVA que los extractos provenientes de *Vaccinium floribundum* disminuyen la expresión del gen *G6P*. Se comparó entre las células a las que se les indujo a realizar gluconeogénesis y las células que fueron tratadas con el extracto elaborado con solventes orgánicos, y el etanol.

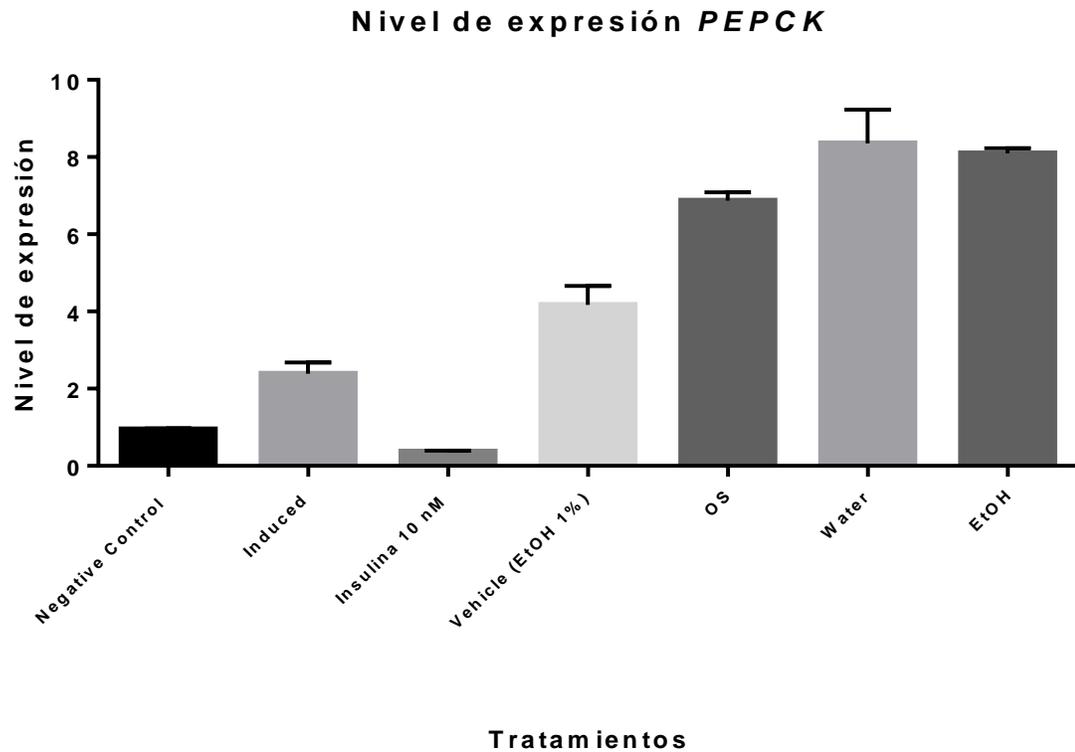


Figura 10. Expresión del gen *PEPCK* frente al tratamiento con los extractos del mortiño.

Govorko y sus colaboradores (2007, p. 1508) en un estudio realizado sobre el gen *PEPCK* y la disminución de su actividad frente a un extracto obtenido de *Artemisia dracuncululus*, (considerada una planta con alto contenido polifenólico), observaron que los polifenoles actuaban de manera negativa sobre la expresión de este gen. En este trabajo se obtuvieron resultados que contradicen a los obtenidos por Govorko. La prueba ANOVA demostró que no hubo una disminución en la expresión del gen *PEPCK* al comparar las células inducidas a realizar gluconeogénesis con las células tratadas con los tres tipos de extractos.

Basados en lo manifestado por Pérez y sus colaboradores (2012, p. 11) La enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasas y glucosa 6-fosfatasa codificadas por sus respectivos genes *PEPCK* y *G6P* son considerados punto clave en la ruta de la gluconeogénesis ya que se encuentra al inicio y final de dicha ruta. En los resultados obtenidos en el presente proyecto no existió disminución en la expresión del gen *PEPCK* por lo que la gluconeogénesis avanzó hasta el metabolito glucosa-6-fosfato donde al no existir acción de la enzima y por consiguiente no existió transcripción del gen *G6P* por que los resultados mostraron que los extractos si actuaron de manera negativa sobre la expresión dicho gen, la ruta de la gluconeogénesis se vio afectada.

5.6 Producción de glucosa

El ensayo de cuantificación de glucosa se realizó cuatro veces. En cada ensayo se realizaron triplicados de las muestras. En los tres primeros ensayos se aplicaron los extractos obtenidos con solventes orgánicos, agua y etanol de manera directa sin realizar ningún tratamiento previo. Al realizar la lectura con el espectrofotómetro (260 y 280nm), se determinó que las células hepáticas no respondieron al tratamiento aplicado para la inducción a la gluconeogénesis, ya que uno de los controles positivos (control inducido) presentaba un valor similar al control negativo, sin embargo, se observaron valores de glucosa elevados en las muestras tratadas con los tres diferentes extractos. Para realizar el cuarto ensayo se realizó un tratamiento previo a los extractos, el cual consistió en la eliminación de azúcares usando cartuchos C18, los cuales se encargaban de retener los azúcares en los filtros para limpiar los extractos. Se mantuvieron las demás condiciones del experimento. Tras la lectura de la placa del cuarto experimento se observó que las células al igual que en experimentos anteriores, no realizaron gluconeogénesis, pero se observó una disminución en los valores de glucosa en las muestras tratadas con los extractos, presentándose similares a los valores del control negativo. Para este tratamiento se usaron 200 mg de cada extracto, dando como resultado (tabla 13):

Tabla 13.

Extractos de mortiño con solventes orgánicos, agua y etanol libres de azúcares.

| EXTRACTOS | PESO FINAL | % DE PÉRDIDA |
|--------------------|-------------------|---------------------|
| Extracto Solventes | 8,8 mg | 95,6% |
| Extracto Agua | 3,1 mg | 98,45% |
| Extracto Etanol | 2,0 mg | 99% |

Según Roopchand y sus colaboradores (2013, p. 61), era necesario privar a las células de glucosa por un periodo de 16 horas para inducir la producción de glucosa y posterior a esto poder aplicar los tratamiento y determinar la eficacia de los extractos en las células, sin embargo en este proyecto de investigación el protocolo no pudo ser reproducible, por lo que las células no respondieron de manera positiva a la privación de glucosa por ese intervalo prolongado de tiempo y no se logró inducir a la gluconeogénesis, sin embargo se observó presencia de glucosa en las células sometidas al tratamiento con los extractos de mortiño. Los protocolos tomados de Prencipe y colaboradores para la elaboración del extracto con solventes orgánicos y de Roopchand para los extractos elaborados con etanol y agua presentaban azúcares en su composición después del proceso de extracción, es por ello que se necesitó de columnas para eliminar el azúcar de los extractos. Se repitió el experimento con los extractos libres de glucosa, sin embargo, no se logró inducir la gluconeogénesis en las células tratadas. Rojo y sus colaboradores (2012, p. 389), realizaron un ensayo similar y señalaron que se debe usar células con un pase menor a 10. En este trabajo experimental se usaron células hepáticas con pase 18, lo que pudo ser una causa probable de que no se lograra inducir la gluconeogénesis debido a los signos de senescencia celular que presentaban. Sin embargo, en otros estudios (Roopchand) no se menciona que las células deban tener un pase específico para realizar los experimentos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Los extractos elaborados con agua y etanol presentaron alta cantidad de polifenoles y son aptos para el consumo humano por ser estos solventes de grado alimenticio.

Los extractos de mortiño disminuyeron la expresión del gen *G6P*, por lo que influyen de manera negativa en la producción de glucosa por la vía de la gluconeogénesis.

6.2 Recomendaciones

En el proceso de liofilización usar de preferencia platos ya que los balones no permiten una liofilización uniforme, además de extender el proceso de liofilización de 4 a 5 días.

No colocar los extractos que se están elaborando con etanol en el baño de María, usar un sistema de reflujo.

Conservar el mortiño liofilizado protegido de la luz y a temperatura ambiente.

Para realizar el experimento de producción de glucosa se deben filtrar los extractos en columnas de cromatografía para eliminar los azúcares.

Realizar el experimento de expresión de genes con extractos sin azúcares para determinar si existe algún cambio en la acción de los extractos sobre la expresión de los genes *PEPCK* y *G6P*.

Para realizar los experimentos se deben usar células que se encuentren en un pase menor a 10, para lograr la inducción de la gluconeogénesis.

REFERENCIAS

- Ainsworth, E. y Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature*. 2(4), 875-877 Recuperado el 15 agosto de 2016 de doi: 10.1038/nprot.2007.102
- American Diabetes Association (2016). Diabetes mellitus tipo 2. Recuperado el 10 de septiembre de 2016 de <http://www.diabetes.org/es/informacion-basica-de-la-diabetes/diabetes-tipo-2/?loc=hottopics-es?referrer=http://www.diabetes.org/es/?referrer=https://www.google.com.ec/>
- Arencibida, D., Rosario, L. y Curveco, (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista detoxicología en línea*. 35(9), 40-52. Recuperado el 10 de septiembre de 2016 de www.setox.com.ar/img/item_full/19003.pdf
- Avello, M. y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*. 494(2), 161-172. Recuperado el 15 de septiembre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>
- Barberán, T. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud*. 10 (2), 41-53. Recuperado el 2 de agosto de 2016 de doi: 1136-4815/03/41-53
- Cersosimo, E., PharmD, C., Mandarino, L. y DeFronzo, R. (2000). *Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus*. (1^a ed.). Arizona, Estados Unidos: *South Dartmouth (MA)*.
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E. y Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento

ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja, Revista de Ciencias de la Vida* 16(2), 5-13. Recuperado el 20 de octubre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n%25x>

Díaz-Alonso, C., Garrote, H., Amor, A., Suárez, Y., Fernández, L. y Ruiz, V. Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 31(4), 300-303. Recuperado el 25 de septiembre de 2016 de: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/349>

Estevéz, A. (2016). *Efectos del consumo de un jugo de frutos rojos y uva rico en polifenoles procesado con ultrasonido en ratos Wistar con diabetes inducida*. (Tesis de maestría). Universidad Veracruz.

Fansworth, N., Akerele, O., Bingel, A., Soejarto, D. y Guo, Z. (1989). Las plantas medicinales en la terapéutica. *Bolt of Sanit Panam*. 107(4), 314-329. Recuperado el 4 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2536466/pdf/bullwho00089-0002.pdf>

Gomis, R., Favre, C., García-Rocha, M., Fernández-Novell, J., Ferrer, J. y Guinovart, J. (2003). Glucose 6-Phosphate Produced by Gluconeogenesis and by Glucokinase Is Equally Effective in Activating *Hepatic* Glycogen Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(11), 9740-9746. Recuperado el 13 de agosto de 2016 de doi: 10.1074/jbc.M212151200

Govorko, D., Logendra, S., Wang, Y., Esposito, D., Komarnytsky, S., Ribnicky, D., Poulev, A., Wang, Z., Cefalu, W. & Raskin, I. (2007). Polyphenolic compounds from *Artemisia dracunculus* L. inhibit PEPCK gene expression and gluconeogenesis in an H4IIE hepatoma cell line. *America Journal of*

Physiology-Endocrinology and Metabolism. 293(6), 1503-1510.
Recuperado el 15 de agosto de 2016 de doi:10.1152/ajpendo.00420.2007.

Hernández, A. y Guzmán, M. (2013). Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 15(1), 71-91. Recuperado 9 de septiembre de 2016 de: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=4776375>

Hernández, M. y Prieto, E. (1999). *Plantas que contienen polifenoles. Antioxdantes dentro del estilo de vida.* *Revista cubana de investigación biomédica.* 18(1), 12-14. Recuperado el 3 de agosto de 2016 de http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol18_1_99/ibi04199.htm

Kuskoski, M., Asuero, A., García-Parilla, C., Troncoso, A. y Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 24(4), 691-693. Recuperado el 12 de octubre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612004000400036>

Lazo de la Vega, M., y Fernández, C. (2013). Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role of Vitamins with Antioxidant Actions. *Intech.* 9(2013), 209-232. Recuperado el 20 de noviembre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.5772/51788>

Lieberman, M. y Marks, A. (2013). *Basic Medical Biochemistry.* (4^a ed.). Estados Unidos: Wolter Kluwer.

Mafla, G., Vivas, C., Villegas, P. y Alberto, R. (2012). *Plan de desarrollo turisico comunitario para la parroquia de Lloa, D.M. de Quito, Provincia de Pichincha.* (Tesis de Pregrado). Univerdiad Central de Ecuador.

Magnusson, I., Rothman, D., Katz, L., Shulman, R., y Shulman, G. (1992). Increased Rate of Gluconeogenesis in Type 11 Diabetes Mellitus. *The*

- American Society for Clinical Investigation, Inc.* 90(5), 1323-1327. Recuperado el 10 de Julio de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI115997>.
- Martín, D., Weise, A. y Niclas, J. (1976). The Solvent Dimethyl Sulfoxide. *A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker.* 6(4), 318-334. Recuperado el 2 de diciembre de 2016 de doi: 10.1002/anie.196703181
- Mata, M., Antoñanzas, F., Tafalla, M., y Sanz, P. (2002). El coste de la diabetes tipo 2 en España. El estudio CODE-2. *Gaceta Sanitaria.* 16(6), 511-520. Recuperado el 1 de agosto de 2016 de doi: doi:10.1016/S0213-9111(02)71973-0
- Mooler, M. y Wink, K. (2007). Characteristics of Apoptosis Induction by Alkaloid Emetine in Human Tumor Cell Lines. *Planta Medical.* 73(2), 1389-1396. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de doi: 10.1055/s-2007-990229
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods.* 65(1983), 55-63. Recuperado el 30 de Julio del 2016 de doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D., y Accili, D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo 1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *The journal of clinical investigation.* 108(9), 1359-1367. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de doi:10.1172/JCI200112876.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (2013). *What do you need to know about diabetes medicines.* (1^a ed.). Estados Unidos. p. 10-18). National Diabetes Information Clearinghouse.

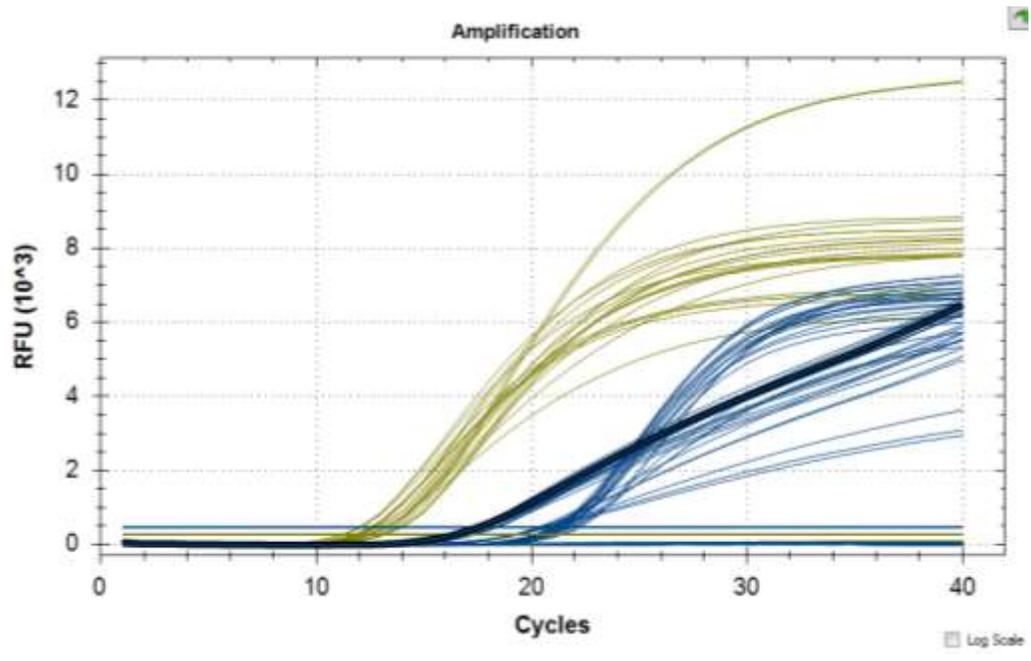
- Nikzad, S., Baradaran, M. y Nasri, P. (2014). Dose-response modeling using MTT assay: a short review. *Life Science Journal*. 11(9), 432-437. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de doi: 20140448698
- Pérez, G. (2003). Los flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Investigación en Biomedicina*. 22(1), 48-57. Recuperado el 2 de septiembre de 2016 de doi: ISSN 1561-3011
- Pérez, M., De Ita, D. y Díaz-Muñoz. (2012). Gluconeogénesis: Una nueva visión contemporánea de una vía metabólica antigua. *Revista de Educación Bioquímica*. 31(1), 10-20. Recuperado el 4 de octubre de 2016 de <http://biblat.unam.mx/es/revista/reb-revista-de-educacion-bioquimica/articulo/gluconogenesis-una-vision-contemporanea-de-una-via-metabolica-antigua>
- Prencipe, F., Bruni, R., Guerrini, A., Rossi, D., Benvenuti, S. y Pellati, F. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in Vaccinium berries and determination of their chemopreventive properties. *Journal Farmaceutical and Biomedical Analysis*. 89(2014), 257-267. Recuperado el 12 de noviembre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.016>
- Rojo, L., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M., Lila, M. y Raskin I. (2012). In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*. 131(2013), 3877-396. Recuperado el 16 de noviembre de 2016 de doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.066
- Roldán, S. (2012). *Caracterización molecular funcional y estudio del comportamiento post cosecha del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) de la comunidad de Quinticusig del cantón Sigchos en la provincia de Cotopaxi*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional.

- Roopchand, D., Krueger, C., Moskal, K., Fridlender, B., Lila, M. y Raskin, I. (2013). Food-compatible method for the efficient extraction and stabilization of cranberry pomace polyphenols. *Food Chemistry*. 141(2013), 3664-3669. Recuperado el 15 de Julio de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.050>
- Roopchand, D., Kuhn, P., Rojo, L., Lila, M. y Raskin, I. (2013). Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacological Research*. 68(1), 59-67. Recuperado el 3 de agosto de 2016 de doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.008
- Rovayo, R. (2006). Pie Diabético. En R. Robayo (Comps). Epidemiología de la diabetes mellitus. Quito: Sin editorial.
- Sandoval, C., Ferreira, J., y Speisky, H. (2014). Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 30(2014), 1-16. Recuperado el 7 de octubre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.017>
- Schreckinger, M., Lotton, J., Lila, M. y Gonzalez de Mejia, E. (2010). Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD*. 13(2), 233–246. Recuperado el 12 de agosto de 2016 de doi: 10.1089=jmf.2009.0233.
- Schreckinger, M., Wang, J., Yousef, G., Lila, M. y Gonzalez de Mejia, E. (2010). Antioxidant Capacity and in Vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*. 58(16), 8966–8976. Recuperado el 3 de septiembre de 2016 de doi: 10.1021/jf100975m

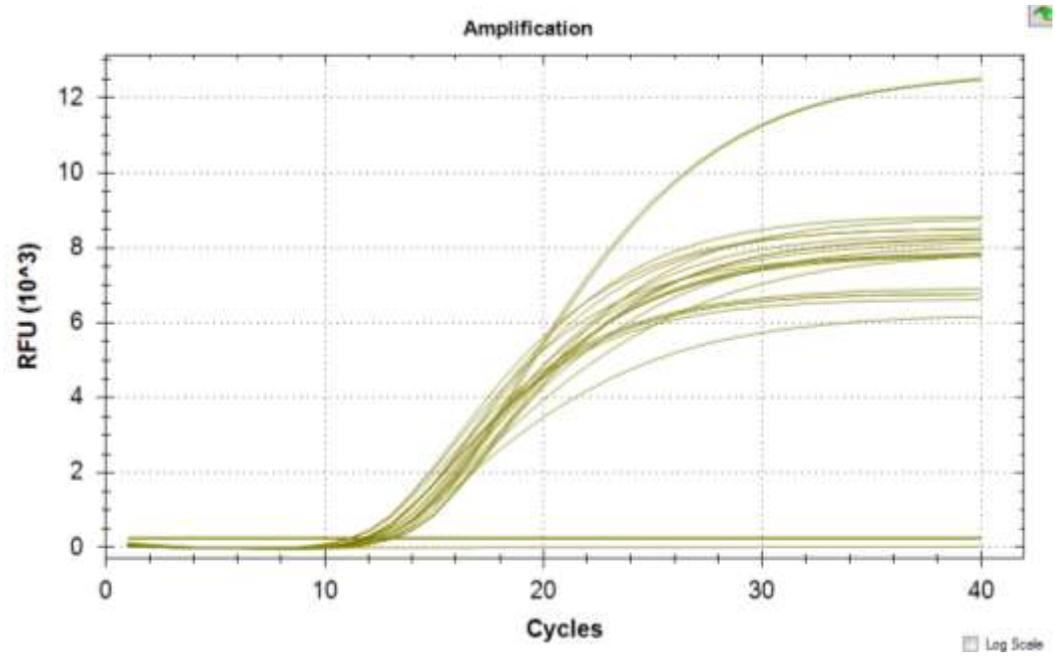
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman, B., Coumans, G., Henne, G., Igout, A. y Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* 75(1999), 291-295. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de doi: S0168-1656(99)00163-7
- Trujillo, D. (2008). *Cultivo in vitro del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., y Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical Composition and Phenolic Compound Profile of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of agriculture and food chemistry*. 57(18), 8274–8281. Recuperado el 20 de octubre de 2016 de doi: 10.1021/jf9013586.
- Yoon, J., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C., Granner, D., Newgard, C. y Spiegelma, B. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*. 413(6852), 131-138. Recuperado el 20 de noviembre de 2016 de doi: 10.1038/35093050

ANEXOS

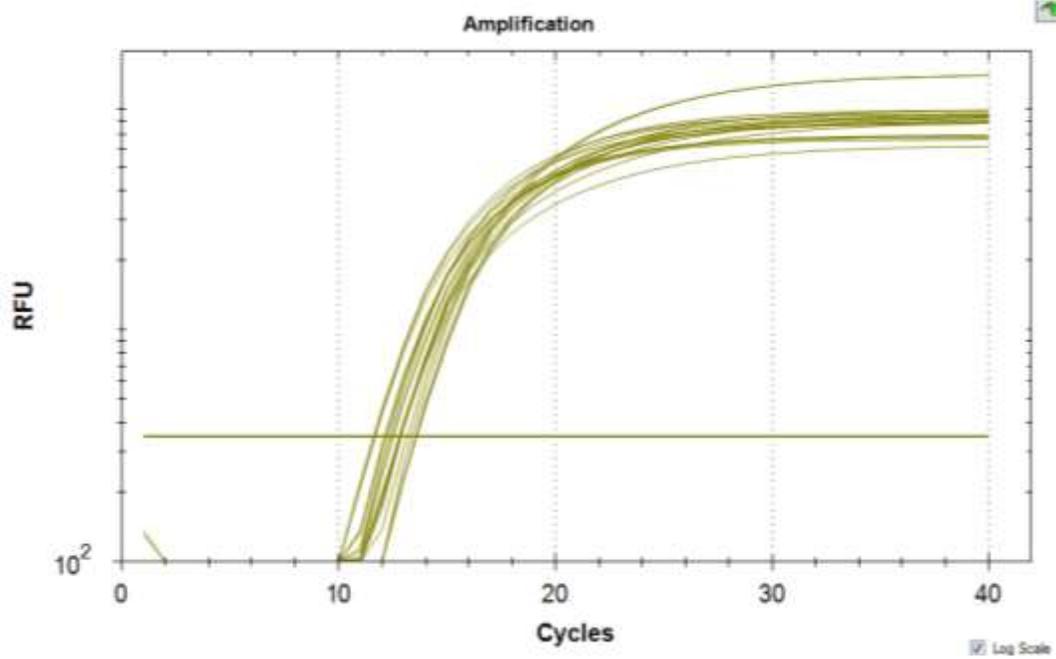
Anexo 1. Gráfica RT-PCR Expresión de genes



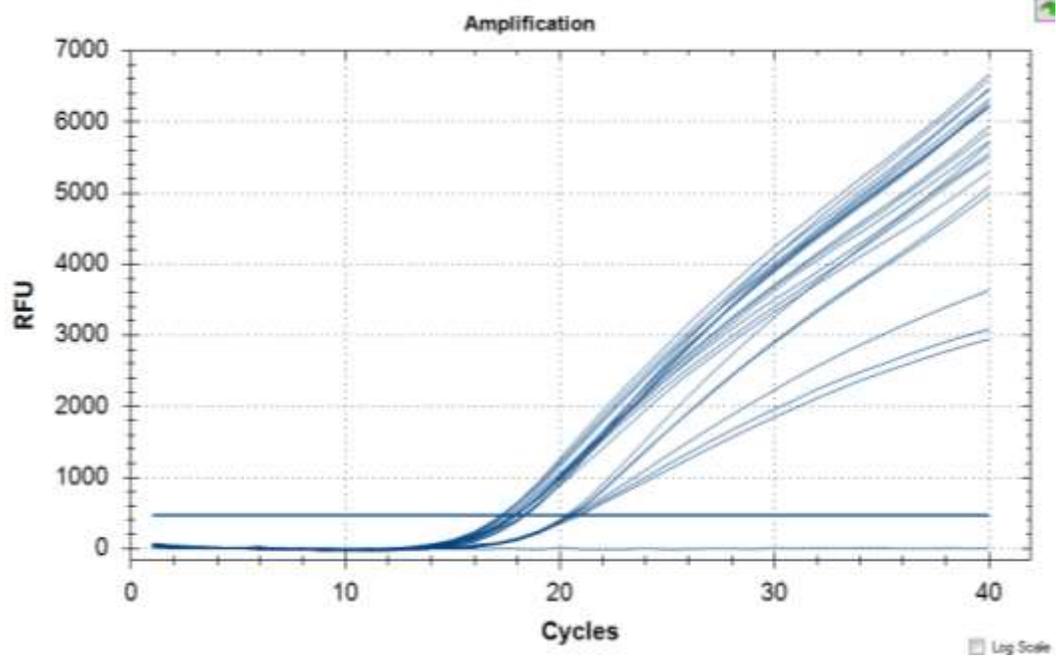
Anexo 2. Gráfica RT-PCR Beta Actina



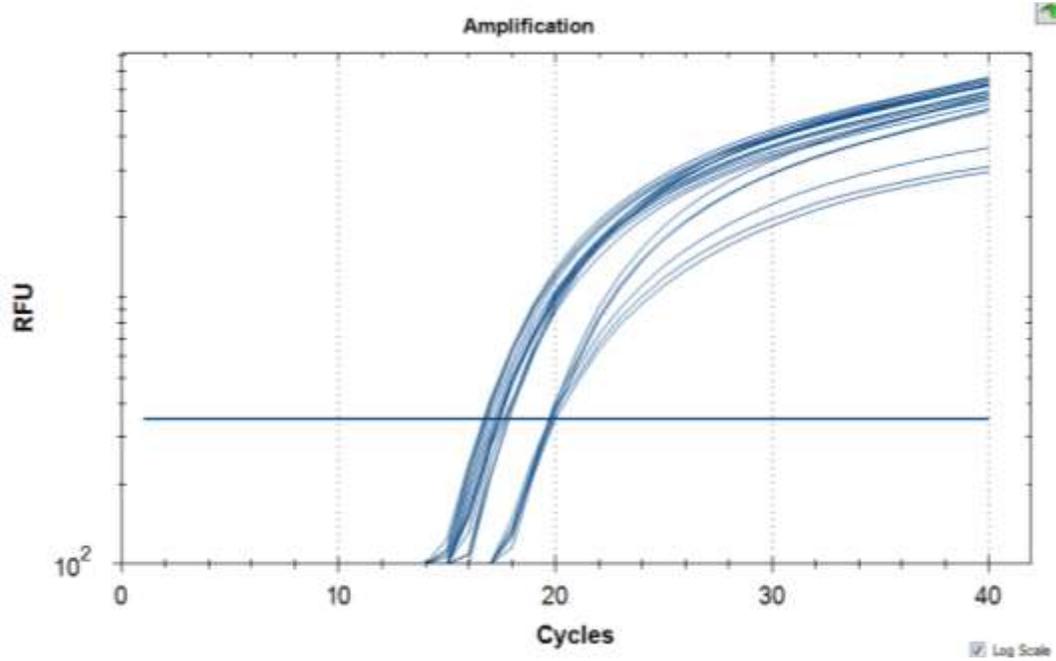
Anexo 3. Gráfica RT-PCR Beta Actina (Escala logarítmica)



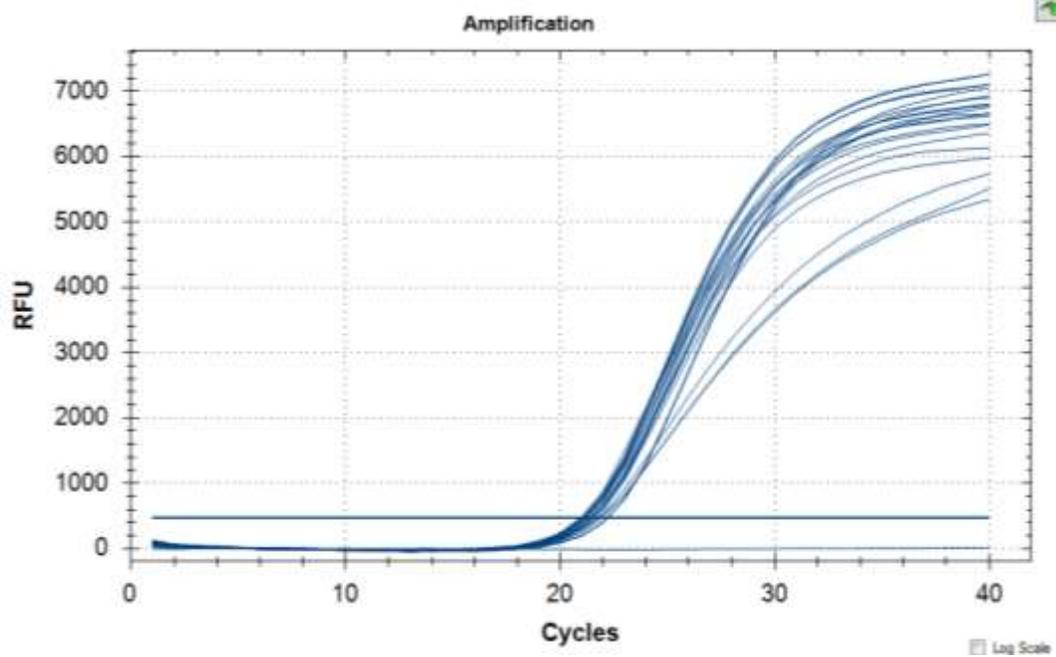
Anexo 4. Gráfica RT-PCR PEPCK



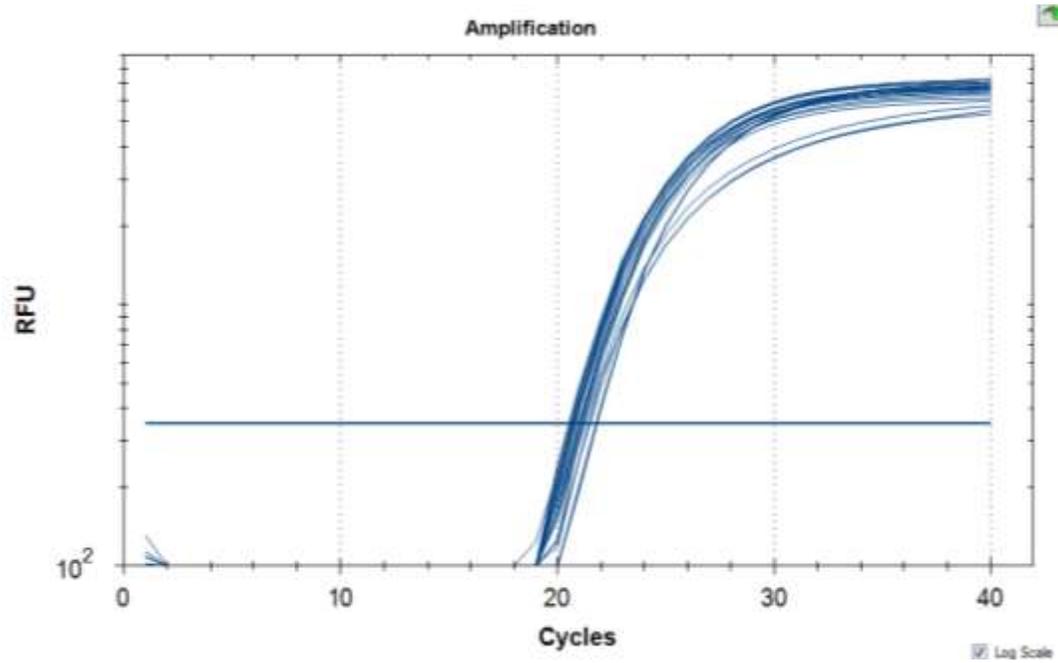
Anexo 5. Gráfica RT-PCR PEPCK (Escala logarítmica)



Anexo 6. Gráfica RT-PCR G6P



Anexo 7. Gráfica RT-PCR G6P (Escala logarítmica)



Anexo 8. Prueba ANOVA con corrección de Turkey analizando los datos de cuantificación de polifenoles

| | |
|----------------------------------|------|
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 36 |
| Alpha | 0,05 |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant |
|-----------------------------------|------------|-----------------|-------------|
| agua pH2 vs. OS | -164,1 | -443,0 to 114,8 | No |
| agua pH3 vs. OS | -211,8 | -490,7 to 67,06 | No |
| agua pH4 vs. OS | -171,5 | -450,4 to 107,4 | No |
| agua pH5 vs. OS | -83,22 | -362,1 to 195,7 | No |
| EtOH pH2 vs. OS | 81,56 | -197,3 to 360,5 | No |
| EtOH pH3 vs. OS | 141,2 | -137,7 to 420,1 | No |
| EtOH pH4 vs. OS | 39,57 | -239,3 to 318,5 | No |
| EtOH pH5 vs. OS | 12,08 | -266,8 to 291,0 | No |
| agua pH3 vs. agua pH2 | -47,76 | -326,7 to 231,1 | No |
| agua pH4 vs. agua pH2 | -7,38 | -286,3 to 271,5 | No |
| agua pH5 vs. agua pH2 | 80,86 | -198,0 to 359,8 | No |
| EtOH pH2 vs. agua pH2 | 245,6 | -33,26 to 524,6 | No |
| EtOH pH3 vs. agua pH2 | 305,2 | 26,34 to 584,2 | Yes |
| EtOH pH4 vs. agua pH2 | 203,7 | -75,25 to 482,6 | No |
| EtOH pH5 vs. agua pH2 | 176,2 | -102,7 to 455,1 | No |
| agua pH4 vs. agua pH3 | 40,38 | -238,5 to 319,3 | No |
| agua pH5 vs. agua pH3 | 128,6 | -150,3 to 407,5 | No |
| EtOH pH2 vs. agua pH3 | 293,4 | 14,50 to 572,3 | Yes |
| EtOH pH3 vs. agua pH3 | 353 | 74,10 to 631,9 | Yes |
| EtOH pH4 vs. agua pH3 | 251,4 | -27,50 to 530,3 | No |
| EtOH pH5 vs. agua pH3 | 223,9 | -54,98 to 502,8 | No |
| agua pH5 vs. agua pH4 | 88,24 | -190,7 to 367,1 | No |
| EtOH pH2 vs. agua pH4 | 253 | -25,88 to 531,9 | No |
| EtOH pH3 vs. agua pH4 | 312,6 | 33,72 to 591,5 | Yes |
| EtOH pH4 vs. agua pH4 | 211 | -67,87 to 489,9 | No |
| EtOH pH5 vs. agua pH4 | 183,5 | -95,36 to 462,5 | No |
| EtOH pH2 vs. agua pH5 | 164,8 | -114,1 to 443,7 | No |
| EtOH pH3 vs. agua pH5 | 224,4 | -54,52 to 503,3 | No |
| EtOH pH4 vs. agua pH5 | 122,8 | -156,1 to 401,7 | No |
| EtOH pH5 vs. agua pH5 | 95,3 | -183,6 to 374,2 | No |
| EtOH pH3 vs. EtOH pH2 | 59,6 | -219,3 to 338,5 | No |
| EtOH pH4 vs. EtOH pH2 | -41,99 | -320,9 to 236,9 | No |
| EtOH pH5 vs. EtOH pH2 | -69,48 | -348,4 to 209,4 | No |
| EtOH pH4 vs. EtOH pH3 | -101,6 | -380,5 to 177,3 | No |
| EtOH pH5 vs. EtOH pH3 | -129,1 | -408,0 to 149,8 | No |
| EtOH pH5 vs. EtOH pH4 | -27,49 | -306,4 to 251,4 | No |

Anexo 9. Prueba ANOVA con corrección de Dunnett analizando los datos de citotoxicidad

| | |
|---|------|
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 14 |
| Alpha | 0,05 |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant |
|--|-------------------|------------------------|--------------------|
| Vehicle (EtOH 2%) vs. Growth control | 3,433 | -29,95 to 36,81 | No |
| Emetine 100 μ M vs. Growth control | -99,13 | -132,5 to -65,75 | Yes |
| OS 1 vs. Growth control | 0,8 | -32,58 to 34,18 | No |
| OS 10 vs. Growth control | -1,9 | -35,28 to 31,48 | No |
| OS 100 vs. Growth control | -12,07 | -45,45 to 21,31 | No |
| OS 1000 vs. Growth control | -12,93 | -46,31 to 20,45 | No |
| W 1 vs. Growth control | -3,333 | -36,71 to 30,05 | No |
| W 10 vs. Growth control | 3,467 | -29,91 to 36,85 | No |
| W 100 vs. Growth control | 4 | -29,38 to 37,38 | No |
| W 1000 vs. Growth control | 4,8 | -28,58 to 38,18 | No |
| EtOH 1 vs. Growth control | -4,1 | -37,48 to 29,28 | No |
| EtOH 10 vs. Growth control | -12,23 | -45,61 to 21,15 | No |
| EtOH 100 vs. Growth control | -12,93 | -46,31 to 20,45 | No |
| EtOH 1000 vs. Growth control | -6,8 | -40,18 to 26,58 | No |

Anexo 10. Prueba ANOVA con corrección de Dunnett analizando los datos de la expresión del gen *PEPCK*

| | |
|---|------|
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 6 |
| Alpha | 0,05 |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant |
|--|-------------------|------------------------|--------------------|
| Negative Control vs. Induced | -1,445 | -3,651 to 0,7609 | No |
| Insulina 10 nM vs. Induced | -2,017 | -4,030 to -0,002939 | Yes |
| Vehicle (EtOH 1%) vs. Induced | 1,777 | -0,2371 to 3,790 | No |
| OS vs. Induced | 4,483 | 2,470 to 6,497 | Yes |
| Water vs. Induced | 5,963 | 3,950 to 7,977 | Yes |
| EtOH vs. Induced | 5,707 | 3,693 to 7,720 | Yes |

Anexo 11. Prueba ANOVA con corrección de Dunnett analizando los datos de la expresión del gen *G6P*

| | |
|---|------|
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 6 |
| Alpha | 0,05 |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant |
|--|-------------------|------------------------|--------------------|
| Negative Control vs. Induced | -2,668 | -3,149 to -2,187 | Yes |
| Insulina 10 nM vs. Induced | -1,415 | -1,896 to -0,9340 | Yes |
| Vehicle (EtOH 1%) vs. Induced | -3,298 | -3,779 to -2,817 | Yes |
| OS vs. Induced | -3,382 | -3,863 to -2,901 | Yes |
| Water vs. Induced | -3,398 | -3,879 to -2,917 | Yes |
| EtOH vs. Induced | -3,425 | -3,906 to -2,944 | Yes |

