

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Efecto del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum  
tuberosum* “puca simi” sobre enzimas de detoxificación  
de fase II en un modelo de hiperbilirrubinemia**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

**AUTOR**

Emilio Germán Ramírez Roca

**ASESOR**

Silvia Suarez Cunza

Lima – Perú

2015

A Dios, por todo lo que me ha dado

A mis hijos, por su amor y comprensión

A mi padre y a la memoria de mi madre

A mis hermanos, por su aliento permanente.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Humana.

A la Dra. Silvia Suarez Cunza, por su excelente asesoría y dedicación

A todos mis profesores del Centro de Investigación en Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM, por su apoyo y colaboración.

Al jurado informante de la tesis

Mg. Luz Dora Velásquez Ramos

Mg. Acela Inés Arnao Salas

Dra. Silvia Suárez Cunza

Por sus valiosas contribuciones y consejos

Al jurado Examinador y Calificador:

Dra. María Mercedes Soberón Lozano

Mg. Luz Dora Velásquez Ramos

Mg. Acela Inés Arnao Salas

Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Dra. Silvia Suárez Cunza

## INDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABLA Y GRÁFICOS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Situación problemática.....	1
1.2. Formulación del problema.....	2
1.3. Justificación teórica.....	2
1.4. Justificación practica.....	3
1.5. Objetivos:.....	3
1.5.1. Objetivo general.....	3
1.5.2. Objetivos específicos.....	3
<b>CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1. Antecedentes de la investigación.....	4
2.2. Bases teóricas.....	5
2.2.1. Papa nativa.....	6
2.2.2. Descripción morfológica de <i>Solanum tuberosum ssp</i> .....	7
2.2.3. Clasificación taxonómica.....	8
2.3. Metabolismo hepático.....	9
2.3.1. Glucuronidación.....	12

2.3.2. Conjugación con glutatión.....	12
2.4. Bilirrubina.....	13
2.4.1. Metabolismo de la bilirrubina.....	14
2.5. Glucuroniltransferasa.....	16
2.6. Mecanismos de defensa antioxidante.....	17
2.6.1. Superóxido dismutasa.....	18
2.6.2. Catalasa.....	18
2.6.3. Glutatión S-transferasa.....	19
2.7. Biomarcadores no enzimáticos.....	20
2.7.1. Glutatión (GSH).....	20
2.7.2. Peroxidación lipídica.....	21
2.7.3. <i>Modelos experimentales de Hiperbilirrubinemia</i> .....	25
<b>CAPITULO 3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	26
3.2. Población de estudio .....	26
3.3. Muestra.....	26
3.4. Unidades experimentales.....	26
3.5. Técnicas de recolección de datos.....	26
3.5.1. Recolección de la muestra.....	26
3.5.2. Secado y molienda.....	26
3.5.3. Obtención del extracto acuoso.....	27
3.5.4. Marcha fitoquímica.....	27
3.5.5. Cromatografía en capa fina del extracto acuoso.....	28
3.5.6. Cromatografía en capa fina a escala preparativa.....	29
3.5.7. Elucidación estructural mediante espectrofotometría UV.....	29
3.6. Ensayos Bioquímicos.....	29

3.6.1. Determinación de Hematocrito, método de Wintrobe .....	31
3.6.2. Determinación de bilirrubina total: Protocolo Laboratorio Bialex	32
3.6.3. Determinación de la concentración total del GSH .....	32
3.6.4. Determinación de la Actividad de la glutatión S-transferasa.....	33
3.6.5. Determinación de la Actividad de la enzima UGT.....	33
3.6.6. Determinación de la peroxidación lipídica (MDA).....	34
3.6.7. Determinación de proteínas totales según Lowry.....	34
3.7. Análisis estadístico.....	35
<b>CAPITULO 4. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>CAPITULO 5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>CAPITULO 6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>CAPITULO 7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>MDA</b>	= Malondialdehido
<b>GST</b>	= Glutation S-transferasa
<b>UGT</b>	= Uridindifosfato glucuroniltransferasa
<b>SULF</b>	= Sulfoniltransferasa
<b>MT</b>	= Metiltransferasa
<b>GSH</b>	= Glutation reducido
<b>GSSG</b>	= Glutation oxidado
<b>CIP</b>	= Centro Internacional de la papa
<b>CYP</b>	= Citocromo P450
<b>EROs</b>	= Especies reactivas del oxigeno
<b>CAT</b>	= Catalasa
<b>SOD</b>	= Superóxido dismutasa
<b>4-HNE</b>	= 4-hidroxinonenal
<b>GPx</b>	= Glutation peroxidasa
<b>GRed</b>	= Glutation reductasa
<b>AGPI</b>	= Ácidos grasos poli-insaturados
<b>UV</b>	= Ultravioleta
<b>INS</b>	= Instituto nacional de salud
<b>DMSO</b>	= Dimetilsulfoxido
<b>ATC</b>	= Acido tricloroacético
<b>DTNB</b>	= Acido ditionitrobenzoico
<b>UDPGA</b>	= Acido uridindifosfatoglucurónico
<b>TBARS</b>	= Sustancias que reaccionan con el acido tiobarbitúrico

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Variedades de papa nativa.....	7
<b>Figura 2.</b> Cultivo de especies de papa nativa.....	8
<b>Figura 3.</b> Papel de las enzimas metabolizadoras de fármaco en la bioactivación y biodesactivación de fármacos en el metabolismo de fase I y fase II.....	11
<b>Figura 4.</b> Metabolismo de la bilirrubina.....	16
<b>Figura 5.</b> Estructura tridimensional de la glucuroniltransferasa.....	17
<b>Figura 6.</b> Reacciones químicas correspondientes a las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas.....	18
<b>Figura 7.</b> Estructura tridimensional de la glutatión S-transferasa.....	20
<b>Figura 8.</b> Estructura química del glutatión.....	21
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de la peroxidación lipídica.....	24
<b>Figura 10:</b> Actividad transferásica de la GST.....	33
<b>Figura 11.</b> Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F1 del extracto acuoso de la papa nativa <i>Solanum tuberosum</i> “puca simi”.....	37
<b>Figura 12.</b> Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F2 del extracto acuoso de la papa nativa <i>Solanum tuberosum</i> “puca simi”.....	38
<b>Figura 13.</b> Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F4 del extracto acuoso de la papa nativa <i>Solanum tuberosum</i> “puca simi”.....	39
<b>Figura 14.</b> Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F5 del extracto acuoso de la papa nativa <i>Solanum tuberosum</i> “puca simi”.....	40

## LISTA DE TABLA Y GRÁFICOS

<b>Tabla 1.</b> Marcha fitoquímica del extracto acuoso de la papa nativa <i>Solanum tuberosum</i> “puca simi” .....	36
<b>Gráfico 1.</b> Hiperbilirrubinemia por inducción de anemia hemolítica expresada en Hematocrito.....	41
<b>Gráfico 2.</b> Hiperbilirrubinemia por inducción de anemia hemolítica expresada en niveles plasmáticos de bilirrubina total.....	42
<b>Gráfico 3.</b> Efecto del extracto de papa en la lipoperoxidación hepática en estado de hiperbilirrubinemia.....	43
<b>Gráfico 4.</b> Efecto del extracto de papa sobre la actividad específica de las enzimas de detoxificación de fase II en hiperbilirrubinemia inducida Glutación S-transferasa (GST) y UDP-glucurónido transferasa.....	44
<b>Gráfico 5.</b> Efecto del Extracto de papa sobre la actividad total de las enzimas de detoxificación de Fase II en hiperbilirrubinemia inducida. Glutación S-transferasa (GST) y UDP-glucurónido transferasa.....	45
<b>Gráfico 6.</b> Efecto del extracto acuoso de la papa nativa <i>Solanum tuberosum</i> “puca simi” sobre la concentración total del GSH en estado de hiperbilirrubinemia.....	46

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” sobre enzimas de detoxificación de fase II en un modelo de hiperbilirrubinemia. Se empleó 28 ratas de cepa *Rattus norvegicus* de 200 a 250 g de peso en cuatro grupos de siete cada uno, a los que se le administró el siguiente tratamiento por vía orogastrica: Grupo I Control, suero fisiológico; Grupo II, Fenilhidrazina 60 mg/kg de peso; Grupo III, extracto de papa 665 mg/kg de peso; Grupo IV, Extracto de papa y Fenilhidrazina. Se determinó los niveles de proteínas totales, bilirrubina total, malondialdehído (MDA), hematocrito y la actividad de glutatión S-transferasa (GST), UDP-glucuroniltransferasa. En el estudio fitoquímico se encontró polifenoles, flavonoides y saponinas, se halló una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de los niveles de hematocrito, bilirrubina total en los grupos III y IV respecto a los grupos I y II. También se encontró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la lipoperoxidación en el grupo III (1,53 ng/g tej) y IV (1,56 ng/g tej) respecto al grupo II (2,03 ng/g tej) y grupo I (1,63 ng/g tej), asimismo la actividad específica de la UDP-glucuroniltransferasa aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) en el grupo IV con respecto a los demás grupos, pero la actividad específica y total de la glutatión S-transferasa no exhibe ninguna diferencia significativa en los cuatro grupos, incrementa de manera significativa el efecto del GSH total en los grupos III y IV respecto a los grupos I y II ( $p < 0,05$ ). Se concluye que el extracto de papa nativa “puca simi” contiene metabolitos secundarios que protegen la lipoperoxidación e incrementa de manera significativa la actividad de la UDP-glucuroniltransferasa, enzima de detoxificación de fase II.

**Palabras clave:** Papa nativa “puca simi”, lipoperoxidación, UDP-glucuroniltransferasa, glutatión S-transferasa, GSH total, metabolismo de fase II.

## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of aqueous extract of the native potato *Solanum tuberosum* "simi puca" on detoxification enzymes of phase II a model of hyperbilirubinemia. 28 rats from the strain *Rattus norvegicus*; weight of 200 to 250 g that were divided into four groups of seven each were used, which were administered from orogastric via the following treatment: Control group I, saline; Group II, phenylhydrazine 60 mg/kg; Group III, potato extract 665 mg/kg; Group IV, potato extract and phenylhydrazine. Levels of total protein, total bilirubin malondialdehyde (MDA), hematocrit and activity of glutathione S-transferase (GST), UDP-glucuronosyltransferase were determined. In the phytochemical study it was found polyphenols, flavonoids and saponins, a significant ( $p < 0.05$ ) levels of hematocrit, total bilirubin in the groups III and IV compared to groups I and II. A significant decrease ( $p < 0.05$ ) lipid peroxidation was also found in the group III (1.53 ng/g tissue) and IV (1.56 ng/g tissue) compared to group II (2.03 ng/tissue g) and group I (1.63 ng/g tissue), also the specific activity of the UDP-glucuronosyltransferase significantly increased ( $p < 0.01$ ) in group IV with respect to the other groups, but the specific activity and total glutathione S-transferase exhibits no significant difference in the four groups, significantly increases the effect of total GSH in the groups III and IV compared to groups I and II ( $p < 0.05$ ). It is concluded that native potato extract "puca simi" contains secondary metabolites that protect the lipid peroxidation and significantly increases the activity of the UDP-glucuronosyltransferase enzyme phase II detoxification.

**Keywords:** Native Papa "puca simi", lipid peroxidation, UDP-glucuronyl transferase, glutathione S-transferase, Total GSH, phase II metabolism.

## **CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Situación problemática**

Para los países del área andina, especialmente el Perú, las papas nativas constituyen productos con un potencial nutricional, nutracéutico y comercial interesante; que se cultiva sobre los 3000 msnm por las comunidades de la región andina de nuestro país que viven en pobreza o en pobreza extrema (Coultrate, 1984; Universidad Católica de Chile, 2000). Estos productos contienen diversos metabolitos secundarios con diversas propiedades, como los polifenoles (Suárez y col., 2012).

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos de las plantas, los que están presentes también en algunas especies de papa nativa. Estos compuestos son esenciales para su fisiología, ya que contribuyen a su morfología, crecimiento, y reproducción. Además, los polifenoles están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes externos como la radiación ultravioleta, la agresión de patógenos y predadores (Bravo L, 1998).

Más allá de las propiedades antioxidantes, a estos compuestos se les atribuye otra serie de actividades biológicas beneficiosas para la salud como, acciones cardioprotectoras, hepatoprotectoras, anticancerígenas y neuroprotectoras (Stevenson & Hurst, 2007), ya que pueden interactuar con funciones celulares a diferentes niveles tales como inducción de enzimas o cascadas de señalización intracelular por interacción con receptores de membrana y/o nucleares. Además, toda esta serie de acciones las podrían realizar a concentraciones mucho más pequeñas que las requeridas para desempeñar su actividad antioxidante (Virgili & Marino, 2008).

El hígado es uno de los órganos más susceptibles de daño por el contacto frecuente que tiene con fármacos, drogas, alcohol, toxinas etc., esto supone

una elevada incidencia de enfermedades hepáticas y el Perú ocupa el quinto lugar como causa de mortalidad y segundo como morbilidad; dentro de estas se encuentran básicamente la cirrosis, hepatitis, hepatopatía alcohólica, esteatosis hepática, entre otras (Bustíos, 2007).

En la actualidad existen investigaciones experimentales de la actividad hepatoprotectora de varios recursos terapéuticos y que pueden ser considerados como terapias alternativas para el tratamiento de las enfermedades hepáticas y sus complicaciones (Vargas, 2012).

La investigación del extracto acuoso de la papa nativa como un hepatoprotector formaría parte de las terapias alternativas de estos padecimientos es un área poco explorada por eso consideramos que es importante relacionar la actividad antioxidante del extracto con sus propiedades hepatoprotectoras.

## **1.2. Formulación del Problema**

¿El extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” modificará la actividad de las enzimas de detoxificación de fase II en un modelo de hiperbilirrubinemia?

## **1.3. Justificación Teórica**

El Perú es el centro con mayor diversidad de papas nativas, más de 2800 cultivares de las 3900 existentes en el mundo. Las enfermedades hepáticas en el país ocupan el quinto lugar como causa de mortalidad y segundo como morbilidad donde la hiperbilirrubinemia es una patología frecuente que se presenta en diversos periodos de la vida, por lo que se requiere investigar alternativas provenientes de fuentes vegetales que coadyuven a resolverla así como conocer los mecanismos que sustenten el papel de estas en el metabolismo de la bilirrubina. El ensayo de este estado clínico con papas nativas no se ha realizado previamente, por lo que el aporte científico es importante desde varias perspectivas.

## **1.4. Justificación Práctica**

El estudio de investigación es original y tiene como objetivo demostrar la actividad del extracto acuoso de una variedad de papa nativa en el metabolismo de la bilirrubina en un modelo experimental de hiperbilirrubinemia, así como dilucidar algunos mecanismos bioquímicos en

el metabolismo de esta sustancia endógena. Para ello se desarrolló un diseño experimental con ratas albinas machos, que en el laboratorio se inició con la estandarización de un modelo experimental de hiperbilirrubinemia. La muestra de papa nativa fue obtenida de los agricultores del departamento de Apurímac en coordinación con el Centro Internacional de la Papa. Se espera que el extracto obtenido de la papa nativa ejerza un rol favorable en el metabolismo de la bilirrubina.

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

- Evaluar el efecto del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” sobre enzimas de detoxificación de fase II en un modelo de hiperbilirrubinemia.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Determinar el efecto del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” sobre la actividad de la UDP-glucuronil transferasa hepática en estado de hiperbilirrubinemia.
- Determinar el efecto del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” sobre la actividad de la glutatión S-transferasa en situación de hiperbilirrubinemia.
- Determinar el efecto del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” sobre la concentración de GSH total en estado de hiperbilirrubinemia.
- Evaluar la actividad del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” sobre la peroxidación lipídica en un modelo de hiperbilirrubinemia.
- Determinar los niveles de proteínas totales, bilirrubina total sérica y hematocrito.

## **CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Antecedentes de la investigación**

Resultados obtenidos por el grupo llamado “Biología Comparativa en Solanáceas” (Andrew y col., 2012), muestran que los niveles de los polifenoles saludables son mayores en la cáscara respecto de la pulpa de las variedades de papa estudiadas. Esta relación es dependiente de la variedad. Asimismo, los niveles de estos compuestos son, en general, mayores en las variedades de pulpa y cáscara coloreada respecto de las variedades blancas o amarillentas. Resultados preliminares también indican una acción antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas tomando como referente a la bacteria *Escherichia coli*, debido a que son de gran interés en el sector alimentario, y por estar implicadas en la mayoría de los casos de toxiinfecciones alimentarias.

Los resultados en la investigación “Potencial antioxidante de 62 variedades de papas nativas del sur andino del Perú” (Suárez y col., 2012); muestran que los valores de TEAC-ABTS de las 62 muestras estuvieron entre 3,8 y 47,6 mmol % de materia soluble y los de TEAC-DPPH se hallaron entre 2,8 y 32,1 umol/g de materia soluble. Las 15 mejores variedades en contenido de polifenoles tuvieron de 1,03 a 2,24 g EAG/L; en este mismo grupo, las antocianinas tuvieron de 30,9 a 204,3 mg/L. El coeficiente de correlación (CC) de TEAC-ABTS y TEAC-DPPH fue 0,91; el CC de polifenoles-antocianinas fue 0,926 y concluyen que: las papas nativas constituyen fuentes potenciales de antioxidantes mediados por la composición de metabolitos antioxidantes, como antocianinas y polifenoles, en general.

Investigaciones en el Instituto de la Papa y Cultivos Andinos (Ipaca) de la Universidad Nacional de Trujillo (López M, 2008), concluyeron que las papas

nativas son muy ricas en polifenoles, pues registran en promedio cuatro veces más de polifenoles que las variedades mejoradas, lo que constituye una gran noticia, pues los polifenoles actúan como antioxidantes naturales que protegen el cuerpo humano del efecto dañino de los radicales libres, ayudan a combatir enfermedades degenerativas e inhiben la formación y crecimiento de tumores. En ese sentido, propusieron como carácter prioritario la conservación, caracterización y revalorización del cultivo de las papas nativas a través de su incorporación a la cadena de valor, mediante el desarrollo de productos con valor agregado y la promoción de su cultivo y consumo.

Estudios realizados sobre *Solanum tuberosum* “papa nativa” (Cuesta y col., 2010) concluyen, que los diferentes caracteres evaluados podrían ser usadas ya sea en forma directa o utilizando este germoplasma como progenitores dentro de un programa de mejoramiento para la obtención de variedades con resistencia al tizón tardío y altos contenidos de macro, microelementos, vitamina C, polifenoles y carotenoides.

## **2.2. Bases teóricas**

Las papas nativas originarias de los Andes son el producto de la domesticación, selección y conservación realizada por nuestros antepasados debido a su resistencia a plagas y enfermedades, así como tolerancia a factores abióticos como heladas y sequías, las cuales a su vez presentan formas, colores, sabores y otras características agronómicas así como de procesamiento, las cuales las hacen muy apetecidas y constituyen un rico reservorio de genes para los programas de fitomejoramiento. Sin embargo, algunas variedades están en peligro de extinción, mientras que otras ya definitivamente se han perdido. Ante lo cual se han hecho ingentes trabajos de colección, caracterización, conservación y promoción (PAPANAT, 2010).

Ante esta situación el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en coordinación con el Centro Internacional de la papa (CIP) a través del Proyecto Red Latinpapa y el Instituto Vasco de Investigación NEIKER, organizaron el I Congreso Internacional de papas nativas, el cual se constituye en una plataforma en la que científicos, técnicos y empresarios tienen un espacio para discutir necesidades,

oportunidades, desarrollo de productos innovadores a partir de papas nativa para establecer colaboraciones mutuas (PAPANAT, 2010).

### **2.2.1. Papa nativa**

La papa tiene una antigüedad de aproximadamente 5500 años (Engel, 1970; Ugent y Ochoa, 2006), y se identifica a la región andina, lugar donde hoy se cultivan las variedades nativas, como la zona en la que el hombre finalmente consiguió su domesticación. Hoy se sabe que durante el Pleistoceno (Edad del Hielo), solo había extensos glaciares por encima de los 3 000 msnm (Simpson, 1975; Ugent y Ochoa 2006). Fue a finales de dicha era (8000 a 6000 a.C.), que se dio inicio a una agricultura incipiente, produciéndose así la mayor domesticación de plantas cultivadas sobre la Tierra. La papa fue una de ellas. Los hallazgos más antiguos ubican su nacimiento en el Cañón del Chilca, en la costa central del Perú (Engel, 1970).

Actualmente existe en el mundo una gran diversidad de papas nativas. Más de 4000 especies sembradas en la región andina han sido catalogadas por el Centro Internacional de la Papa (CIP), 2500 de las cuales son cultivares peruanos. Taxonómicamente, la papa está dividida en siete especies de acuerdo con la clasificación de Hawkes (1990), en nueve según Ochoa (1999) y en una sola según Huamán y Spooner (2002). Citológicamente se identifican cuatro grupos distintos: diploide ( $2n=24$ ), al que pertenecen las variedades *ajanhui*, *stenotomum* y *phureja*; triploide ( $2n=36$ ), con variedades como *chaucha* y *juzpeczukii*; tetraploide ( $2n=48$ ), donde se ubican el *andigenum* y *chilotanum*; y pentaploide ( $2n=60$ ), que contiene, entre otros, al *curtilobum*.

El conocimiento local de las familias alto andinas ha jugado un rol esencial en la conservación de la biodiversidad de las papas nativas. Se sabe que poseen una adecuada información de los diversos atributos de dicha planta y que entre ellos existen niveles taxonómicos andinos muy distintos a los planteados en los esquemas formales. Esto último sugiere prácticas de conservación de la biodiversidad de papas adecuadas a su ecosistema, con evidencias que sugieren que dicho conocimiento local posee adicionalmente estrategias viables para la conservación *in situ* (Brush y col., 1995). Esta

labor de conservación se sustenta en los patrones culturales de cada comunidad, habiéndose establecido un vínculo muy estrecho entre el mantenimiento de las papas nativas y las actividades cotidianas al interior de las comunidades alto andinas.

Claverías y Quispe (2002) identificaron que la biodiversidad de papas nativas está más vinculada al autoconsumo y a la seguridad alimentaria de la comunidad, precisamente allí donde los riesgos climáticos y los niveles de pobreza son más altos, como en Puno.



**Figura 1: Variedades de papa nativa**

**Fuente: Bioandes, 2008.**

### **2.2.2. Descripción morfológica de *Solanum tuberosum ssp.***

*Tallo.*- De color verde, café rojizo, verde con porciones moradas, marrón con porciones moradas o verdes, morado con porciones verdes, sección angular, a las rectas, onduladas y dentadas a veces sin ellas, con 3 a 6 tallos principales por planta.

*Hoja.*- De color verde claro, verde y verde oscuro, haz y envés poco pubescentes y pubescentes, superficie foliar brillante poco arrugado, arrugado o mate poco arrugado, foliolo terminal e intermedio elíptico ensanchado, a veces elípticos lanceolados.

*Floración.*- A los 58 a 79 días, después de la siembra.

*Inflorescencia.*- Poco numerosa o muy numerosa, floración abundante, rara vez escasa, pedúnculo largo, a veces mediano, pocas veces corto.

*Flor.*- Cáliz de color verde, con porciones moradas, morado con porciones verdes, café rojizo con porciones verdes, corola de color

blanco, lila, violeta, morado, de forma semirotada, a veces pentagonal de gran diámetro, y pocas veces de diámetro mediano, estambres de color amarillo, pocas veces amarillo pálido o naranja, estigma bilobulada, a veces capitada o clavada, pistilo muy excerto, excerto o poco excerto.

*Fruto*.- De color verde, verde pigmentado, rara vez enteramente pigmentado, de forma redonda, redonda bilabiada, cónica bilocada, fructificación abundante, mediana o rara vez escasa.

*Tubérculo*.- De forma redonda, ovaladas, redonda-ovaladas, alargadas, largas chatas, tuberosadas, falcadas, sub-cilíndricas, color blanco, crema, amarillo crema, amarillo, rosado, rojo, rojo oscuro, rojo guinda, morado o morado muy oscuro, ojos superficiales, semiprofundas y profundas, carne blanca, crema, amarilla, a veces pigmentadas de rojo, guinda o morado (Gutiérrez, 2008).



**Figura 2: Cultivo de especies de papa nativa**  
**Fuente: Catalogo de variedades de papa nativa**

### **2.2.3. Clasificación Taxonómica**

Las especies cultivadas de la papa están clasificadas dentro de la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Engler (Engler, 1887–1915):

Reino : Vegetal  
División : Fanerógamas  
Subdivisión : Angiospermas  
Clase : Dicotiledóneas  
Subclase : Simpétala  
Sección : Anisocárpeas

Orden : Tubifloríneas  
Familia : Solanaceae  
Género : Solanum  
Sección : Petota  
Especie : *Solanum* spp  
(Información tomada de Ochoa, 1999).

### **2.3. Metabolismo hepático**

La capacidad que tiene el ser humano de metabolizar y depurar fármacos es un proceso natural que incluye las mismas vías enzimáticas y sistemas de transporte que se utilizan para el metabolismo normal de los componentes de la dieta. En la actualidad, la mayor parte de los productos xenobióticos a los que se encuentra expuesto el ser humano proviene de la contaminación ambiental, los aditivos alimentarios, los cosméticos, las sustancias agroquímicas, los alimentos procesados y los fármacos (Brunton y col., 2007).

El hígado es el principal órgano relacionado con el metabolismo de los fármacos, muchos de ellos son los sustratos para las enzimas o bien pueden alterar la actividad de éstas a través de la inducción o inhibición de los sistemas enzimáticos microsomales hepáticos. Localizadas también en riñón, pulmón, mucosa intestinal, plasma y tejido nervioso, promueven la eliminación de sustancias liposolubles al ser transformadas en compuestos más polares que pueden ser excretados más fácilmente fuera del organismo a través de la orina o bilis (Caccia y Garattini, 1990).

Los fármacos hidrosolubles se eliminan sin modificarse por la orina y permanecen poco tiempo en el organismo, sin embargo los fármacos liposolubles no son metabolizados tan fácilmente y permanecen durante más tiempo en el organismo. Los principales citocromos P450 (CYP) relacionados con el metabolismo de fármacos pertenecen a las familias CYP1, CYP2 y CYP3 (Brosen, 1995), así la actividad de éstas enzimas varía entre los individuos y entre grupos étnicos.

Las reacciones que sufren los fármacos durante su metabolismo se encuentran divididas en dos fases:

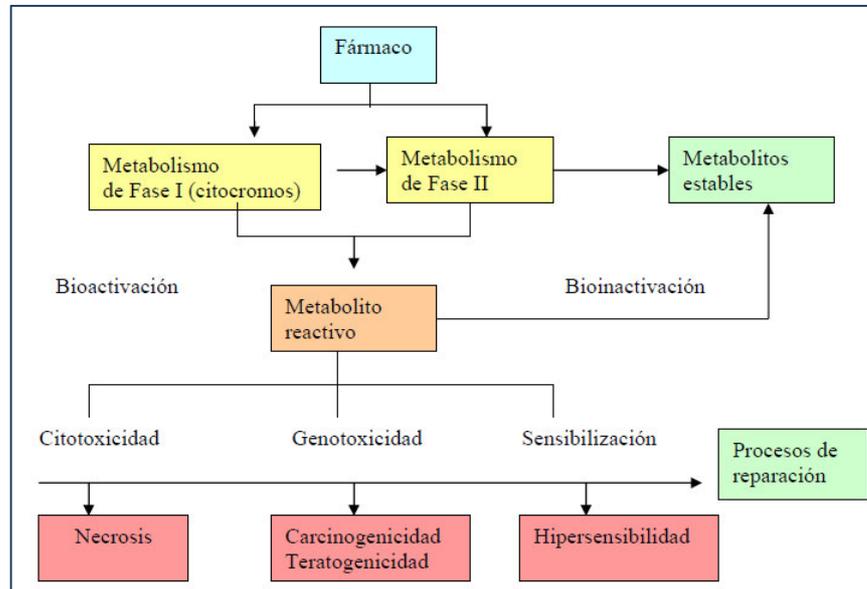
- a) Las reacciones de fase I, son aquellas en las cuales las enzimas que participan causan un cambio en la molécula del fármaco; por ejemplo reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, estas incluyen a las reductasas, oxidasas e hidrolasas. Los citocromos P450 pertenecientes a las familias 1, 2 y 3 participan en el 70-80% de todas las reacciones metabólicas de fase I relacionadas con la biotransformación de los fármacos, que se utilizan habitualmente en la práctica clínica. El metabolismo de fase I se conoce como fase de funcionalización del metabolismo, las reacciones que llevan a cabo las enzimas de esta fase inactivan al medicamento activo (Brunton y col., 2007).
- b) Las reacciones de fase II, las cuales comprenden todas las enzimas que son transferasas ya que transfieren grupos como sulfatos, glutatión, aminoácidos y metilos a los fármacos que han sido metabolizados por enzimas de fase I, estas enzimas llevan a cabo reacciones de conjugación, en las cuales hay formación de un conjugado con el fármaco y/o el metabolito producido en las reacciones de fase I (González y Gelboin, 1994).

Las enzimas de la fase II facilitan la eliminación de los fármacos y la inactivación de los metabolitos electrófilos y potencialmente tóxicos producidos por la oxidación. Si bien muchas reacciones de la fase I provocan la inactivación biológica del fármaco, las reacciones de la fase II producen un metabolito más hidrosoluble y de mayor peso molecular, lo que facilita la eliminación del fármaco del tejido (Brunton y col., 2007).

La deficiencia de un enzima metabolizadora de un determinado fármaco, conduce a un aumento en el riesgo de toxicidad farmacológica debido a una eliminación deficiente de dicho fármaco, como se observa en la figura 3.

Las enzimas de la fase II más importantes son la Glutatión S-transferasa (GST), UDP-glucuroniltransferasa (UGT), Sulfoniltransferasa (SULT), N-acetiltransferasa (NAT) y Metiltransferasa (MT). Para que estas reacciones de conjugación se lleven a cabo es necesario que el sustrato tenga oxígeno, nitrógeno y átomos de azufre que sirven como sitios aceptores de la fracción hidrofílica como glutatión, ácido glucurónico, sulfato o un grupo acetilo, que

se conjuga de manera covalente con un sitio aceptor en la molécula (Brunton y col., 2007).



**Figura 3.- Papel de las enzimas metabolizadoras de fármaco, en la bioactivación y biodesactivación de fármacos en el metabolismo de fase I y fase II.**

**Fuente: Pirmohamed y col., 1996.**

### **2.3.1. Glucuronidación**

La reacción consiste en agregar un grupo glucuronil en un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del xenobiótico. La enzima que cataliza la reacción es la UDP- glucuroniltransferasa (UGT) y el donador del grupo polar es el ácido UDP- glucurónico. La enzima se encuentra localizada en el retículo endoplásmico, a diferencia de las otras enzimas de la Fase II que se localizan en el citosol. Los compuestos glucuronidados son muy solubles en agua y aparecen en la orina y en la bilis. Existe un número muy grande de xenobióticos que son substrato de esta enzima.

Hay 18 genes que codifican a las proteínas UGT, de ellas 9 son codificados por el locus UGT1 y 9 por la familia de genes UGT2. Desde el punto de vista clínico la expresión de UGT1A1 tiene una función importante en el metabolismo de los fármacos, puesto que la glucuronidación de la bilirrubina

a cargo de la UGT1A1 constituye un paso importante un paso limitante para la eliminación satisfactoria de la bilirrubina y este índice puede modificarse por variaciones génicas y por sustratos competitivos como los xenobióticos (Brunton y col., 2007).

### **2.3.2. Conjugación con glutathion**

La glutathionización consiste en la adición de glutathion (GSH), a través de su grupo sulfhidrilo (nucleofílico), con un carbono electrofílico del xenobiótico. La reacción es catalizada por la glutathion-S-transferasa y el glutathion mismo es el cofactor de alta energía. El glutathion es un tripéptido, Glu-Cis-Gli. El compuesto que se forma se rompe en el riñón produciendo el Cis-derivado, que se acetila para producir un conjugado del ácido mercaptúrico, el cual se excreta en la orina. Esta reacción es importante en la detoxificación de epóxidos y peróxidos. La glutathion S-transferasa se encuentra en células de muy diversos tejidos. Si esta reacción disminuye significativamente el nivel celular de glutathion, el organismo puede sufrir daños considerables debido a la peroxidación de lípidos o por otros tipos de agresión química. La concentración de glutathion en las células es alta, casi siempre de aproximadamente 7  $\mu\text{mol/g}$  de hígado o en el límite de las 10 mM, por lo tanto muchos fármacos y xenobióticos reaccionan en forma no enzimática con el glutathion (Brunton y col., 2007).

### **2.4. Bilirrubina**

La bilirrubina es un pigmento derivado del metabolismo de varias hemoproteínas, es muy insoluble en agua, viaja por el torrente sanguíneo unida a la seroalbúmina que impide su paso a los tejidos y está presente en concentraciones menores de 20  $\mu\text{M}$ , la determinación de la concentración sanguínea en casos de ictericia es útil para el diagnóstico de enfermedades hepáticas subyacentes (Lehninger, 2009). El 80% de la bilirrubina procede de la hemoglobina de los eritrocitos senescentes, destruidos por las células mononucleares fagocíticas del sistema reticuloendotelial del bazo, hígado y médula ósea (Mathews, 2006). La oxidación del hem por la hemoxigenasa produce biliverdina, y la reducción de ésta por la biliverdina reductasa origina la bilirrubina. El 20% restante proviene de otras hemoproteínas como la mioglobina y de la denominada eritropoyesis ineficaz. La bilirrubina libre o no

conjugada es capaz de eliminar el oxígeno singlete y radicales peroxilos y contribuye significativamente a las defensas antioxidantes no enzimáticas presentes en el plasma. (Lehninger, 2009).

La bilirrubina no conjugada es liposoluble, no siendo filtrada por el glomérulo renal ni eliminada por la orina. A través del endotelio sinusoidal, el complejo albúmina-bilirrubina pasa al espacio de Disse, siendo captado y disociado por el hepatocito. En el interior del hepatocito, la bilirrubina se une a proteínas citoplasmáticas y es transportada al retículo endoplásmico. En el retículo endoplásmico del hepatocito, la bilirrubina es conjugada con el ácido glucorónico mediante la Uridindifosfato-glucuroniltransferasa (UGT), dando lugar a mono y diglucurónidos de bilirrubina. Mediante este proceso de conjugación, la bilirrubina pierde sus efectos tóxicos sobre el organismo. La bilirrubina conjugada es excretada a través de la membrana del hepatocito al canalículo biliar, posteriormente se agrega a la bilis y llega hasta el duodeno a través del árbol biliar. La bilirrubina conjugada o directa es hidrosoluble y, por tanto, puede eliminarse por la orina (Murray, 2006).

#### **2.4.1. Metabolismo de la Bilirrubina.**

El conocimiento de la bioquímica de las porfirinas y el grupo hemo es fundamental para la comprensión de las diversas funciones de las hemoproteínas en el organismo, y patologías asociadas a las mismas. Las porfirinas son compuestos cíclicos formados por la unión de cuatro anillos pirrólicos enlazados por puentes metenilo (-HC=) (Murray, 2006). Las hiperbilirrubinemias se producen por perturbaciones en el metabolismo y transporte de la bilirrubina. La bilirrubina es el producto final de la degradación del hemo, debido a su insolubilidad en el medio acuoso se encuentra estrechamente ligada a la albúmina (bilirrubina indirecta). Su paso por el hígado produce la bilirrubina conjugada (bilirrubina directa).

La bilirrubina es un compuesto endógeno potencialmente tóxico, especialmente en el recién nacido; sin embargo también es conocido que la bilirrubina no conjugada es un potente antioxidante y la hiperbilirrubinemia no conjugada moderada puede tener efectos benéficos. En el laboratorio clínico, la determinación de bilirrubina sirve como un marcador bioquímico de desórdenes hepáticos y sanguíneos. La hiperbilirrubinemia puede

presentarse debido a desórdenes del metabolismo de la bilirrubina generado por un proceso hemolítico o por diseritropoyesis, de origen genético o por desórdenes adquiridos (Fevery, 2008).

La degradación de la bilirrubina se produce por la catálisis inicial de la Hemo-oxigenasa sobre el grupo hemo, originando a tres productos fundamentales: biliverdina, el hierro libre y el monóxido de carbono; la primera da lugar a la bilirrubina. Existe una isoforma inducible, denominada hemo oxigenasa-1. Esta enzima juega un papel muy importante en la modulación de procesos inflamatorios (demostrado en diferentes modelos experimentales tanto en animales como humanos), en los mecanismos de defensa antioxidantes que posee el organismo ante la presencia de algún daño y en el bloqueo de los procesos apoptóticos donde han sido involucradas distintas rutas de señalización celular. Su expresión se incrementa considerablemente en presencia de hipoxia, hiperoxia, endotoxinas bacterianas, radiaciones ionizantes, citoquinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, metales pesados, factores de crecimiento, etc. (Sánchez y col., 2005).

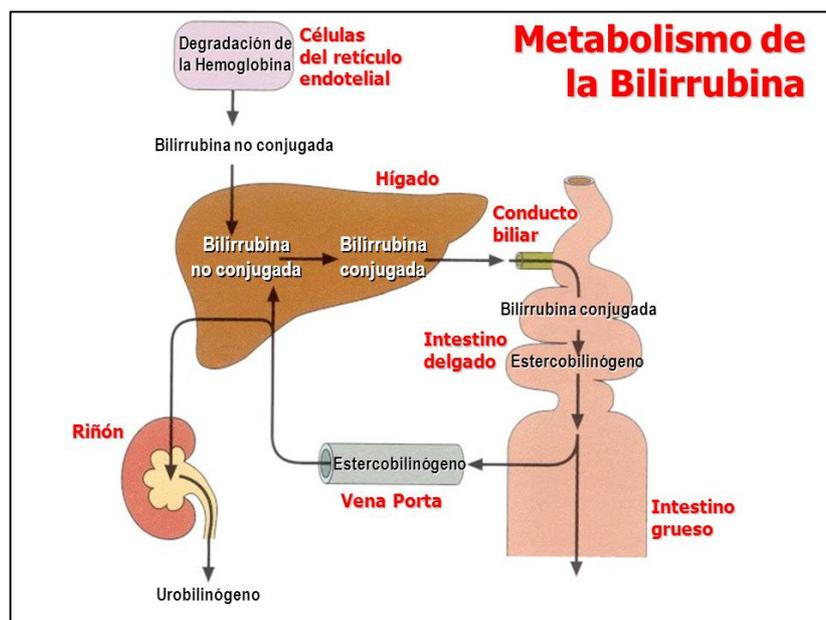
La enzima responsable de la conjugación es la UDP-glucuronil transferasa (UGT) y es inmadura en el nacimiento. Esto explica la llamada “ictericia fisiológica del neonato” con picos de bilirrubina a los 3 a 4 días. La UGT además es responsable de alrededor del 35% de las reacciones de la Fase II del metabolismo de xenobióticos. La modulación de esta enzima por compuestos endógenos puede ser uno de los principales mecanismos que explican las diferencias inter-/intra-individuales en la sensibilidad a las drogas; también los componentes de la dieta pueden explicar parcialmente las diferencias individuales. (Ishii y col., 2010). Cuando el metabolismo de la bilirrubina es deficiente por una mala glucuronidación, su concentración sérica se incrementa y origina el síndrome clínico llamado hiperbilirrubinemia o ictericia. Hay más de 50 lesiones génicas en el gen de UGT1A1 que provocan hiperbilirrubinemia no conjugada hereditaria. El síndrome de Crigler-Najjar tipo I se diagnostica por la falta total de glucuronidación de la bilirrubina, mientras que en el tipo II aparece una pequeña cantidad de

glucurónidos de bilirrubina en las secreciones duodenales (Brunton y col., 2007).

Otras enzimas relacionadas con la bilirrubina son las glutatión S-transferasas formadas por 5 isoenzimas, este grupo de enzimas participa en dos formas de detoxificación, la primera es catalizar el ataque nucleofílico del sustrato fisiológico glutatión reducido sobre el centro electrófilo de un gran número de estructuras tóxicas y la segunda es que exhibe capacidad de ligar bilirrubina. (Towsend, 2009).

Por otro lado, es importante desarrollar estudios de los componentes fitoquímicos hidrosolubles en papas nativas y relacionar con sus posibles actividades bioquímicas. Asimismo se ha demostrado que estos compuestos polifenólicos tienen actividad antioxidante, sin embargo se desconoce los mecanismos bioquímicos subyacentes a sus actividades antioxidantes (Suárez y col., 2012).

Es posible que su actividad antioxidante in vitro pueda reflejarse in vivo, además de participar como modulador en el metabolismo de la bilirrubina en una situación de hiperbilirrubinemia, teniendo en cuenta que esta sustancia endógena además de su potencial tóxico ejerce un papel antioxidante en el organismo humano.

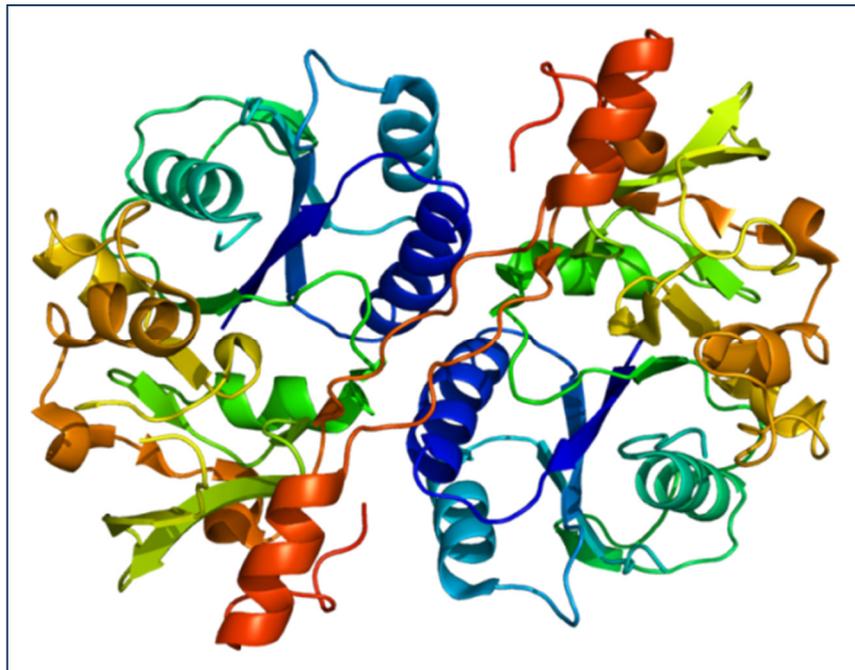


**Figura 4: Metabolismo de la bilirrubina**

Fuente: <http://slideplayer.es/slide/2331288/#>

## 2.5. Glucuronil transferasa (EC: 2.4.1.17)

La UDP-glucuroniltransferasa es una enzima hepática que pertenece al grupo de las glicosiltransferasas y cataliza la transformación de bilirrubina no conjugada o indirecta en bilirrubina conjugada o directa, mediante la adición de ácido glucurónico. La bilirrubina conjugada es soluble en agua y puede ser eliminada fácilmente a través de la bilis. Tiene varios nombres alternativos: Glucuroniltransferasa, UDP-glucuroniltransferasa y UDP-GT. Existen varias enfermedades congénitas en las que existe una deficiencia de esta enzima, puede ser leve como en el síndrome de Gilbert, o severa en el síndrome de Crigler-Najjar tipo I (Mulichak, 2004). Además de la UDP-glucuroniltransferasa, hoy se conocen diferentes glucuroniltransferasas que actúan sobre otros sustratos, incluyendo alcoholes, aminas y ácidos grasos. Funcionan como enzimas metabolizadoras de eliminación (MacDougall, 2011).

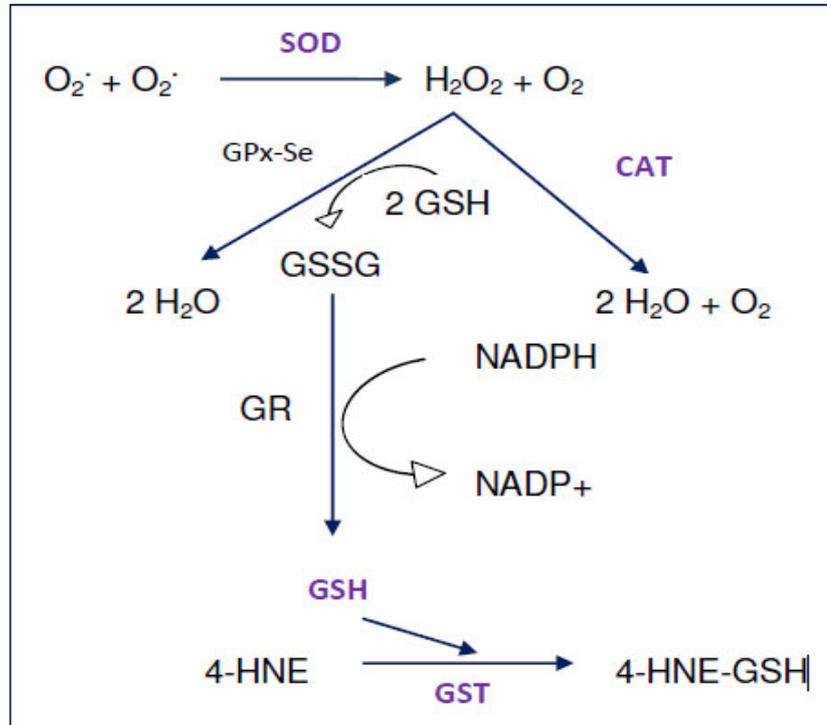


**Figura 5: Estructura tridimensional de la glucuroniltransferasa**

## 2.6. Mecanismos de defensa antioxidante

Se conocen mecanismos de defensa antioxidante frente al daño oxidativo provocado por las EROs, formados por sistemas enzimáticos (catalasa-CAT, superóxido dismutasa-SOD) y no enzimáticos (vitaminas C, E y glutatión-

GSH). Cuando hay un desequilibrio en el balance entre la generación de radicales libres y su eliminación por los antioxidantes, se produce una situación de estrés oxidativo (Figura 6).



**Figura 6. Reacciones químicas correspondientes a las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas.**

### 2.6.1. Superóxido dismutasa (EC: 1.15.1.1)

Las SODs son un grupo de metaloenzimas que catalizan la siguiente reacción:



Muchos organismos producen varios tipos de superóxido dismutasas (SOD). La reacción que catalizan ocurre rápidamente, esto apoya la teoría que el  $O_2^{\cdot -}$  juega un rol importante en el estrés oxidativo. Los vertebrados tienen tres formas distintas: cobre/zinc (CuZnSOD), manganeso (MnSOD) y extracelulares (ECSOD). Las SODs juegan un rol principal en el mecanismo antioxidante y su importancia está dada por su presencia en todos los organismos aerobios examinados (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### **2.6.2. Catalasa (EC: 1.11.1.6)**

Aunque las SODs son muy efectivas reduciendo el  $O_2^{\cdot-}$  producen  $H_2O_2$ ; este producto puede ser dañino y en presencia de metales de transición como el cobre o hierro puede ser precursor de una especie más reactiva ( $\cdot OH$ ). La catalasa (CAT) metaboliza por degradación al peróxido de hidrógeno.



La mayoría de los organismos aerobios y todos los vertebrados poseen dos tipos de enzimas (Figura 6) que metabolizan el peróxido de hidrógeno: la catalasa y peroxidasas. Estas últimas pueden actuar sobre una variedad de productos orgánicos además del  $H_2O_2$ , mientras que la catalasa no. La localización subcelular de la CAT en vertebrados es principalmente en los peroxisomas (Hermes-Lima, 2004).

### **2.6.3. Glutación S-transferasa (EC: 2.5.1.18)**

Es una familia de enzimas de la Fase II que proveen protección celular contra los efectos tóxicos de una amplia variedad de compuestos endógenos y ambientales. Son enzimas diméricas que se distribuyen ampliamente y comprenden aproximadamente el 2 al 4% de las proteínas citosólicas totales del hígado. Su rol principal es la detoxificación de productos del estrés oxidativo que surgieron de la oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La GST cataliza la conjugación de GSH con xenobióticos, incluyendo los aldehídos producidos durante la peroxidación lipídica (Hermes-Lima, 2004).

En la Figura 6 se ejemplifica el modo de acción de la GST: el 4HNE (4-hidroxinonenal), un aldehído insaturado particularmente reactivo que es generado durante la peroxidación lipídica como resultado de la degradación de ácidos grasos poli-insaturados, es transformado a otro menos reactivo (Halliwell y Gutteridge, 1999; Di Giulio y Mayer, 2008).

Existen dos familias multigen distintas, la superfamilia GST soluble y la superfamilia MAPEG. Las transferasas de la familia GST solubles y MAPEG no tienen similitud a nivel de estructura primaria. Hay diferencias significativas en los tamaños de las subunidades de la proteína en las dos superfamilias. Todas las transferasas solubles son proteínas diméricas, y

esas subunidades GST que están más estrechamente relacionados pueden formar heterodímeros (Sherratt y col., 2001). En base a sus propiedades bioquímicas, inmunológicas, y estructurales, las GST solubles se clasifican en 4 clases principales: alfa, mu, pi, y theta. El gen pi glutatión S-transferasa (GSTP1) es un gen polimórfico que codifica funcionalmente diferentes proteínas GSTP1, que se cree que son activos en el metabolismo de xenobióticos y desempeñan un papel en la susceptibilidad al cáncer y otras enfermedades (Wang, 2001).



**Figura 7: Estructura tridimensional de la glutatión S-transferasa**

## **2.7. Biomarcadores No enzimáticos**

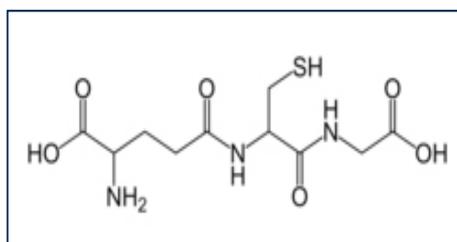
### **2.7.1. *Glutatión (GSH).***

El GSH es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina. Juega un rol crítico en la protección celular, pero también es importante en el metabolismo, biosíntesis, transporte y comunicación celular. El glutatión es cofactor de las reacciones enzimáticas de la glutatión peroxidasa (GPx) y de la glutatión S-transferasa (GST), pero también puede actuar como un antioxidante y eliminar EROs con el grupo tiol (-SH) de cisteína, el grupo activo que sufre la oxidación. Sus principales funciones son la detoxificación, principalmente por conjugar intermediarios electrofílicos vía GST y como antioxidante (Hermes-Lima, 2004). La depleción de GSH puede ocurrir por la eliminación directa de oxirradicales o en su papel de cofactor. El NADPH se oxida para mantener los niveles de GSH a través de la glutatión reductasa (GRED).

Tal vez el efecto directo más evidente de algunos contaminantes, sea producir una disminución en el estado de tior, es decir, la proporción del glutatión reducido respecto al glutatión oxidado (GSH: GSSG), ya sea debido a la elevada actividad de la glutatión peroxidasa o la eliminación de radicales libres. Normalmente en células saludables, sin estrés oxidativo la proporción GSH:GSSG es 100:1 y disminuye en situaciones de estrés (Van der Oost y col., 2003).

Los grupos tior (-SH) se mantienen en un estado reducido a una concentración de aproximadamente 5 mM en células animales. En efecto, el glutatión reduce el enlace disulfuro (-S-S-) formado dentro de proteínas citoplasmáticas de cisteínas, al actuar como un donante de electrones. En el proceso, el glutatión se convierte en su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG).

El glutatión se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la glutatión reductasa, enzima que actúa sobre su forma oxidada (GSSG), es constitutivamente activa e inducible al estrés oxidativo. La proporción de glutatión reducido a glutatión oxidado dentro de las células a menudo se utiliza como una medida de la toxicidad celular (Díaz y col., 2007).



**Figura 8: Estructura química del glutatión**

### **2.7.2. Peroxidación lipídica**

La peroxidación lipídica es un mecanismo de daño celular, siendo por ello utilizado como indicador del estrés oxidativo y biomarcador de contaminación ambiental (Di Giulio, 1991). Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de las membranas biológicas se generan, entre otros, malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), como productos finales de reacción. Gracias a su determinación se puede cuantificar la peroxidación lipídica y, por tanto, el estrés oxidativo en los organismos.

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas y son los responsables, en buena medida, de la fluidez de ésta. La función de estos lípidos localizados en las membranas biológicas es mantener la integridad de la célula (Muriel, 1997). Entre los lugares en los que se pueden encontrar los AGPI destacan la membrana plasmática, la membrana celular del retículo endoplasmático y la membrana de la mitocondria.

Los AGPI son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación se denomina peroxidación lipídica. Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que la destrucción de los AGPI de la membrana junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y la ruptura de éstas, provoca un desmoronamiento de la estructura de membrana que conduce a una pérdida de la permeabilidad y, posteriormente, a la muerte celular. La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende, en gran medida, del grado de insaturación y de la posición de los dobles enlaces en la membrana, así como de la existencia de iones hierro (Ursini y col., 1991), ya que son estos los que catalizan en su mayoría las reacciones de oxidación, además de activar el oxígeno en la formación de las EROs.

El proceso de peroxidación lipídica consta de una serie de reacciones en cadena, que demuestran la capacidad de las EROs para producir reacciones bioquímicas dañinas para la célula (Livingstone, 1991). Son reacciones dañinas, porque provocan la formación de distintas especies afines, las cuales a su vez tienen la capacidad de degradar las membranas.

La primera etapa de la peroxidación lipídica es la iniciación, que es favorecida por algún tipo de iniciador (I<sup>•</sup>). Este iniciador puede ser cualquier molécula con la suficiente reactividad para extraer un átomo de hidrógeno de un radical metileno (-CH<sub>2</sub>-) de un AGPI, produciéndose la captación del hidrógeno por el iniciador y la formación de un radical orgánico, R<sup>•</sup>, mediante la disociación de la energía del enlace alílico en el AGPI (Minotti y Aust, 1992).

Esta iniciación **(a)** se puede producir en cualquier lugar de la cadena del AGPI, aunque los carbonos con hidrógenos bis-alílicos son atacados preferentemente, ya que así se estabiliza por resonancia el radical orgánico que se forma en el carbono central (Ryan y Aust, 1992).



Se han postulado distintos iniciadores de la peroxidación lipídica, siendo la teoría más extendida la que propone a las EROs como promotores de la fase de iniciación. Así destaca como iniciador, en primer lugar, el radical hidroxilo ( $\text{OH} \cdot$ ), que es el radical más reactivo de todos ( $E^\circ = 1,6 \text{ V}$ ) **(b)**, siendo generado por medio de la reacción de Haber-Weiss, en la que participan el  $\text{O}_2^-$  y el  $\text{Fe}^{+3}$  (Minotti y Aust, 1992).



Por el contrario, el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) no es lo suficientemente reactivo para funcionar como un iniciador y, además, su carga le impide entrar en las membranas de naturaleza lipofílica; sin embargo, la forma protonada de este anión ( $\text{HO}_2^-$ ), es más reactiva **(c)** y, no sólo puede actuar como iniciador, sino que también es capaz de dañar las membranas por sí mismo, aunque esto último aún no ha sido demostrado de un modo fiable (Halliwell y Gutteridge, 1999).



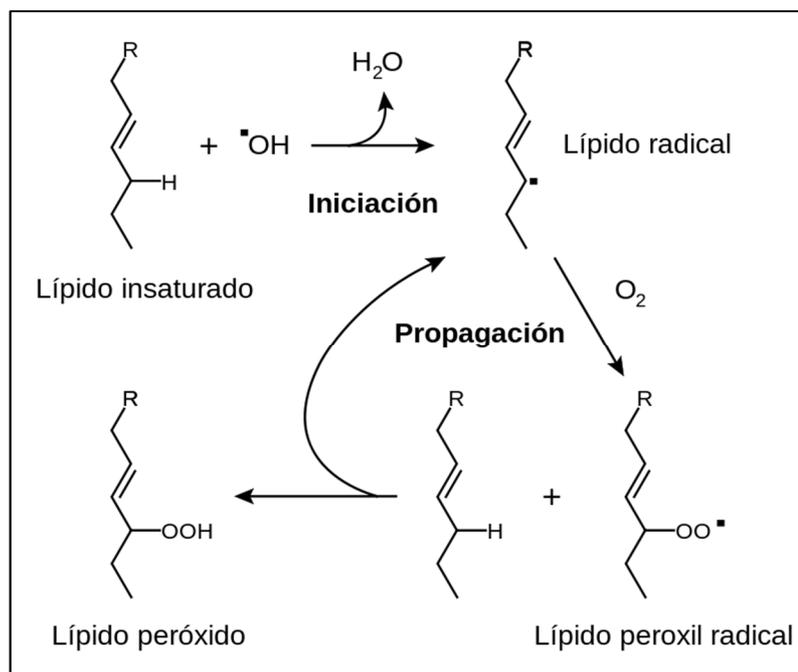
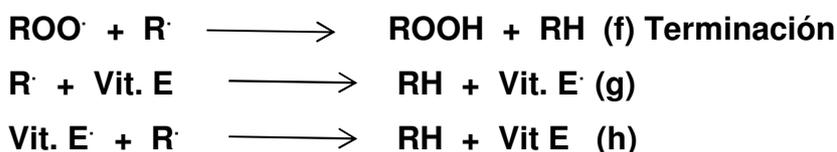
Tras esta fase de iniciación, se forma un radical lipídico  $\text{R} \cdot$  y comienza la fase de propagación. En primer lugar, el radical lipídico  $\text{R} \cdot$  sufre reacciones de combinación o adición con el oxígeno, formando radicales peroxilo orgánicos ( $\text{ROO} \cdot$ ) **(d)**.



La importancia de estos radicales  $\text{ROO} \cdot$  se basa en la capacidad que tienen para captar un átomo de hidrógeno desde un enlace alílico de una molécula lipídica vecina formando hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ), de este modo se produce la propagación **(e)** y las reacciones encadenadas están ya en marcha.



A esta fase de propagación le sucede la fase de terminación, en la cual se produce la combinación de los productos iniciales de la peroxidación (radicales lipídicos) para dar lugar a compuestos no radicales del tipo del MDA o del 4-HNE (**f**) o a la producción de compuestos no reactivos mediante reacciones con antioxidantes tipo "scavenger", como la vitamina E (**g y h**).



**Figura 9. Mecanismos de la peroxidación lipídica (de Marnett LJ. Mutation research, 1999).**

### **2.7.3. Modelos experimentales de Hiperbilirrubinemia**

Se sabe que Fenilhidrazina (FHZ) es un agente hemotóxico ampliamente utilizado para inducir anemia en modelos animales. La acción de FHZ ha sido asociada al estrés oxidativo inducido por drogas que tiene lugar dentro de los eritrocitos (Beutler, 1969; Jain y col., 1979). Este proceso conduce a una aumentada oxidación de la oxihemoglobina a metahemoglobina, produciendo hemicromos irreversibles, los cuales a su vez, forman los cuerpos de Heinz. Además del daño proteico y la peroxidación lipídica, otras alteraciones como depleción de glutatión y ATP, desbalance catiónico,

reducción en la deformabilidad de la membrana y unión de anticuerpos, han sido asociadas a la respuesta hemolítica inducida por drogas oxidantes (Goldberg y col., 1977;). Se sabe que la activación inmune está asociada con la anemia inducida por Fenilhidrazina en distintas especies, y en estas condiciones el bazo es el principal órgano involucrado en la compensación del estado hemolítico (Naughton y col., 1990). También, se conoce que en situaciones de gran demanda eritropoyética, el hígado puede asumir la función hemopoyética.

## **CAPITULO 3: METODOLOGÍA**

### **3.1. Tipo y diseño de investigación**

El presente estudio corresponde a un diseño de investigación experimental.

### **3.2. Población de estudio**

Papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi”

### **3.3. Muestra**

Constituída por 1 kg de papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi”.

### **3.4. Unidades experimentales**

Ratas machos, *Rattus norvegicus* (variedad albina) procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS).

### **3.5. Técnicas de la recolección de datos**

Para ello se procedió de la siguiente manera:

#### **3.5.1. Recolección de la muestra**

Las papas nativas fueron recolectadas en la comunidad de Champaccocha del distrito de San Jerónimo, provincia de Andahuaylas, departamento de Apurímac a una altitud aproximada de 3,500 msnm.

#### **3.5.2. Secado y Molienda**

Las papas colectadas fueron lavadas con agua a presión, luego fueron cortadas en rodajas finas para luego ser secadas en la estufa a  $38 \pm 0.2$  °C con ventilación permanente de aire. Una vez secas las papas fueron molidas, hasta obtener un polvo fino, que es conservado en un frasco de vidrio ámbar limpio, seco y rotulado (CYTED, 1995).

### **3.5.3. Obtención del extracto acuoso de papa nativa**

Se realizó una extracción empleando 40 g del polvo de papa nativa en 400 mL de agua bidestilada acidulada por 24 h en baño maría de 35°C con agitación constante en un incubador agitador Dubonoff GCA/Precision Scientific. El extracto se centrifugó a 7000 rpm por 20 minutos en una centrífuga refrigerada (4°C) Sorvall modelo RCB-2 rotor SS34. Al precipitado se realizó una segunda extracción añadiendo 200 mL de agua bidestilada acidulada por 24 h y se procedió de la misma forma. Se juntaron las dos extracciones obteniéndose un volumen total aproximado de 500 mL, se concentró en una estufa a 38°C hasta un volumen de 300 mL, se midió 1 mL del extracto final y se llevó a desecación hasta peso constante para determinar los sólidos en suspensión. Se realizó por triplicado.

Finalmente el extracto se dividió en dos partes iguales, empleándose la primera parte para los ensayos bioquímicos y la segunda parte se evaporó a sequedad el que se empleó para la marcha fitoquímica (Anexo 1), (Anexo 7).

### **3.5.4. Marcha fitoquímica**

Se pesó 500 mg de extracto acuoso total se disolvió en etanol al 50 % y se realizó las reacciones químicas correspondientes (Anexo 2), mediante las técnicas de (Miranda y col., 1992; Lock de Ugaz, 1994), para reconocer los metabolitos secundarios presentes en el extracto mediante las siguientes reacciones:

#### **Taninos:**

Gelatina: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución de gelatina al 1%, un precipitado de color blanco denso es positivo.

Agua de Bromo: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución agua de bromo, un precipitado de color blanco denso es positivo.

**Aminoácidos libres:**

Ninhidrina: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo al 0,1%, un color violáceo es positivo para aminoácidos libres y grupos amino, si la reacción es negativa calentar.

**Flavonoides:**

Shinoda: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó mg de Mg metálico más gotas de HCl concentrado, un color rojo es positivo para flavonoides, chalconas, auronas.

**Compuestos fenólicos:**

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto, se agregó gotas de solución de FeCl<sub>3</sub> al 1%, un color verde o azul es positivo.

**Saponinas:**

Ensayo de espuma: En un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto, se agregó 8 mL de agua destilada, agitar fuertemente, la producción de espuma por 15 minutos de 0,5 a 1 cm. es positivo para saponinas

**Triterpenos y esteroides:**

Liebermann-Burchard: en un tubo de ensayo se colocó 100 mg del extracto se disuelve en 2 mL de cloroformo y se le añadió gotas del reactivo, un color verde, azul o naranja es positivo para triterpenos y esteroides.

**3.5.5. Cromatografía en capa fina del extracto acuoso total**

Se empleó el extracto acuoso total, placas cromatográficas en capa fina unidimensional ascendente de 10 x 15 cm; con fase estacionaria Sílica Gel G-60 y fase móvil butanol - ácido acético - agua en proporciones de 2:1:3.

Se realizó dos siembras de diez repeticiones cada una. Para el revelado se utilizaron los reactivos específicos, luz UV, vapores de amoniaco. Los metabolitos secundarios encontrados fueron separados (por raspado) para su empleo en la cromatografía en capa fina a escala preparativa (Anexo 3).

**3.5.6. Cromatografía en capa fina a escala preparativa**

Se realizó para aislar, purificar y elucidar la estructura química de los flavonoides y se emplearon placas cromatográficas de 10 x 15 cm, como

fase estacionaria Sílica Gel G-60 y fase móvil el sistema de solventes constituido por n-butanol – ácido acético - agua en proporciones de 4:1:5; después de realizar el ensayo los resultados del cromatograma fueron observados en la luz UV y luego separados (por raspado) y disueltos con metanol absoluto, luego se filtró y las alícuotas obtenidas se emplearon en la elucidación estructural mediante Espectroscopia UV-Visible (Sharapin, 2000).

### **3.5.7. Elucidación estructural mediante espectrofotometría UV**

Después de separar las manchas de las placas cromatográficas a escala preparativa se procedió a extraer con metanol absoluto del polvo de sílica gel G-60. Se obtuvieron 5 fracciones (Anexo 4) de las cuales la fracción 3 no presentó fluorescencia al UV y las fracciones 1, 2, 4 y 5 presentaron fluorescencia frente al UV a 366 nm. Para confirmar la pureza de las fracciones, todas se llevaron al análisis espectrofotométrico del UV descartándose la fracción 3, finalmente al analizar los espectros UV de las fracciones 1, 2, 4, 5 y comparados sus longitudes de onda de los picos de cada fracción con una tabla de referencia (Mabry y cols, 1970), nos permitió elucidar las estructuras propuestas (Saharapin, 2000).

## **3.6. Ensayos bioquímicos**

Para el ensayo se emplearon 27 ratas machos, *Rattus norvegicus* (variedad albina) que fueron adquiridas en el INS-Chorrillos los que fueron alojados y aclimatados durante una semana antes del experimento en el Bioterio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana, a una temperatura ambiental entre 23 a 26 °C y una humedad relativa de 60 a 70 % con 12 horas de luz y 12 h de oscuridad. Fueron alimentados ad libitum. El alimento fue adquirido en el mismo INS-Chorrillos.

### **Inducción de hiperbilirrubinemia.**

Previamente se preparó una solución de Fenilhidrazina a una concentración de 75 mg/mL el que se disolvió en una mezcla de etanol-agua en una proporción de 1:1 con agitación constante por unos 10 minutos. Para inducir la anemia hemolítica se administró la solución de fenilhidrazina a la dosis

única de 60 mg/kg/día vía intraperitoneal (Anexo 5). A las unidades experimentales del grupo control se les inyectó 0,2 mL de suero fisiológico por vía intraperitoneal (Nakanishi y col., 2003).

### **Protocolo experimental**

Para la realización del presente trabajo de investigación las unidades experimentales *Rattus norvegicus* (variedad albina) fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos, a los cuales se les administró el siguiente tratamiento, durante 7 días:

I.- Grupo Control (Control): 1 mL de suero fisiológico por vía orogástrica durante 7 días y 0,2 mL de suero fisiológico vía intraperitoneal 48 h antes del sacrificio.

II.- Grupo Fenilhidrazina (FH): 1 mL de suero fisiológico por vía orogástrica durante 7 días y Fenilhidrazina (disuelto en una mezcla hidroalcohólica 1:1) 60 mg/kg/día de peso corporal, por vía intraperitoneal 48 horas antes del sacrificio (Nakanishi y col., 2003).

III.- Grupo Extracto de papa (ExtPapa): Extracto acuoso de papa 665 mg/kg/día de peso corporal por vía orogástrica durante 7 días y 0,2 mL de suero fisiológico vía intraperitoneal 48 h antes del sacrificio.

IV.- Grupo Fenilhidrazina-Extracto de papa (ExtPapa-FH): Extracto de papa 665 mg/kg/día de peso corporal, por vía orogástrica durante 7 días y Fenilhidrazina 60 mg/kg/día de peso corporal por vía intraperitoneal 48 h antes del sacrificio.

Al octavo día las ratas fueron anestesiadas para la obtención de las muestras biológicas (sangre total y tejido hepático).

### **Aspectos éticos**

En la presente investigación para el uso de los animales de experimentación *Rattus norvegicus* (variedad albina), se tuvo en consideración el título IV: de la Experimentación e Investigación y la Docencia; de la Ley N° 11794-2000, Ley Peruana de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio.

### **Procesamiento para la obtención de muestras biológicas**

Para la obtención de las muestras biológicas las ratas fueron anestesiadas con éter etílico, luego se procedió a extraer sangre por punción cardiaca e inmediatamente sacrificadas para extraer el hígado (Anexo 5).

Las muestras de sangre se obtuvieron a la misma hora (9:30-10:30 am) y alternando los grupos de manera que transcurriera el tiempo necesario para no acentuar la anemia. La cantidad extraída fue de 1.0-1.5 mL necesario para determinar las siguientes pruebas plasmáticas:

- Bilirrubina total
- Hematocrito

Luego los animales en estado de anestesia fueron decapitados, inmediatamente se procedió a la extracción del hígado luego lavados con buffer fosfato pH = 7.2, y colocados en congelación.

Finalmente para realizar los ensayos en el tejido hepático se preparó un homogenizado de hígado al 10% en buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,4 y se empleó para determinar:

- Glutación total
- Glutación S-transferasa
- UDP-glucuroniltransferasa
- Peroxidación lipídica como MDA
- Proteínas

#### **3.6.1. Determinación de Hematocrito, método de Wintrobe.**

Se tomó la muestra de sangre en capilares heparinizados directamente. Luego se llenó aproximadamente 70%-80% del capilar. Se tapó un extremo del capilar con plastilina. Luego se colocó el capilar sobre la plataforma del cabezal de una centrífuga de microhematocrito, con el extremo ocluido adherido al reborde externo de la plataforma. Se centrifugó por 30 minutos a 3000 rpm y finalmente se midió el volumen de glóbulos rojos.

#### **3.6.2. Determinación de bilirrubina total: Protocolo Laboratorio Bialex**

El ácido sulfanílico reacciona con el nitrito de sodio para producir ácido sulfanílico diazotado (Diazo). La bilirrubina directa e indirecta se acopla con

el diazo para producir azobilirrubina en presencia de DMSO. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de la concentración de bilirrubina total presente en la muestra. Se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm, expresándose los resultados en mg/dL.

### **3.6.3. Determinación de la concentración total de GSH**

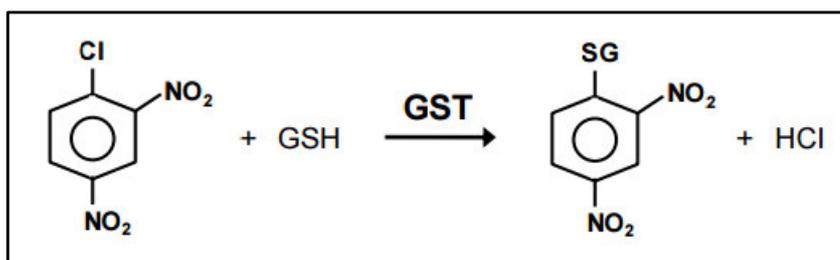
Los niveles totales de glutatión fueron determinados utilizando el método de Griffith (1980). El glutatión total fue evaluado por el procedimiento de reciclaje enzimático en el cual, el GSH es oxidado por el ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por el NADPH en presencia de glutatión reductasa formándose el ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB). Para lo cual en un tubo de microcentrífuga se midió 950 uL de homogenizado de hígado al 10% y se añadió 50 uL de ATC 100% (para desproteínizar), se agitó enérgicamente, se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm, luego se tomó 0,2 mL del sobrenadante para la determinación de GSH total, en el siguiente protocolo (Boyne y col, 1972):

Tubos	VitC-Gli	H <sub>2</sub> O	St <sub>1</sub>	St <sub>2</sub>	M.P.
Blanco	1 mL	0,2 mL	--	--	--
St <sub>1</sub>	1 mL	0,12 mL	0.08 mL	--	--
St <sub>2</sub>	1 mL	0,1 mL	--	0,1 mL	--
Muestra	1 mL	---	--	--	0,2 mL

Finalmente se incubó por 5 minutos a 67 °C, se enfrió con agua, se agregó 0,2 mL de DTNB, se mezcló y se hizo la lectura a los 5 minutos en el espectrofotómetro a 412 nm. Los resultados de glutatión total, GSH y GSSG se expresaron como  $\mu$ moles por gramo de tejido hepático.

### **3.6.4. Determinación de la actividad de la enzima GSH-transferasa**

La actividad se midió de acuerdo a la técnica espectrofotométrica descrita por Habig y col., (1974). La reacción química catalizada por la GSH-transferasa es la siguiente:



**Figura 10: Actividad transferásica de la GST**

**Fuente: Letelier y cols., 2005**

Para lo cual la mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1 mL: buffer fosfato 0,1M pH = 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 1mM; GSH 4mM; muestra problema 10 µg/mL. El blanco contiene todos los reactivos, a excepción del GSH. La reacción se inicia agregando el GSH a la cubeta muestra y la actividad se determinó midiendo la absorbancia del conjugado formado enzimáticamente a 340 nm, en forma continua durante 3 min a 20°C. La velocidad enzimática se cuantificó utilizando el coeficiente de extinción del conjugado formado: 9,6 mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> expresando los resultados en actividad total (µmol/g tej) y específica (µmol conjugado/min/mg prot).

### **3.6.5. Determinación de la actividad de la enzima UGT**

La actividad se ensayó según el método de G.J. Mulder (1971) con modificaciones. Esta técnica mide la formación de glucurónido, cuantificando la cantidad de p-nitrocatecol remanente en la mezcla de reacción. Para ello se aprovechan las propiedades espectroscópicas del p-nitrocatecol en medio básico; bajo estas condiciones, absorbe fuertemente a 555 nm, propiedad que se pierde al ser conjugado con UDPGA. Para determinar el p-nitrocatecol que queda después de 15 minutos de incubación se procedió en las siguientes condiciones: 0,5 mM de p-nitrocatecol, 2 mM de UDPGA, 100 mM Tris HCl pH = 8,5, 4 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mg/mL de proteína. Las muestras de control se realizaron en ausencia de UDPGA y la reacción se detuvo adicionando ácido tricloroacético 5%. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. El resto de p-nitrocatecol fue determinado a 555 nm empleando estándares de concentración conocida. La velocidad de reacción fue determinada en función de la formación de producto dependiente del tiempo y la concentración. Los resultados se expresaron en

actividad específica ( $\mu\text{mol 4NCglucoronido/mg prot}$ ) y actividad total ( $\mu\text{mol UGT/g tej}$ ).

### **3.6.6. Determinación de la peroxidación lipídica (MDA)**

La peroxidación lipídica da origen a transformaciones profundas de la membrana celular, dando lugar a una serie de productos de descomposición como el Malondialdehído (MDA), el cual se emplea como indicador directo del daño celular y de la peroxidación lipídica.

El fundamento de la técnica (TBARS) es hacer reaccionar la muestra a analizar con ácido tiobarbitúrico en medio ácido, adicionándole un cromógeno, que posteriormente se estima mediante absorbancia o fluorescencia. El MDA estimado proviene de la descomposición de lípidos peroxidados durante la reacción en medio ácido, principalmente, siendo su concentración proporcional a la absorbancia. Esta prueba es simple e inespecífica ya que otros aldehídos formados en la lipoperoxidación también forman compuestos de la misma absorción (Halliwell y col., 1993).

Para su determinación inicialmente comprende una etapa de precipitación proteica, luego se añade el ácido tiobarbitúrico que produce una reacción directa con la fracción de malondialdehído presente en el suero. El producto de MDA se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 535 nm. Coeficiente de extinción  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (Suárez y col., 2012). Los resultados se expresaron en nmoles de MDA/mg proteínas y nmoles MDA/g tejido húmedo.

### **3.6.7. Determinación de proteínas totales según Lowry.**

Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas totales en la que a la muestras se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. Este método consta de dos etapas:

1. Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a

participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

2. La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso (Lowry, 1951).

### **3.7. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos presentan en tablas y gráficos en el que se expresa las concentraciones o actividades de las enzimas. Asimismo los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS 19.0, empleando los estadísticos de ANVA, prueba de Tukey para un nivel de confianza del 95 %.

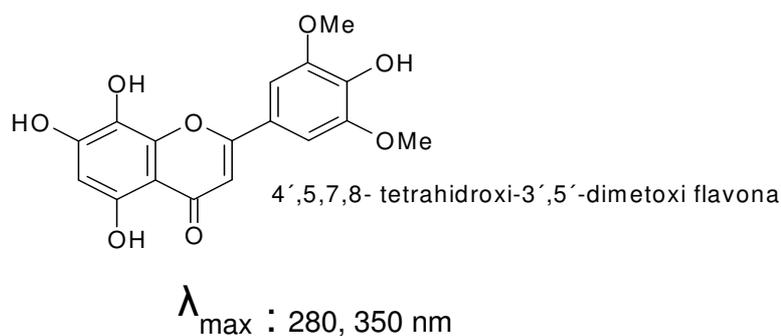
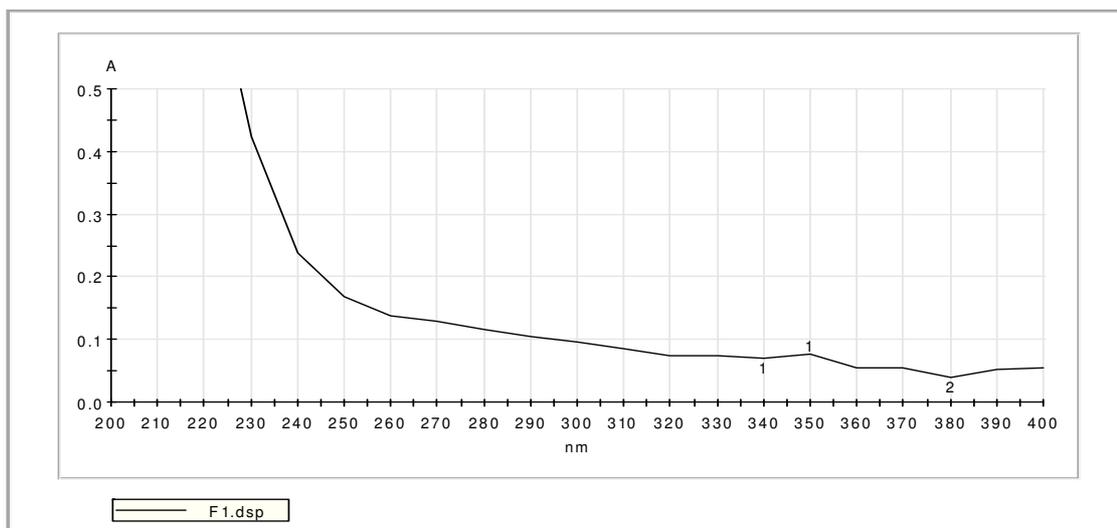
## CAPITULO 4: RESULTADOS

Tabla 1. Marcha fitoquímica del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi”.

Metabolitos secundarios	Reacción	Resultados	Observaciones
<b>Taninos</b>	Gelatina	--	Negativo
<b>Aminoácidos libres</b>	Ninhidrina	--	Negativo
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	++	Coloración roja
<b>Compuestos fenólicos</b>	FeCl <sub>3</sub>	+++	Coloración verde
<b>Saponinas</b>	Ensayo de espuma	+++	Abundante espuma
<b>Triterpenos y/o esteroides</b>	Liebermann-Burchard	--	Negativo

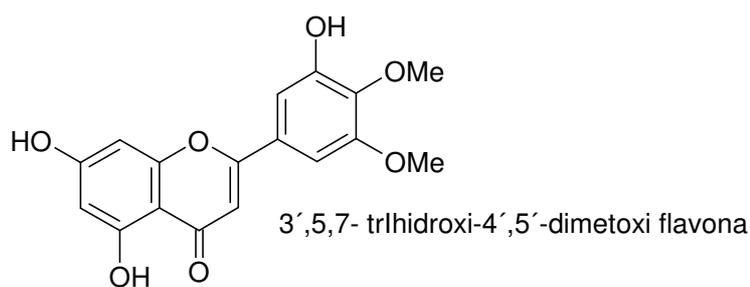
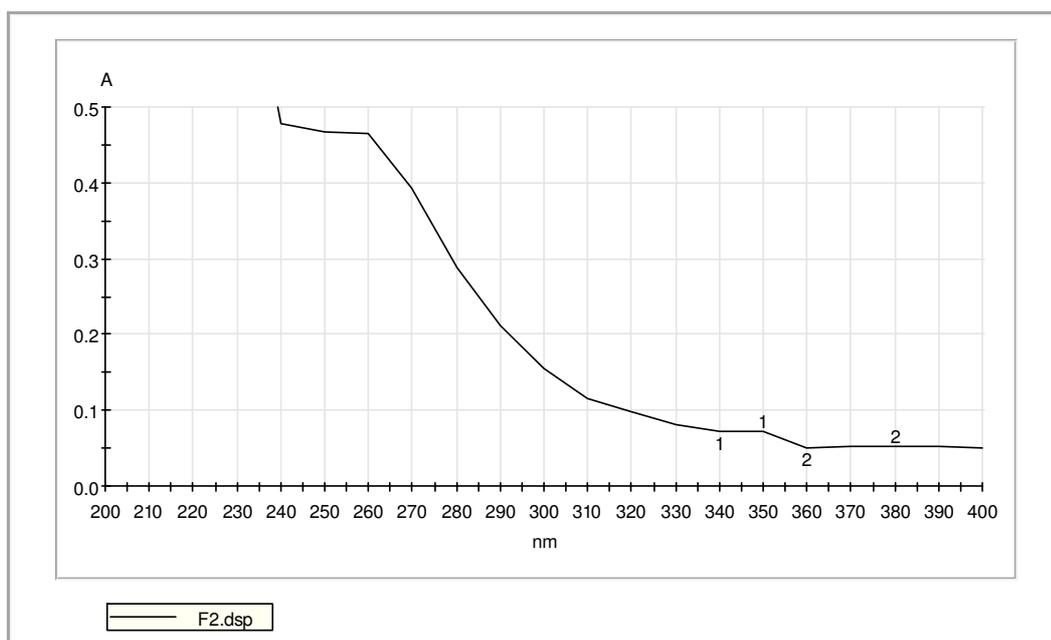
**Leyenda:** (-): No se evidencia presencia; (+): Presencia de trazas;  
(++): Presencia moderada; (+++): Presencia abundante

Los resultados muestran la presencia de compuestos fenólicos, saponinas, flavonoides, donde los polifenoles y saponinas los más abundantes en el extracto y serían los responsables del efecto antioxidante.



**Figura 11. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F1 del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi”.**

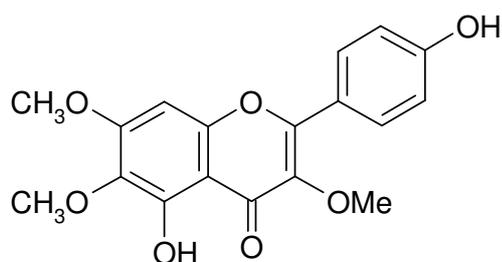
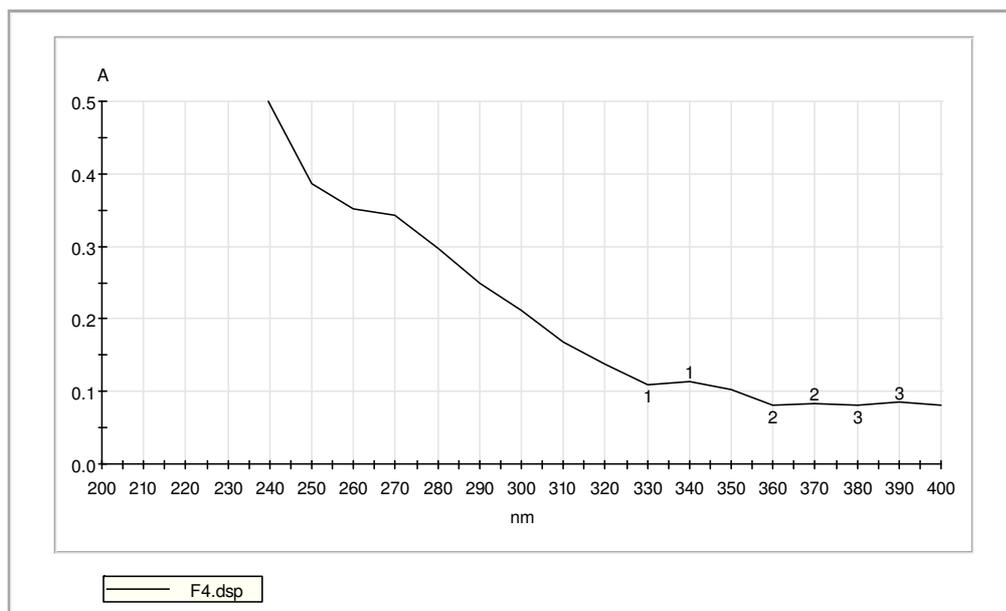
El espectrograma de la F1 corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 280 y 350 nm, la molécula presenta tres hidroxilos libres en las posiciones 5, 7 y 8 del núcleo A y un grupo hidroxilo en la posición 4' y dos metoxi en la posición 3', 5' del núcleo B, por consiguiente se propone la estructura de la flavona: 4', 5, 7, 8-tetrahidroxi-3', 5'-dimetoxi flavona.



$$\lambda_{\text{max}} : 268, 350 \text{ nm}$$

**Figura 12. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F2 del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi”.**

El espectrograma de la F2 corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 268 y 350 nm, la molécula presenta dos hidroxilos libres en las posiciones 5 y 7 del núcleo A, además un grupo hidroxilo en la posición 3' y dos grupos metoxi en la posición 4' y 5' del núcleo B, por consiguiente se propone la estructura de la flavona: 3' 5, 7-trihidroxi-4', 5'-dimetoxi flavona.

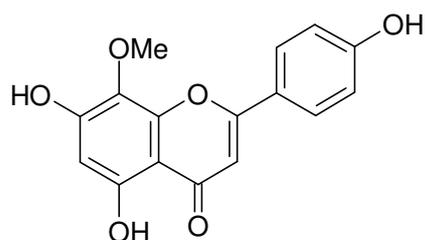
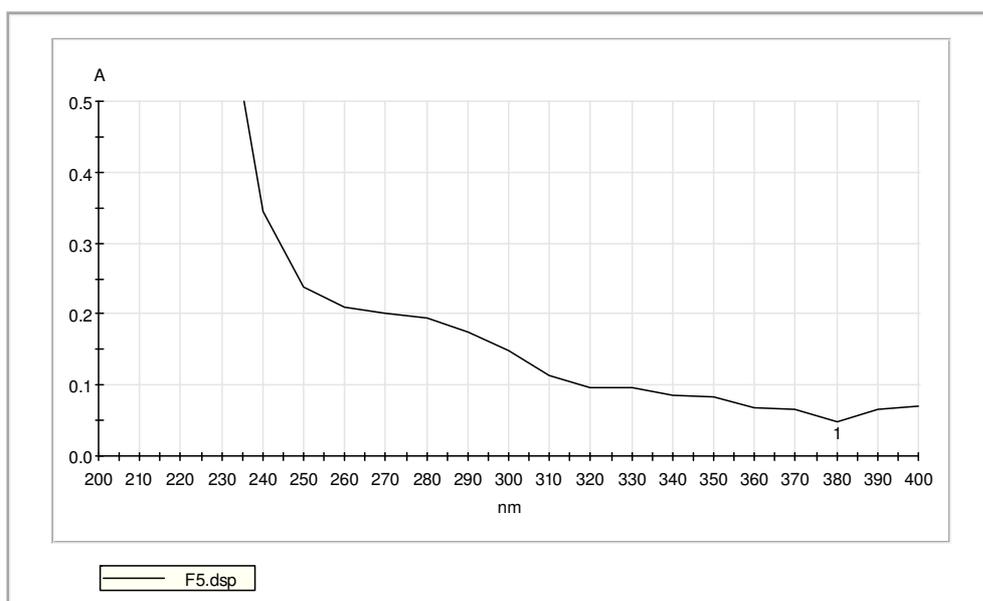


4',5- dihidroxi-3,6,7-trimetoxi flavona  
PENDULETIN

$$\lambda_{\max} : 272, 340 \text{ nm}$$

**Figura 13. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F4 del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi”.**

El espectrograma de la F4 corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 272 y 340 nm, la molécula presenta un hidroxilo libre en la posición 5 y tres grupos metoxi en la posiciones 3, 6 y 7 del núcleo A y un grupo hidroxilo en la posición 4' del núcleo B, por consiguiente se propone la estructura de la flavona: 4' 5- dihidroxi- 3, 6, 7- trimetoxi flavona (PENDULETIN).

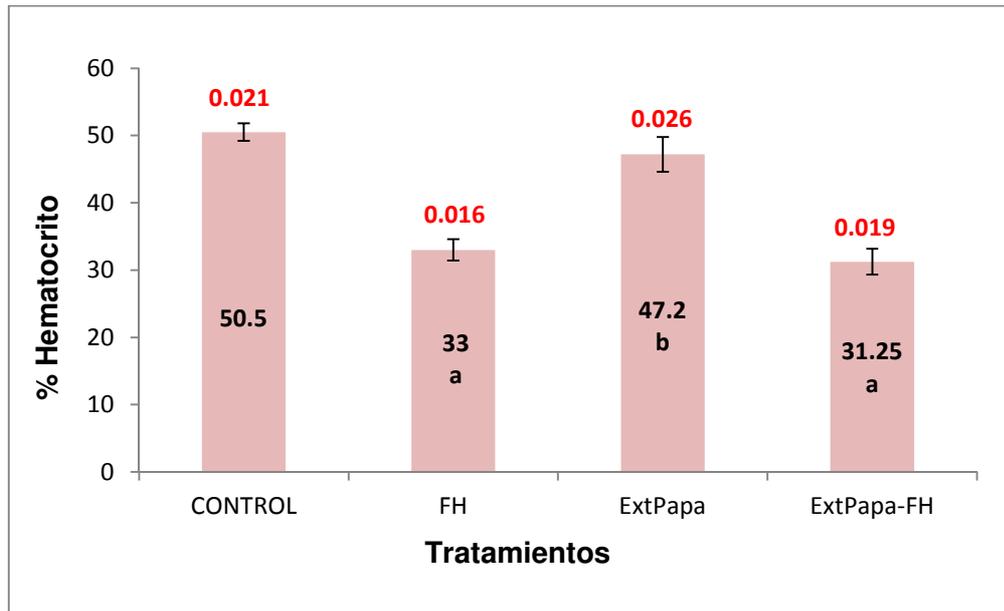


4',5,7- trihidroxi-8-metoxi flavona

$$\lambda_{\text{max}} : 275, 333 \text{ nm}$$

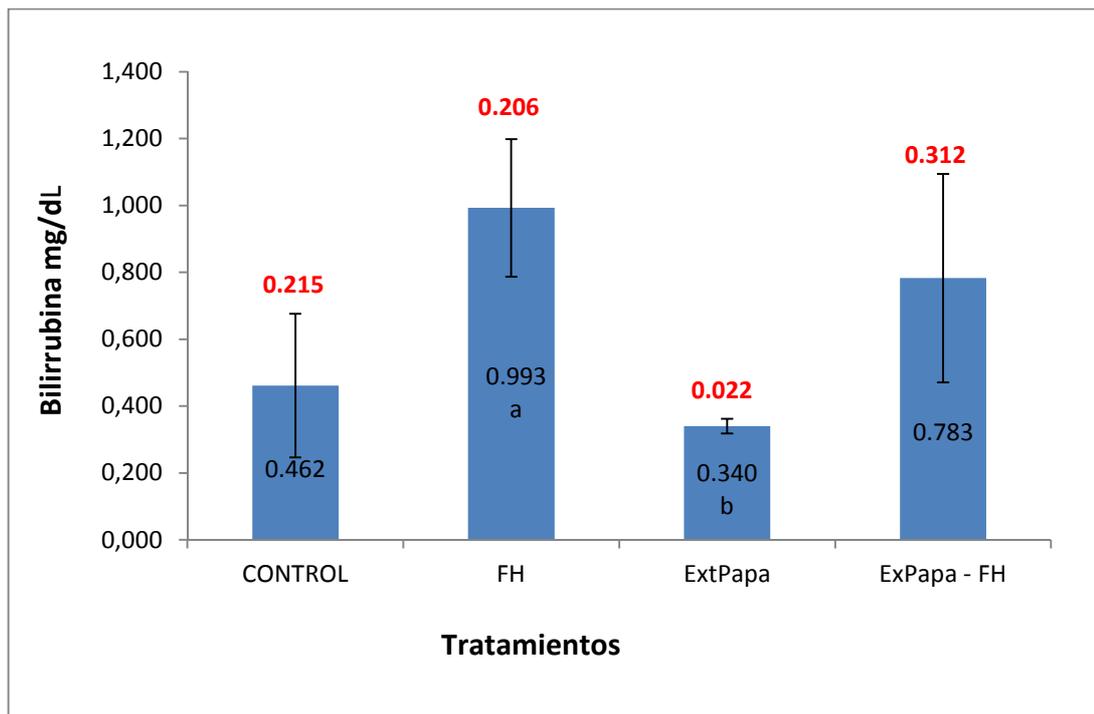
**Figura 14. Espectro UV y caracterización química del flavonoide identificado en la fracción F5 del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi”.**

El espectrograma de la F5 corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 275 y 333 nm, la molécula presenta dos hidroxilos libres en las posiciones 5 y 7, un grupo metoxi en la posición 8 del núcleo A y un hidroxilo en la posición 4' del núcleo B, por consiguiente se propone la siguiente estructura química de la flavona: 4', 5, 7-trihidroxi-8-metoxiflavona.



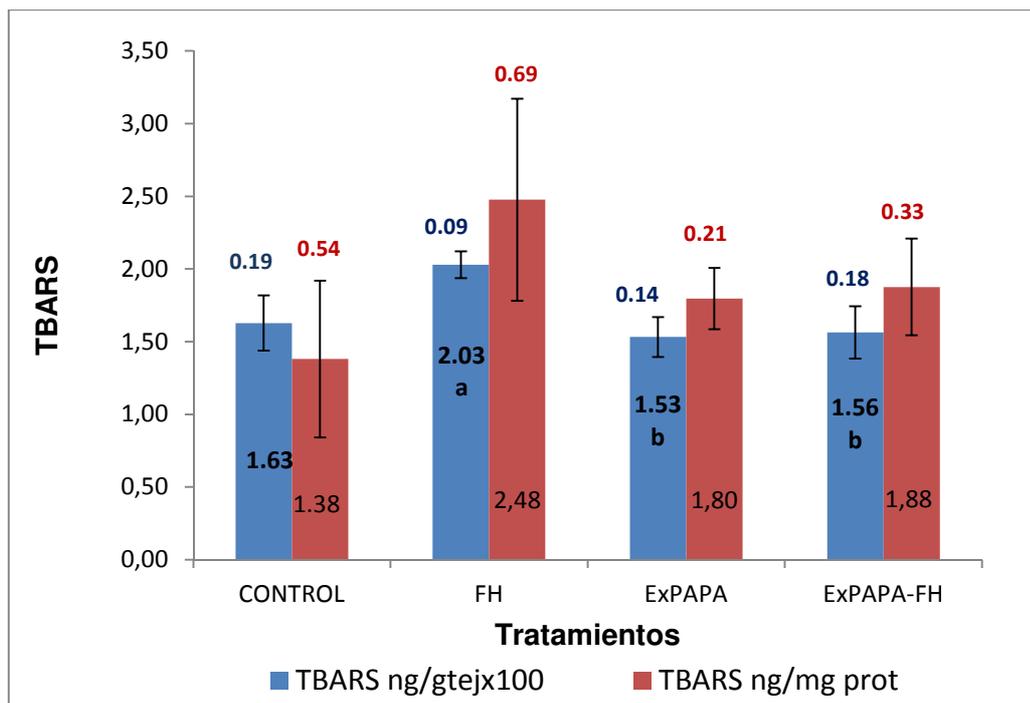
**Gráfico 1. Hiperbilirrubinemia por inducción de anemia hemolítica expresada en Hematocrito.**

Los resultados muestran la efectividad de la Fenilhidrazina para producir una disminución del hematocrito. La disminución del hematocrito se observa en el grupo FH (33%) y grupo ExtPapa-FH (31.25%) con respecto al grupo control (50.5%). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) están expresadas con la letra (a) con respecto al grupo control y con la letra (b) con respecto al grupo FH.



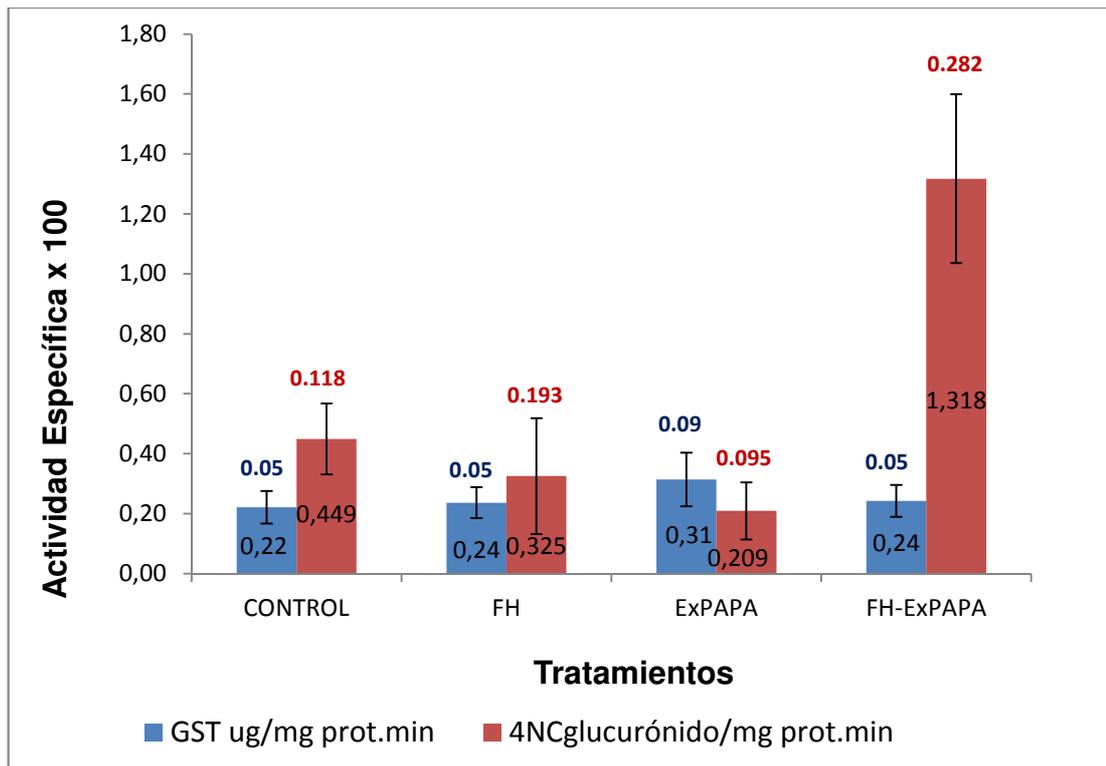
**Gráfico 2. Hiperbilirrubinemia por inducción de anemia hemolítica expresada en niveles plasmáticos de bilirrubina total.**

El gráfico muestra la efectividad de la Fenilhidrazina para producir hiperbilirrubinemia, que se produce por la anemia hemolítica observándose un aumento de los valores de bilirrubina en el grupo FH (0.993 mg/dL) y grupo ExtPapa-FH (0.783 mg/dL) con respecto al grupo control (0.462 mg/dL). Las diferencias significativas frente al control son expresadas como (a) y las diferencias frente a FH son expresadas como (b), ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 3. Efecto del Extracto de papa en la Lipoperoxidación hepática en estado de hiperbilirrubinemia.**

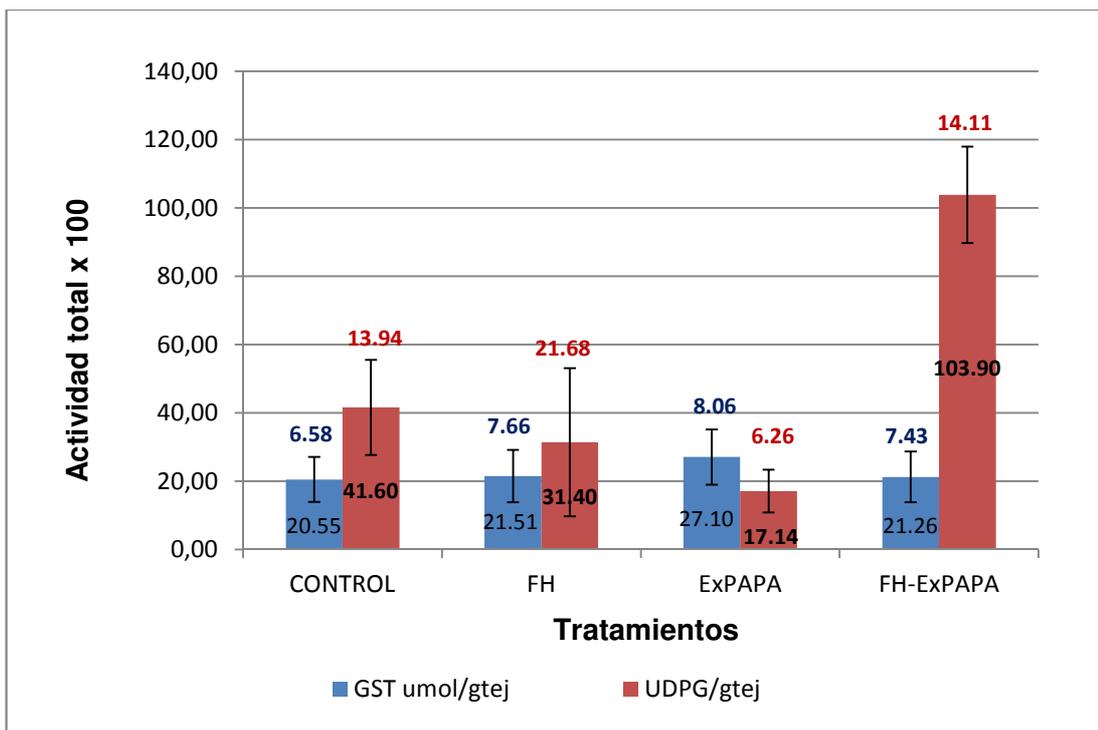
La formación de TBARS como expresión de lipoperoxidación fue significativamente mayor en el grupo FH, el grupo injuriado para hacer hiperbilirrubinemia. En el mismo gráfico, se observa el efecto antilipoperoxidación del extracto de papa de manera significativa al compararlo con el grupo FH. El grupo ExPapa-FH exhibe valores semejantes al grupo control como con el grupo que solo recibió el extracto. Las diferencias significativas frente al control son expresadas como (a) y las diferencias frente a FH como (b), ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 4. Efecto del Extracto de papa sobre la actividad específica de las enzimas de detoxificación de Fase II en hiperbilirrubinemia inducida. Glutation S-transferasa (GST) y UDP-glucurónido transferasa (4NCglucurónido), ( $p < 0,01$ ).**

La actividad específica de la UDP-glucuroniltransferasa aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) en el grupo FH-ExPapa frente a los otros tres grupos; pero el grupo tratado solo con ExPapa exhibe un ligero incremento de la actividad enzimática con respecto al control.

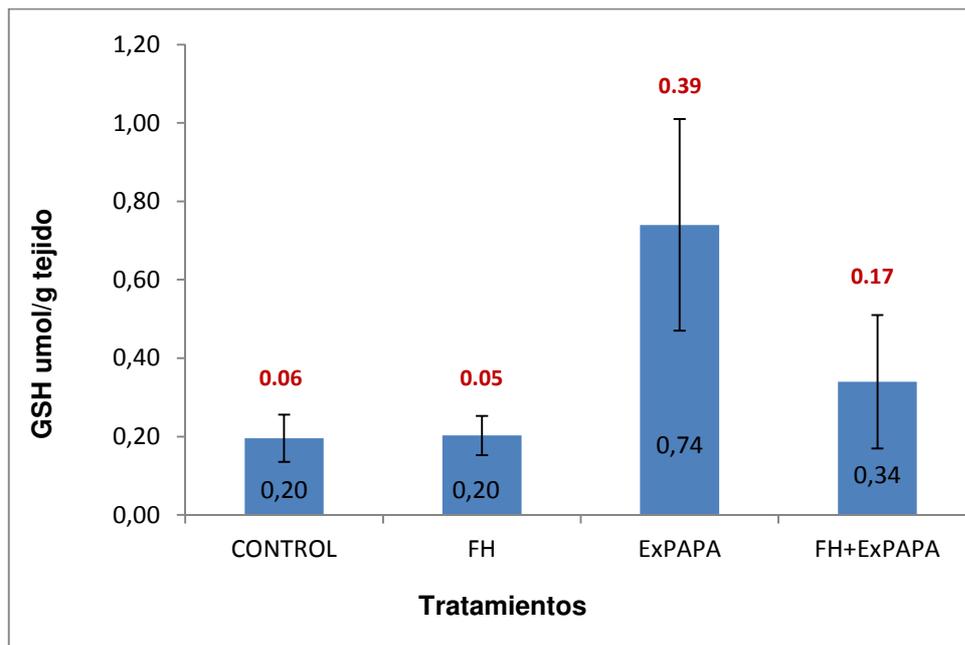
Sin embargo, la actividad específica de la GST no exhibe ninguna diferencia significativa en los cuatro grupos.



**Gráfico 5. Efecto del Extracto de papa sobre la actividad total de las enzimas de detoxificación de Fase II en hiperbilirrubinemia inducida. Glutación S-transferasa (GST) y UDP-glucurónido transferasa (4NCglucurónido), ( $p < 0,01$ ).**

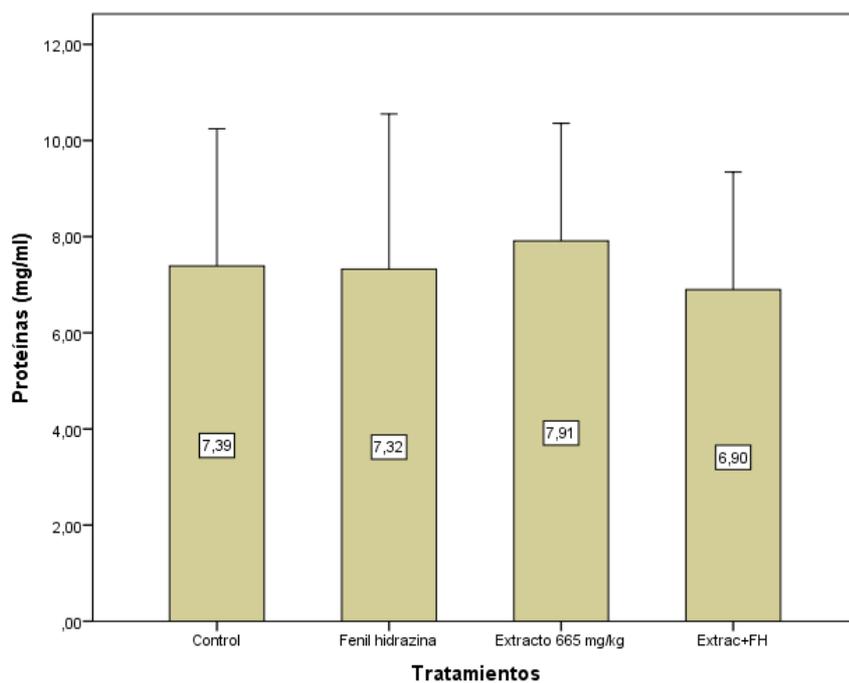
La actividad total de la UDP-glucuroniltransferasa aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) en el grupo FH-ExPapa frente a los otros tres grupos; pero se ha observado este comportamiento en el grupo tratado solo con ExPapa que exhibe una disminución de la actividad enzimática con respecto al control.

Sin embargo, la actividad total de la GST no exhibe ninguna diferencia significativa en los cuatro grupos.



**Gráfico 6. Efecto del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” sobre la concentración del GSH total en estado de hiperbilirrubinemia. ( $p < 0,01$ ).**

La concentración del GSH total fue significativamente mayor en el grupo ExPapa, respecto al Control y al grupo injuriado para hacer hiperbilirrubinemia. Así mismo se observa el efecto antioxidante no enzimático del extracto de papa nativa de manera significativa al compararlo con el grupo FH. El grupo ExPapa-FH se incrementa de manera significativa ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo control y el grupo que solo recibió FH. Estos resultados se explicarían porque a la dosis de extracto empleado, sus metabolitos secundarios antioxidantes como los polifenoles y los mecanismos antioxidantes a nivel hepático estarían controlando el estrés oxidativo.



**Gráfico 7. Efecto del extracto de papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” sobre los niveles de proteínas en el tejido hepático en un modelo de hiperbilirrubinemia.**

En relación a los niveles de proteínas en hígado no se han encontrado diferencias significativas entre todos los tratamientos.

## CAPITULO 5. DISCUSIÓN

La determinación de la composición química de los cultivares de papa nativa, tales como la fibra, grasa, proteínas, carbohidratos, minerales y vitamina C, tiene importancia porque representa su consumo en poblaciones indígenas donde se conservan y consumen las papas nativas, asimismo la confirmación de la presencia de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes tales como las antocianinas, polifenoles y carotenos, permiten determinar el aporte de estas sustancias no solo a la alimentación sino también a la salud de la población consumidora.

En la marcha fitoquímica realizada en el extracto de la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” se encontró la presencia de compuestos fenólicos, saponinas, flavonoides (Tabla 1), los resultados muestran que son los polifenoles y saponinas los más abundantes en el extracto (Anexo 2) y serían los responsables del efecto antioxidante. Los polifenoles también fueron reportados en estudios realizados por Villacréz y col., (2007), así mismo según el CIP, la papa tiene un alto contenido de carbohidratos (principalmente almidón), una cantidad importante de vitaminas hidrosolubles, minerales, fibras y proteínas de elevado valor nutritivo.

No obstante, la característica que permite incluir a la papa dentro de los alimentos funcionales es su contenido de los denominados compuestos antioxidantes (Suárez y col., 2012). Los estudios previos en muestras de papas nativas han mostrado su composición en polifenoles y flavonoides (Suárez y col., 2012). Estos metabolitos secundarios están presentes también en frutas, verduras y diversos extractos vegetales; constituyen una excelente fuente de antioxidantes que pueden contribuir a restablecer el equilibrio prooxidante y/o antioxidante en una situación de estrés oxidativo.

En la papa nativa, la cantidad y actividad antioxidante de los polifenoles saludables puede ser entre 1 a 5 veces menor que en otros vegetales, tales como la espinaca y el brócoli. Sin embargo, la papa aporta la mayor cantidad de polifenoles a la dieta humana debido a su elevado consumo. Por otra parte existen muchas otras variedades de papa con mayores niveles de polifenoles saludables. La mayoría de ellas pertenecen a la especie *Solanum tuberosum*, con dos subespecies *andigena* y *tuberosum*.

Estas papas de pulpa y/o piel coloreada contienen niveles de polifenoles saludables comparables a los elevados niveles de estos compuestos encontrados en frutillas y arándanos. Es por eso que las papas *andigena* forman una de las mejores fuentes de polifenoles saludables, con la ventaja adicional de que es más fácil incorporarlas a la dieta tanto por su costo como por su disponibilidad en el mercado durante todas las estaciones (Andrew y col., 2012).

Asimismo los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de ciertos vegetales se deben a la presencia de los polifenoles (Coultate, 1984). Los polifenoles presentes en ciertos alimentos vegetales de colores morados y rojos, actúan como antioxidantes, protegiendo al cuerpo humano del efecto dañino de los radicales libres. Además, por algún otro mecanismo inhiben la iniciación, promoción y progresión de los tumores (Coultate, 1984).

A través de los ensayos cromatográficos se confirmó en el extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* "puca simi" la presencia de los flavonoides, observándose los cromatogramas con luz UV a 254 y 366 nm (Anexo 3) y luego se procedió a su identificación química con el  $\text{FeCl}_3$  5%, NaOH 0,1 M y el reactivo de Shinoda (Anexo 2).

Según Martínez (2005), los flavonoides se reconocen experimentalmente mediante diferentes reacciones químicas de coloración. En la reacción de Shinoda, los flavonoides con el núcleo benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas) producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio metálico seguido de HCl concentrado.

La caracterización química de los flavonoides, se realizó por cromatografía en capa fina unidimensional ascendente de 10 x 15 cm, empleando Sílica Gel G 60 como fase estacionaria en la que se realizó la siembra del extracto y para el fraccionamiento del extracto acuoso se empleó como fase móvil una mezcla de n-butanol-ácido acético-agua en proporciones de 4:2:6 (Anexo 3), verificándose la presencia de los flavonoides por la reacción de Shinoda, obteniéndose un compuesto de color rojo que es un indicador positivo para los flavonoides, luego se procedió a su aislamiento y purificación mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa logrando aislar 5 fracciones (F1, F2, F3, F4 y F5) (Anexo 4), de las cuales 4 fueron purificadas y se caracterizó la estructura química de los flavonoides aislados por espectroscopia UV-Visible en metanol, al analizar los espectros obtenidos de las fracciones F1, F2, F4 y F5 se observó que corresponde a flavonoides del grupo de las flavonas, sugiriéndose las estructuras de 4 flavonoides por comparación con espectros UV obtenidos en la literatura por Mabry y col., (1970).

Según Martínez M. (2005), los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la función cinamoílo y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (función benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción.

La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituídos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm. La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento (Mabry y col., 1970).

La fracción F1 de acuerdo al espectrograma UV obtenido en metanol corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 280 y 350 nm, y de acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Mabry y col., (1970), la molécula presenta tres

hidroxilos libres en las posiciones 5, 7 y 8 del núcleo A y un grupo hidroxilo en la posición 4' y dos metoxi en la posición 3', 5' del núcleo B, por consiguiente se propone la siguiente estructura de la flavona: 4', 5, 7, 8-tetrahidroxi-3', 5'-dimetoxi flavona. (Figura 11).

La fracción F2 de acuerdo al espectrograma UV obtenido en metanol corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 268 y 350 nm respectivamente y de acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Mabry y col., (1970), la molécula presenta dos hidroxilos libres en las posiciones 5 y 7 del núcleo A, además un grupo hidroxilo en la posición 3' y dos grupos metoxi en la posición 4' y 5' del núcleo B, por consiguiente se propone la siguiente estructura de la flavona: 3' 5, 7-trihidroxi-4', 5'-dimetoxi flavona (Figura 12).

La fracción F4 de acuerdo al espectrograma UV obtenido en metanol corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 272 y 340 nm respectivamente y de acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Mabry y col., (1970), la molécula presenta un hidroxilo libre en la posición 5 y tres grupos metoxi en las posiciones 3, 6 y 7 del núcleo A y un grupo hidroxilo en la posición 4' del núcleo B, por consiguiente se propone la siguiente estructura de la flavona: 4' 5-dihidroxi- 3, 6, 7- trimetoxi flavona (PENDULETIN) (Figura 13).

El espectrograma UV de la fracción F5 corresponde al núcleo básico de una flavona ya que presenta dos picos muy característicos a 275 y 333 nm respectivamente y de acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Marby y col., (1970), la molécula presenta dos hidroxilos libres en las posiciones 5 y 7, un grupo metoxi en la posición 8 del núcleo A y un hidroxilo en la posición 4' del núcleo B, por consiguiente se propone la siguiente estructura química de la flavona: 4', 5, 7-trihidroxi-8-metoxiflavona (Figura 14).

La hiperbilirrubinemia inducida por fenilhidrazina se produce por la anemia hemolítica que es medida por la disminución del hematocrito y el aumento de la bilirrubina total que puede observarse (Gráfico 1 y 2) en las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos tratados.

En ambos gráficos se observa diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con inducción de hiperbilirrubinemia. Igualmente puede observarse que el grupo al que se le administró el extracto de papa conserva ambos parámetros a niveles comparables con el grupo control.

Del mismo modo puede observarse que a nivel plasmático ya se observa una tendencia a la recuperación de la bilirrubina total en el grupo ExPapa-FH, el resultado muestra una disminución marcada de 25% con respecto al grupo con hiperbilirrubinemia. La importancia de este resultado es por el significado de la participación de metabolitos secundarios del extracto de papa nativa en este grupo. Los probables mecanismos bioquímicos se podrían explicar con los siguientes resultados.

La patología debida a la fenilhidrazina se ha estudiado a través de experimentos con animales y observaciones clínicas, la información sobre los efectos de la fenilhidrazina en el hombre se ha obtenido a partir del uso del clorhidrato de fenilhidrazina con fines terapéuticos. Los efectos observados fueron anemia hemolítica, con hiperbilirrubinemia y urobilinuria, aparición de cuerpos de Heinz, lesiones hepáticas con hepatomegalia, ictericia y orina muy oscura por contener fenoles y también, en ocasiones, manifestaciones renales (Mager y col., 2009).

La formación de TBARS como expresión de lipoperoxidación, es decir daño a nivel de lípidos principalmente a nivel de membranas fue significativamente mayor en el grupo FH, el grupo injuriado para hacer hiperbilirrubinemia (Gráfico 3). En el mismo gráfico, el efecto antilipoperoxidación del extracto de papa puede observarse de manera significativa al compararlo con el grupo FH ( $p < 0,05$ ) cuando se expresa en ng/g tejido y no así cuando se expresa en ng/mg de proteína. El grupo ExPapa-FH exhibe valores semejantes al grupo control como con el grupo que solo recibió el extracto. Se explicaría porque a la dosis de extracto empleada, sus metabolitos secundarios antioxidantes como los polifenoles y los mecanismos antioxidantes a nivel hepático estarían controlando el estrés oxidativo.

Estudios realizados con compuestos polifenólicos (especialmente los flavonóides y antocianinas) demuestran su capacidad antioxidante y su

significativa contribución en la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas, hepáticas y enfermedades neurológicas. Los polifenoles son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones- $\pi$  (Kuskoski y col., 2004).

Clásicamente se ha considerado que la bilirrubina es simplemente un “producto final” del catabolismo del Hem, sin embargo desde hace más de veinte años, también se ha considerado que la bilirrubina tiene funciones fisiológicas, a concentraciones normales específicamente como un potente antioxidante y antiinflamatorio y como tal puede evitar la oxidación de lípidos y de otras sustancias de manera más eficiente que la vitamina E, postulándose que es uno de los principales mecanismos de defensa presentes en el suero contra el estrés oxidativo y puede tener efectos protectores pulmonares, cerebrales, hepatobiliares, inmunológicos y cardiovasculares (Otero y col., 2009).

El concepto de la bilirrubina no conjugada como un poderoso antioxidante puede ser la respuesta a la reflexión desde el punto de vista teleológico, sobre cuál sería la necesidad de los mamíferos para involucrar la producción de bilirrubina y no detener la cadena catabólica del Hem hasta biliverdina como lo hacen los anfibios, reptiles y aves (McDonagh, 1979)

Suárez y col, (2009), en el estudio “extracto acuoso de *Lepidium meyenii Walp* (maca) y su papel como adaptógeno, en un modelo animal de resistencia física” encontraron que el efecto protector del extracto en el marcador bioquímico de peroxidación lipídica TBARS, se producía a la dosis de 800 y 1200 mg extracto/kg de peso corporal, dosis superior al empleado en nuestro estudio.

Resultados protectores para la lipoperoxidación también fueron reportados por Toro y col., (2013) en un modelo de hepatotoxicidad inducida por  $\text{CCl}_4$ , igualmente con el mismo modelo, Sotelo y col., (2002), empleando carnosol,

un metabolito fenólico de la *Physalis peruviana* a una dosis de 250 mg/kg de peso. Es importante resaltar que nuestro estudio está basado en un extracto, lo que puede llevar a proponer que algunos de los metabolitos fenólicos del extracto de papa también podrían exhibir semejante o mejor comportamiento.

La actividad específica de la UDP-glucuroniltransferasa aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) en el grupo con hiperbilirrubinemia que recibió fenilhidrazina mas extracto de papa frente a los otros tres grupos (Gráfico 4); el mismo resultado se observa cuando la actividad es expresada en actividad total (Gráfico 5). Sin embargo el grupo tratado solo con extracto de papa exhibe un ligero incremento de la actividad enzimática (40% expresado como actividad específica y 32% expresado como actividad total) con respecto al control.

Sin embargo, en el mismo gráfico puede observarse que el resultado de la actividad específica y total de la glutatión S-transferasa no exhibe ninguna diferencia significativa en los cuatro grupos.

Las reacciones de fase II facilitan la conjugación de los xenobióticos, o de los metabolitos generados en las reacciones de fase I, con moléculas endógenas tales como el ácido glucurónico, glutatión, sulfatos o aminoácidos. La UDP-glucuroniltransferasa tiene un rol importante en la eliminación de una serie de sustancias endógenas especialmente la bilirrubina, producto de la degradación e hemoglobina. La reacción del donador ácido UDP-glucurónico se produce por conjugación con grupos funcionales como hidroxilo, carboxilo, amino o tiol de una molécula blanco activada (aglicona) formándose O-, N-, ó S-glucurónidos, respectivamente. La enzima forma un  $\beta$ -D-glucurónido, que produce un incremento de la polaridad de la aglicona de manera que puede ser más fácilmente excretado por la bilis o la orina (Patana Anne-Sisko y col., 2007).

Las glucuroniltransferasas son una superfamilia de enzimas, de las isoformas de dicha enzima, sólo la UGT1A1 que se encuentra más en el tejido hepático es la que contribuye de forma significativa al proceso de conjugación de la bilirrubina en humanos (Murray y col., 2009). En el

presente estudio se observa que el extracto de papa incrementa de manera significativa la actividad de esta enzima. Esta investigación inicial no nos permite todavía expresar el mecanismo de activación, y la complicación aumenta debido a la gran diversidad de isoformas de esta enzima.

Desde el punto de vista bioquímico son numerosos los estudios que han mostrado que los polifenoles especialmente los flavonoides (Tabla 1), poseen propiedades antioxidantes, inhibiendo la peroxidación lipídica y captando radicales libres como hidroxilo, supéroxido y alcoxi radical (Sichel y col., 1991). Normalmente esta actividad antioxidante se debe a la proximidad de los grupos hidroxilo (posición 3' y 4'), un doble enlace entre C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> conjugado con un grupo carbonilo en posición C<sub>4</sub>, y grupos hidroxilo en C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>. Por lo que se les atribuyen propiedades hepatoprotectoras (Kawada y col., 1998), debido a que estimularían la actividad de la UDP-glucuroniltransferasa (Gráfico 4 y 5).

En el caso de la Glutación S-transferasa, se trata de un grupo importante de proteínas halladas en dos grandes superfamilias, la más abundante es la citosólica o soluble, puede constituir hasta el 10% de las proteínas solubles del hepatocito. Aún con estas características, el inductor de la hiperbilirrubinemia empleado en este estudio, no es sustrato para esta enzima, razón por la que no se ha hallado diferencias significativas en los cuatro grupos. Sin embargo puede notarse que el grupo tratado solo con extracto de papa exhibe un ligero incremento de la actividad enzimática (40% expresado como actividad específica y 32% expresado como actividad total) con respecto al control.

Puede proponerse que algunos metabolitos secundarios de la papa pueden estar participando como activadores o sustratos de esta enzima; teniendo en cuenta que sus sustratos pueden ser grupos con epóxidos, carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados, quinonas entre otros. Esta enzima además cumple otras funciones bioquímicas diferentes a la conjugación (Sherratt and Hayes, 2001) como la actividad antioxidante. Luego los metabolitos secundarios del extracto de papa, podrían estar participando a nivel de las otras actividades de esta enzima.

Entre las defensas antioxidantes no enzimáticas ocupa un lugar predominante el glutatión (GSH). Esta pequeña molécula protege a la célula contra diferentes especies oxidantes y se ha comprobado que participa muy activamente en numerosos desórdenes neurodegenerativos (Klatt y Lamas, 2000). En los resultados obtenidos se observa que el extracto de papa nativa “puca simi” incrementa de manera significativa la concentración del GSH total ( $p < 0,05$ ).

La concentración del GSH total como expresión de la defensa antioxidante no enzimática, es decir daño a nivel de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos fue significativamente mayor en el grupo ExPapa, respecto al Control y al grupo injuriado para hacer hiperbilirrubinemia (Gráfico 6). En el mismo gráfico, el efecto antioxidante no enzimático del extracto de papa nativa puede observarse de manera significativa al compararlo con el grupo FH. El grupo ExPapa-FH se incrementa de manera significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo control y el grupo que solo recibió FH. Estos resultados se explicarían porque a la dosis de extracto empleado, sus metabolitos secundarios antioxidantes como los polifenoles y los mecanismos antioxidantes a nivel hepático estarían controlando el estrés oxidativo.

En estudios *in vivo*, se ha demostrado que la silimarina y, particularmente la silibinina (flavonoide), tiene acción protectora contra diversos hepatotóxicos como el acetaminofeno, el etanol, el tetraclorometano, el tolueno, el xileno, la D - galactosamina, la anatoxina y la dimetilnitrosamina (Chrungoo y col., 1997; Di Sario y col., 2005). También se ha demostrado que protege a los hepatocitos del daño isquémico (Wu y col., 1993) y la toxicidad por hierro y por plomo (Shalan y col., 2005).

Finalmente la confirmación de la presencia de la presencia de componentes antioxidantes en la papa nativa *Solanum tuberosum* “puca simi” , tales como los polifenoles, flavonoides y antocianinas permitirán determinar el aporte de estos productos no solo a la alimentación sino también a la salud de la población consumidora, como las enfermedades hepáticas..

En relación a los niveles de proteínas en hígado no se han encontrado diferencias significativas entre todos los tratamientos (Gráfico 7).

## CAPITULO 6. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto acuoso de papa nativa "puca simi", son: Flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas; y se ha caracterizado la estructura química de cuatro flavonoides: 4', 5, 7, 8-tetrahidroxi-3', 5'-dimetoxi flavona; 3' 5, 7-trihidroxi-4', 5'-dimetoxi flavona; 4' 5-dihidroxi- 3, 6, 7- trimetoxi flavona; 4', 5, 7-trihidroxi-8-metoxiflavona.
2. El extracto acuoso de la papa nativa "puca simi" incrementa de manera significativa ( $p < 0,01$ ) la actividad específica y total de la UDP-glucuroniltransferasa en el grupo cuatro, no modifica de manera significativa la actividad específica y total de la glutatión S-transferasa en los cuatro grupos.
3. El extracto acuoso de papa nativa "puca simi" incrementa de manera significativa la concentración del GSH total en el grupo tratado con ExPapa y ExPapa + FH respecto al control y FH ( $p < 0,05$ ).
4. El extracto acuoso de papa nativa "puca simi" a la dosis empleada muestra una disminución significativa de la peroxidación lipídica ( $p < 0,05$ ), en el que sus metabolitos secundarios como los polifenoles estarían controlando el estrés oxidativo a nivel hepático.

## **CAPITULO 7. RECOMENDACIONES**

1. Realizar otros estudios químicos que permitan separar y caracterizar la estructura química los metabolitos secundarios más abundantes hallados en el presente estudio y realizar ensayos para evaluar su actividad biológica.
2. Realizar ensayos para evaluar la actividad de estos metabolitos secundarios en otros tejidos como el cerebro, corazón, riñón, etc.
3. Realizar otros estudios sobre la actividad de las enzimas de Fase II empleando otros modelos experimentales.
4. Realizar estudios que propongan su conservación, propagación y uso racional, de otras especies de papa nativa, porque hoy es considerada como un recurso natural muy promisorio.

## CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrew, A., Clausen, A., Lanteri, M., Valiñas, M., Silvera, M., Martínez, M., Gómez, D., Barbini, L., Castaño, E. (2012). Polifenoles saludables en papa: Su posible uso como agentes terapéuticos. Instituto de Investigaciones Biológicas- IIB. Primer Congreso Nacional de agregado de valor en origen. Córdoba Argentina.
2. Beutler, E. (1969). Drug induced hemolytic anemia. *Pharmac Rev.* 21: 73-103.
3. Boyne, A., Ellman, C. (1972). Assay for glutathione. *Anal Biochem.*46: 639-53.
4. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr.Rev.* 56, 317-333.
5. Brosen, K. (1995). Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P4501A2. *Clin Pharmacokinet*; 29 Suppl 1: 20-5.
6. Brunton, L., Lazo, J., Parker, K. (2007). En: Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.
7. Brush S, Taylor J. (1995). Diversidad biológica en el cultivo de papa. En: Brush, S., Mayer, E. (Ed.). *La chacra de papa: economía y ecología*. Lima: CEPES.
8. Bustíos, C., Dávalos, M., Román, R., Zumaeta, E. (2007). Características epidemiológicas y clínicas de la cirrosis hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud. *Rev Gastroenterol Perú.* 27:238-45.
9. Caccia, S., Garattini, S. (1990). Formation of active metabolites of psychotropic drugs. An updated review of their significance. *Clin Pharmacokinet*; 18: 434-59.
10. Chrungoo, V., Singh, K., Singh, J. (1997). Silymarin mediated differential modulation of toxicity induced by carbon tetrachloride, paracetamol and D-galactosamine in freshly isolated rat hepatocytes. *Indian J Exp Biol* 35(6), 611-617.

11. Claverías, R., Quispe, C. (2002). Biodiversidad cultivada: una estrategia campesina para superar la pobreza y relacionarse con el mercado. En: Pulgar-Vidal M, Zegarra E, Urrutia J. (Eds). *Perú: el problema agrario en debate*. Lima: Seminario Permanente de Investigación Agraria (SEPIA IX), pp. 180-204.
12. Coultate, P. (1984). Alimentos, química de sus componentes: Pigmentos. Zaragoza España. Editorial Acribia. pp.104 -128.
13. Cuesta, X., Rivadeneira, J., Yáñez, E., Delgado, R., Tello, C., Riera, W., Hinojosa, L., Carrera, E., Reinoso, I. (2010). Caracterización de papas nativas ecuatorianas para resistencia a factores bióticos, abióticos y calidad. Centro internacional de la papa. CIP. PAPANAT.
14. CYTED. (1996). Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el Desarrollo. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. Editor Mohabir P. Gupta Ph. D. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo - Subprograma de Química fina Farmacéutica. p. 87-93.
15. Díaz, J., Juárez, J. (2007). Bioquímica. Un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Primera edición.
16. Di Giulio, R.T. (1991). Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination. En: *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*. Mayes y Barron (eds.). Vol. 14, pp. 15-31.
17. Di Sario, A., Bendia, E., Taffetani, S., Omenetti, A., Candelaresi, C., Marzoni, M., De Minicis, M., Benedetti, A. (2005). Hepatoprotective and antifibrotic effect of a new silybin-phosphatidylcholine -Vitamin E complex in rats. *Dig Liver Dis* 37(11), 869-876.
18. Ellman, G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 82: 70-77.
19. Engel, F. (1970). Explorations of the Chilca Canyon, Perú. En: *Current Anthropology*. Chicago. 11 (1), pp. 55-58.
20. Fevery, J. (2008). Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver International*. Blackwell Munksgaard. ISSN 1478-3223.

21. Goldberg B, Stern A. (1977). The mechanism of oxidative hemolysis produced by phenylhydrazine. *Mol Pharmacol*. 13: 832-839.
22. Gonzalez, FJ., Gelboin, HV. (1994). Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev*; 26: 165-83.
23. Griffith, O. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinilpyridine. *Anal Biochem*. 106: 207-12.
24. Gutiérrez, R. (2008). *Papas nativas, desafiando el cambio climático*. Intermediate Technology Development Group, ITDG.
25. Halliwell, B., Gutteridge, J. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. New York.
26. Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 57 (Suppl), 715s-725s.
27. Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem*. 249, 7130-7139.
28. Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: *Functional metabolism: regulation and adaptation*, Storey HB (Ed) p 319-368.
29. Huamán, Z., Spooner, D. (2002). Reclassification of Landrace Populations of Cultivated Potatoes (*Solanum Sect. Petota*). En: *American Journal of Botany*. Lancaster. 89 (6), pp. 947-965.
30. Hawkes, J. (1990). *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Londres: Belhaven Press.
31. Ishii, Y., Nurrochmad, A., Yamada, H. (2010). Modulation of UDP-Glucuronosyltransferase Activity by Endogenous Compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet*. 25 (2): pp. 134–148.
32. Jain, SK., Hochstein, P. (1979). Generation of superoxide radicals by hydrazine. Its role in phenylhydrazine induced hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta* 586: 128-134.
33. Kawada, N., Seki, S., Inoue, M., Kuroki, T. (1998): "Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and kupffer cells", *Hepatology*, 27: 1265-1274.

34. Klatt, P., Lamas, S. (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 267(16), 4928-4944.
35. Kuskoski M., Asuero A., García-parilla C., Troncoso A., Fett R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 24(4): 691-693.
36. Lehninger. Principios de Bioquímica. Quinta edición. Editorial Omega.
37. Letelier, M., Pimentel, A., Pino, P., Lepe, A., Faúndez, M., Aracena, P., & Speisky, H. (2005). Microsomal UDP-Glucuronyltransferase in Rat Liver: Oxidative Activation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 96(6), 480-486.
38. Livingstone, D.R. (1991). Towards a specific index of impact by organic pollution for marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 151-155.
39. Lock de Ugaz. (1994). Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio los Productos Naturales. Segunda Edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
40. López, M. (2008). Papa nativa y cultivos andinos. Instituto de la papa y cultivos andinos. IPACA. Universidad nacional de Trujillo.
41. Lowry, N.J., Rosebrough, A.L., Farr y R.J. Randall. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
42. Mabry, T., Markhan, K., Thomas, M. (1970). The systematic identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. pp: 16-147.
43. MacDonagh, AF. (1979). Bile pigments: bilatrienes and 5, 15 biladiens. En: Dolphin D (Editor). *The porphyrins*. New Cork, NY: Academic Press p. 293-491.
44. MacDougall, C., Chambers, H. (2011). *Protein Synthesis Inhibitors and Miscellaneous Antibacterial Agents*. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (12 ed.). New York: McGraw-Hill. Retrieved October.

45. Mager, J., Osinsky, D., Markkanen, P. (2009). Guía de productos químicos. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Base de datos de sustancias peligrosas. 4ta Edición.
46. Martínez, A. (2005). Los flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
47. Mathews, C., Van Holde, E., Ahern, K. (2006). Bioquímica. Tercera edición. Editorial Pearson.
48. Ministerio de Educación. (2000). Ley 11794, Perú – Ley de Protección a los Animales Domésticos y a los Animales Silvestres Mantenidos en Cautiverio. Creación del Comité Nacional de Protección de Animales y Comités de Protección de Animales.
49. Minotti, G. Aust, S. (1992). Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, 27(3): 219-226.
50. Miranda, M., Cuellar, A. (2000). Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana - Cuba: Editorial Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana. pp. 23-33.
51. Mulichak, A., Lu, W., Losey, H., Walsh, C., Garavito, R. (2004). Crystal structure of vancosaminyltransferase GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway: interactions with acceptor and nucleotide ligands. *Biochemistry* 43 (18): 5170–5180.
52. Muriel, P. (1997). Peroxidation of lipids and liver damage. En: Oxidants, antioxidants and free radicals. Baskin y Salem (eds.), Taylor & Francis, New York. Vol. 14, pp. 237-257.
53. Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., Weil, A. (2009). Bioquímica ilustrada de Harper. 28 Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
54. Nakanishi, A., Kinuta, K., Abe, T., Araki, K., Yoshida, Y., Liang, S., Li, S., Takei, K., Kinuta, M. (2003). Formation of meso, N-diphenylprotoporphyrin IX by an aerobic reaction of phenylhydrazine with oxyhemoglobins. *Acta Med Okayama*. 57:249–256.
55. Naughton, B., Dornfest, B., Bush, M., Carlson, C., Lapin, D. (1990). Immune activation is associated with phenylhydrazine induced anemia in the rat. *J Lab Clin Med*. 116: 498-507.

56. Ochoa, C.M. (1999) Las Papas de Sudamérica: Perú (Parte 1). Allen Press, Kansas, Estados Unidos (USA).
57. Otero W., Velasco H., Sandoval H. (2009). Papel protector de la bilirrubina en el ser humano Unidad de Gastroenterología, Universidad Nacional de Colombia.
58. Patana Anne-Sisko, Kurkela Mika, Goldman Adrian and Finel Moshe. (2007). The Human UDP-Glucuronosyltransferase: Identification of Key Residues within the Nucleotide-Sugar Binding Site. *Molecular Pharmacology*. September, 72 (3): 604-611.
59. PAPANAT. (2010). I Congreso Internacional de Investigación y Desarrollo de Papas Nativas. Quito-Ecuador.
60. Pirmohamed, M., Madden, S., Park, BK. (1996). Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as a pathogenic mechanism. *Clin Pharmacokinet*; 31: 215-30.
61. Ryan, T.P. y Aust, S.D. (1992). The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Critic. Rev. Toxicol.*, 22(1): 119-141.
62. Sánchez, C., Rodeiroli, G., & Delgado, R. (2005) Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4): 619-26.
63. Shalan, M., Mostafa, M., Hassouna, M., El-Nabi, S., El-Refaie, A. (2005). Amelioration of lead toxicity on rat liver with Vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology* 206(1), 1-15.
64. Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Red Iberoamericana de productos fitoterapéuticos. Subprograma X del CYTED.
65. Sherratt, J., and Hayes, D. (2001). Glutathione S-transferases in Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. Edited by Costas Ioannides. Ed. John Wiley & Sons Ltd. ISBN (Electronic) 0-470-84630-5. Pp 319-352.
66. Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., De Bilio, A., Bonomo, R. (1991): "In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub><sup>·-</sup>", *Free Rad. Biol. Med.*, 11: 1-8.
67. Simpson, B. (1975). Pleistocene Changes in Flora of the High Tropical Andes. En: *Paleobiology*. Lancaster. Vol 1, N° 3, pp. 273-294.

68. Sotelo-Felix, J., Martinez-Fong, D., Muriel, P. (2002). Protective effect of carnosol on CCl<sub>4</sub>- induced acute liver damage in rats. *Europ J Gastr Hepatol.* 14(9):1001-6.
69. Stevenson, D., Hurst, R. (2007). Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2900-2916.
70. Suárez, S., Oré, R., Arnao, I., Rojas, L., Trabucco, J. (2009). Extracto acuoso de *Lepidium meyenii* Walp (maca) y su papel como adaptógeno, en un modelo animal de resistencia física. *Anales de la Facultad de Medicina*, Sin mes, 181-185.
71. Suárez, S., Trabucco, J., Oré, R., Arnao, I., Rojas, L., y Ramírez, J. (2012). Potencial antioxidante de 62 variedades de papas nativas del sur andino del Perú. *An Fac Med.*; 73:S36, Supl 1.
72. Toro, A., Reina, M., Aragón, N., Diana, M., Ospina, G., Luis, F. (2013). Hepatoprotective effect of calyces extract of *Physalis peruviana* on hepatotoxicity induced by CCl<sub>4</sub> in wistar rats. *Vitae.* 125-132.
73. Townsend, DM., Manevich, Y., Lin, H., Hutchens, S., Pazoles, CJ., and Tew, KD. (2009). Novel Role for Glutathione S-Transferase. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 284, No. 1, pp. 436–445.
74. Ugent, D., Ochoa, C. (2006). *La Etnobotánica del Perú. Desde la prehistoria hasta el presente.* Lima: Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC).
75. Universidad Católica de Chile. (2000). Polifenoles con propiedades anticancerígenas. En *Boletín Ciencia, Vino y salud.* 4p.[http://www.bio.puc.cl/vinsalud/boletin/41 polifenoles.htm](http://www.bio.puc.cl/vinsalud/boletin/41%20polifenoles.htm). Consultado 23 octubre. 2013.
76. Ursini, F., Maiorino, M. y Sevanian, A. (1991). Membrane hydroperoxides. En: *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants.* H. Sies (ed.), Academic Press, London. Cap. 12, pp. 319-336.
77. Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
78. Vargas, N. (2012). Efecto hepatoprotector y antioxidante del extracto y los principios activos de *Geranium shiedeanum*. Universidad Autónoma de Hidalgo. Instituto de Ciencias de salud. Tesis en ciencias biomédicas y de la salud.

79. Villacrés, E., Quilca N., Monteros, C. (2007). Caracterización química y funcional de papas nativas para orientar sus usos futuros. Tesis. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador.
80. Virgili, F., Marino, M. (2008). Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1205-1216.
81. Wang, T., Arifoglu, P., Ronai, Z., Tew, K. (2001). Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J. Biol. Chem.* (United States) 276 (24): 20999–1003.
82. Wu, C., Chamuleau, R., Bosch, K., Frederiks, W. (1993). Protective effect of silymarin on rat liver injury induced by ischemia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64(5), 259-263.

## ANEXOS:

### Anexo 1. Proceso de obtención del extracto acuoso de papa nativa “puca simi”.



Muestra de papa nativa



Corte en rodajas



Obtención de polvo fino



Preparación del extracto

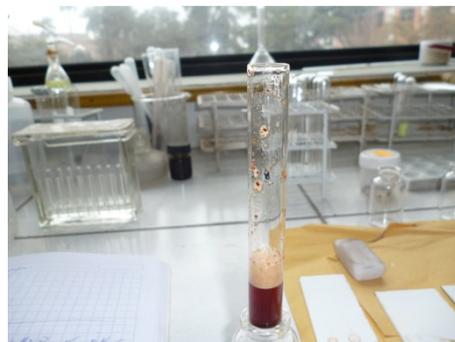


Obtención del extracto

**Anexo 2. Fotografía de las reacciones fitoquímicas de los metabolitos secundarios identificados en el extracto acuoso de papa nativa “puca simi”.**

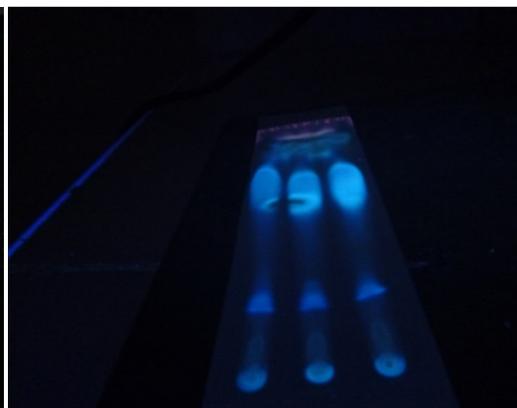


**Reacción para flavonoides  
NaOH, FeCl<sub>3</sub> y Shinoda**



**Identificación de saponinas**

**Anexo 3. Fotografía de los ensayos cromatograficos de los metabolitos secundarios identificados en el extracto acuoso de papa nativa “puca simi”.**



**Anexo 4: Fotografía de la cromatografía y las fracciones para la elucidación estructural.**



**Anexo 5. Fotografía de la administración del extracto acuoso y Fenilhidrazina a ratas y obtención del tejido hepático para los estudios bioquímicos.**



Administración del extracto



Administración de Fenilhidrazina



Proceso de anestesiado



Obtención de tejido hepático



Preparación de homogenizados