

**Potencial neuroprotector del verbascósido mediante la inhibición
enzimática y la captación de radicales libres**

Lema: *VEROS*

Para optar al PREMIO DE LA ACADEMIA DE FARMACIA DE CASTILLA y LEÓN

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. El verbascósido: estructura química, ruta biosintética y distribución en la naturaleza.....	4
1.2. Bioactividad del verbascósido.....	5
1.2.1. <u>Actividad antioxidante.....</u>	5
1.2.2. <u>Actividad antiinflamatoria.....</u>	6
1.2.3. <u>Actividad antimicrobiana.....</u>	7
1.2.4. <u>Actividad antitumoral y preventiva del cáncer.....</u>	7
1.2.5. <u>Otras actividades.....</u>	8
1.3. Enfermedades neurodegenerativas.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y METODOS.....	10
3.1. Verbascósido y reactivos.....	10
3.2. Determinación <i>in vitro</i> de la capacidad antioxidante del verbascósido.....	10
3.2.1. <u>Capacidad de captura del radical DPPH.....</u>	10
3.2.2. <u>Ensayo de la xantina/xantina oxidasa.....</u>	11
3.2.3. <u>Ensayo de captura del radical hidroxilo.....</u>	12
3.2.4. <u>Capacidad antioxidante total (CAT).....</u>	13
3.3. Estudios de la capacidad neuroprotectora del verbascósido mediante su capacidad de inhibición enzimática <i>in vitro</i>.....	13
3.3.1. <u>Inhibición de la enzima tirosinasa.....</u>	13
3.3.2. <u>Inhibición de la enzima MAO-A.....</u>	14
3.3.3. <u>Inhibición de la enzima AChE.....</u>	14
3.4. Determinación de la capacidad antioxidante del verbascósido en cultivo celular.....	15
3.4.1. <u>Cultivo de la líneas celulares HepG2 y SH-SY5Y.....</u>	15
3.4.2. <u>Ensayo de ERO en cultivo celular.....</u>	16
3.5. Análisis estadístico de los resultados.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Determinación <i>in vitro</i> de la capacidad antioxidante del verbascósido.....	18
4.1.1. <u>Capacidad de captura de radical DPPH.....</u>	18
4.1.2. <u>Ensayo de la xantina/xantina oxidasa.....</u>	19
4.1.3. <u>Ensayo de captura de radical hidroxilo.....</u>	20
4.1.4. <u>Ensayo de la capacidad antioxidante total.....</u>	22
4.2. Determinación de la capacidad antioxidante del verbascósido en cultivo celular de la línea HepG2.....	24
4.2.1. <u>Ensayo de ERO en cultivo celular. Efecto directo.....</u>	24
4.2.2. <u>Ensayo de ERO en cultivo celular. Efecto protector.....</u>	25
4.3. Estudios de inhibición enzimática <i>in vitro</i>.....	26
4.3.1. <u>Inhibición de la enzima tirosinasa.....</u>	26
4.3.2. <u>Inhibición de la enzima MAO-A.....</u>	27
4.3.3. <u>Inhibición de la enzima AChE.....</u>	29
4.4. Estudio del efecto antioxidante del verbascósido en cultivo celular de SH-SY5Y.....	31
4.4.1. <u>Ensayo de ERO en cultivo celular. Efecto directo.....</u>	31
4.4.2. <u>Ensayo de ERO en cultivo celular. Efecto protector.....</u>	32
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	34

INDICE DE ABREVIATURAS

AChE: Acetilcolinesterasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ATCI: Acetilcolina.

BSA: Albumina de suero bovino.

CAT: Capacidad antioxidante total.

DCF: Diclorofluoresceína.

DCFH: Diclorodihidrofluoresceína.

DCFH-DA: Diclorodihidrofluoresceína diacetato.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPPH: 1,1-difenil-2-picridacil.

DTNB: 5,5 Ditiobis-(2-nitrobenzoato).

EBSS: Earle's Balanced salt solution (solución salina equilibrada de Earle).

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

EMEM: Eagle's minimum essential medium (medio mínimo esencial de Eagle).

IC50: Concentración que inhibe el 50 % de la actividad.

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

MAO: Monoamino oxidasa.

NBT: Nitroazul de tratrazolio.

PBS: Tampón fosfato salino.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

Potencial neuroprotector del verbascósido mediante la inhibición enzimática y la captación de radicales libres

Lema: *VEROS*

RESUMEN

El aumento en la prevalencia de enfermedades en las que tiene lugar una pérdida de neuronas del sistema central, conocidas como enfermedades neurodegenerativas, se han convertido en un problema de salud pública en todo el mundo debido al incremento de la esperanza de vida. Los compuestos fenólicos derivados de plantas han mostrado capacidad para inhibir enzimas implicadas en el desarrollo de estas enfermedades, así como una potente actividad antioxidante capaz de revertir el estrés oxidativo responsable de la inducción de neurotoxicidad. En el presente trabajo se analizó la capacidad antioxidante y neuroprotectora del verbascósido, un compuesto fenólico ampliamente distribuido en plantas pertenecientes a la familia de las *Lamiales*. Para ello se llevaron a cabo pruebas *in vitro* tanto para analizar su capacidad antioxidante (DPPH, xantina/xantina oxidasa, captura radical HO^{*}, capacidad antioxidante total), como su efecto sobre enzimas implicadas en enfermedades neurodegenerativas: tirosinasa, monoamino oxidasa-A y acetilcolinesterasa. Por otro lado, se analizó su potencial antioxidante y neuroprotector en cultivo celular, determinado su efecto en los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno en cultivo celular de la línea de hepatocarcinoma humano HepG2, y de neuroblastoma SH-SY5Y.

El verbascósido demostró una alta capacidad antioxidante al capturar radicales libres en ensayos *in vitro*. Por otro lado, este compuesto presenta capacidad para inhibir la MAO-A y la acetilcolinesterasa, y provoca una reducción de los niveles de ERO intracelulares tras la inducción de estrés oxidativo con H₂O₂, tanto en cultivo de la línea HepG2 como de SH-SY5Y, demostrando así su potencial neuroprotector.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El verbascósido: estructura química, ruta biosintética y distribución en la naturaleza

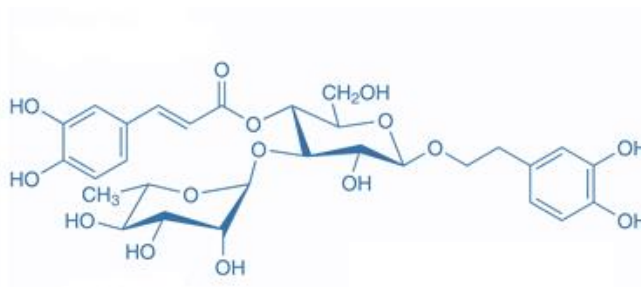


Figura 1. Estructura química del verbascósido.

El verbascósido, también conocido como acteósido o kusaginina, es un heterósido de un feniletanoide y el ácido cafeico, concretamente el 2-(3, 4-dihidroxifenil) etil-1-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-(4-O-E-caffeoil)- β -D-glucopiranosido (Figura 1). Se trata de un compuesto ampliamente distribuido en plantas. Hasta el momento se ha aislado en más de 150 plantas, pertenecientes a 20 familias distintas (He *et al.*, 2011). El acteósido aparece distribuido en diversas Familias de Dicotiledóneas como *Scrophulariaceae*, *Verbenaceae*, *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Bignoniaceae*, *Labiatae*, *Plantaginaceae*, *Buddlejaceae* o *Acantheacea* (Wang *et al.*, 2017). Fue aislado por primera vez en 1963 de *Verbascum sinuatum* L. (Scarpati y Monache, 1963). La mayor concentración de este compuesto ha sido obtenida de las raíces de *Verbascum nigrum* (3%), especie conocida comúnmente como gordolobo negro (Georgiev *et al.*, 2011a). Pese a detectarse principalmente en especies de *Verbascum*, entre las cuales aparecen importantes diferencias cuantitativas, también es significativa su concentración en otras especies como la hierbaluisa (*Aloysia citriodora* Palau) o el olivo (*Olea europea* L.). Se obtiene principalmente de partes aéreas como hojas y flores donde suele aparecer en mayor concentración (Georgiev *et al.*, 2011b), aunque también puede acumularse en los tallos y cortezas, como en algunas especies del género *Magnolia* (Shen *et al.*, 2009), o como se ha indicado anteriormente en raíces. La distribución del verbascósido puede ayudar, no sólo a la búsqueda de principios activos con actividad farmacológica, sino también a entender la evolución de las especies vegetales, ya que especies cercanas frecuentemente tienen una evolución química y biosintética similar (He *et al.*, 2011).

Biosintéticamente deriva del ácido cafeico, que proviene de la fenilalanina, vía ácido *p*-cumárico, y del hidroxitirosol, derivado de la tirosina, vía dopamina. Se trata, por tanto, de un compuesto fenólico sintetizado a través de la ruta del ácido siquímico, cuya síntesis y enzimas implicadas en la misma, todavía no han sido completamente elucidadas (Wang *et al.*, 2017).

1.2. Bioactividad del verbascósido

Actualmente hay un interés creciente en el estudio de los compuestos fenólicos en general debido a sus posibles implicaciones en la salud humana, como son: la prevención del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares, o incluso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Algunos de los feniletanoides más conocidos como el ácido cinámico y sus derivados (ácido cumárico o ácido cafeico), son de gran interés por su rol en la prevención y el tratamiento de varias enfermedades en humanos. Las plantas que contienen altas concentraciones de verbascósido se han utilizado en medicina tradicional con distintos fines, lo que ha suscitado el interés por este compuesto (Georgiev *et al.*, 2012). A continuación se exponen las principales actividades farmacológicas del verbascósido.

1.2.1. Actividad antioxidante

El verbascósido ha sido descrito ampliamente como antioxidante tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos deriva de su capacidad para transferir electrones (Li *et al.*, 2016). La capacidad captadora de radicales libres del verbascósido, protege a importantes biomoléculas del daño oxidativo, como lípidos y ADN. Se ha comprobado que el verbascósido presente en un extracto de hierbaluisa es capaz de inhibir la peroxidación lipídica mitocondrial. Este extracto administrado a ratas vía oral, mostraba la existencia de una alta correlación entre la concentración máxima de verbascósido circulante, y la máxima capacidad antioxidante, sin mostrar toxicidad en los animales (Funes *et al.*, 2009).

Con respecto al ADN, esta molécula es capaz de reparar radicales de ADN como el 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato, y la 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato. Estos desoxinucleótidos pueden producir daños en la célula que deriven en mutaciones y cáncer. Se ha comprobado que el verbascósido es capaz de reparar estos daños oxidativos en el ADN (Li *et al.*, 2018b).

La radiación UV, como es bien sabido, provoca numerosas patologías en la piel, como cáncer y envejecimiento. Estos efectos son debidos a la excesiva producción de ERO y a la depleción de antioxidantes endógenos. Del mismo modo, la inflamación derivada de la exposición a rayos UV es debida a un desajuste en el balance de radicales libres/antioxidantes. La capacidad captadora de radicales libres, es precisamente el mecanismo de acción del verbascósido para actuar como protector frente a la radiación UV (Alipieva *et al.*, 2014)

Además de actuar como captador de radicales libres, los metabolitos generados a partir del acteósido aumentan significativamente la acción de las principales enzimas antioxidantes celulares: catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. El efecto del verbascósido se lleva acabo a nivel post traduccional (Quirantes-Piné *et al.*, 2013).

1.2.2. Actividad antiinflamatoria

El efecto antiinflamatorio del verbascósido está relacionado, al menos en parte, con la inhibición de liberación de histamina y ácido araquidónico en mastocitos (Lee *et al.*, 2006). Esta actividad inhibitoria depende de la presencia de calcio, y se relaciona con la inhibición de la fosfolipasa A2 (Song *et al.*, 2012).

Por otro lado, el verbascósido inhibe de forma significativa la producción de iNOS/NO, TNF- α y IL-12 *in vitro*. La inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), demostrada tanto *in vitro* como *in vivo*, está íntimamente relacionada con la regulación a la baja de factores de transcripción como NF κ B y la proteína activadora 1 (AP-1). AP-1 juega un papel fundamental en el control de los niveles de citoquinas modulando por un lado los procesos inflamatorios crónicos como reúma, o la enfermedad de Crohn, pero también, la proliferación celular, las transformaciones neoplásicas, y la apoptosis. Por este motivo AP-1 se ha convertido en una interesante diana terapéutica. La capacidad del verbascósido para inhibir tanto AP-1 como NF κ B, hace de esta molécula un antiinflamatorio más eficaz que otros polifenoles que inhiben de forma selectiva sólo uno de los dos factores de transcripción (Alipieva *et al.*, 2014).

Los estudios animales han confirmado la buena biodisponibilidad y eliminación del verbascósido administrado por vía oral. Por otro lado, este compuesto muestra también potencial como agente terapéutico en el tratamiento de la dermatitis atópica debido a su capacidad antiinflamatoria, presentándose como una alternativa a los corticoides, que vía tópica en tratamiento crónico, provocan

múltiples efectos secundarios. El verbascósido proporciona a nivel tópico una disminución de las lesiones, y a nivel sérico, una reducción de citoquinas en sangre periférica (Li *et al.*, 2018a).

1.2.3. Actividad antimicrobiana

Las plantas con elevado contenido en verbascósido se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento de infecciones microbianas, como por ejemplo frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Se ha demostrado que esta molécula junto a otros polifenoles reducen el número de UFC/mL en las salmueras de aceitunas manzanilla. Por este motivo se ha empezado a utilizar como conservante alimenticio, reduciendo la carga microbiana de los alimentos (Aligiannis *et al.*, 2003). El verbascósido tiene efectos antiplasmídicos, inhibiendo así la transferencia de resistencia a antibióticos, como se ha demostrado en cepas de *Escherichia coli* (Molnár *et al.*, 1989).

Por otro lado, como ya se ha comentado, el acteósido presenta también actividad antifúngica, especialmente elevada frente a *Cryptococcus neoformans* y *Candida* spp (Funari *et al.*, 2012), con capacidad equiparable a la amfotericina B (Pereira *et al.*, 2014). En este sentido, Ali *et al.* (2011) describen el efecto sinérgico de verbascósido y amfotericina B, con potentes y prolongados resultados fungicidas.

La combinación de la capacidad antiinflamatoria y antibacteriana sugieren que el verbascósido y las plantas con altos contenidos en esta molécula, pueden ser un prometedor tratamiento para el acné (Azimi *et al.*, 2012).

1.2.4. Actividad antitumoral y preventiva del cáncer

Estudios en cultivos celulares demuestran que el verbascósido puede considerarse un potente agente quimiopreventivo y quimioterapéutico capaz de inhibir la proliferación celular, inducir la rediferenciación celular de células cancerígenas revirtiendo fenotipos malignos, e inducir su apoptosis. Su mecanismo de acción en células HL-60 de leucemia polimielocítica (Verbascosido IQB 2010), se relaciona con el bloqueo de ciclinas y de quinasas dependientes de ciclinas que bloquean el ciclo celular en el paso de G0 a G1. (Wartenberg *et al.*, 2003).

Por otro lado la aplicación de verbascósido vía tópica proporciona una prominente y prolongada actividad antiinflamatoria y protectora de radiación UV, evitando así el daño irreversibles causados por la exposición al sol y la posible aparición de cáncer de piel (Pastore *et al.*, 2009).

1.2.5. Otras actividades

Se ha descrito la capacidad del acteosido como neuroprotector, reduciendo los depósitos β amiloides, así como su toxicidad, mejorando el sistema antioxidante celular; hepatoprotector, debido principalmente a su actividad antioxidante; antiviral frente al herpesvirus causante de la enfermedad de Aujeszky; y analgésica similar a la del ibuprofeno (He *et al.*, 2011). Sin embargo, muchas de estas actividades están directamente relacionadas con el poder antioxidante del verbascósido.

1.3. Enfermedades neurodegenerativas

En los últimos 100 años, nuestra esperanza de vida ha aumentado de forma significativa, y como consecuencia se ha incrementado la edad media de la población. Este envejecimiento progresivo de la sociedad, va asociado a una mayor prevalencia de enfermedades relacionadas con la edad, como la demencia, y supone un importante problema de salud pública. Una gran parte de personas con más de 60 años deben hacer frente a deterioro cognitivo, déficits de memoria, y cambios en estructuras cerebrales (Hugel, 2015). El Alzheimer y el Parkinson son algunas de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en la actualidad. Además, el estrés oxidativo contribuye de forma significativa al avance de la degeneración neuronal (Hardy y Selkoe, 2002).

Los enfermos de Alzheimer presentan un deterioro de la función colinérgica en el cerebro basal anterior y corteza cerebral. Por este motivo, el aumento de la transmisión colinérgica está considerada como una de las principales dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad (Whitehouse *et al.*, 1982). Los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), son capaces de mitigar los déficits colinérgicos y mejorar la neurotransmisión al aumentar los niveles de acetilcolina, consiguiéndose así una mejora de la función cognitiva en este tipo de enfermos (Bae *et al.*, 2013).

La enzima tirosinasa, cataliza la oxidación de la tirosina, etapa limitante que controla la producción de melanina. Por tanto, esta enzima juega un papel fundamental en la pigmentación de la piel, ojos y pelo en humanos. Por otro lado, existe una relación entre el melanoma, la enfermedad de Parkinson y esta enzima. Alteraciones relacionadas con la melanina se asocian a la aparición de varios tipos de cáncer de piel, como el melanoma, mientras que las alteraciones en la neuromelanina se correlacionan con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. Este hecho sugiere que la melanina, y por ello la

tirosinasa, juegan un papel importante en la vulnerabilidad a estas enfermedades (Mendes *et al.*, 2014), aunque los mecanismos exactos de su implicación no se conocen todavía (Pan *et al.*, 2011). Varios polifenoles, incluyendo flavonoides y estilbenos han demostrado su capacidad para inhibir esta enzima, motivo por el cual han despertado el interés de la industria farmacéutica y cosmética para su utilización en el tratamiento de diversas afecciones de la piel.

La enzima monoamina oxidasa, tanto la isoforma A como la B, catabolizan neurotransmisores monoaminérgicos, por lo que constituyen dianas terapéuticas en enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas (Youdium *et al.*, 2006). Los inhibidores de MAO-A prolongan la acción central de la serotonina y se utilizan para el tratamiento de la ansiedad y depresión. Los inhibidores de MAO-B se emplean para la terapia sintomática de la enfermedad de Parkinson (Joubert *et al.*, 2014).

El incremento del estrés oxidativo es otro de los factores clave responsables de la inducción de neurotoxicidad y muerte celular, generando enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo está directamente relacionado con la aparición de especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno, y radicales superóxido (Tan *et al.*, 2013). Estos radicales libres causan daño oxidativo en moléculas esenciales para la supervivencia celular como ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos, pudiendo llegar a desencadenar procesos de apoptosis celular (Birben *et al.*, 2012). La principal fuente de ERO intracelular es la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Durante los procesos de envejecimiento celular la cantidad de estos radicales libres aumenta y evidentemente, la excesiva producción de ERO supone un factor de riesgo en la patogénesis y progresión de numerosas enfermedades (Radak *et al.*, 2016; Gay *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio es analizar la capacidad antioxidante y neuroprotectora del verbascósido utilizando distintos ensayos tanto *in vitro* como en cultivo celular. Cada ensayo de antioxidación difiere en los radicales generados, la estrategia de medida, la capacidad antioxidante evaluada, y su sensibilidad. Por ese motivo, el uso de diferentes métodos de evaluación de la antioxidación es necesario para obtener información útil que nos permita entender el/los mecanismo/s de acción de la molécula. Por este motivo, se analizó la facultad de captura del radical DPPH•, el efecto del verbascósido en el sistema xantina/xantina oxidasa (tanto el efecto sobre la enzima, como su capacidad para captar el

radical superóxido), su potencial de captura del radical hidroxilo, y la capacidad antioxidante total (CAT). Por otro lado, se evaluó su potencial neuroprotector *in vitro*, analizando su efecto sobre la actividad de distintas enzimas implicadas en enfermedades neurodegenerativas como la tirosinasa, monoamino oxidasa-A y acetilcolinesterasa.

En cuanto a los estudios realizados en cultivo celular, se emplearon las líneas: HepG2 como modelo que reproduce el hepatocito humano, y SH-SY5Y para evaluar su posible actividad neuroprotectora. Se analizó el efecto de verbascósido en dichas células, tanto creciendo en condiciones normales, como tras ser sometidas a estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Verbascósido y reactivos

El verbascósido utilizado en el presente trabajo, es de origen vegetal. Este compuesto fue aislado de la parte aérea de una planta Dicotiledónea, purificado e identificado mediante HPLC-MS y RMN. La procedencia y el método de extracción y purificación no pueden ser detallados por encontrarse bajo secreto por proceso de patente.

Todos los reactivos y patrones utilizados en este trabajo fueron adquiridos a Sigma Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

3.2. Determinación *in vitro* de la capacidad antioxidante del verbascósido

3.2.1. Capacidad de captura del radical DPPH

Para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* se utilizó el ensayo del 1,1-difenil-2-picridacil (DPPH) (Koleva *et al.*, 2002). Consiste en analizar la capacidad del verbascósido para reducir el radical DPPH• donándole un hidrogeno, formándose una especie estable DPPH-H. Esta reducción produce un cambio de color en el DPPH, que pasa de color morado (forma oxidada) a color amarillo (forma reducida).

Para realizar el estudio, se preparó una solución 1 mM de DPPH en metanol que se mantuvo en todo momento protegida de la luz. Se realizaron diluciones en metanol de ácido gálico (20-1,76 µg/mL), como patrón, y de verbascósido (110-7,2 µg/mL). 100 µL de cada dilución se dispusieron en placa de 96 pocillos, y se les añadieron 100 µL de DPPH.

La placa se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, y se procedió a medir las absorbancias en un lector de placas Versa Max (Molecular Devices) a 517 nm.

Con los resultados obtenidos se calculó el % de reducción aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Reducción} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

Donde A_0 es la absorbancia del control y A_1 es la absorbancia del verbascósido o del ácido gálico a cada concentración. Así mismo se determinó la IC_{50} , concentración de verbascósido o patrón capaz de reducir el 50% del radical DPPH.

3.2.2. Ensayo de la xantina/xantina oxidasa

El sistema xantina/xantina oxidasa tiene la capacidad de generar un radical superóxido capaz de producir la reducción del NBT (nitroazul de tretrazolio). Las sustancias con capacidad antioxidante son capaces de capturar dicho radical y evitar la reducción de NBT, como se ilustra en la Figura 2.

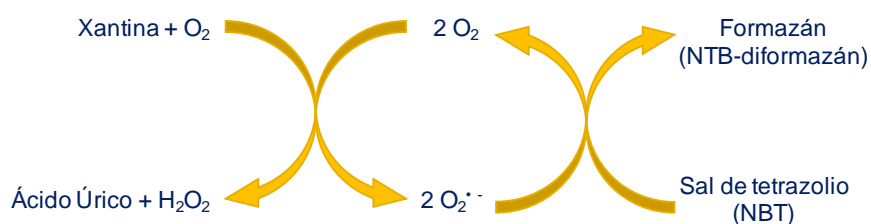


Figura 2. Reacción catalizada por la xantina oxidasa.

La capacidad de captura del verbascósido a distintas concentraciones, se cuantificó mediante la medida de los cambios de absorbancia a 560 nm a lo largo del tiempo. El resultado se expresó como porcentaje de inhibición de la reducción de NBT.

Para realizar el ensayo todos los reactivos se prepararon en tampón fosfato (50 mM de KH_2PO_4/KOH , pH 7,4). El estudio se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, siguiendo el protocolo de Muñoz Mingarro *et al.* (2015). Para la preparación del blanco se añadieron: 100 μL de tampón fosfato, 10 μL de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 15 mM, 15 μL de hipoxantina 3 mM y 25 μL de NBT 0,6 mM. Para realizar el control positivo: 75 μL de tampón fosfato 50 mM (KH_2PO_4 pH 7,4), 10 μL de EDTA 15 mM, 15 μL de hipoxantina 3 mM, 25 μL de NBT 0,6 mM y, por último (ya que se trata de la enzima que desencadena la reacción), se añaden

25 µL de xantina oxidasa (1 unidad por 10 mL de tampón). Para evaluar la actividad del verbascósido se añadió en cada pocillo: 62,5 µL de tampón fosfato, 10 µL de EDTA 15 mM, 15 µL de hipoxantina 3mM, 12,5 µL de verbascósido a distintas concentraciones, 25 µL de NBT 0,6 mM y por ultimo 25 µL de xantina oxidasa (1 unidad por 10 mL de tampón).

Las medidas de las absorbancias se realizaron durante 40 minutos a intervalos de 5 minutos en el lector de placas Versa Max (Molecular Devices) a 560nm. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la reducción de NBT.

Para analizar la capacidad del verbascósido para inhibir la enzima xantina oxidasa, se determinó la cantidad de ácido úrico producido (295 nm), expresando los resultados como % de inhibición de la producción de ácido úrico. Para ello se añadieron 600 µL de tampón fosfato 50 mM pH 7,4, 60 µL de EDTA 15 mM, 90 µL de xantina 0.1 mM, 75 µL de tampón o verbascósido a distintas concentraciones, y por último 150 µL de xantina oxidasa (1 unidad/10 mL de tampón). Las medidas de absorbancia se realizaron durante 40 minutos a intervalos de 5 minutos en el lector de placas Versa Max (Molecular Devices). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la enzima xantina oxidasa.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.2.3. Ensayo de captura del radical hidroxilo

Para la determinación de la capacidad de captura del radical hidroxilo del verbascósido se siguió el método de Sudha *et al.* (2015). La mezcla de reacción estaba formada por 1 mL de disolución de FeSO₄ 1,5 mM, 0,7mL de peróxido de hidrogeno 6 mM, 0,3 mL de salicilato sódico 20 mM, y 1 mL de diferentes concentraciones de verbascósido. Después de incubar durante 1 hora a 37 °C se midió la absorbancia del complejo salicílico hidroxilado a 562 nm en el lector de placas Asys UVM 340.

El porcentaje de captura del radical hidroxilo fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cap} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100.$$

Donde A₀ es la absorbancia del control y A₁ es la absorbancia del verbascósido, A₂ es la absorbancia del verbascósido sin salicilato sódico.

3.2.4. Capacidad antioxidante total (CAT)

Para la determinación de la capacidad antioxidante total se utilizó el ensayo de reducción del fosfomolibdeno según el método de Pietro *et al.* (1999). Este ensayo consiste en la medida de las absorbancias del complejo verde de fosfomolibdeno, derivado de la reducción del Mo (IV) a Mo (V) llevada a cabo por fenoles. La recta de calibrado se realizó con ácido ascórbico (2-0,125 mg/mL); para el verbascósido se prepararon diferentes disoluciones, de las que se tomaron 300 μ L a los que se añadió 3 mL del reactivo formado por molibdato amónico 4 mM, fosfato sódico 28 mM y ácido sulfúrico 0,6 mM.

La mezcla se mantuvo a 90 $^{\circ}$ C en baño de agua durante 90 minutos; transcurrido este tiempo, se enfrió, y se midió la absorbancia a 695 nm en el lector de placas Asys UVM 340. El resultado final se expresa como equivalentes de ácido ascórbico (μ g/mL).

3.3. Estudios de la capacidad neuroprotectora del verbascósido mediante su capacidad de inhibición enzimática *in vitro*

3.3.1. Inhibición de la enzima tirosinasa

La tirosinasa es una enzima presente en los tejidos de plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos a partir de la tirosina por oxidación. El ensayo para estudiar la capacidad de inhibición del verbascósido se basa en la reacción que aparece en la Figura 3.

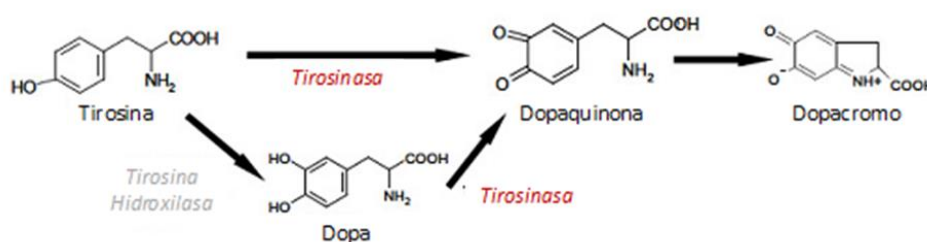


Figura 3. Esquema de las etapas de oxidación de la tirosina catalizadas por la tirosinasa.

Para determinar el posible efecto del verbascósido sobre la actividad de la enzima, se midió la cantidad de dopacromo producida en función del tiempo a 475 nm. La reacción se lleva a cabo en placa de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron: 10 μ L de verbascósido a distintas concentraciones (2 – 0,176 mg/mL), o de ácido α -kójico, que se utilizó como sustancia de referencia (0,66 – 0,059 mg/mL), o con 10

μL de H_2O como control; 40 μL de L-DOPA 5 mM en tampón fosfato 63 mM pH 6,8; 80 μL de tampón fosfato 63 mM pH 6,8; 40 μL de tirosinasa 200 U/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Posteriormente se midió la absorbancia cada 3 minutos durante 15 minutos en un lector de placas Spectrostar Nano (BGM Labtech) a 37°C (Casedas *et al.*, 2016). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la enzima a cada concentración. Para ello, la pendiente del cambio lineal en absorbancia a lo largo del tiempo de los ensayos con verbascósido o ácido α -kójico, se compararon con la pendiente del control. A partir de estos datos se calculó la IC_{50} (concentración que inhibe el 50% de la actividad enzimática) para ambos compuestos.

3.3.2. Inhibición de la enzima MAO-A

El ensayo para la determinación de la capacidad del verbascósido para inhibir la MAO-A se llevó a cabo en placa de 96 pocillos, siguiendo el protocolo propuesto por Olsen *et al.* (2008). En cada pocillo se añadieron: 50 μL de verbascósido a distintas concentraciones disuelto en DMSO (8,43-0,95 μM), o 50 μL de clorgilina, que se utilizó como sustancia de referencia (0,4-0,036 μM), o 50 μL de DMSO como control; 50 μL de solución cromogénica (0,8 mM de ácido vanílico, 0,417 mM de 4-aminoantipirina, 4 U/mL de peroxidasa en tampón fosfato potásico 0,2 M pH 7,6); 100 μL de tiramina 3 mM en tampón fosfato potásico 0,2 M pH 7,6; 50 μL de MAO-A 8 U/mL en tampón fosfato potásico 0,2 M pH 7,6. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Posteriormente se midió la absorbancia cada 5 minutos durante 40 minutos en un lector de placas Spectrostar Nano (BGM Labtech) a 37 °C. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la enzima a cada concentración de verbascósido o sustancia de referencia. Para ello, la pendiente del cambio lineal en absorbancia de los ensayos con verbascósido o clorgilina se compararon con la pendiente del control. A partir de estos datos se calculó la IC_{50} para el verbascósido y la clorgilina.

3.3.3. Inhibición de la enzima AChE

La acetilcolinesterasa es una enzima ubicada en el tejido nervioso y en los glóbulos rojos, cuya función principal es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina. Para poder estudiar el efecto del verbascósido sobre la AChE se llevó a cabo un ensayo colorimétrico, en el que la acetiltiocolina se utilizó como sustrato de la enzima. El grupo tiol de la tiocolina producida como consecuencia de la hidrólisis enzimática de la

acetiltiocolina, reacciona con el DTNB (5-5 ditiobis-2-nitrobenzoato) produciendo el anión del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico de color amarillo, cuantificable a 405 nm (Rhee *et al.*, 2001).

La reacción se llevó a cabo en placa de 96 pocillos a los que se les añadió: 25 µL de verbascósido a distintas concentraciones (2 - 0,117 mg/mL) disuelto en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, o galantamina, que se utilizó como control positivo (21,5 - 2,83 µg/mL), o tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, como control; 25 µL de ATCI (acetiltiocolina) 15 mM (en agua mili-Q); 125 µL de DTNB 3 mM en tampón C (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,1 M y MgCl₂ 0,02M); 50 µL de tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 8 con 0,1 % de BSA (albúmina de suero bovino)).

A los 30 segundos se midió la absorbancia a 405 nm (T₀). A continuación, se añadieron 25 µL de acetilcolinesterasa (0,22 U/mL en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8) y se midió la absorbancia cada 90 segundos durante un total de 15 minutos a 37°C en lector de placas Spectrostar Nano (BGM Labtech). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la enzima a cada concentración de verbascósido o sustancia de referencia. Para ello, la pendiente del cambio lineal en absorbancia de los ensayos con verbascósido o galantamina, se compararon con la pendiente del control. A partir de estos datos se calculó la IC₅₀ para el verbascósido y la galantamina.

3.4. Determinación de la capacidad antioxidante del verbascósido en cultivo celular

3.4.1. Cultivo de la líneas celulares HepG2 y SH-SY5Y

Para realizar los ensayos de la capacidad antioxidante en cultivo celular del verbascósido se utilizaron las líneas celulares: HepG2 de hepatocarcinoma humano (Ref. ECACC 85011430) y SH-SY5Y de neuroblastoma humano (Ref. ECACC 94030304). Se trata en ambos casos, de células cancerosas adherentes que crecen formando monocapas y pequeños agregados. Las células de la línea HepG2 constituyen un modelo que reproduce el hepatocito humano y han sido ampliamente utilizado para evaluar los efectos antioxidantes de distintos componentes de origen natural (Goya *et al.*, 2009). Por otro lado SY-SH5Y se utiliza habitualmente como modelo in Vitro de la función y diferenciación neuronal (Xie *et al.*, 2010). Las líneas celulares se descongelaron y se procedió a su cultivo en incubador a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. El medio de cultivo utilizado para HepG2 fue EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) que se enriqueció con 2 mM de

glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 10 % de suero fetal bovino y, finalmente, 1 % de antibióticos (10.000 U de penicilina y 10 mg de estreptomina por mL). Para SH-SY5Y el medio de cultivo empleado fue Ham's F-12: EMEM (EBSS) 1:1 suplementado con glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1 %, suero fetal bovino al 1 5% y solución de antibióticos al 1 % (10.000 U de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina). Los cultivos se examinaron periódicamente al microscopio para verificar su correcto crecimiento.

Una vez alcanzado el 80 % de confluencia celular, las células se tripsinizaron, a fin de separarlas de la pared del frasco de cultivo, obteniendo una suspensión celular que se utilizó para los estudios de ERO intracelular. Para estos ensayos, las células se resuspenden en medio con suero al 1%, para evitar que los componentes del suero interaccionen con el verbascósido, ya que se podrían originar artefactos con capacidad citotóxica (Long y Halliwell, 2011).

3.4.2. Ensayo de ERO en cultivo celular

Con objeto de determinar el efecto del verbascósido en la concentración de ERO intracelulares, y así poder conocer su capacidad antioxidante en cultivo celular se utilizó el ensayo de la 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Cardomy y Cotter, 2000; Muñoz Mingarro *et al.*, 2015). Esta molécula atraviesa las membranas celulares y las esterasas del interior de las células la deacetilan formándose la 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Esta última, en presencia de ERO se oxida y da lugar a la 2,7-diclorofluoresceína (DCF) emitiendo fluorescencia. Es decir, la fluorescencia detectada en el ensayo es directamente proporcional a la concentración de ERO intracelular.

Este ensayo se llevó a cabo para comprobar el posible efecto antioxidante del verbascósido en dos situaciones: a) midiendo el efecto directo del verbascósido sobre las células; b) preincubando las células con distintas concentraciones de verbascósido antes de inducirles estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno, a lo que nos referiremos como efecto protector.

Para ello se sembraron 8000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron en estufa durante 24 horas a 37°C y en atmósfera de 5% CO₂.

Para el estudio del efecto directo, transcurridas las 24 h de incubación, se aspiró el medio y se procedió a añadir 200 µL/pocillo de DCFH-DA 0,02 mM en tampón fosfato salino (PBS) glucosado, incubándose en oscuridad durante 30 minutos. Las placas se preservaron de la luz durante su manipulación. Transcurrido

el tiempo, se procedió al lavado con PBS glucosado y se añadieron las distintas concentraciones de verbascósido (1-0,2 mg/mL) disuelto en el medio correspondiente para cada línea celular, enriquecido con suero fetal bovino al 1%. La fluorescencia comenzó a medirse en el momento de añadir el verbascósido.

Para la determinación del efecto protector, en primer lugar, y a diferencia con el ensayo anterior, las células se pre-trataron con diferentes concentraciones de verbascósido disuelto en medio el medio adecuado para cada línea suplementado con suero fetal bovino al 1 %, durante 24 horas. Posteriormente, se añadió como en el caso anterior, la DCFH-DA y se incubó durante 30 minutos. Se aspiró el medio, se lavó con PBS glucosado y, se procedió a provocar en las células un estrés oxidativo, añadiendo medio suplementado con H₂O₂ 200 µM para HepG2, y 500 µM para SH-SY5Y. Se realizaron dos controles únicamente con medio en presencia y ausencia de H₂O₂. La fluorescencia comenzó a medirse en el momento de añadir el medio con peróxido de hidrógeno.

Las medidas de fluorescencias se realizaron en un lector de placas Fluostar optima (BMG Labtech) durante 90 minutos a intervalos de 15 minutos, a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm. Se calcularon las medias de las medidas realizadas en cada intervalo de tiempo para cada concentración de verbascósido. Los resultados se expresaron como fluorescencia frente al tiempo, para cada uno de los tratamientos.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.5. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante ANOVA, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 2.0. La comparación por pares basada en las medidas marginales estimadas, se llevó a cabo mediante ajuste para comparaciones múltiples Bonferroni ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación *in vitro* de la capacidad antioxidante del verbascósido.

4.1.1. Capacidad de captura de radical DPPH

El ensayo de captura del radical DPPH• es ampliamente utilizado para testar de forma preliminar la capacidad captadora de radicales libres de un extracto vegetal o de compuestos aislados de los mismos (Govindan y Muthukrishnan, 2013). El radical químico DPPH• es estable y de color violeta, pero al recibir protones, en este caso del verbascósido, se reduce adquiriendo color amarillo (Mathew y Abraham, 2004). Los compuestos con elevada actividad captadora de este radical suponen una buena base para futuros estudios *in vitro* e *in vivo*.

Como se puede observar en la Figura 4, la capacidad del verbascósido para captar el radical DPPH• es muy elevada, pues se consigue cerca de un 80 % de reducción del mismo a la máxima concentración ensayada (55 µg/mL). Con los valores de porcentaje de captura de radical DPPH• se calculó la IC₅₀, concentración de verbascósido necesaria para capturar el 50 % del radical DPPH•. El resultado obtenido fue 36,26 µg/mL ± 0,35. Estudios previos han determinado para este ensayo una IC₅₀ para antioxidantes de referencia como el ácido ascórbico, o el ácido gálico, de 54,01 µg/mL (Kaur et al., 2012), y de 60 µg/mL respectivamente (Pavithra y Vadivukkarasi, 2015). El verbascósido mostró mejores valores para la captura de este radical que las sustancias de referencia, por lo que, estos resultados señalan al verbascósido como un buen antioxidante.

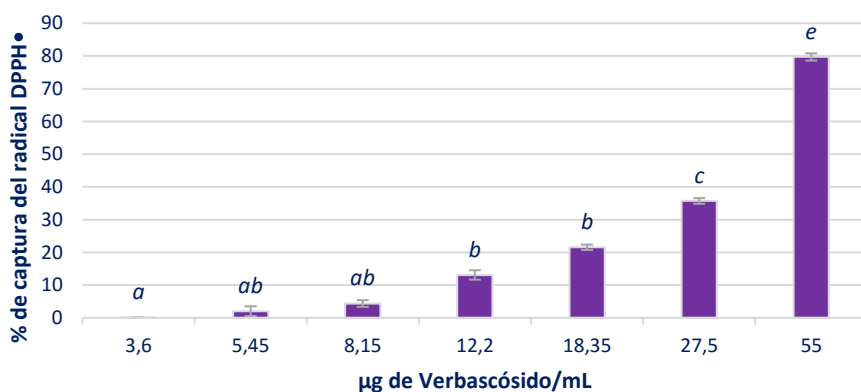


Figura 4. Porcentaje de captura del radical DPPH• a distintas concentraciones. Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni $p < 0,05$).

4.1.2. Ensayo de la xantina/xantina oxidasa

- Capacidad de captura del radical $O_2^{\bullet-}$

El feniletanoide objeto de estudio es capaz de captar el radical $O_2^{\bullet-}$, o inhibir su producción, evitando la reducción del NBT, como se observa en la Figura 5. A mayor concentración de verbascósido, se registra una menor absorbancia, lo que implica una menor reducción del NBT y por tanto, un efecto en el sistema xantina/xantina oxidasa dosis dependiente.

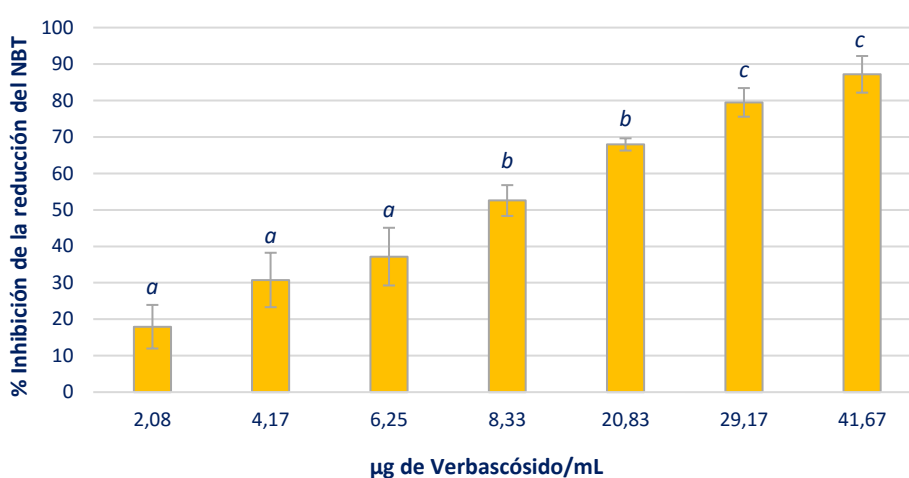


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la reducción del NBT para cada concentración de verbascósido.

Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni $p < 0,05$).

Con los valores de porcentaje de inhibición de la reducción de NBT para cada concentración de verbascósido se realizó una recta de regresión con objeto de calcular la IC_{50} , que resultó ser de $15,2 \mu\text{g/mL} \pm 0,9$ de verbascósido.

- Capacidad de inhibición de la xantina oxidasa

Como hemos comentado en el apartado anterior, el verbascósido es capaz de inhibir la reducción del NBT. Este efecto puede ser debido a su capacidad para captar el radical superóxido, o a su habilidad para inhibir la enzima xantina oxidasa, produciéndose en ese caso una menor cantidad radical superóxido, y por lo tanto, detectándose una menor reducción del NBT (Figura 5). Para comprobar si el acteósido es capaz de inhibir esta enzima, se estudió la producción de ácido úrico a lo largo del tiempo. Se analizaron concentraciones comprendidas entre 2,08 y 83,3 $\mu\text{g/mL}$. Tras representar la absorbancia obtenida frente

al tiempo para cada concentración, se compararon las pendientes de las rectas obtenidas con la calculada para el control. En ningún caso se observaron diferencias con respecto al control, por lo que concluimos, que este compuesto es capaz de captar el radical O_2^{\bullet} , pero no de inhibir la enzima xantina oxidasa.

El radical superóxido está implicado en múltiples procesos patofisiológicos debido a su transformación en especies más reactivas como el radical hidroxilo (Pietta, 2000). Por tanto, el anión superóxido juega un importante papel en la formación de ERO, como el radical hidroxilo, el oxígeno singlete o el peróxido de hidrógeno. Estos ERO son capaces de producir daño oxidativo en macromoléculas como lípidos, proteínas o ADN, y por lo tanto, están implicados en numerosas patologías (Parejo *et al.*, 2002).

La capacidad captadora del anión superóxido podría deberse a la acción de los grupos hidroxilo presentes en la molécula del verbascósido (Govindan y Muthukrishnan, 2013).

4.1.3. Ensayo de captura de radical hidroxilo

A la vista de los resultados que aparecen en la Figura 6, podemos observar como el verbascósido presenta una interesante actividad captadora del radical OH^{\bullet} . Debido a que las concentraciones utilizadas en este ensayo fueron muy superiores a las del resto de análisis de capacidad de captura de radicales, nos planteamos la necesidad de utilizar una sustancia de referencia, eligiendo para ello el ácido ascórbico. A las concentraciones más bajas, el verbascósido es incluso más eficaz que el ácido ascórbico. Sin embargo, a la concentración más alta ensayada (0,33 mg/mL), el verbascósido presenta un porcentaje de captura del 60,4 % mientras el ácido ascórbico alcanza el 98,8 %. Los resultados indican una actividad captadora del radical dependiente de la concentración de verbascósido, aunque sólo existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para la concentración más alta y el resto de las ensayadas.

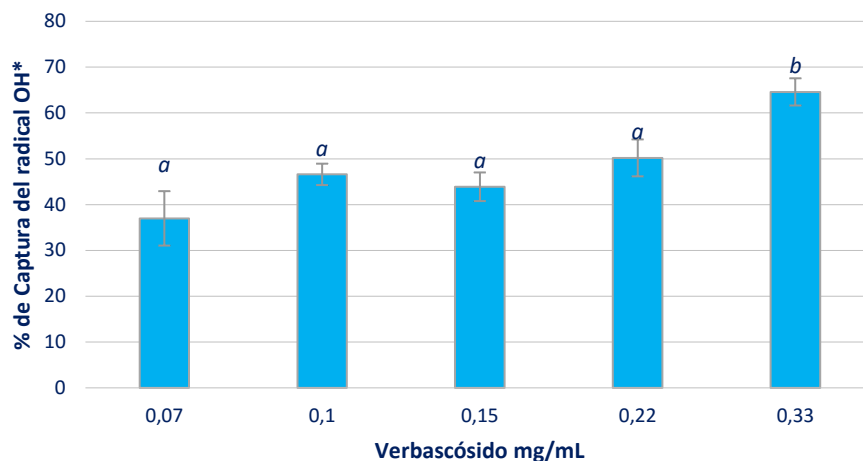


Figura 6. Porcentaje de captura del radical OH* del verbascósido (mg/mL). Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni $p < 0,05$).

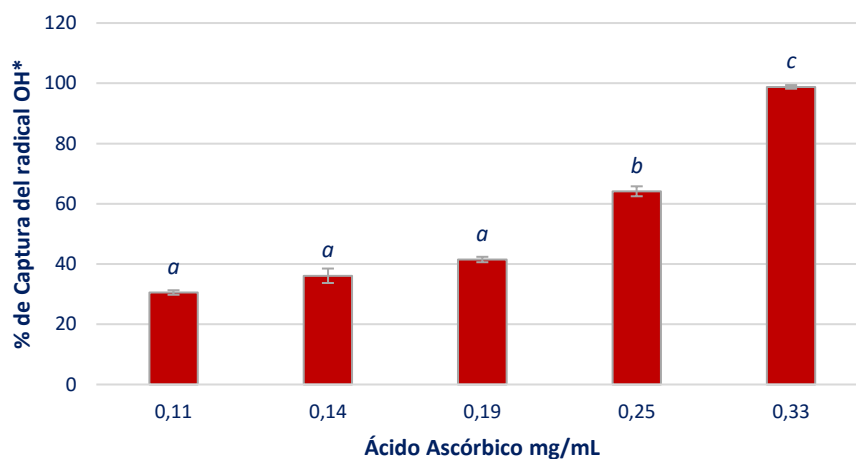


Figura 7. Porcentaje de captura del radical OH* del ácido ascórbico (mg/mL). Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni $p < 0,05$).

Con los datos obtenidos se calculó la IC_{50} para el verbascósido y el ácido ascórbico, siendo de $223,0 \pm 10,5$ y $181,7 \pm 3,5$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos datos concuerdan con los observados por (Ameni *et al.* 2015), en lo que se refiere a la capacidad de captura del radical hidroxilo del ácido ascórbico (169 ± 5 $\mu\text{g/mL}$).

El radical hidroxilo es conocido por ser sumamente nocivo, ya que es capaz de iniciar la auto-oxidación, polimerización y fragmentación de numerosas moléculas biológicas (Liu y Ng, 2000). Estos radicales son

las ERO más reactivas, causando daño al ADN, proteínas y otras biomoléculas esenciales para la célula, y provocando por este motivo, mutagénesis, carcinogénesis, o simplemente envejecimiento (Lee *et al.*, 2002). Asimismo, el peróxido de hidrógeno puede derivar en radicales hidroxilo, por lo que su eliminación es muy importante para la defensa antioxidante en el sistema celular (Battu *et al.*, 2011). La capacidad captadora de radicales hidroxilo parece estar directamente relacionada con la prevención de la peroxidación lipídica (Herput *et al.*, 2011).

En la Tabla 1 podemos observar las IC₅₀ del verbascósido para la captura de los distintos radicales ensayados. Los resultados indican que el verbascósido resulta eficaz como captador de los distintos radicales libres analizados.

Actualmente existe un creciente interés en la búsqueda de compuestos antioxidantes de fuentes vegetales, con objeto de encontrar moléculas farmacológicamente potentes y con pocos o ningún efecto secundario. Las plantas producen gran cantidad de compuestos para prevenir el estrés oxidativo, y esos metabolitos secundarios son una fuente potencial de compuestos de interés farmacológico. El interés por los antioxidantes naturales seguros y efectivos, crece con objeto de reemplazar a los antioxidantes sintéticos (Govindan y Muthukrishnan, 2013). En este sentido, y a la vista de la capacidad captadora del verbascósido, esta podría ser una molécula de interés no sólo en la industria farmacéutica como agente preventivo y terapéutico, sino también en la industria alimenticia.

Tabla 1. Capacidad de captura de radicales libres del verbascósido. IC₅₀ µg/mL.

	DPPH	O ₂ ^{-•}	OH [•]
IC ₅₀ µg/mL	36,26 ± 0,35	15,2 ± 0,9	223,0 ± 10,5

4.1.4. Ensayo de la capacidad antioxidante total

El uso de distintos ensayos para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto, no siempre tiene fácil interpretación. En este sentido, el concepto de un test que refleje la capacidad antioxidante total resulta interesante. El ensayo de la CAT utilizado en este trabajo, se basa en la capacidad de los fenoles para reducir el Molibdeno VI a Molibdeno V.

Para realizar el ensayo se tomó como sustancia de referencia el ácido ascórbico. Posteriormente, se analizó la muestra de verbascósido y se comparó su CAT con la capacidad de la sustancia de referencia. Con los valores de absorbancia de ácido ascórbico a cada concentración se obtiene una recta de regresión. Los valores de absorbancia de la muestra de verbascósido serán interpolados en la recta ($y = 0,0015x + 0,0211$) obteniendo los valores de CAT para cada concentración de verbascósido como EAA (equivalentes de ácido ascórbico $\mu\text{g}/\text{mL}$). De nuevo, como se observa en la Figura 8, existe una actividad antioxidante dosis dependiente.

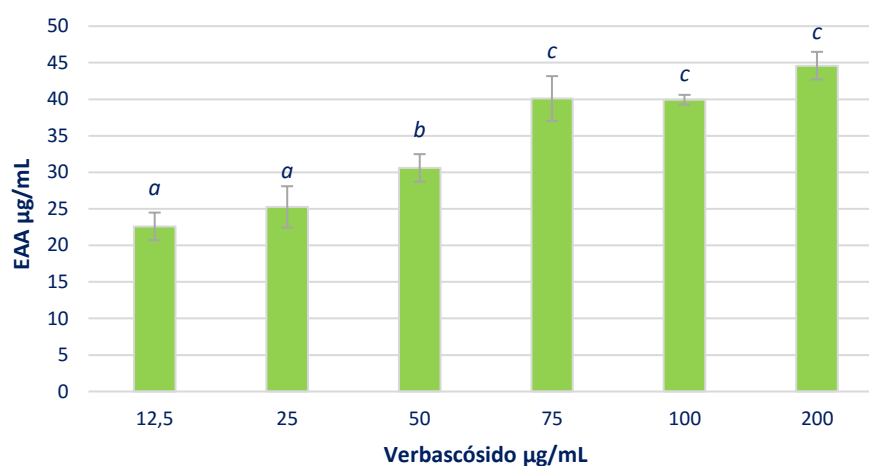


Figura 8. Capacidad antioxidante total del verbascósido expresada como equivalentes de ácido ascórbico ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni $p < 0,05$).

La capacidad antioxidante del verbascósido se ha estudiado utilizando varios ensayos *in vitro* con objeto de conocer mejor las posibles aplicaciones terapéuticas de este compuesto. La presencia de grupos hidroxilo en los fenoles mejora su capacidad para captar radicales libres, como es el caso del verbascósido. El estrés oxidativo se caracteriza por un incremento significativo de la concentración intracelular de especies químicas oxidantes, como ERO, que normalmente van acompañadas de una pérdida de capacidad antioxidante celular (sistema antioxidante endógeno de la célula). Puesto que muchas enfermedades, como ya hemos comentado anteriormente, se asocian con la sobreproducción de radicales libres (isquemia cerebral, inflamación, cáncer, neurodegeneración o envejecimiento), los antioxidantes capaces de contrarrestar el estrés oxidativo están ganando interés en la prevención y terapéutica de las mismas (Asungalem *et al.*, 2004).

4.2. Determinación de la capacidad antioxidante del verbascósido en cultivo celular de la línea HepG2

4.2.1. Ensayo de ERO en cultivo celular. Efecto directo

En este ensayo se evaluó el efecto del verbascósido a distintas concentraciones sobre los niveles de ERO intracelulares en cultivo de hepatocarcinoma humano. Tras poner en contacto las células con el verbascósido se cuantificó la fluorescencia, proporcional a los niveles de ERO en la célula. El cultivo de esta línea celular se ha establecido como un modelo celular *in vivo*, donde el efecto de un potencial compuesto quimiopreventivo puede ser ensayado de forma fiable y con mínimas variaciones entre ensayos (Goya *et al.*, 2009).

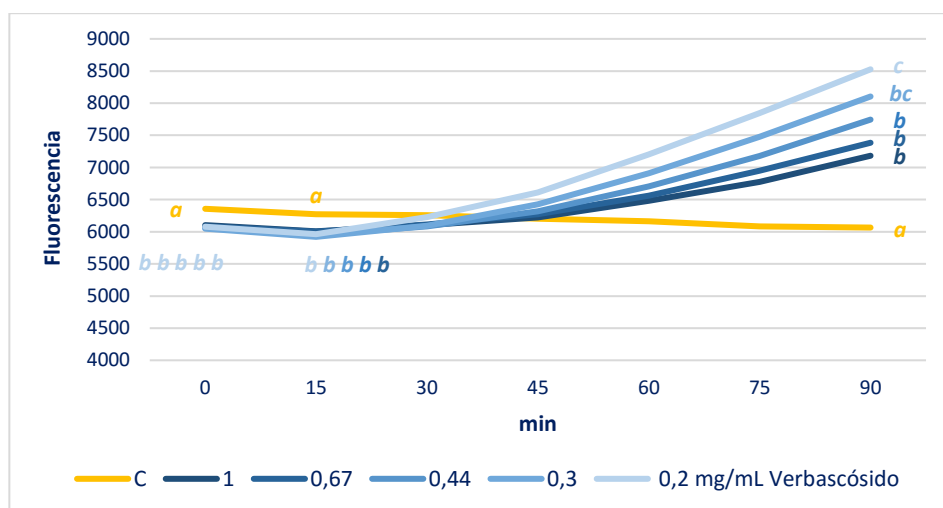


Figura 9. Efecto directo del verbascósido sobre la concentración de ERO intracelular en cultivo HepG2. Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni $p < 0,05$).

Como se puede observar en la Figura 9, el verbascósido produce un significativo aumento de los niveles de ERO a lo largo del tiempo en células creciendo en condiciones normales a todas las concentraciones ensayadas. Se observa un aumento de la fluorescencia claramente dosis dependiente, siendo significativamente mayor en las células tratadas con la menor cantidad de verbascósido, y menos patente a las mayores concentraciones ensayadas. Estos datos coinciden con el efecto detectado por Dell'Aquila *et al.* (2014) que observaban un incremento de los niveles de ERO en oocitos de cordero tras su tratamiento con verbascósido, siendo este efecto más pronunciado a las concentraciones más bajas.

Estos resultados nos señalan que en el cultivo celular de HepG2, bajo las condiciones ensayadas, el verbascósido tiene un efecto promotor del estrés oxidativo, probablemente tóxico, tras cortas exposiciones a las concentraciones estudiadas. Esta toxicidad podría estar causada por la degradación del verbascósido y la subsiguiente generación de H₂O₂, como ya se ha descrito para la oxidación de otros compuestos fenólicos en medio de cultivo (Hong *et al.*, 2002).

4.2.2. Ensayo de ERO en cultivo celular. Efecto protector

Observamos que transcurridos 90 minutos de la inducción del estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno, se produce un aumento significativo en la cantidad de ERO (C con H₂O₂ frente al C sin estresar) (Figura 10). Las células que han sido pretratadas con el verbascósido son capaces de reducir significativamente los niveles de ERO con respecto a las no tratadas, aunque no llegan a reducirlo hasta los niveles del C sin estresar. A la menor concentración ensayada no se observan diferencias significativas con el control de células estresadas, por lo que a esta concentración el verbascósido no muestra capacidad protectora frente al estrés oxidativo inducido.

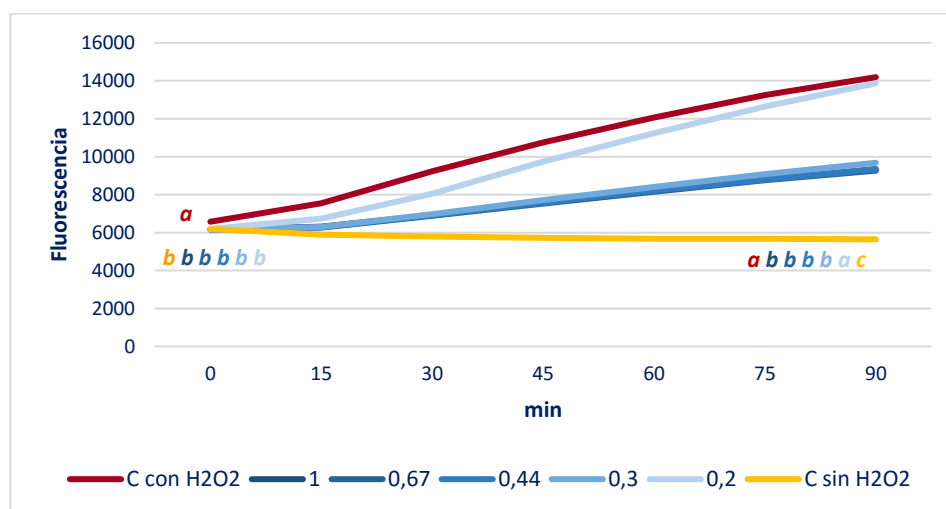


Figura 10. Efecto protector del verbascósido sobre la concentración de ERO intracelular en cultivo HepG2. Las células fueron pretratadas y posteriormente estresadas con H₂O₂ (200μM). Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA-Test Bonferroni p<0,05).

Se ha comprobado tanto *in vitro*, como *in vivo* que la capacidad captadora de ERO del verbascósido, contribuye a la inhibición de la apoptosis (An *et al.*, 2014). En el presente estudio las células de la línea HepG2 preincubadas con verbascósido y sometidas a estrés oxidativo, mostraban una reducción

significativa de la generación de ERO intracelulares. La capacidad captadora de radicales libres del verbascósido se puede correlacionar con esta actividad quimiocitoprotectora. Efectos similares han sido descritos por Yang *et al.* (2015) en fibroblastos tras provocarles estrés oxidativo con rayos UV.

4.3. Estudios de inhibición enzimática *in vitro*

4.3.1. Inhibición de la enzima tirosinasa

En la Figura 11 se observa el porcentaje de inhibición producido por el ácido α -kójico. Estos resultados nos permitieron calcular la IC₅₀ de este ácido, que resultó ser de $83,71 \pm 4,52 \mu\text{M}$.

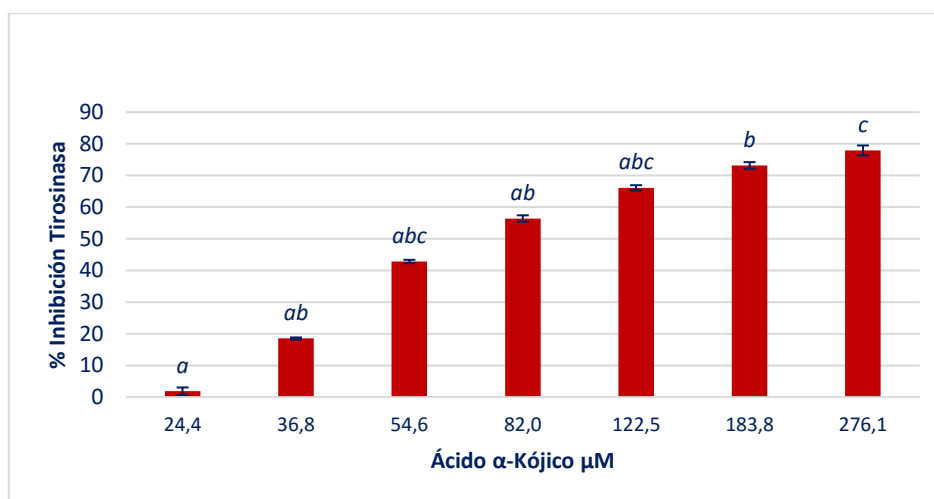


Figura 11. Efecto del Ácido α -Kójico sobre la actividad de la enzima tirosinasa. Los resultados aparecen como porcentaje de inhibición \pm desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA Bonferroni $p < 0,05$).

En la Figura 12, observamos los resultados obtenidos en este ensayo para el verbascósido. Esta sustancia, lejos de inhibir la enzima tirosinasa provoca una activación dosis dependiente, que pese a no ser muy acusada, ni siquiera a las concentraciones más altas, si es significativa. Debido al efecto antibacteriano y antifúngico, tanto del verbascósido aislado, como de extractos de plantas con altas concentraciones de este producto (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze o *Commiphora mukul* (Hook. ex Stocks) Engl.), se ha postulado como una sustancia prometedora para el desarrollo de tratamientos

farmacológicos para el tratamiento del acné (Azimi *et al.*, 2012). Nuestros resultados desaconsejan este uso del verbascósido por la posibilidad de producir manchas en la piel, debido a la activación que produce sobre la síntesis de melanina al actuar sobre la tirosinasa.

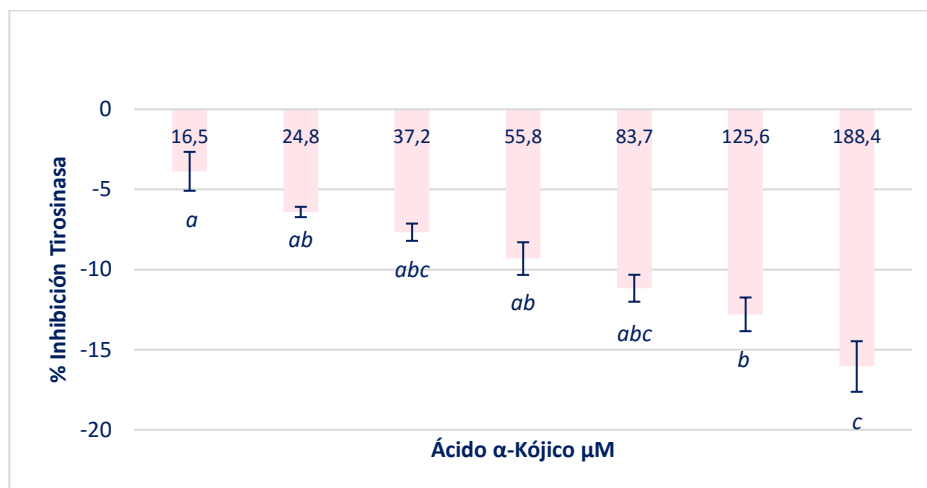


Figura 12. Efecto del verbascósido sobre la actividad de la enzima tirosinasa. Los resultados aparecen como porcentaje de inhibición \pm desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA Bonferroni $p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 12, a la máxima concentración ensayada, el verbascósido (188,4 μM) produce una activación de la tirosinasa próxima al 16 %, lo que podría aportar cierta utilidad a este compuesto en el tratamiento de repigmentación del vitíligo (Yin *et al.*, 2018). Asimismo, la melanina tiene efectos fotoprotectores, y por tanto, los agentes que inducen su síntesis suponen un medio para conseguir una piel bronceada con un menor daño debido a la exposición a la radiación ultravioleta solar, o de cámaras de bronceado. Además, el incremento en la cantidad de melanina en la piel puede ayudar a reducir síntomas asociados a problemas de fotosensibilidad como la porfiria eritropoyética o la urticaria solar (Ubeid y Hantash, 2014).

4.3.2. Inhibición de la enzima MAO-A

La actividad inhibitoria de la clorgilina sobre la MAO-A a las distintas concentraciones ensayadas se muestra en la Figura 13. La IC_{50} para esta sustancia, utilizada como inhibidor de referencia, es de $0,122 \pm 0,009 \mu\text{M}$.

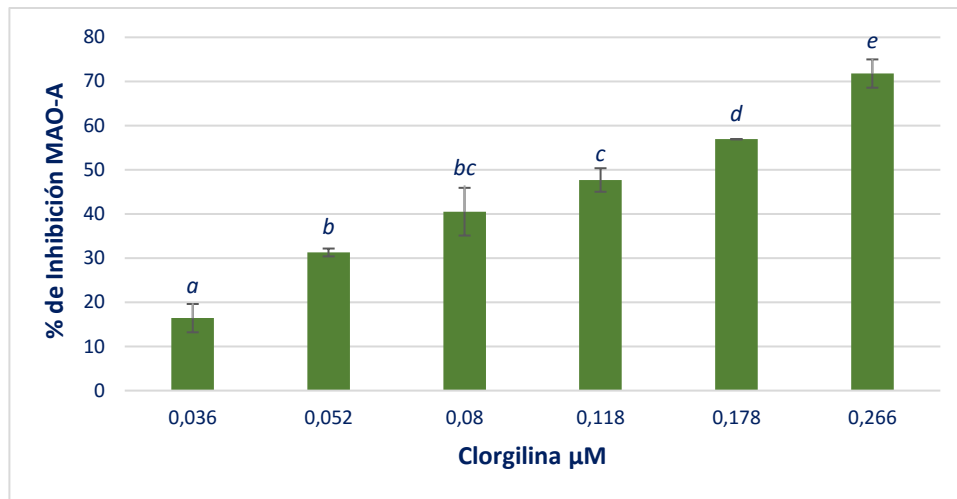


Figura 13. Efecto de la clorgilina sobre la actividad de la enzima MAO-A. Los resultados aparecen como porcentaje de inhibición \pm desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA Bonferroni $p < 0,05$).

El verbascósido muestra (Figura 14) una capacidad inhibitoria significativa de la MAO-A dosis dependiente, con una IC_{50} de $3,44 \pm 0,06 \mu\text{M}$. MAO-A muestra una alta selectividad por el neurotransmisor serotonina, por lo que los inhibidores de esta enzima prolongan la acción de este neurotransmisor y son útiles en el tratamiento de la depresión y la ansiedad (Larit *et al.*, 2018).

Pese a que la MAO-B es la isoforma utilizada en el tratamiento del Parkinson, la mayoría de estos enfermos presentan signos de depresión, por lo que los inhibidores de la MAO-A resultan también beneficiosos para estos pacientes (Costa *et al.*, 2012). Además, los inhibidores de la MAO-A producen beneficios sintomáticos reduciendo la oxidación de la dopamina que cataliza esta enzima. Pese a que hay una mayor concentración de MAO-B en los ganglios basales, los inhibidores de la isoforma A aumentan la concentración de dopamina a este nivel. Por tanto, la inhibición de ambas isoformas, MAO-A y B resulta más eficaz para conservar la dopamina a nivel de los ganglios basales que la inhibición selectiva (Youndim y Bakhle, 2006).

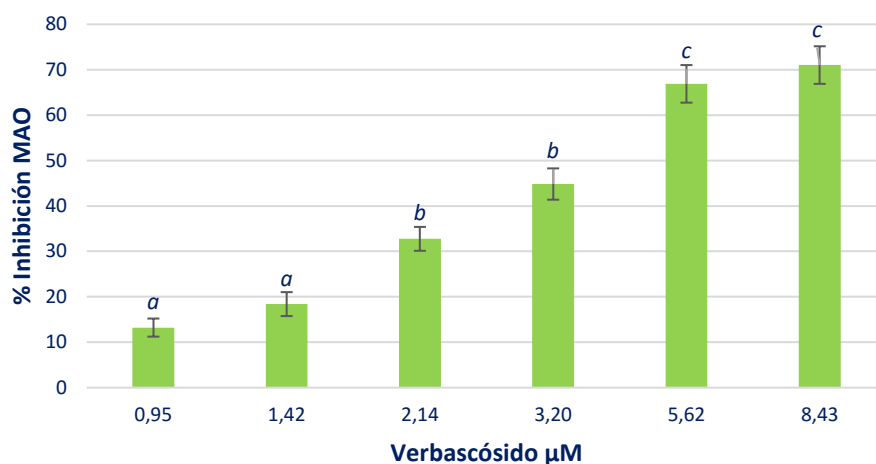


Figura 14. Efecto del verbascosido sobre la actividad de la enzima MAO-A. Los resultados aparecen como porcentaje de inhibición \pm desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA Bonferroni $p < 0,05$).

4.3.3. Inhibición de la enzima AChE

La galantamina es un conocido inhibidor de la AChE, los datos de los porcentajes de inhibición obtenidos para esta sustancia aparecen en la Figura 15. La IC_{50} calculada a partir de estos datos resultó ser de $4,09 \pm 0,18 \mu\text{M}$.

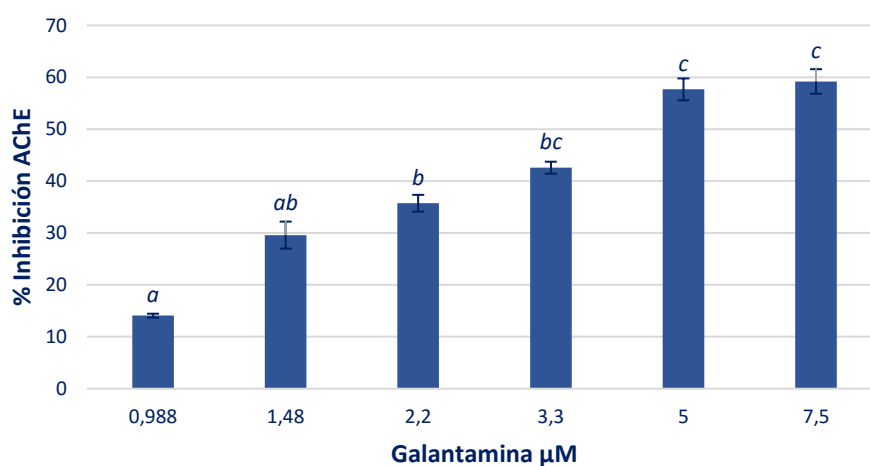


Figura 15. Efecto de la galantamina sobre la actividad de la enzima AChE. Los resultados aparecen como porcentaje de inhibición \pm desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas

(ANOVA Bonferroni $p < 0,05$).

El efecto del verbascósido sobre esta enzima es el que mostró resultados menos lineales de todos los ensayos enzimáticos analizados en este trabajo. Podemos observar en la Figura 16 un efecto inhibitorio por parte de este compuesto, que no alcanzó niveles del 50 % a la concentración más alta ensayada, por lo que no se pudo calcular su IC_{50} . Diversos estudios realizados con extractos de plantas que contienen verbascósido han demostrado una potente inhibición de esta enzima (Bae *et al.*, 2013), sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con los de estos autores.

De acuerdo con la hipótesis colinérgica, la pérdida de memoria en pacientes con demencia senil o con Alzheimer es debida a una deficiencia en la función colinérgica cerebral (Tougu, 2001). El uso de colinomiméticos y de inhibidores de la AChE son las principales estrategias terapéuticas. El verbascósido es capaz de producir una inhibición significativa de la enzima desde las concentraciones más bajas ensayadas, por lo que podría ser de interés como agente terapéutico en el tratamiento del Alzheimer.

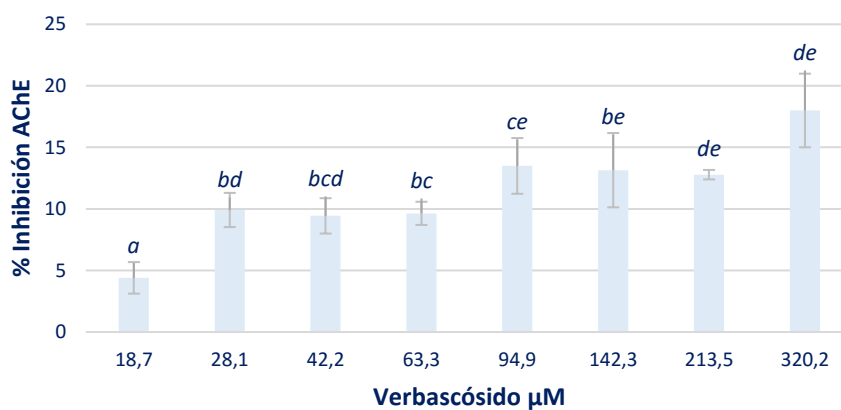


Figura 16. Efecto del Verbascósido sobre la actividad de la enzima AChE. Los resultados aparecen como porcentaje de inhibición \pm desviación estándar. Distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA Bonferroni $p < 0,05$).

4.4. Estudio del efecto antioxidante del verbascósido en cultivo celular de SH-SY5Y

4.4.1. Ensayo de ERO en cultivo celular. Efecto directo

El aumento del estrés oxidativo es un factor clave en el inicio y progresión de enfermedades neurodegenerativas. El efecto citotóxico de las ERO se ha documentado extensamente sobre distintas células, entre ellas las neuronas, provocando muerte celular en traumatismos cerebrales, isquemias y enfermedades neurodegenerativas (Uttara *et al.*, 2009). Sin embargo, las ERO también actúan como señales moleculares en procesos fisiológicos como la proliferación, migración y supervivencia celular (Rhee *et al.*, 2000; Stone y Yang, 2006; Veal *et al.*, 2007). Mientras que los efectos deletéreos del estrés oxidativo causado por las ERO está muy bien documentado, las consecuencias beneficiosas de estas moléculas en neuronas del sistema nervioso central están infravaloradas (Huang y McNamara, 2012).

En la Figura 17 podemos observar como la cantidad de ERO intracelular aumenta ligeramente con el tiempo, y de manera dosis dependiente, en los tratamientos con verbascósido. Estos resultados coinciden con los obtenidos para la línea celular HepG2. Las ERO son capaces de actuar como neuroprotectoras activando receptores tirosin-quinasa implicados en la supervivencia neuronal y su diferenciación, así como en la estructura, función y plasticidad sináptica (Huang y Reichardt, 2001). En este sentido, vemos como el efecto neuroprotector del ejercicio moderado es parcialmente debido a la activación del metabolismo celular asociado con la producción de ERO, que altera las señales redox a nivel cerebral (Radak *et al.*, 2016). Por lo tanto, este pequeño incremento de las ERO causado por el verbascósido, podría implicar efectos protectores para las neuronas, aunque serían necesarios más estudios para poder profundizar en este sentido.

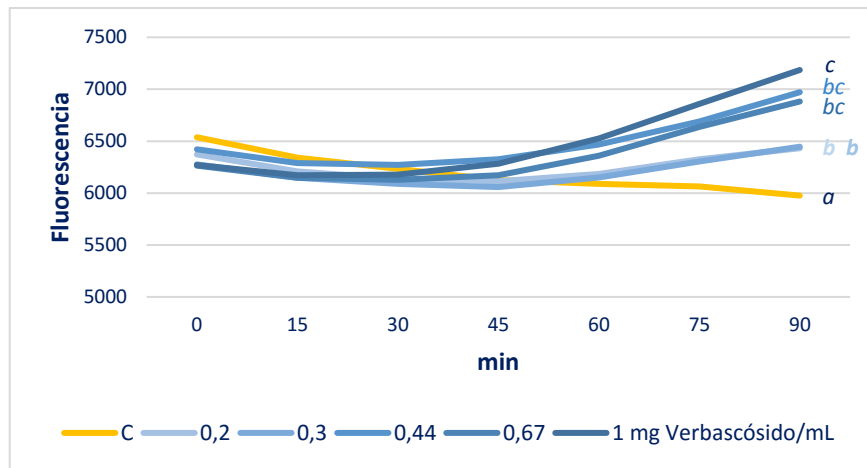


Figura 17. Efecto directo del verbascósido sobre la concentración de ERO intracelular en cultivo SH-SY5Y. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos a cada tiempo, (ANOVA Bonferroni: $p < 0,05$).

4.4.2. Ensayo de ERO en cultivo celular. Efecto protector

El estrés oxidativo, es decir los altos niveles de ERO intracelulares, resultan dañinos para todas las células (Salminen *et al.*, 2013). Como se muestra en la Figura 18, todas las concentraciones de verbascósido ensayadas fueron capaces de reducir de forma significativa el estrés oxidativo inducido por el H_2O_2 . Por lo tanto, este compuesto muestra un efecto protector en células de neuronales humanas (SH-SY5Y) frente al daño oxidativo inducido con H_2O_2 . El efecto de los fenoles, en este caso particular del verbascósido, sobre la producción de ERO sugiere su potencial para prevenir los cambios redox celulares que favorecen la neurodegeneración.

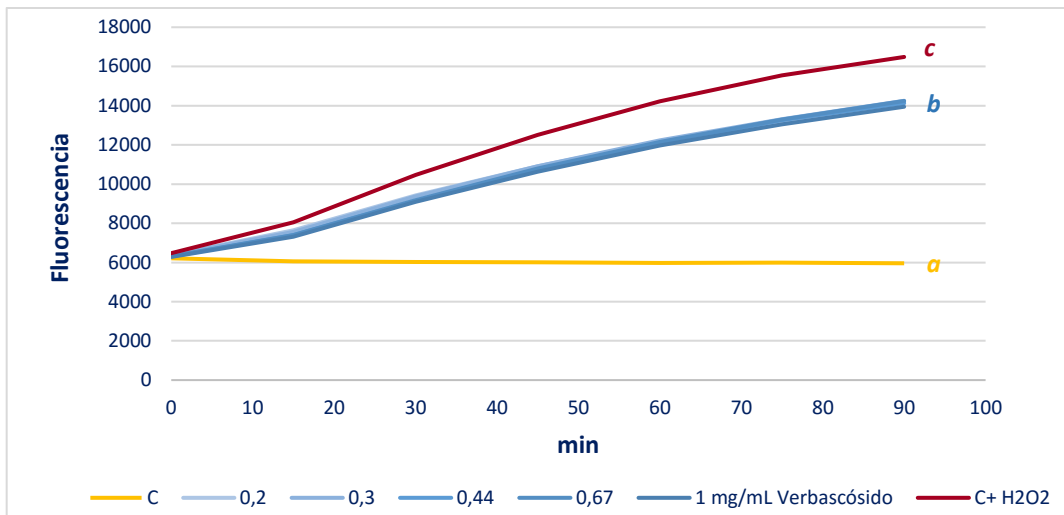


Figura 18. Efecto protector del verbascósido sobre la concentración de ERO intracelular en cultivo SH-SY5Y. Las células fueron pretratadas con distintas concentraciones de verbascósido y posteriormente sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂ 500 μM. Distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos a cada tiempo, (ANOVA Bonferroni: p<0,05).

En la misma línea de nuestros resultados, Lee *et al.* (2016) observaron la capacidad del verbascósido para reducir los niveles de ERO, y en consecuencia, la apoptosis y necrosis celular en fibroblastos fetales de perro. Los resultados obtenidos avalan la hipótesis de que el consumo de fenoles, pueden suponer una alternativa o al menos una terapia complementaria para la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Omar *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apuntan a que la actividad neuroprotectora del verbascósido, están de un modo u otro relacionadas con su capacidad para captar radicales libres. Esta relación ha sido ya demostrada para otras actividades del verbascósido como su capacidad antiinflamatoria o protectora frente a radiación UV (Alipieva *et al.*, 2014)

7. CONCLUSIONES

- Los ensayos realizados *in vitro* concluyen que el efecto antioxidante del verbascósido puede explicarse por su elevada capacidad de captura de los radicales DPPH•, O₂⁻, HO•, así como capacidad de reducción de fosfomolibdeno (CAT).

- El compuesto ensayado no tiene actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa y por lo tanto de la producción de ácido úrico, por lo que su efecto beneficioso en el tratamiento de la artritis es debido a sus propiedades antiinflamatorias.
- El verbascósido es una molécula con potencial terapéutico en la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en especial por su capacidad para inhibir la MAO-A y así disminuir la degradación de neurotransmisores monoaminérgicos
- Los ensayos realizados sobre cultivos celulares, revelan que el verbascósido muestra una actividad antioxidante significativa como protector celular frente al estrés oxidativo inducido, reduciendo los niveles de ERO intracelulares.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, I., Sharma, P., Suri, K.A., Satti, N.K., Dutt, P., Afrin, F., Khan, I.A. 2011. *In vitro* antifungal activities of amphotericin B in combination with acteoside, a phenylethanoid glycoside from *Colebrookea oppositifolia*. *J. Med. Microbiol.*, **60**(Pt 9):1326-36.
- Aligiannis, N., Mitaku, S., Tsitsa-Tsardis, E., Harvala, C., Tsaknis, I., Lalas, S., Haroutounian, S. 2003. Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. *J. Agric. Food Chem.*, **51**(25): 7308-12.
- Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI. 2014. Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol. Adv.*, **32**(6): 1065-76.
- Ameni, D., Baghiani, A., Boumerfeg, S., Dahamna, S., Khennouf, S., Zarga, H.M.A., Arrar, L. 2015. Phytochemical profiles, antioxidant capacity and protective effect against AAPH-induced mouse erythrocyte damage by *Daphne gnidium* L. shoots extracts. *Int.J. Pharm. Pharmaceutical Sci.*, **7**: 148-156.
- An, Z., Qi, Y., Huang, D., Gu, X., Tian, Y., Li, P., Li, H., Zhang, Y. 2014. EGCG inhibits Cd⁽²⁺⁾-induced apoptosis through scavenging ROS rather than chelating Cd⁽²⁺⁾ in HL-7702 cells. *Toxicol. Mech. Methods*, **24**: 259-267.
- Asungalem, E.A., Foyet, H.S., Ekobom S., Dimo, T., Kamtchouing, P. 2004. Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus*. *J. Ethnopharmacol.*, **95**: 63-68.

- Azimi, H., Fallah-Tafti, M. Khakshur, A.A., Abdollahi, M. 2012. A review of phytotherapy of acne vulgaris: perspective of new pharmacological treatments. *Fitoterapia*, **83**: 1306-1317.
- Bae, Y.H., Coung, T.D., Hung, T.M., Kim, J.A., Woo, M.H., Byeon, J.S., Choi, J.S., Min, B.S. 2014. Cholinesterase inhibitors from the roots of *Harpagophytum procumbens*. *Arch. Pharm. Res.*, **37**(9): 1124-1129.
- Battu, G.R., Ethadi, S.R., Veda, P.G., Priya, K.S., Chandrika, K., Rao, A.V., Reddy, S.O. 2011. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of *Euphorbia heyneana* Spreng. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, S191eS194.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.*, **5**(1): 9–19.
- Cardomy, R.J. y Cotter, T.G. 2000. Oxidative stress induces caspasas independent retinal apoptosis *in vitro*. *Cell Death. Differ.*, **7**(3): 282-291.
- Cásedas, G., Les, F., Gómez-Serranillos, M.P., Smith, C., López, V. 2016. Bioactive and functional properties of sour cherry juice (*Prunus cerasus*). *Food & Funct.*, **7**: 4675.
- Costa, F.H., Rosso, A.L., Maultasch, H., Nicaretta, D.H., Vincent, M.B. 2012. Depression in Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *Arq. Neuropsiquiatr.*, **70**(8): 617-20.
- Dell'Aquila, M.E., Bogliolo, L., Russo, R., Martino, N.A., Filioli Uranio, M., Ariu, F., Amati, F., Sardanelli, A.M., Linsalata, V., Ferruzzi, M.G., Cardinali, A., Minervini, F. Prooxidant Effects of Verbascoside, a Bioactive Compound from Olive Oil Mill Wastewater, on *In Vitro* Developmental Potential of Ovine Prepubertal Oocytes and Bioenergetic/Oxidative Stress Parameters of Fresh and Vitrified Oocytes. *Biomed. Res. Int.*, **2014**: 878062.
- Funari C.S., Gullo F.P., Napolitano, A., Carneiro, R.L., Soares Mendes-Giannini, M.J., Fusco-Almeida, A.M., Piacente, S., Pizza, C., Siqueira Silva, D.H. 2012. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia species* (*Verbenaceae*) from Brazil. *Food Chemistry*, **135** (3): 2086-2094.

- Funes, L., Fernandez-Arroyo, S., Laporta, O., Pons, A., Roche, E., Segura-Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A., Micol, V. 2009. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chem.*, **117**:589-98.
- Gay, N.H., Phopin, K., Suwanjang, W., Songtawee, N., Ruankham, W., Wongchitrat, P., Prachayasittikul, S., Prachayasittikul, V. 2018. Neuroprotective Effects of Phenolic and Carboxylic Acids on Oxidative Stress-Induced Toxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y. *Cells. Neurochem. Res.*, **43**(3): 619-636.
- Georgiev, M., Alipieva, K., Orhan, I., Abrashev, R., Denev, P., Angelova, M. 2011a. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chem.*, **128**(1): 100-5.
- Georgiev, M.I., Ali, K., Alipieva, K., Verpoorte, R., Choi, Y.H. 2011b. Metabolic differentiations and classification of *Verbascum species* by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry*, **72**:2045-51.
- Georgiev, M.I., Pastore, S., Lulli, D., Alipieva, K., Kostyuk, V., Potapovich, A., Panetta M., Korkina, L. 2012. *Verbascum xanthophoeniceum*-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferón-gamma-stimulated human keratinocytes. *J. Ethnopharmacol.*, **144**: 754-760.
- Govindan, P., Muthukrishnan, S. 2013. Evaluation of total phenolic content and free radical scavenging activity of *Boerhavia erecta*. *J. Acute Med.*, **3**, 103e109.
- Goya, L., Martin, M.A., Ramos, S., Mateos, R., y Bravo, L. 2009. A Cell Culture Model for the Assessment of the Chemopreventive Potential of Dietary Compounds. *Current Nutrition & Food Science*, **5**: 56-64.
- Hardy, J., Selkoe, D.J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**(5580): 353-356.
- He, J., Hu, X.P., Zeng, Y., Li, Y., Wu, H.Q., Qiu, R.Z., Ma, W.J., Li, T., Li, C.Y., He, Z.D. 2011. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. *J. of Asian Nat.Prod. Res.*, **13**(5): 449-464.
- Herput, U.S., Arihan, O., Iskit, A.B., Akito, N., Saracoglu, I. 2011. Antinociceptive, free radical-scavenging, and cytotoxic activities of *Acanthus hirsutus* Boiss. *J. Med. Food*, **14**(7/8): 767-774.

- Hong, J., Lu, H., Meng, X., Ryu, J.-H., Hara, Y., Yang, C.S. 2002. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Research*, **62**(24): 7241–7246.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**: 609-42.
- Huang, Y.Z., McNamara, J.O. 2012. Neuroprotective effects of reactive oxygen species mediated by BDNF-independent activation of TrkB. *J. Neurosci.*, **32**(44): 15521-32.
- Hugel, H.M. 2015. Brain food for Alzheimer-free aging: focus on herbal medicines. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **863**: 95-116.
- Joubert, J., Peter, J.P., Prins, L.H.A., Respod, B.P., Malan, S.F. 2014. Multifunctional enzyme inhibition for neuroprotection-A focus on MAO, NOS, and AChE Inhibitors. *En: Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*. Atta-ur-Rahman y M. Iqbal Choudhary (eds.). Bentham Science Publishers Ltd. Elsevier. Londres. 291-365 pp.
- Kaur, A. Dhari, J., Prakash Sharma, O., Gupta, G.D., Kharb, V. 2012. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of lycopene. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.*, **3**(3): 1220-1228.
- Koleva, I., Beek, T.A., Linszen, J., Groot, A. y Evstatieva, L. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochem. Anal.*, **13**, 8-30.
- Larit, F., Elokely, K.M., Chaurasiya, N.D., Benyahia, S., Nael, M.A., León, F., Abu-Darwish, M.S., Efferth, T., Wang, Y.H., Belouahem-Abed, D., Benayache, S., Tekwani, B.L., Cutler, S.J. 2018. Inhibition of human monoamine oxidase A and B by flavonoids isolated from two Algerian medicinal plants. *Phytomedicine*, **40**: 27-36.
- Lee, J.H., Chun, J.L., Kim, K.J., Kim, E.Y., Kim, D.H., Lee, B.M., Han, K.W., Park, K.S., Lee, K.B., Kim, M.K. 2016. Effect of Acteoside as a Cell Protector to Produce a Cloned Dog. *PLoS One*, **11**(7):e0159330.
- Lee, J.C., Kim, H.R., Kim, J., Jang, Y.S. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia flocus-indica* var. *sabote*. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 6490-6.

- Lee, J.H., Lee, J.Y., Kang, H.S., Jeong, C.H., Moon, H., Whang, W.K., Kim, C.J., Sim, S.S. 2006. The effect of acteoside on histamine release and arachidonic acid release in RBL-2H3 mast cells. *Arch. Pharm. Res.*, **29**: 508-13.
- Li, X., Jiang, Q., Wang, T., Liu, J., Chen, D. 2016. Comparison of the Antioxidant Effects of Quercitrin and Isoquercitrin: Understanding the Role of the 6''-OH Group. *Molecules*, **21**(9). pii: E1246.
- Li, X., Xie. Y., Li, K., Wu, A., Xie, H., Guo, Q., Xue, P., Maleshibek, Y., Zhao, W., Guo, J., Chen, D. 2018b. Antioxidation and Cytoprotection of Acteoside and Its Derivatives: Comparison and Mechanistic Chemistry. *Molecules*, **23**(2). pii: E498.
- Li, Y., Yu, H., Jin, Y., Li, M., y Qu, C 2018a. Verbascoside Alleviates Atopic Dermatitis-Like Symptoms in Mice via Its Potent Anti-Inflammatory Effect; *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **175**(4): 220-230.
- Liu, F., Ng,T.B. 2000. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci.*, **66**: 725-35.
- Long, L.H y Halliwell, B. 2011. Artefacts in cell culture:alpha-ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media, *Biochem.Biophys.Res. Comm.*, 406:20-24.
- Mathew, S., Abraham, E.T. 2004. *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol.*, **44**:198e206.
- Mendes, E., Perry, M.J., Francisco, A.P. 2014. Design and discovery of mushroom tyrosinase inhibitors and their therapeutic applications. *Expert Opin. Drug Discov.*, **9**(5): 533-54.
- Molnár, J., Gunics, G., Mucsi, I., Koltai, M., Petri, I., Shoyama, Y., Matsumoto, M., Nishioka, I. 1989. Antimicrobial and immunomodulating effects of some phenolic glycosides. *Acta Microbiol Hung.*, **36**(4):425-32.
- Muñoz Mingarro, D., Plaza, A., Galán, A., Vicente, J.A., Martínez, M.P., Acero, N. 2015. The effect of five *Taraxacum* species on *in vitro* and *in vivo* antioxidant and antiproliferative activity. *Food & Function*, **8**: 2787-2793.

Olsen, H.T., Stafford, G.I., van Staden, J., Christensen, S.B., Jäger, A.K. 2008. Isolation of the MAO-inhibitor naringenin from *Mentha aquatica* L. *J. Ethnopharmacol.*, **117**(3): 500–502.

Omar, S.H., Kerr, P.G., Scott, C.J., Hamlin, A.S., Obied, H.K. 2017. Olive (*Olea europaea* L.) Biophenols: A Nutraceutical against Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *Molecules*, **22**(11): 1858.

Pan, T., Li, X., Jankovic, J. 2011. The association between Parkinson's disease and melanoma. *Int. J. Cancer.*, **128**(10): 2251-60.

Parejo, I, Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C.2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric Food Chem.*, **50**(23): 6882-90.

Pastore, S., Potapovich, A., Kostyuk, V., Mariani, V., Lulli, D., De Luca, C., Korkina, L. 2009. Plant polyphenols effectively protect HaCaT cells from ultraviolet C-triggered necrosis and suppress inflammatory chemokine expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1171**: 305-13.

Pavithra, K., Vadivukkarasi, S. 2015. Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Food Science and Human Wellness*, **4**: 42-46.

Pereira, A.M., Hernandez, C., Pereira, S.I., Bertoni, B.W., França, S.C., Pereira, P.S. Taleb-Continim S.H. 2014. Evaluation of anticandidal and antioxidant activities of phenolic compounds from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. *Chem Biol Interact.*, **224**: 136-41.

Pietta P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **63**:1035e1042.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*, **269**(2): 337-41.

Quirantes-Piné, R., Herranz-López, M., Funes, L., Borrás-Linares, I., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. *Phytomedicine*, **20**(12): 1112-8.

- Radak, Z., Suzuki, K., Higuchi, M., Balogh, L., Boldogh, I., Koltai, E. 2016. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radic. Biol. Med.*, **98**: 187-196.
- Rhee, I.K., van de Meent, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R. 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A.*, **915**(1-2): 217-23.
- Rhee, S.G., Bae, Y.S., Lee, S.R., Kwon, J. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE.*, **53**: pe1.
- Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. 2013. Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**(2): 3834-59.
- Scarpati, M.L., Monache, F.D. 1963. Isolation from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. *Ann. Chim.*, **53**: 356-367.
- Shen, C.C., Ni, C.L., Shen, Y.C., Huang, Y.L., Kuo, C.H., Wu, T.S., Chen, C.C. 2009. Phenolic constituents from the stem bark of *Magnolia officinalis*. *J. Nat Prod.*, **72**: 168-71.
- Song, H.S., Choi, M.Y., Ko, M.S., Jeong, J.M., Kim, Y.H., Jang, B.H., Sung, J.H., Kim, M.G., Whang, W.K., Sim, S.S. 2012. Competitive inhibition of cytosolic Ca²⁺ dependent phospholipase A2 by acteoside in RBL-2H3 cells. *Arch. Pharm. Res.*, **35**: 905-10.
- Stone, J.R., Yang, S. 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid. Redox Signal.*, **8**(3-4):243-70.
- Sudha, G., Priya, M.S, Shree, R.I., Vadivukkarasi, S. 2015. *In vitro* free radical scavenging activity of raw pepino fruit. *Indian J. Pharm. Sci.*, **77**(2): 170–177.
- Tan, J.L., Li, Q.X., Ciccotosto, G.D., Crouch, P.J., Culvenor, J.G., White, A.R., Evin, G. 2013. Mild oxidative stress induces redistribution of BACE1 in non-apoptotic conditions and promotes the amyloidogenic processing of Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *PLoS ONE*, **8**(4): e61246.
- Tougu, V. 2001. Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. *Current Med. Chem.*, **1**: 155-170.

- Ubeid, A.A., Hantash, B.M. 2014. Novel pentapeptide activators of mammalian and mushroom tyrosinase. *Curr. Top. Med. Chem.*, **14**(12): 1463-8.
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R.T. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.*, **7**(1): 65-74.
- Veal, E.A., Day, M.A., Morgan, B.A. 2007. Hydrogen peroxide sensing and signalling. *Mol. Cell.*, **26**: 1-14.
- Verbascosido IQB 2010. <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha106.htm>.
- Wang, F., Zhi, J., Zhang, Z., Wang, L., Suo, Y. Xie, C., Li, M., Zhang, B., Du, J., Gu, L., Sun, H. 2017. Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *Rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq technique for identification of genes involved in acteoside biosynthesis. *Frontiers in Plant Sci.*, **8** Article: 787.
- Wartenberg, M., Budde, P., De Mareés, M., Grünheck, F., Tsang, S.Y., Huang, Y., Chen, Z.Y., Hescheler, J., Sauer, H. 2003. Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation cultures of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional chinese medicine. *Lab. Invest.*, **83**(1): 87-98.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, G.R., Clarke, A.W., Coyle, J.T., DeLong, M.R. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, **15**: 533-537.
- Xie, H.R., Hu, L.S., Li, G.Y. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J. (Engl.)*, **123**(8):1086-92.
- Yang, J., Yan, Y., Liu, H., Wang, J., Hu, J. 2015. Protective effects of acteoside against X-ray-induced damage in human skin fibroblasts. *Mol. Med. Rep.*, **12**: 2301-2306.
- Yin, L., Pang, G., Niu, C., Habasi, M., Dou, J., Aisa, H.A. 2018. A novel psoralen derivative-MPFC enhances melanogenesis via activation of p38 MAPK and PKA signaling pathways in B16 cells. *Int. J. Mol. Med.*, **41**(6):3727-3735.
- Youdim, M.B., Bakhle, Y.S. 2006. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br. J. Pharmacol.*, **147**, Suppl 1: S287-96.

Youdim, M.B., Edmondson, D., Tipton, K.F. 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**: 295-309.