

**Efecto neuroprotector de *Zea mays* (maíz morado)
en un modelo in vitro de neurodegeneración**
Neuroprotective effect of *Zea mays* (purple corn)
in a neurodegeneration in vitro model

Robles Román Margarita Elena¹, Zaa Limascca César Alexander¹, Marcelo Rodríguez Alvaro¹, López Romero Gladys².

Resumen

El interés en antocianinas se ha incrementado debido a sus múltiples actividades biológicas en la prevención de la obesidad, salud cardiovascular, efectos antiinflamatorios y anticancerígenos. El maíz morado (*Zea mays*) es una fuente de antocianinas en nuestro medio y el interés es averiguar su potencial como protector de las células nerviosas. El contenido de antocianinas en los granos y en la coronta de maíz es de 4.9 y 4.2 mg% respectivamente. Los espectros en el UV y Vis muestran picos de antocianinas alrededor de 526 y de 256 nm. Se ha usado un sistema de cultivo in vitro derivado de células embrionarias de hipocampo de rata para probar el efecto de extractos de maíz morado en la viabilidad celular. Muestras de maíz morado muestran un efecto protector usando glutamato como toxina. El comportamiento de protección del extracto en los cultivos es variable dependiendo de las regiones de obtención de las muestras. Esto podría indicar que las respuestas biológicas dependen de la composición de metabolitos secundarios de los extractos vegetales.

Palabras clave: Antocianinas, hipocampo, neuroprotección, espectros, *Zea mays*.

Abstract

The interest in anthocyanins has increased due to its multiple biological activities related to prevention of obesity, cardiovascular health, anti-inflammatory effects and anti-cancer properties. The purple corn (*Zea mays*) is a source of anthocyanins and the interest is to find out its potential as a protection agent of neural cells. The content of anthocyanins in grains and in the cob was 4.9 and 4.2 m% respectively. The spectra in the UV-Vis region showed anthocyanin peaks around 526 and 256 nm. An in vitro culture system has been used and derived from cells of hippocampus of rat brain to test the effect of purple corn extracts in cell viability. Samples of purple corn showed a protective effect against glutamate. The behavior of protection of the extracts on the cell cultures is variable depending on the source of the corn. This may indicate that the biological responses depended on the composition of secondary metabolites of the vegetal extracts.

Key words: anthocyanins, hippocampus, neuroprotection, spectra, *Zea mays*.

¹Universidad Nacional Federico Villarreal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática.

²Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina.

INTRODUCCIÓN

La viabilidad celular es un método usado entre otras cosas para evaluar los daños celulares debido a las toxinas. *Zea mays L.*, variedad morado, es una variedad genética de maíz peruano (Otiniano, 2012). Entre los componentes químicos del maíz morado encontramos a los compuestos fenólicos (Arroyo et al., 2010), que actúan como antioxidantes, secuestrando especies reactivas de oxígeno e inhibiendo las enzimas productoras de radicales libres (Atina ni et al., 2011). En la planta de maíz morado, los compuestos fenólicos son las antocianinas, presentes en diferentes estructuras, como tallo, vaina, hojas e inflorescencias (Salinas et al., 2012).

El glutamato es uno de los neurotransmisores aminoacídicos más importantes. Su importancia radica en que es el principal neurotransmisor excitador. Sin embargo a elevadas concentraciones produce el aumento de la concentración de Ca^{2+} causando muerte celular por apoptosis (Zhang y Bhavnani, 2006)

MATERIAL Y MÉTODO

Disección del tejido: se sacrificó por dislocación cervical una rata adulta preñada de 18 días de estado gestacional (E18) y se procedió a transferir los embriones en solución de Hank. Luego de separarlos de la placenta y bolsa amniótica se transfirieron en 15mL de solución de disección nueva.

Preparación de la suspensión celular: se separó el hipocampo y se colocó en una placa Petri cortándolo en pequeños pedazos, agregando 5 mL de tripsina al 0,25% y 5 ml de solución de disección. Se incubó a 37°C en estufa de CO_2 durante 20 minutos. Se colocaron los pedazos (pellet) en un tubo de 15mL con 5mL de medio plating, se dejó decantar, se sacó el pellet y se resuspendió con 5mL de medio plating. Luego se disoció empleando una pipeta Pasteur de vidrio de 2 mL.

Preparación de los cultivos: se utilizaron placas de 96 pozos para el cultivo de las células. Previamente, el día anterior se aplicó 100 uL de poli-lisina a cada pocillo, manteniéndolo en oscuridad y a temperatura ambiente. Se agregó 100 uL de las células disociadas en cada pocillo y se incubó a 37°C y 5% de CO_2 hasta la formación de la monocapa celular. Luego se colocó 5 uL del extracto vegetal y 24 horas después se agregó 5 μ L de glutamato (5 mM) a los pocillos correspondientes. Cuatro días después se agregó 20 μ L de agua destilada a todos los pocillos. Se retiró aproximadamente 75 μ L de sobrenadante de todos los pocillos de la placa y se colocaron en otra placa en el mismo orden. Luego se agregó 75 μ L de solución de lisis a cada uno de los pocillos de la placa con las células adheridas (Aguayo et al., 2009).

Determinación de la viabilidad celular

Para el conteo celular se usó el hemocitómetro de Bauer. Se contaron los 2 campos internos cuadrículados y se sumaron ambos y luego se multiplicaron por 10,000 para obtener el número de células /mL. En la prueba enzimática se ensayó la actividad de fosfatasa alcalina en el sobrenadante del medio de cultivo y en las células adheridas a los pocitos de la microplaca de 96 pocitos usando el Kit de Valtex para fosfatasa por medición continua. Se supone que la actividad en el sobrenadante refleja la actividad de las células no adheridas y no viables mientras que la actividad de las células adheridas es relacionada a las células viables. La viabilidad celular se calcula como el porcentaje de actividad de células adheridas sobre el total de la actividad en el sobrenadante y las adheridas (actividad aditiva).

Determinación de los espectros UV - VIS de maíz morado

Se prepararon extractos etanólicos de maíz morado. Se obtuvieron 2 muestras de Huacho (G) y de Arequipa (T) para la preparación de los

extractos. Se sacaron las cutículas secas de los granos de maíz para preparar soluciones saturadas de granos de maíz tomando 1 gramo de cáscara y se diluyó en 2 mL de alcohol al 70%.

Las corontas y los granos de maíz morado fueron secadas a 40°C. Luego una cantidad conocida de ellos fueron macerados en metanol (MeOH). Se tuvieron stocks de soluciones a 1g/L que se usaron para diluciones posteriores. La coronta de maíz morado seca se pesó 0.5 gr y se diluyó en 1 mL de alcohol 70%

Las soluciones saturadas se diluyeron apropiadamente de 50 a 200 veces para sacar los espectros en un espectrofotómetro UV - VIS. De estos espectros se determinaron los picos espectrofotométricos y los valles en los rangos ultravioleta y visible.

Determinación del contenido total de antocianinas en extractos de maíz morado.

Se usó el método diferencial de pH (Giusti y Worsltad, 2001).

Del extracto liofilizado se tomó 50 μ L de solución que es equivalente a 0.05 mg del liofilizado y se completó hasta 2.5 mL con solución de buffer pH 1.0 (0.1M HCl). Otra muestra similar se completó hasta 2.5 mL con buffer pH 4.5 (buffer acetato 25 mM). Las absorbancias fueron medidas a 510 nm y 700 nm respectivamente y fueron calculadas como:

$$Ab = (A_{519} - A_{700})_{pH1} - (A_{519} - A_{700})_{pH4.5}$$

El contenido de antocianina total (CAT) se calculó con la ecuación:

$$CAT \text{ (mg /100g)} = \frac{Ab}{eL} \times MW \times D \times \frac{V}{G} \times 100$$

Donde Ab=absorbancia, e= 26900, L=longitud del camino de la celda (1 cm), MW=peso molecular de la antocianina (449.2da), D=factor de dilución, V=volumen final (2.5 mL), y

G=peso seco maíz morado (mg). Se usó un coeficiente de extinción molar (e) de 26900 para cianidina-3-glucosido.

RESULTADOS

Se observó mayor viabilidad celular en el cultivo expuesto al tóxico con el Extracto T de maíz morado (100%), mientras que en el cultivo expuesto al Extracto G la viabilidad fue de 92,1%. Estos valores son aproximaciones derivadas de los contajes celulares.

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad del cultivo expuesto al extracto vegetal T.

Muestra	% viabilidad
Células	100
Células + Toxina	74
Células + Extracto vegetal T	100
Células + Extracto vegetal T + Toxina	100

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad del cultivo expuesto al extracto vegetal G.

Muestra	% viabilidad
Células	100
Células + Toxina	74
Células + Extracto vegetal G	93
Células + Extracto vegetal G + Toxina	93

En el caso de las células adheridas, el número fue mayor en el cultivo celular expuesto al extracto G (Fig. 2).

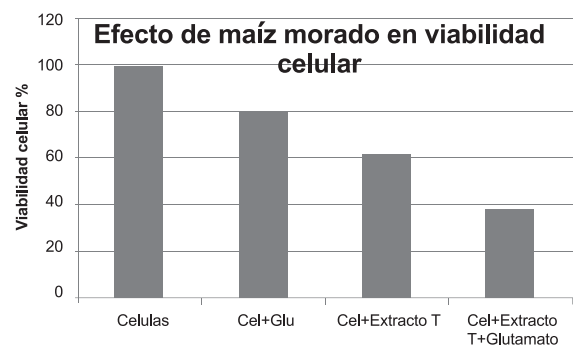


Figura 1. Células adheridas expuestas al extracto vegetal T.

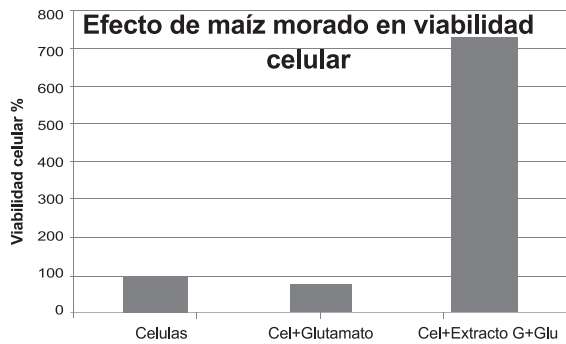


Figura 2. Células adheridas expuestas al Extracto vegetal G. Evaluación de la viabilidad celular en células incubadas con glutamato como agente tóxico.

Espectros UV - VIS de maíz morado.

Las muestras de maíz morado mostraron picos y valles en zonas muy cercanas. Hay ligeras diferencias entre los espectros de coronta y de granos.



Figura 3. Espectro VIS de coronta de maíz morado extraído en MeOH.

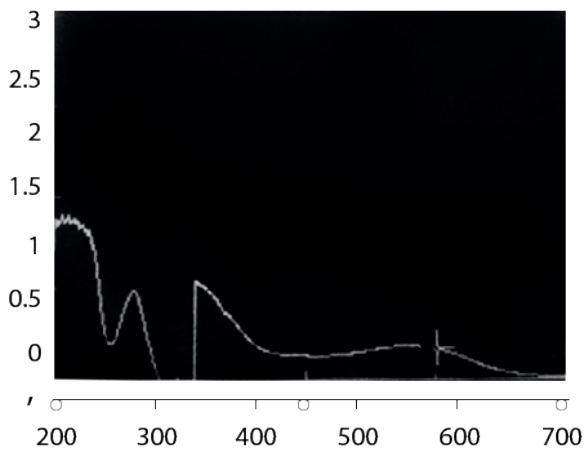


Figura 4. Espectro de la coronta de maíz morado extraído en etanol 70°.

Los picos y valles característicos de maíz morado se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Picos y valles de absorbancia de los extractos alcohólicos de maíz morado de coronta y de granos.

Muestra	P1	V1	P2	P3
Extracto coronta	215	259	281	558
Extracto coronta 2		256	285	541
Extracto cáscara		256	283	526

P=Picos (nm)

V=Valles (nm)

Determinación del contenido total de antocianina.

Maíz morado liofilizado. Extracto metanólico (MeOH)

	Ab 510	Ab 700	d(510-700)	d(pH1-pH4.5)	CAT mg/100g
pH1	0,1259	0,01	0,1159	0,059	4,9
pH4.5	0,061	0,001	0,06		

	Ab 510	Ab 700	d(510-700)	d(pH1-pH4.5)	CAT mg/100g
pH1	0,118	0,004	0,114	0,09	4,2
pH4.5	0,027	0,003	0,024		

Esquema 1. Contenido de antocianinas totales tanto para el maíz morado liofilizado como el de coronta.

CAT: Contenido de antocianinas totales

Ab: absorbancia (en nm).

DISCUSIÓN

Hay una variabilidad de la viabilidad celular entre los datos obtenidos por conteo celular y por determinación de actividad enzimática de la fosfatasa alcalina. Lo que se observa es que hay una fuerte dependencia de la viabilidad celular basada en el porcentaje de la adherencia de las células al soporte basal a la microplaca. Esto último depende del uso de poli-lisina como agente de adherencia. Los métodos clásicos de determinación de viabilidad celular están basados en morfología celular (conteo celular) y

permeabilidad de la membrana (azul de tripán, LDH o fosfatasa alcalina) (Mandar A, Aras. 2008).

La toxina probada (glutamato) muestra una disminución de la viabilidad celular cuando se añade a los cultivos celulares (Fig. 1 y 2) pero su comportamiento es más elaborado cuando se añaden los extractos de maíz morado. El comportamiento del extracto de maíz morado depende de la procedencia de la muestra, lo que probablemente esté relacionado con el contenido relativo de metabolitos secundarios y tal vez más con el contenido de antocianinas (fig. 3 y 4). El contenido de antocianinas es un poco mayor en la cáscara del grano de maíz que de la coronta (4.9 vs 4.2 mg%). Estos valores son menores a los reportados por Fernando Ramos-Escudero, 2012. El contenido de compuestos orgánicos que absorben más en el ultravioleta es mayor de lo que aparece en la fig.4. en la cual se cambió la escala UV a un valor menor para evidenciar los picos y valles reportados en la tabla 3. La mayoría de los picos de las antocianinas que se muestran en el rango UV coinciden con el pico 2 que se muestra alrededor de 283 nm (Fig. 4) y en el visible se evidencia un pico alrededor de 526 nm (Fig. 3) los cuales coinciden con las picos reportados en la literatura (Yang, 2008; Giusti, 2001) para las principales antocianinas de maíz morado.

El comportamiento de los extractos de maíz morado es distinto en la respuesta a la viabilidad celular y merece un análisis más detallado. Se puede concluir que hay una presencia de antocianinas que probablemente sea responsable de la actividad antioxidante reportada para este vegetal y que su respuesta como agente neuroprotector estaría ligado a la mejora de la viabilidad celular presente en los extractos vegetales (Fig. 2). Se amerita un estudio más detallado de la actividad de neuroprotección con otros métodos de medición de viabilidad celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguayo, L.G. et al (2009). Alzheimer β -amyloid blocks epileptiform activity in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 41: 420–428.
- Arroyo, J. et al (2010). Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (*Zea mays* L) en ratas hipercolesterolémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 24:157-162.
- Atmani, E et al. Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *J. Med. Plants res*. 5:589-598.
- Back et al. Phenolic Compounds from the Stems of *Zea mays* and Their Pharmacological Activity. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2014 1-7.
- Giusti, M. M., & Worsltad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry* New York: Wiley.
- Mandar A, Aras et al . 2008. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures.. *Current protocols in neuroscience* 7.18.1. Supplement 44.
- Otiniano, V. Actividad antioxidante de antocianinas presentes en la coronta y grano de maíz (*Zea mays* L.) variedad morada nativa cultivada en la ciudad de Trujillo. Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Cesar Vallejo. 2012. 7p.
- Ramos-Escudero, Fernando. 2012 Purple Corn (*Zea mays* L.) Phenolic Compounds Profile and Its Assessment as an Agent Against Oxidative Stress in Isolated Mouse Organs. *D. J Med Food* 15 (2), 206–215.

Rochet et al. Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidinrich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2014 March 25; 1555: 60–77

Salinas, Y. et al (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Rev. Fitotec. Mex* 285-294.

Sotomayor, R. Extracción y cuantificación de antocianinas a partir de los granos de *Zea mays* L. (maíz morado). *Revistas UAP.* P 1-6.

Yang, Z. et al. 2008. Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry. *Eur Food Res Technol* 227:409–415.

Zhang Yue Mei & Bhagu R Bhavnani. 2006. Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC Neuroscience.* 7:49. 1 - 22.

e-mail: mroblesr@unfv.edu.pe