

**EFFECTO GENOTÓXICO DE LA EXPOSICIÓN AL 6-SHOGAOL EN  
CÉLULAS TUMORALES**

**PAULA ALEJANDRA MUÑOZ CASTELLANOS**  
Autor

**TRABAJO DE GRADO**

Presentado como requisito para optar al título de

**NUTRICIONISTA DIETISTA**

**ANDRÉS FELIPE ARISTIZABAL PACHÓN, Ph.D.**  
Director

**MIRIAM LUCÍA OJEDA ARREDONDO, Ph.D.**  
Co-Directora

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
NUTRICIÓN Y DIETÉTICA  
BOGOTÁ D.C. – JUNIO DE 2019**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**EFFECTO GENOTOXICO DE LA EXPOSICIÓN AL 6-SHOGAOL EN  
CÉLULAS TUMORALES**

**PAULA ALEJANDRA MUÑOZ CASTELLANOS**

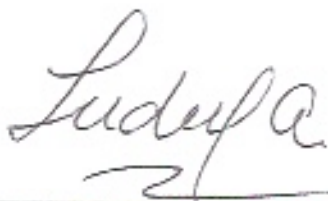
**APROBADO**



Andrés Felipe Anstizabal Pachón  
B.Sc., PhD.  
Director



Miriam Lucía Ojeda Arredondo  
ND. MSc. PhD.  
Codirectora



Ludis Del Rosario Morales  
Química - Bióloga. PhD.  
Jurado

**EFFECTO GENOTÓXICO DE LA EXPOSICIÓN AL 6-SHOGAOL EN  
CÉLULAS TUMORALES**

PAULA ALEJANDRA MUÑOZ CASTELLANOS

**APROBADO**

---

Concepción J. Puerta B.  
Bacterióloga PhD.  
Decana de Facultad de ciencias  
Dietética

---

Martha Constanza Liévano F.  
Nutricionista Dietista MSc.  
Directora Carrera Nutrición y

## DEDICATORIA

*A Dios*

*A mi familia y a las personas que me apoyaron en todo momento*

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente, doy gracias a Dios por permitirme llegar a este punto acompañada de personas que creyeron en mí y me apoyaron en todo momento.

A mi director de tesis el Dr. Andrés Aristizábal quien me dio la oportunidad de vivir esta experiencia, quien compartió conmigo una pequeña parte de su conocimiento y logró que yo explorara un camino importante de mi carrera. Así mismo a mi codirectora, la Dra. Miriam Ojeda quien estuvo interesada en mi proceso de manera constante y me ayudó en todo lo que estuvo a su alcance.

A mi compañera Ángela García por enseñarme y acompañarme a lo largo del semestre, despejar dudas de la parte técnica y colaborar en los procedimientos.

Expreso gratitud también a mis compañeros del laboratorio de bioquímica computacional y bioestadística quienes me enseñaron a hacer todas las operaciones necesarias para sacar este trabajo adelante, de igual forma, por ayudarme e instruirme frente al uso de equipos y por tenerme paciencia a la hora de hacer las cosas.

A mi mamá, mis abuelos, mis tíos y mi hermana por siempre estar presente, por mostrarme apoyo constante, por motivarme a la finalización de este trabajo y por darme todas las oportunidades que hasta el día de hoy me han dado.

A mi novio Andrés, por ayudarme y motivarme en momentos de frustración, por desearme siempre lo mejor y también por prepararme para no desfallecer en los momentos difíciles de este proyecto.

Muchas gracias a todos

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Cáncer .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Panorama general.....	2
2.1.2 Fibrosarcoma .....	3
2.1.3 Tratamientos alternativos.....	3
<b>2.2 Zingiber officinale .....</b>	<b>4</b>
2.2.1 Gingerol.....	4
2.2.2 Shogaol .....	4
2.2.3 Propiedades medicinales del jengibre y sus compuestos.....	5
<b>2.3 Genotoxicidad .....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Ensayo del cometa.....	6
2.3.2 Otras pruebas .....	8
<b>3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>4.1 Objetivo general .....</b>	<b>10</b>
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>10</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>6.1. Diseño de la investigación .....</b>	<b>10</b>
6.2.1. Cultivo celular.....	11
2.3.3 Viabilidad Celular .....	11
2.3.4 Ensayo del cometa.....	12
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>18</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>20</b>
<b>10. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>20</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>21</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Compuestos activos del jengibre y sus propiedades .....	5
<b>Tabla 2</b> Principales enzimas de reparación utilizadas y su potencial .....	7
<b>Tabla 3.</b> Operacionalización de variables .....	10

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estandarización de la prueba ensayo del cometa. A) Células HT-1080 sin exposición a agentes genotóxicos B) Células HT-1080 expuestas a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> C) Momento de la cola con y sin presencia de agentes genotóxicos D) Momento de Olive en células con y sin exposición. ****, diferencias estadísticamente significativas.....	14
<b>Figura 2</b> Viabilidad celular en los diferentes tratamientos A) % células HT-1080 vivas a 6 y 12 horas B) % células HT-1080 vivas a 24 y 48 horas.....	14
<b>Figura 3 .</b> Efecto genotóxico del 6-shogaol en la línea tumoral HT-1080 a 6 y 12 horas. A) Tail Moment a 6 horas de exposición. B) Olive Moment a 6 horas de exposición. C) Tail Moment a 12 horas de exposición. D) Olive Moment a 12 horas de exposición. ****, diferencias estadísticamente significativas.....	15
<b>Figura 4.</b> Comportamiento del efecto genotóxico del 6-shogaol en la línea tumoral HT-1080 a 24 y 48 horas. A) Tail Moment a 24 horas de exposición. B) Olive Moment a 24 horas de exposición. C) Tail Moment a 48 horas de exposición. D) Olive Moment a 48 horas de exposición. ****, diferencias estadísticamente significativas. ....	16
<b>Figura 5.</b> Comportamiento general de las diferentes concentraciones a lo largo de los tiempos de exposición. A) Momento de Olive B) Momento de la cola. ....	17

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1. PROTOCOLO ENSAYO DEL COMETA</b> .....	25
<b>ANEXO 2. PRUEBA DE NORMALIDAD</b> .....	31



## RESUMEN

Los compuestos bioactivos poseen innumerables propiedades, con acciones benéficas en el tratamiento de diversas enfermedades. En este estudio se buscó caracterizar el efecto genotóxico del 6-Shogaol en cultivos celulares en la línea tumoral HT-1080; para lo anterior, se evaluó la viabilidad por medio de azul de tripan y así mismo se realizó el ensayo del cometa; este ensayo se basa en exponer las células al compuesto en una solución de lisis; posteriormente, se llevó a desenrollamiento alcalino durante 30 minutos; se realizó la corrida electroforética, durante 30 minutos (300mA constantes, 25V). Al terminar la corrida, cada lámina se puso en solución de neutralización por 15 minutos y se sometió a deshidratación con metanol. Para la lectura, se tiñeron con hydragreen 5X y se leyeron al microscopio de fluorescencia (20X). Se tomaron 50 células por lámina para analizarlas por el Software ImageJ y el pluggin OpenComet. La estadística se realizó mediante GraphPad-Prisma 6. Como resultado se obtuvo que a 6h y 12h no existe diferencia significativa entre los tratamientos y el control negativo. A 24 y 48 horas se observó que el efecto es dependiente de la concentración con efectos significativos. Para concluir se encontró que el tiempo de exposición y la concentración con mayor efecto genotóxico fue el de 40 $\mu$ M a 24 horas, así mismo, las células expuestas a las diferentes concentraciones realizadas en este estudio no evidencian efecto del 6-Shogaol sobre la viabilidad de la línea tumoral HT-1080.

## ABSTRACT

Bioactive compounds have innumerable properties, with beneficial actions in the treatment of various diseases. In this study, we sought to characterize the genotoxic effect of 6-shogaol in cell cultures in the HT-1080 tumor line; for the above, the viability was evaluated by means of trypan blue and the comet test was used. This test is based on exposing the cells to the compound in a lysis solution: afterwards, the alkaline unwinding was carried out for 30 minutes and the electrophoretic run was carried out for 30 minutes (constant 300mA, 25V). At the end of the run, each sheet was placed in neutralization solution for 15 minutes and dehydrated in methanol. For reading, they were stained with hydragreen 5X and read under the fluorescence microscope (20X). 50 cells were taken per sheet for analysis by the ImageJ Software and the OpenComet pluggin The statistic was made using GraphPad-Prisma 6. As results, it was obtained that at 6h and 12h there is no significant difference between the treatment and the negative control. At 24 and 48 hours. It was observed that the effect is concentration-dependent with significant effects. To conclude, it was found that the exposure time and the concentration with the greatest genotoxic effect was 40M at 24 hours. Likewise, the cells exposed to the different concentrations carried out in this study do not show any effect of 6-Shogaol on the viability of the HT-1080 tumor line

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales enfermedades del mundo causantes de la mortalidad de los individuos; por esta razón la ciencia está en constante investigación sobre posibles agentes o fármacos que impidan el progreso de esta enfermedad.

Dentro de estos posibles agentes se encuentran los compuestos bioactivos de alimentos y plantas, a los cuales se le han destacado sus propiedades medicinales, siendo estos una gran alternativa para tratar algunas enfermedades o emplear conjuntamente con los tratamientos actuales, potencializando o mejorando los resultados de estos. Uno de los alimentos que muestra gran número de propiedades medicinales es el jengibre, el cual posee como compuestos bioactivos los gingeroles, shogaoles, paradoles, entre otros.

Este trabajo de investigación buscó evidenciar el potencial genotóxico de uno de los compuestos activos del jengibre, el 6-Shogaol, al cual se le han atribuido diversas propiedades antitumorales. Es por esto, que este estudio tiene como objetivo caracterizar el efecto genotóxico del 6-Shogaol en cultivos celulares de líneas tumorales derivadas de fibrosarcoma humano HT-1080. De esta manera este compuesto podría tener una acción conjunta con los medicamentos terapéuticos del cáncer.

El efecto genotóxico se evaluó por medio de la electroforesis alcalina de células individuales o Ensayo del Cometa. El ensayo consta de diversos pasos, iniciando con un proceso de lisis, seguido por un desenrollamiento alcalino; así mismo se llevo a cabo una electroforesis alcalina y una neutralización. Todo lo anterior fue leído por medio de la tinción con un fluorocromo intercalante en el ADN y leído en un microscopio de fluorescencia.

Se encontró pertinente realizar este estudio entendiendo que al ser un agente genotóxico para células cancerosas podría ser un posible tratamiento sinérgico con los tratamientos actuales contra el cáncer, permitiendo un resultado favorable en los pacientes que padecen esta enfermedad.

## **2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer se define como una patología multifactorial, en la cual las células se desarrollan de manera anormal; se dividen, crecen y diseminan sin control en cualquier parte del cuerpo (Puente & Velasco, 2017). Existen factores predisponentes, entre los cuales están los físicos (radiaciones ultravioleta o ionizantes), químicos (amianto, el humo del tabaco y sus componentes, las aflotoxinas, el arsénico) y biológicos (virus, bacterias y parásitos) (Plummer et al., 2016).

Esta enfermedad como muchas otras tiene diversos factores de riesgo que no se limitan a la genética, las principales situaciones que aumentan la probabilidad de padecer esta enfermedad son el sedentarismo y los malos hábitos alimentarios tales como tener un elevado índice de masa corporal, una dieta pobre en frutas y verduras, el consumo de alcohol y el tabaquismo, (Plummer et al., 2016). Como se puede observar, en su gran mayoría son aspectos modificables, lo cual lograría disminuir la predisposición de los individuos a esta enfermedad.

#### **2.1.1 Panorama general**

En el 2018, el cáncer se posicionó como la segunda causa de muerte en el mundo, pues este fue el responsable de 9,5 millones de muertes; así mismo, se presentaron 18,1 millones de casos nuevos para este año. Los tipos de cáncer que más defunciones producen son en primer lugar, el pulmonar, seguido del cáncer de seno, el colorrectal, el de próstata y el gástrico (The Global Cancer Observatory, 2018).

El tratamiento en etapas tempranas del cáncer presenta un mejor pronóstico que los que son detectados y tratados en etapas avanzadas de la enfermedad; por otra parte, se deben considerar que el diagnóstico y tratamiento de los pacientes está sujeto a la cobertura en salud que cada uno de ellos tenga. Para el año 2017, se observó que en los países con bajos ingresos solo se ofrece tratamiento a los enfermos de esta patología en un 30%, mientras que, en los países con ingresos altos, el 90% logra tener un tratamiento oncológico (Plummer et al., 2016).

En Colombia, el panorama no es distinto. El cáncer se considera un problema de salud pública, y los datos arrojan que alrededor de 46 mil personas murieron a causa de esta enfermedad en el 2018 y se presentaron alrededor de 101 mil casos nuevos para el mismo

año (The Global Cancer Observatory, 2018). Las últimas cifras reportadas para el país, demuestran que los principales tipos de cáncer a los cuales se les atribuye la mortalidad son el cáncer de seno, el de próstata, el colorrectal, el gástrico y el de pulmón (The Global Cancer Observatory, 2018).

### 2.1.2 Fibrosarcoma

Este tipo de cáncer se define como un tumor maligno caracterizado por la aparición de haces entrelazados de fibras colágenas, sin otro tipo de estructuras histológicas (cartílago o hueso) (World Health Organization Classification of Tumours., 2003). El 36% de los sarcomas primarios corresponden a este tipo de tumor. Es importante mencionar que este tipo de cáncer no tiene una etiología esclarecida, sin embargo, en algunos casos se ha determinado un componente genético importante en la aparición de estas masas, así como la exposición a radiaciones. Dependiendo la clasificación histopatológica se define el pronóstico de la enfermedad, dándole principal importancia a la morfología celular y al patrón de crecimiento del tumor (Mercado et al., 2005).

### 2.1.3 Tratamientos alternativos

Con el pasar de los años, se han atribuido diversas propiedades a los compuestos funcionales de los alimentos; un ejemplo son los isoprenoides tales como el escualeno, un terpeno presente principalmente en el aceite de hígado de tiburón, así como en el aceite de amaranto, oliva, trigo, maíz y arroz. A esta molécula se le atribuyen propiedades antioxidantes, que como su nombre lo indica previenen la oxidación de otros compuestos. De igual forma, los carotenoides, han mostrado un efecto antioxidante el cual está relacionado con la prevención y tratamiento del cáncer (Drago & López, 2006).

Por otro lado, se ha observado que el ácido graso esencial linolénico (omega 3) precursor del DHA y EPA, promueve y aumenta la actividad de fármacos anticancerígenos por medio de una mayor captación celular del fármaco y un aumento en la sensibilidad celular a los medicamentos antineoplásicos (Drago & López, 2006; León, Salgado, Sánchez, & Cortés, 2014). En otro estudio, se observó que la disminución de la relación de ácidos grasos omega-6/omega-3, indicaría un descenso en la generación de moléculas pro inflamatorias y pro cancerígenas en pacientes con cáncer de próstata, esto relacionado con el potencial pro-inflamatorio que tienen los ácidos grasos omega 6 (ácido graso linoleico) y el potencial anti-inflamatorio de los ácidos grasos omega 3 (ácido graso linolénico). (Valenzuela B, Bascuñan G, Chamorro M, & Valenzuela B, 2011).

## 2.2 Zingiber officinale

Es una planta herbácea de la familia de las zingiberáceas, la cual puede llegar a medir hasta un metro de altura. Posee un rizoma grueso, carnoso y nudoso, siendo ésta, la parte principalmente utilizada de la planta; de igual forma, posee tallos simples, los cuales tienen hojas a lo largo de él en dos líneas paralelas. Sus flores se encuentran en una espiga densa al extremo del tallo, son sésiles y amarillas (Salgado, 2011).

Esta planta es reconocida por su importancia medicinal, aromática y condimentaria en diversas partes del mundo. El principal productor de jengibre es el continente asiático; India y China son los principales países que destacan la producción de jengibre fresco, seguidos de Nigeria, Nepal, Indonesia, Tailandia, Camerún, Bangladesh, Japón y Filipinas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2017). Se debe destacar que el aceite esencial de jengibre es usado en la industria de alimentos, bebidas, industria farmacéutica, cosmética y perfumería, y se destacan compuestos activos como el gingerol y el shogaol a los cuales se le atribuyen propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, antieméticas y anticancerígenas (Sasidharan, Venugopal, & Menon, 2012)

### 2.2.1 Gingerol

En el jengibre hay numerosos compuestos activos de los cuales se destacan las oleoresinas, estas son conocidas como el aceite de jengibre; es importante destacar que un compuesto biológicamente activo se define como una sustancia química presente en las plantas y ciertos alimentos que contienen fitoquímicos bioactivos capaces de promover diversos efectos sobre el organismo (Drago & López, 2006). Los principales componentes son terpenos, hidrocarburos de sesquiterpenos y compuestos fenólicos como el gingerol y el shogaol. Cabe resaltar que los gingeroles tienen el potencial de ser convertidos en shogaol, zingerona y paradol (Rahmani, Al Shabrimi, & Aly, 2014). Dependiendo de los procedimientos por los cuales ha sido sometido el jengibre sus compuestos pueden variar las concentraciones, estos procedimientos pueden ser fresco, seco, salteado o carbonizado, debido a que al ser procesado a alta temperatura, se pierde gran parte de sus propiedades antioxidantes por la conversión de gingeroles a shogaoles (Morais, Tkeuchi, & Vannucchi, 2018).

### 2.2.2 Shogaol

Este principio activo se obtiene mediante el calentamiento y el secado del rizoma; en el jengibre fresco, el Shogaol existe en muy pequeñas cantidades, sin embargo, en jengibre

seco o deshidratado está presente en mayores cuantías (Ling, Yang, Tan, Chui, & Chew, 2010), esto relacionado principalmente por la reducción del gingerol lo cual lo transforma en shogaol. Al 6-shogaol se le han atribuido diversas propiedades como la inducción de apoptosis en células humanas de carcinoma colorrectal, también se le ha encontrado que reduce la viabilidad de células en cáncer gástrico, así como su eficiencia en la inhibición de la expresión de mediadores inflamatorios. Finalmente se ha demostrado su acción anti-inflamatoria in vivo reduciendo la inflamación crónica en rodillas de ratones (Ling et al., 2010). En cuanto a los estudios realizados hasta el momento en la línea celular de fibrosarcoma HT-1080, se ha encontrado la evaluación del 6-Shogaol sobre la captación de glucosa y la supervivencia de estas células (Romero & Morales, 2018). Así mismo, se encuentran estudios para determinar si el compuesto tiene efecto sobre la actividad HIF en esta línea tumoral (Rosas, Guzmán, Iglesias, & Tehéran, 2018).

### 2.2.3 Propiedades medicinales del jengibre y sus compuestos

Se han determinado diversas propiedades a partir de los compuestos derivados del Jengibre; en la tabla 1, se destacan algunas de ellas.

**Tabla 1** Compuestos activos del jengibre y sus propiedades

Compuesto activo	Actividades biológicas
Gingerol	Antioxidante
	Antitumoral por medio de la inducción de apoptosis, modulación genética
	Antiinflamatoria y anti-analgésica
	Antimicrobiano Protector hepático
Paradol	Antioxidante y anticanceroso
	Antimicrobiano
Shogaol	Antioxidante y antiinflamatoria
	Anticancerosa por inhibición de la invasión celular
	Anti-proliferativa y anti-invasiva
Zingerona	Antioxidante
	Antiinflamatoria

## Antibacteriano

Terpenoides Induce apoptosis por la activación de P53

Flavonoides Antioxidante

---

Tomado de: Rahmani, A. H., Al Shabrmi, F. M., & Aly, S. M. (2014). Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. *International Journal of Physiology, Pathophysiology & Pharmacology*, 6(2), 125–136. [https://doi.org/10.1016/0029-7844\(94\)00457-O](https://doi.org/10.1016/0029-7844(94)00457-O)

### 2.3 Genotoxicidad

Se define como “la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético originando efectos biológicos adversos” (IntraMed, 2008). Existen diversas formas de medir el daño genético a nivel *in vitro* o *in vivo*; *in vitro*, el ensayo del cometa es uno de los más utilizados para tal fin.

#### 2.3.1 Ensayo del cometa

Este ensayo, denominado también electroforesis alcalina de células individuales busca evaluar el daño ocasionado por agentes químicos o físicos en el material genético. Se reconoce este ensayo como robusto, con alta sensibilidad y con facilidad de análisis estadístico para determinar rupturas o daños en el ADN (Martínez et al., 2018); de esta forma, es uno de los métodos principales y más usados para evaluar genotoxicidad.

Existen diversas variaciones de este ensayo, todas basadas en el mismo fundamento, pero con diferencias en el pH a utilizar en la electroforesis. Sin embargo, en cualquiera de sus variaciones, este ensayo revela ruptura de las cadenas simples o dobles en el ADN y algunas de sus variaciones como la del pH alcalino detecta también sitios lábiles, así como entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas (Rodríguez, Noris, & Fundora, 2016)

##### 2.3.1.1 Versión neutra o alcalina

En este tipo de ensayo se juega con el pH utilizado para los procedimientos tanto de lisis como de electroforesis. En un primer momento se puede llevar a cabo los dos procesos con un pH de 9,5 lo cual permitirá evidenciar fragmentaciones en la cadena doble del ADN, esto debido a que este pH está por debajo del punto de desnaturalización de DNA. De igual forma, se puede realizar la lisis (pH 10) y la electroforesis (pH >13) en ambientes alcalinos, lo cual permitirá evidenciar no solo fragmentación en la cadena doble del ADN, si no también fragmentos de la cadena sencilla (Zúñiga, Marcos, & Creus, 2009).

De igual manera, existe una posibilidad de realizar la lisis y la electroforesis en medios neutros, lo cual evidencia los dos tipos de fragmentación, pero afecta de manera importante la visualización del cometa. Finalmente, al utilizar condiciones alcalinas se determinan fragmentaciones en cadena sencilla y doble de ADN y así mismo se observan sitios lábiles, lo cual mejora el ensayo (Zúñiga et al., 2009).

#### 2.3.1.2 Uso de enzimas de reparación

Con esta variación del ensayo se observan no solo fragmentos de cadena sencilla, doble y sitios lábiles álcalis, sino también bases oxidadas y daños producidos por radiación ultravioleta (los cuales podrían subestimar el daño ya que no generan rupturas) (Zúñiga et al., 2009). Las enzimas principalmente utilizadas se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2** Principales enzimas de reparación utilizadas y su potencial

<b>Enzima de reparación</b>	<b>Detección</b>
Endonucleasa III (EndoIII)	Pirimidinas oxidadas
Formamidopirimidina DNA glicosilada (FPG)	Purinas oxidadas
Endonucleasas uvrABC	Daños producidos por radiación ultravioleta
Metiladenina DNA glicosilasa II (AlkA)	Sitios 3-metiladenina
Uracil glicosilasa (UDG)	Sitios de incorporación de uracilo
Proteinasa K	Relaja ADN condensado y remueve histonas y enlaces DNA-DNA o DNA-Proteínas.

*Elaboración propia*

#### 2.3.1.3 Utilidad a la hora de evaluar la reparación del ADN

Este ensayo permite evaluar el estado de la reparación celular, siendo importante debido a la eliminación de los daños o mutaciones antes de que la célula inicie su proceso de replicación; esto puede influir directamente en la propagación de enfermedades como el cáncer o patologías con defectos genéticos (Zúñiga, 2009).

#### 2.3.1.4 COMET FISH (hibridación)

Este ensayo se realiza por medio de una hibridación; permite identificar cromosomas, regiones de cromosomas, genes y daños en los mismos.



### 2.3.2 Otras pruebas

Aparte del ensayo del cometa, existen muchas otras pruebas para determinar el daño en el material genético, estos pueden ser *in vivo* o *in vitro*. Algunas de estas son: el método *in vitro* de aberraciones cromosómicas en células de mamífero, el método *in vivo* de aberraciones cromosómicas en médula ósea de mamífero, método de micronúcleos, ensayo de mutación reversa utilizando bacteria *Salmonella/microsoma* y *Escherichia coli*, ensayo *in vitro* de mutación genética en células de mamífero, síntesis no secuencial de DNA en células de mamífero *in vitro*, ensayo del letal dominante, entre muchas otras más que evalúa la mutagenicidad, el daño y reparación del DNA, y otros cambios en el material genético (De la Peña, 2014).

## 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad que día a día aumenta su incidencia, llegando a ser un problema de salud pública a nivel mundial. Con el pasar del tiempo la ciencia ha buscado diferentes tipos de tratamientos que sean innovadores, costo-efectivos y de buena tolerancia para los enfermos de cáncer. Por lo anteriormente dicho, la búsqueda de nuevos tratamientos se ha intensificado logrando evidenciar el potencial de los compuestos biológicamente activos con propiedades antitumorales. Según Fiorentino y Urueña (2018) aproximadamente un millón de productos naturales puede contener un 25% de compuestos biológicamente activos, y estos están presentes aproximadamente en el 60% en plantas. Por esta razón, se ha buscado identificar las interacciones que hay entre un alimento y las funciones del organismo que pueden ser moduladas terapéuticamente por estos compuestos (Herrera, Betancur, & Segura, 2014). Un ejemplo son los péptidos funcionales aportados en la dieta, a los cuales se les relaciona con el tratamiento y prevención de enfermedades como hipertensión, trombosis, hiperglicemia e hipercolesterolemia (Herrera et al., 2014).

Para el manejo de las enfermedades neoplásicas (cáncer), se asocian compuestos como los isoprenoides o los ácidos grasos esenciales; esto también se observa en plantas como el anamú, el dividivi y el jengibre (Drago & López, 2006). Teniendo en cuenta los componentes del jengibre, se ha evidenciado que posee una gran variedad de compuestos activos a los cuales se le han atribuido diversas propiedades tales como actividad antitumoral, antiinflamatoria y antioxidante; teniendo en cuenta que estas propiedades no solo se encuentran en el extracto del jengibre sino en los compuestos

bioactivos que contiene (Romero et al., 2018). Una de las sustancias activas, el 6-Shogaol ha evidenciado actividad antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante, anti proliferativa y anti-invasiva en células cancerosas (Rahmani et al., 2014). Dentro de los estudios relacionados con la línea tumoral HT-1080, se ha encontrado que el 6-Shogaol tiene efecto pro-oxidante (Romero et al., 2018); sin embargo, no se ha reportado el efecto genotóxico que este compuesto tiene sobre la línea tumoral HT-1080. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente nos preguntamos, ¿Cuál es el efecto genotóxico de la exposición al 6-Shogaol sobre una línea tumoral derivada de fibrosarcoma humano, HT-1080?

El conocimiento del efecto genotóxico del 6-Shogaol sobre esta línea, puede ser un primer paso para considerar al Jengibre y sus compuestos activos en el tratamiento complementario o alternativo en patologías como el cáncer, en especial, de manera sinérgica con fármacos convencionales. Es así que, es pertinente realizar este estudio puesto que los tratamientos oncológicos actuales refieren una gran cantidad de efectos adversos, que perjudican la calidad de vida de los pacientes; a manera de ejemplo, la aparición de náuseas y vómitos son comunes, y a pesar del desarrollo de medicamentos contra estas reacciones adversas, no se han logrado disminuir los episodios eméticos empeorando la calidad de vida de los pacientes (Navari & Schwartzberg, 2018). Se sabe que cuando no hay profilaxis antiemética, la incidencia de náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia dentro de las primeras 24 horas es del 30% en pacientes con quimioterapia moderadamente ematógena y del 90% en quimioterapia altamente ematógena (Gilmore et al., 2014) produciendo de esta forma un rechazo al tratamiento o una baja tolerancia al mismo por parte del paciente; de igual forma este tratamiento produce una disminución de la ingesta oral, desequilibrios electrolíticos, debilidad general y pérdida de peso (García, Parejo, & Pereira, 2006).

Cabe resaltar el uso del jengibre en pacientes con tratamientos convencionales, en los cuales se ha buscado disminuir la cantidad de episodios eméticos; un estudio determinó el potencial sinérgico del jengibre en la reducción de náuseas y vómitos en pacientes con cáncer tratados con quimioterapia, logrando disminuir la cantidad de veces en los que se producen (Tahir, Khokhar, Ilyas, & Qamar, 2019). Todo lo anteriormente dicho nos lleva a concluir que entre mayores alternativas de tratamiento se tengan, mejor será la experiencia del paciente y su tolerancia al tratamiento; teniendo en cuenta el posible

efecto sinérgico del 6-Shogaol junto con los tratamientos actuales no solo para reducir efectos adversos si no tambien para tener un posible efecto antineoplásico.

#### 4. OBJETIVOS

##### 4.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto genotóxico del 6-Shogaol en cultivos celulares de la línea tumoral derivada de fibrosarcoma humano HT-1080

##### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del 6-shogaol sobre la viabilidad de la línea celular HT-1080.
- Determinar la concentración y el tiempo de exposición al 6-Shogaol en el cual se ejerce un mayor efecto genotóxico.

#### 5. HIPÓTESIS

El 6-Shogaol tiene un efecto genotóxico sobre la línea tumoral derivada de Fibrosarcoma humano HT-1080

#### 6. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 6.1. Diseño de la investigación

Este estudio es de tipo transversal, analítico, experimental, donde la unidad de análisis fueron las células de fibrosarcoma HT-1080. Las variables por evaluar se encuentran caracterizadas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Operacionalización de variables

Variable	Definición	Unidad	Escala	Tipo
Concentración de 6-Shogaol	Cantidad del compuesto activo que será utilizado	µM	Razón (Cuantitativa)	Independiente
Tiempo de exposición	Período determinado donde se expone el compuesto	Horas	Razón (Cuantitativa)	Independiente
Momento de Olive	%DNA en la cola X distancia entre la mitad del núcleo y el final de la cola.	Arbitraria	Razón (Cuantitativa)	Dependiente
Momento de la cola	Logitud de la cola X % DNA en la cola	Arbitraria	Razón (Cuantitativa)	Dependiente

## 6.2. Método

### 6.2.1. Cultivo celular

La línea celular HT1080 derivada de fibrosarcoma humano fue donada por el grupo de investigación, quienes la adquirieron de ATCC (American Type Culture Collection ATCC, ref. ATCC-CCL-12), a partir de un individuo masculino caucásico de 35 años; las células tienen una morfología epitelial adherente (ATCC, 2019).

Las células se cultivaron en DMEM (Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium) suplementado con 10% de SBF (Suero Bovino Fetal). Las células se mantuvieron incubadas a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> en atmosfera húmeda. Al obtener una confluencia del 80% se realizaron pases para darle continuidad al cultivo, usando PBS (buffer fosfato salino, Cloruro de potasio, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, fosfato de potasio) al 0,25% (p/v) y Tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Para exponer las células a las condiciones experimentales, fueron sembradas 3 x 10<sup>5</sup> células en placas de 6 pozos; se dejaron crecer durante 24 horas con DMEM suplementado, posteriormente se privaron con DMEM incompleto (sin SBF) durante 18 horas para posteriormente realizar la exposición al 6-Shogaol.

### 6.2.2. Exposición al 6-Shogaol

El 6-Shogaol fue obtenido de Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA). Por procedimientos anteriores al interior del grupo de investigación se tenían alícuotas de 6-Shogaol diluido en DMEM suplementado con 10% de SBF, a una concentración de 361µM. Basados en trabajos anteriores realizados al interior de nuestro grupo de investigación (Romero et al., 2018) y en otros estudios (Annamalai, Kathiresan, & Kannappan, 2016), se tomaron concentraciones de 0–40µM de 6-Shogaol, con intervalos de 10. Los tiempos de exposición a este compuesto fueron 6h, 12h, 24h y 48h. Adicionalmente, como control negativo se utilizó la concentración de 0µM y como control positivo se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0.3mM

### 2.3.3 Viabilidad Celular

Después de la exposición al 6-Shogaol, las células fueron tripsinizadas y recuperadas en un tubo eppendorf. Se tomaron 20µL de suspensión celular y se adicionaron 20µL de azul de tripan. Se tomaron 10µL de esta suspensión y fueron puestos en la lámina del contador de células; la anterior lámina fue leída en el equipo contador de células TC20 (Automated Cell Counter), (BioRad, California, USA).

#### 2.3.4 Ensayo del cometa

Una vez se realizaron los diversos tratamientos de exposición al 6-shogaol, se tomaron  $1,25 \times 10^4$  células en suspensión para la realización del ensayo del cometa, siguiendo el presente protocolo.

##### *Preparación de lámina*

Para acondicionar la lámina base, se preparó una solución de agarosa de punto de fusión normal y PBS 1X libre de calcio y magnesio en un beaker, esto con ayuda de un microondas o del baño de maría. Seguidamente se tomaron láminas limpias y se sumergieron en la agarosa de punto de fusión normal, hasta lograr una fina capa sobre la lámina, se limpió el reverso de la lámina y se secó sobre una plancha de calor.

Posteriormente, se tomaron 10 $\mu$ L de la suspensión celular y se mezcló con 90  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión a 37°C. A continuación, se colocó toda la mezcla sobre una lámina base y se cubrió con un cubreobjetos alargado; posterior a esto se dejó en la nevera por 10 minutos. Se sacaron las láminas de la nevera, y se removió el cubreobjetos. Seguido a esto, se adicionaron 100  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión a 37°C, se colocó de nuevo el cubreobjetos y se dejó en la nevera por otros 10 minutos.

##### *Lisis Celular*

Se sacaron las láminas de la nevera, y se removió el cubreobjetos; se colocaron las láminas en copplins con solución de lisis fría y fueron reservadas en la nevera a 4°C por un tiempo entre 2 y 15 horas. La solución de lisis estaba compuesta por NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO y tritón X-100 a pH 10. Esta solución permitió el rompimiento de las membranas celulares para tener expuestos los núcleos y permitir la migración posterior de los fragmentos de ADN.

##### *Reposo alcalino*

Se retiraron las láminas de la solución de lisis, y se lavaron con PBS libre de calcio y magnesio. Las láminas fueron puestas en la cámara de electroforesis y allí se adicionó el buffer de electroforesis (NaOH 10N y EDTA 200 mM a pH > 13) lentamente; se dejaron descansar en el tapón de electroforesis por 30 min (4°C). Esto permite el desempaquetamiento de la hebra de ADN y expone los sitios lábiles al álcali.

##### *Electroforesis*

Se corrió la electroforesis por 30 minutos a 25V y 300mA constantes. Se retiraron las láminas lentamente del buffer para evitar que se desprenda el gel de estas.

##### *Neutralización*

Después de lo anterior, se sumergieron en el tapón de neutralización frío por 15 minutos. Las láminas fueron deshidratadas en metanol por 3 minutos y luego se dejaron secar a temperatura ambiente para guardarlas hasta el momento de su lectura.

#### *Tinción*

Al momento de ser leídas las láminas, se adicionaron 50  $\mu$ L de solución de coloración (HydraGreen 5%) en cada una y se cubrieron con una laminilla. Se observaron en el microscopio de fluorescencia en el objetivo 20X con una excitación de 515-560nm en un microscopio invertido Olympus IX53 (Pensilvania, USA), equipado con una cámara de alta resolución.

#### *Análisis de imágenes*

De cada lámina fueron tomadas fotos de 50 cometas. Seguidamente, usando el software de distribución libre ImageJ (Collins, 2007) y el pluggin OpenComet (Gyori, Venkatachalam, Thiagarajan, Hsu, & Clement, 2014), se analizó cada cometa, obteniendo en cada caso, valores del momento de la cola (los cuales hacen referencia al producto entre la longitud de la cola y el %DNA en la cola) y el momento de Olive (se refiere al %DNA por la distancia desde el centro del núcleo hasta donde termina la cola) (Tonina et al., 2017)

#### *Análisis estadístico*

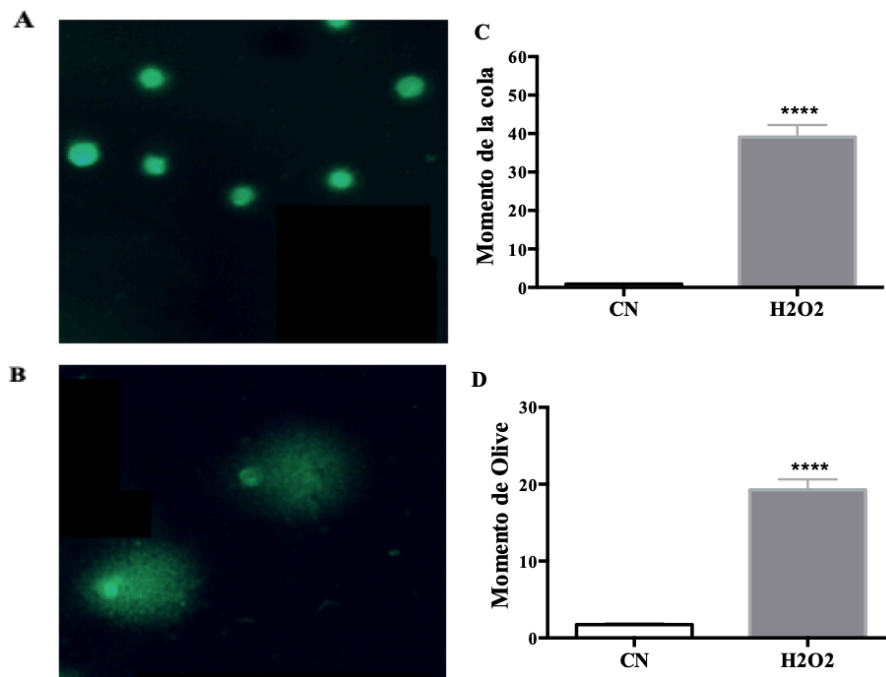
Se depuró la base de datos quitando cometas no identificados por el software y datos atípicos. Se realizó el análisis por medio del software GraphPad Prisma 6. Inicialmente, los datos fueron evaluados en términos de normalidad, usando la prueba de Shapiro Wilk. Seguidamente, se realizó la prueba H de Kruskal-Wallis, según la tendencia no paramétrica de los datos, para identificar las posibles diferencias entre las condiciones experimentales. Los valores de  $p < 0.05$  indicaban diferencias significativas.

## **7. RESULTADOS**

### *Estandarización del Ensayo del Cometa*

Aunque no fue el objetivo principal del presente trabajo, se introdujo y estandarizó la prueba de la electroforesis alcalina en células individuales, comúnmente conocida como el Ensayo del Cometa (Anexo 1 Protocolo del Ensayo del Cometa). En la figura 1 se muestran dos imágenes representativas de células HT-1080 sin exposición a agentes genotóxicos (Fig. 1A) y células HT-1080 expuestas a  $H_2O_2$  que es un reconocido agente genotóxico (Fig. 1B). En la Fig. 1C y D se presentan los valores del momento de la cola y

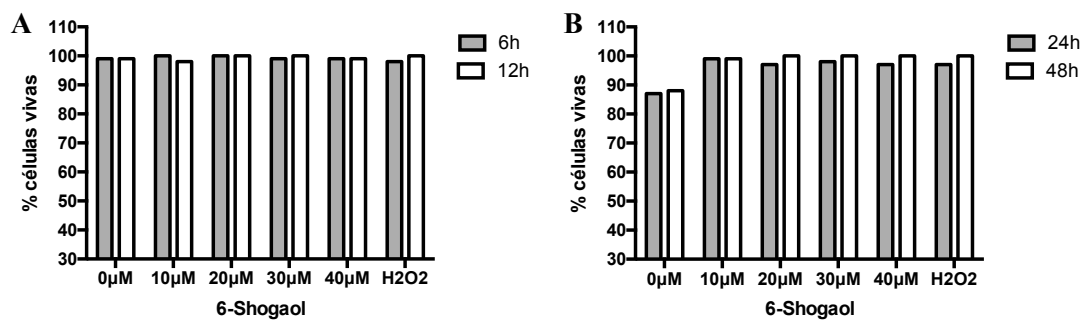
momento de Olive para las anteriores condiciones, mostrando una clara diferencia entre estos, indicando que la técnica mide el daño en el ADN.



**Figura 1.** Estandarización de la prueba ensayo del cometa. A) Células HT-1080 sin exposición a agentes genotóxicos B) Células HT-1080 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> C) Momento de la cola con y sin presencia de agentes genotóxicos D) Momento de Olive en células con y sin exposición. \*\*\*\*, diferencias estadísticamente significativas.

#### Viabilidad Celular

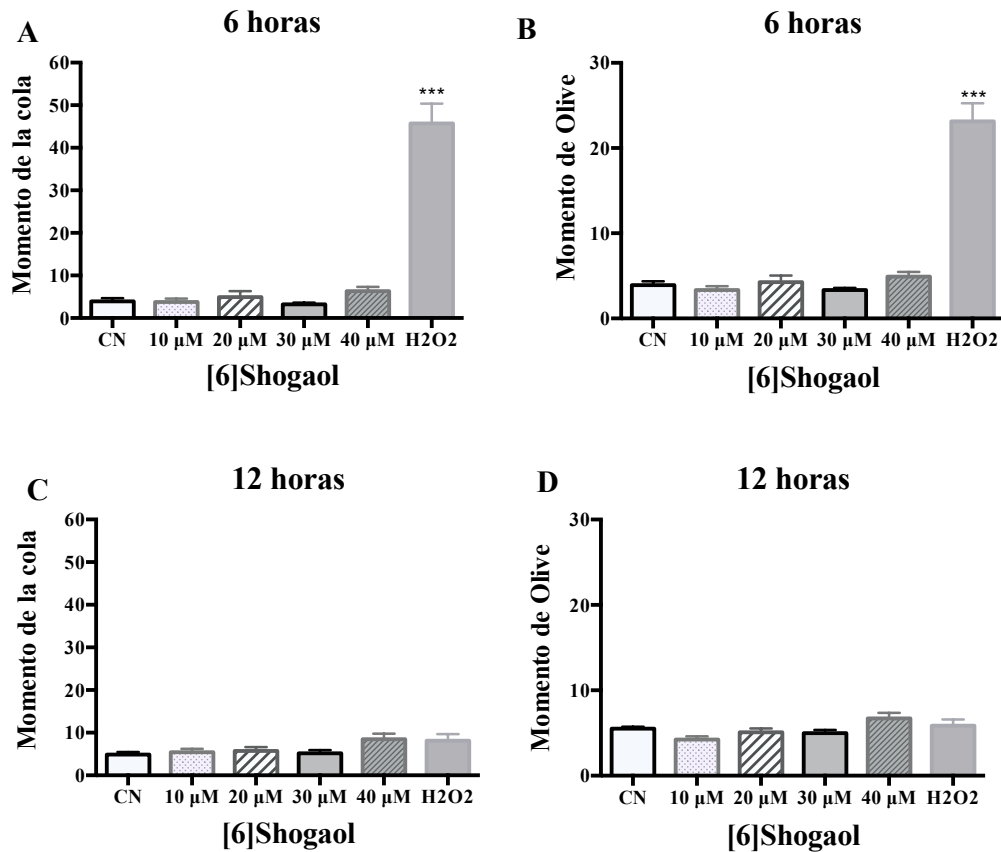
En la figura 2 se pueden apreciar los resultados de viabilidad obtenidos; se observa que el porcentaje de células vivas se mantuvo mayor al 80%. Lo anterior da cuenta de una viabilidad óptima para realizar el ensayo del cometa y evaluar el efecto genotóxico del 6-Shogaol.



**Figura 2** Viabilidad celular en los diferentes tratamientos A) % células HT-1080 vivas a 6 y 12 horas B) % células HT-1080 vivas a 24 y 48 horas

*Evaluación de la genotoxicidad del 6-Shogaol en HT-1080*

En la Figura 3 se evidencia el comportamiento de los diferentes tratamientos que se llevaron a cabo a las 6 y 12 horas de exposición. De esta forma, se muestra que no existe diferencia significativa entre el control y las concentraciones dispuestas para los tratamientos. En el caso de la exposición a 6 horas (fig 2 A y B), solo el control positivo presentó diferencia significativa con el control negativo en ambos parámetros evaluados; aspecto que no sucedió a las 12 horas (fig. 2 C y D).

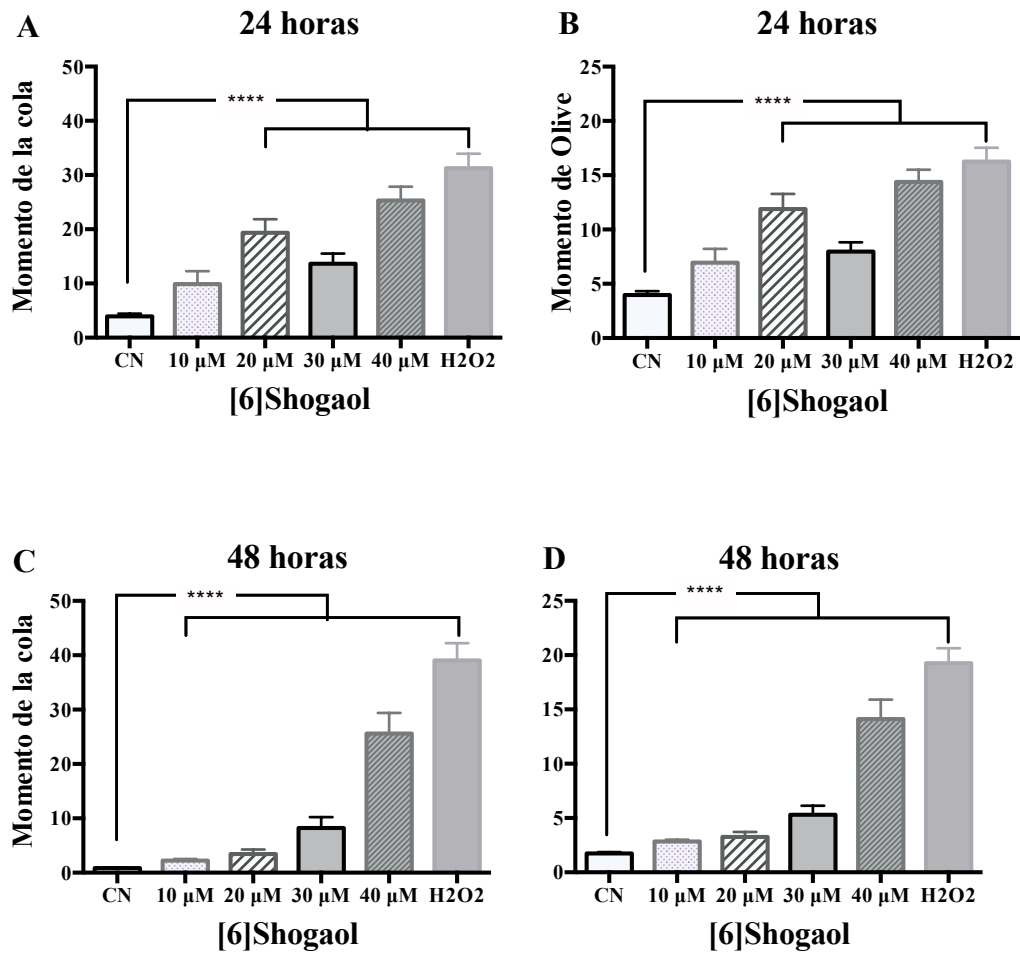


**Figura 3** . Efecto genotóxico del 6-shogaol en la línea tumoral HT-1080 a 6 y 12 horas. A) Tail Moment a 6 horas de exposición. B) Olive Moment a 6 horas de exposición. C) Tail Moment a 12 horas de exposición. D) Olive Moment a 12 horas de exposición. \*\*\*\*, diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 4 se presentan los tratamientos realizados a 24 y 48 horas respectivamente. Cabe resaltar que a las 24 horas de exposición, la evaluación de ambos parámetros determinó que con 20 $\mu$ M y 40 $\mu$ M el efecto fue altamente significativo comparado con el

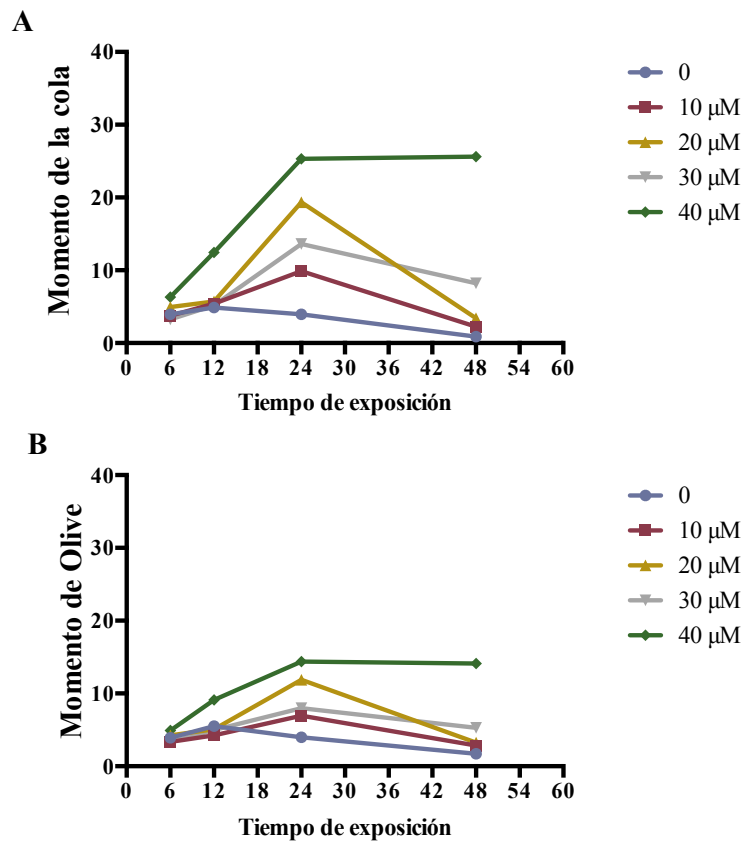


control negativo, mientras que con 30  $\mu\text{M}$ , el efecto a pesar de ser significativo, fue menor que los anteriormente mencionados. Así mismo, al evaluar el tratamiento a las 48 horas de exposición, los dos parámetros evaluados presentaron un aumento de daño a medida que incrementaba la concentración de 6-Shogaol. Con respecto al parámetro denominado momento de la cola, se ve como el nivel de significancia se mantiene a partir de 30  $\mu\text{M}$  sin embargo el efecto de 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  a pesar de ser significativo fue menor que las demás concentraciones. Con referencia al momento de Olive, se evidencia que a medida que aumenta la concentración aumenta de igual forma el efecto significativo a partir de 30  $\mu\text{M}$ .



**Figura 4.** Comportamiento del efecto genotóxico del 6-shogaol en la línea tumoral HT-1080 a 24 y 48 horas. A) Tail Moment a 24 horas de exposición. B) Olive Moment a 24 horas de exposición. C) Tail Moment a 48 horas de exposición. D) Olive Moment a 48 horas de exposición. \*\*\*\* diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 4 se puede observar el comportamiento general de cada una de las concentraciones a medida que aumenta el tiempo de exposición. Teniendo en cuenta lo anterior, como se puede ver en la gráfica, 40 $\mu$ M es la concentración que genera mayor efecto genotóxico, así mismo, se observa que a 24 horas se obtiene el mayor daño en el material genético medido por ambos parámetros. Cabe resaltar que a 48 horas el efecto genotóxico se mantiene constante, es por esto y por términos de eficiencia que se selecciona 24 horas como tiempo de exposición en el que el 6-shogaol desarrolla un mayor efecto genotóxico, puesto que al reproducir este ensayo, no es necesario esperar las 48 horas ya que el mismo efecto se obtiene a 24 horas.



**Figura 5.** Comportamiento general de las diferentes concentraciones a lo largo de los tiempos de exposición. A) Momento de Olive B) Momento de la cola.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este estudio se enfocó en determinar el efecto genotóxico del 6-Shogaol sobre una línea tumoral derivada de fibrosarcoma HT-1080. En este sentido y como se pudo evidenciar en los resultados previamente expuestos, se demostró que el 6-Shogaol tiene un efecto genotóxico sobre esta línea celular a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Esta conclusión es el resultado de los valores observados por los parámetros medidos a través de la prueba.

Los resultados acerca de la viabilidad celular demuestran que el 6-Shogaol no afecta la cantidad de células vivas que se tienen en cada tratamiento. Lo anterior puede ser comparado con los datos obtenidos por Nazim y Park (2019), quienes evidenciaron un porcentaje de células vivas alrededor del 100% en células de cáncer hepático humano tratadas únicamente con este compuesto a una concentración de 20 $\mu$ M por 18 horas. Entendiendo lo mencionado previamente se logra observar que el 6-Shogaol hace daño a la célula mas no la lleva a muerte con las concentraciones utilizadas en este estudio; cabe aclarar que el 6-Shogaol si tiene alto potencial para inducir apoptosis o muerte celular, sin embargo, esto se da a mayores concentraciones, tal como lo evidenciaron Pan *et al.* (2008) quienes utilizaron 60 $\mu$ M con un tiempo de exposición entre 0 y 24 horas; mostrando el potencial pro-apoptótico de este compuesto es incluso mayor que el de otros compuestos presentes en el jengibre como lo es el 6-Gingerol; lo anterior realizado sobre un modelo celular de carcinoma colorectal; en dicho estudio, las células mostraron los principales signos de apoptosis tales como condensación de cromatina y cambios morfológicos (Pan *et al.*, 2008).

Dentro de los resultados presentados es necesario mencionar el hecho que a 6 y 12 horas, no se vio un efecto genotóxico significativo, mostrando así, que 6h y 12 horas no son tiempo suficiente para que el 6-Shogaol ejerza los mecanismos de acción que generan daño al material genético. Resultados similares fueron obtenidos por Pan *et. al* (2008) quienes evidenciaron el inicio del daño después de aproximadamente 9 horas de tratamiento. Sin embargo, sobre la línea tumoral de carcinoma colorectal humano, ellos no evidenciaron un cambio significativo hasta las 24 horas de acción del 6-Shogaol.

Seguido a esto, se logró observar que a 24 y 48 horas el 6-Shogaol muestra un efecto genotóxico importante, que además de ser significativo demostró ser dependiente de la concentración. Es importante destacar que a 24 horas hubo una caída en  $30\mu\text{M}$ , esto podría deberse a algún error procedimental no voluntario.

Annamalai, Kathiresan y Kannappan (2016) evaluaron el daño en el DNA sobre la línea celular Hep-2 a 24 horas con  $5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$  y  $20\mu\text{M}$  de 6-Shogaol; ellos obtuvieron resultados similares a los encontrados en este estudio, demostrando un efecto dosis dependiente. Por otro lado, los datos obtenidos a 48 horas mantienen el efecto genotóxico del 6-Shogaol no varía. Es decir, a  $40\mu\text{M}$  se continuó evidenciando el mayor efecto genotóxico en esta línea celular, lo cual nos podría demostrar que a partir de las 24 horas a esta concentración el efecto se mantiene constante.

Con relación a los mecanismos por los cuales el 6-Shogaol puede generar daño en el ADN, existen diversos estudios. Por ejemplo, Romero et al., (2018) evidenciaron el potencial pro-oxidativo que tiene esta molécula en la línea tumoral derivada de fibrosarcoma humano HT-1080, donde se evidencia un comportamiento dosis dependiente, en el cual a mayor cantidad del compuesto, mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); confirmando lo anterior por medio de la inclusión de N-acetilcisteína (NAC), la cual disminuía potencialmente la producción de ROS en estas células y comprobando que efectivamente el aumento en ROS se debía al tratamiento con 6-Shogaol. Así mismo, en un modelo tumoral de carcinoma renal, Han et al. (2015) evidenciaron el mismo potencial pro-oxidativo.

Las ROS, son moléculas que cumplen diversas funciones en el cuerpo; entre estas especies están el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), hidroxilo ( $\text{OH}^*$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y óxido nítrico ( $\text{NO}^\circ$ ) y se les atribuyen acciones celulares tales como inducir la producción de hormonas, la unión de proteínas G a su receptor, cumplir papeles como factores de transcripción, y participar en mecanismos de regulación de transportadores y canales iónicos, entre muchas otras funciones; sin embargo, al estar en altas concentraciones pueden ser nocivas para el organismo logrando inducir hasta la muerte en las células (Macedo, 2012). Los principales mecanismos de toxicidad de estas moléculas incluyen la oxidación de los enlaces dobles lipídicos, así como la oxidación de los residuos de aminoácidos (cisteína y metionina) en proteínas y desoxiguanosina (posición C8) (Macedo, 2012), ocasionando detención del crecimiento, senescencia y hasta muerte

celular, así mismo, su acción en el daño del ADN está caracterizada por modificaciones en las bases de pirimidinas y purinas (Annamalai et al., 2016).

No solo se ha encontrado que la producción de ROS es la responsable del daño celular, puesto que también la reducción de glutatión intracelular se ve implicada; lo anterior se comprueba en un estudio en el cual se demuestra que al incluir NAC se disminuía la producción de ROS, relacionando esto con el potencial que tiene NAC para producir glutatión. Es así que, la acción prooxidante del 6-Shogaol induce un aumento en ROS, lo cual es uno de los principales mecanismos genotóxicos provocados por este compuesto.

## **9. CONCLUSIONES**

Después de realizar este trabajo se puede concluir que a 6 y 12 horas de exposición no se ve diferencia significativa, evidenciando que es tiempo insuficiente para promover daño en el material genético. Por otra parte, se logró determinar que a 40 $\mu$ M se obtiene el mejor efecto genotóxico; lo anterior sumado a un tiempo de exposición de 24 horas en donde se comprobó que se produce el mayor daño al ADN, generando posteriormente a este periodo de tiempo un efecto constante. A pesar de producir el mayor efecto genotóxico, estas condiciones no afectan la cantidad de células vivas que se tiene en los tratamientos, por lo tanto no se ve afectada la viabilidad celular.

Finalmente, se logró determinar que ambos parámetros evaluados (momento de la cola y momento de Olive), muestran el mismo comportamiento del compuesto en las células. Por lo anterior cualquiera de los dos parámetros puede ser utilizado para medir daño genotóxico en el ensayo del cometa.

## **10. RECOMENDACIONES**

Sería adecuado para próximas investigaciones relacionadas, añadir al ensayo variables capaces de medir el mecanismo por el cual el 6-Shogaol genera el daño genotóxico, esto con el fin de obtener resultados capaces de demostrar de qué manera el 6-Shogaol promueve el daño al ADN en cada una de las concentraciones y tiempos estipulados.

Por otra parte, se recomienda realizar el mismo ensayo en células no cancerosas para evidenciar si existe cambio o no entre cada tipo celular y relacionar los resultados que se obtengan con resultados previos del grupo donde se observaron diferencias en la

viabilidad y en la producción de ROS en los dos modelos: células cancerosas y células normales.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Annamalai, G., Kathiresan, S., & Kannappan, N. (2016). [6]-Shogaol, a dietary phenolic compound, induces oxidative stress mediated mitochondrial dependant apoptosis through activation of proapoptotic factors in Hep-2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.044>
- ATCC. (2019). HT-1080 [HT1080] (ATCC® CCL-121™) [CCL-121]. Recuperado de General Information website: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-121.aspx>
- Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43(1S), S25–S30. <https://doi.org/10.2144/000112517>
- De la Peña, E. (2014). Evaluación de Genotoxicidad y Mutagenicidad [Laboratorio de Mutagénesis Ambiental]. Recuperado de Red Española de Métodos Alternativos website: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/114573/1/SOTOXcq.pdf>
- Drago, M., & López, M. (2006). *Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal*. 37(4), 12.
- Fiorentino, S., & Urueña, C. (2018). La fitoterapia como fuente de medicamentos reguladores del metabolismo tumoral y activadores de la respuesta inmunitaria. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 42(163), 132. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.542>
- García, P. P., Parejo, J., & Pereira, J. (2006). Causas e impacto clínico de la desnutrición y caquexia en el paciente oncológico. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 7.
- Gilmore, J. W., Peacock, N. W., Gu, A., Szabo, S., Rammage, M., Sharpe, J., ... Burke, T. A. (2014). Antiemetic Guideline Consistency and Incidence of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting in US Community Oncology Practice: INSPIRE Study. *Journal of Oncology Practice*, 10(1), 68–74. <https://doi.org/10.1200/JOP.2012.000816>
- Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D., & Clement, M.-V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>
- Han, M. A., Woo, S. M., Min, K., Kim, S., Park, J.-W., Kim, D. E., ... Kwon, T. K. (2015). 6-Shogaol enhances renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated cytochrome c release and down-regulation of c-

- FLIP(L) expression. *Chemico-Biological Interactions*, 228, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.020>
- Herrera, F., Betancur, D., & Segura, M. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad: péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*, 29(1), 10–20. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990>
- IntraMed. (2008). ¿Que es la Genotoxicidad? [Medicina general]. Recuperado de Genotóxicos o xenobióticos website: <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=47111>
- León, J., Salgado, M., Sánchez, M., & Cortés, A. (2014). Conjugated linoleic acid: from nature to biotechnological use. *Revista Cubana de Química*, XXVI(3), 25.
- Ling, H., Yang, H., Tan, S.-H., Chui, W.-K., & Chew, E.-H. (2010). 6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor- $\kappa$ B activation: 6-Shogaol inhibits tumour invasion by targeting NF- $\kappa$ B. *British Journal of Pharmacology*, 161(8), 1763–1777. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00991.x>
- Macedo, A. (2012). *La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las mitocondrias de Saccharomyces cerevisiae*. 15(2), 7.
- Martínez, C., Waliszewski, S., Calderón, M. E., Caba, M., Meza, E., Amador-Muñoz, O., ... Longoria-Espinoza, R. (2018). Comet assay results of pilots exposed to pesticides. *Toxicology Letters*, 28(5). <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.530>
- Mercado, V., Samith, A., Ghiringhelli, A., Liebig, E., Sáez, E., Naranjo, M., & Badillo, O. (2005). Fibrosarcoma. *Revista de Otorrinolaringología, Cirugía de Cabeza y Cuello*, 65, 241–249.
- Morais, B., Tkeuchi, P., & Vannucchi, H. (2018). Efecto del resveratrol, la catequina y el gingerol en la obesidad; evidencias incompletas. *Nutrición Clínica en Medicina*, (1), 37–46. <https://doi.org/10.7400/NCM.2018.12.1.5061>
- Navari, R. M., & Schwartzberg, L. S. (2018). Evolving role of neurokinin 1-receptor antagonists for chemotherapy-induced nausea and vomiting. *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, 6459–6478. <https://doi.org/10.2147/OTT.S158570>
- Nazim, U., & Park, S. (2019). Attenuation of autophagy flux by 6-shogaol sensitizes human liver cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via p53 and ROS. *International Journal of Molecular Medicine*, 43, 701–708. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3994>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017).

- Cultivos de jengibre. Recuperado de FAOSTAT website: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Pan, M.-H., Hsieh, M.-C., Kuo, J.-M., Lai, C.-S., Wu, H., Sang, S., & Ho, C.-T. (2008). 6-Shogaol induces apoptosis in human colorectal carcinoma cells via ROS production, caspase activation, and GADD 153 expression. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(5), 527–537. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700157>
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
- Puente, J., & Velasco, G. (2017). ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? Recuperado de Sociedad Española de Oncología Médica website: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
- Rahmani, A. H., Al Shabrmi, F., & Aly, S. (2014). Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. *International Journal of Physiology, Pathophysiology & Pharmacology*, 6(2), 125–136.
- Rodríguez, A., Noris, E., & Fundora, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 35(2), 184–194.
- Romero, Angie, Forero, M., Sequeda-Castañeda, L. G., Grismaldo, A., Iglesias, J., Celis-Zambrano, C. A., ... Morales, L. (2018). Effect of ginger extract on membrane potential changes and AKT activation on a peroxide-induced oxidative stress cell model. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.09.015>
- Romero, Angie, Morales, L., & Aristizabal, A. (2018). *Efecto del 6-Shogaol sobre la captación de glucosa y supervivencia de células tumorales Iderivadas de Fibrosarcoma humano (ht1080)* (Tesis de Maestría). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.
- Rosas, M., Guzman, V., Iglesias, J., & Tehéran, W. (2018). *Efecto del 6-shogaol en la actividad de HIF en modelos celulares* (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana). Recuperado de <https://search-ebSCOhost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/login.aspx?direct=true&db=cat01040a&AN=pujbc.926981&lang=es&site=eds-live>
- Salgado, F. (2011). El jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Internacional de Acupuntura*, 5(4), 167–173. [https://doi.org/10.1016/S1887-8369\(11\)70041-2](https://doi.org/10.1016/S1887-8369(11)70041-2)



- Sasidharan, I., Venugopal, V. V., & Menon, A. N. (2012). Essential oil composition of two unique ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivars from Sikkim. *Natural Product Research*, 26(19), 1759–1764. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.571215>
- Tahir, M., Khokhar, M. A., Ilyas, S., & Qamar, S. (2019). Chemotherapy induced nausea and vomiting; efficacy of adding ginger to standard therapy as prophylaxis for chemotherapy induced nausea and vomiting (CINV) in cancer patients. *The Professional Medical Journal*, 26(03). <https://doi.org/10.29309/TPMJ/2019.26.03.3276>
- The Global Cancer Observatory. (2018). Colombia. Recuperado de Cancer Today website: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=170&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=170&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group)
- The Global Cáncer Observatory. (2018). World [Gubernamental]. Recuperado de World Health Organization website: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group)
- Tonina, E., Garcete, T., Samaniego, M., Aveiro, R., Aranda, A., Ortiz, J., ... Franco de Diana, D. (2017). Test del cometa en sangre periférica de estudiantes fumadores de la facultad de ciencias de la salud, Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción. *CIMEL*, 22(1), 26–31.
- Valenzuela B, R., Bascuñan G, K., Chamorro M, R., & Valenzuela B, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 y cáncer, una alternativa nutricional para su prevención y tratamiento. *Revista chilena de nutrición*, 38(2), 219–226. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182011000200012>
- World Health Organization Classification of Tumours. (2003). Tumours of the breast and female genital organs [Gubernamental]. Recuperado de World Health Organization website: <https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/BB4.pdf>
- Zúñiga, L., Marcos, R., & Creus, A. (2009). *Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana* (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona). Recuperado de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3930/lazv1de1.pdf?sequence=1>

## ANEXO 1. PROTOCOLO ENSAYO DEL COMETA

### MATERIAL

- Cámara de electroforesis horizontal
- Copplins (opcional)
- Materiales de cultivo celular
- Láminas portaobjetos
- Laminillas cubreobjetos (20mm x 40mm)
- Microscopio de Fluorescencia
- Pinzas
- Beaker
- Plancha de calor
- Pipetas Pasteur
- pHmetro
- TC20 Automated cell counter

### REACTIVOS

- Agarosa de punto de fusión normal
- Agarosa de bajo punto de fusión
- PBS 1X
- Agua MiliQ
- Tris
- NaOH
- EDTA disódico
- DMSO
- Tritón X-100
- Azul de tripán
- HCl
- HydraGreen 5X

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### 1. AGAROSA DE PUNTO DE FUSIÓN NORMAL 1.5%

PBS 1X	100 mL	50 mL	15 mL
Agarosa Standard	1.5 g	0.75 g	0.225 g

- Mezclar la agarosa de punto de fusión normal con el PBS 1X.
- Agitar y calentar en una plancha de calor a 160°C o poner en el microondas por 20 segundos previniendo ebullición.

#### 2. AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN 0.75%

PBS 1X	100 mL	50 mL	10 mL
Agarosa LMPA	0.75g	0.38g	0.075g

- a. Mezclar la agarosa de bajo punto de fusión con el PBS 1X.
- b. Agitar y calentar en una plancha de calor a 130°C o poner en el microondas por 20 segundos previniendo ebullición.
- c. Disminuya la temperatura a 40°C en la plancha de calor.

### 3. SOLUCIÓN DE LISIS

#### Solución Stoque

Reactivos	1000 mL	500 mL	200 mL
NaCl (2.5 M)	146.1 g	73.05g	29.22 g
EDTA disódico (100mM)	37.2g	18.6g	7.44g
Trizma Base (100mM)	1.2g	0.6g	0.24g
NaOH (lentejas)	12g	6g	2.4g

- a. Mezclar los primeros tres reactivos en un beaker adicionando una pequeña cantidad de agua MiliQ.
- b. Utilizar un agitador magnético para disolver los anteriores reactivos.
- c. Adicionar el NaOH a la solución para ayudar a diluir por completo los reactivos.
- d. Agitar por 30 minutos.
- e. Mida el pH y ajústelo a 10 con ayuda de HCl o NaOH concentrado.
- f. Ponga la solución en un balón aforado y termine de adicionar el agua MiliQ para aforar.
- g. Almacenar en un frasco protegido de la luz.

#### Solución de trabajo

Reactivos	500 mL	250 mL	100 mL
Solución stoque de lisis	445mL	222.5mL	89 mL
DMSO 10%	50 mL	25 mL	10 mL
Triton X-100 (1%)	5 mL	2.5 mL	1 mL

- h. Mezclar todos los reactivos.

- i. Almacenar a 4°C en un frasco protegido de la luz.
- j. Esta solución se puede preparar 2 horas antes de ser utilizada.

#### 4. BUFFER DE ELECTROFORESIS

Solución Stock

Sln.	Reactivos	500 mL	200 mL	100 mL
A)	EDTA disódico (200mM)	37.225g	14.89g	7.445g
B)	NaOH (10N)	200g	80g	40g

- a. Mezclar el EDTA con agua MiliQ.
- b. Ajustar el pH a 10 con ayuda de NaOH.
- c. Almacenar en nevera protegido de la luz. Su duración es de 2 semanas
- d. Mezclar el NaOH con agua MiliQ teniendo cuidado del calor producido por este reactivo.
- e. Agitar hasta diluir el reactivo.

Solución de trabajo

Sln.	2000mL	1700mL	1500mL
Agua MiliQ	1930 mL	1640.5 mL	1447.5 mL
A)	10mL	8.5mL	7.5mL
B)	600mL	51mL	45mL
Tipo de camara		FISHER	BIORAD

- f. Mezclar las dos soluciones y agítelas
- g. Llevar a un balón aforado y afore hasta llegar al volumen total. En caso de no tener balón aforado de la capacidad determinada sea exacto con la cantidad de agua MiliQ que le haga falta.
- h. Ajustar el pH a 13 o mayor a este
- i. Almacenar a 4°C. Prepare antes de cada electroforesis o reutilice por 2 electroforesis

#### 5. SOLUCIÓN DE NEUTRALIZACIÓN

Agua MiliQ	1000 mL	500 mL	200 mL
------------	---------	--------	--------

Tris Base 0.4M	48.5g	24.25g	9.7g
----------------	-------	--------	------

- a. Mezclar y disolver el Tris Base con agua miliQ.
- b. Ajustar el pH a 7.5 utilizando HCl.
- c. Almacenar en nevera a 4°C.
- d. Esta solución dura un mes, verifique el aspecto de la solución antes de usarla, si nota un aspecto diferente descarte y prepare una nueva.

## PROCEDIMIENTO

1. Preparación de láminas base: procure realizar las láminas base con un día de anterioridad, con esto ellas estarán perfectamente secas a la hora de ser utilizadas.
  - a. Preparar la agarosa de punto de fusión normal 1.5% y ponerla en una plancha de calor para mantenerla calientes (150°C)
  - b. Poner la agarosa en un beaker, preferiblemente en uno en el que logre sumergir toda la lámina hasta antes de iniciar la parte esmerilada
  - c. Sumergir las láminas limpias, preferiblemente no manipuladas con la piel directamente.
  - d. Sacarlas y limpiar el lado que no será utilizado.
  - e. Poner las láminas sobre la plancha de calor
  - f. Retirar las láminas al momento en el que se vea seca la agarosa sin partes brillantes
  - g. Almacenarlas a 37°C
2. Preparación de la suspensión celular (utilice la menor luz posible a partir de este paso)
  - a. Realizar conteo celular para determinar el número de células a poner en la lámina
  - b. Preparar la agarosa de bajo punto de fusión 0.75% con 30 minutos de anticipación
  - c. Poner entre 10-20µL de suspensión celular (asegurando tener mínimo 10 000 células y máximo 15 000 para evitar que se solapen los cometas) en un eppendorf.
  - d. Agregar 90µL de agarosa de bajo punto de fusión al eppendorf

- e. Poner la mezcla en la lámina base sobre la agarosa de punto de fusión normal previamente seca
  - f. Cubrir con una laminilla la lámina
  - g. Llevar la lámina a la nevera (4°C) por 10 minutos
3. Preparación final de la lámina
- a. Sacar la lámina de la nevera y retirar la laminilla
  - b. Poner 100µL de agarosa de bajo punto de fusión sobre la lámina
  - c. Poner la laminilla y llevar a la nevera por 10 minutos.
  - d. Retirar la laminilla
4. Ensayo del cometa
- a. Poner las láminas en la solución de lisis, logrando cubrir toda la superficie utilizada (puede ayudarse de un copplin para mayor facilidad)
  - b. El tiempo mínimo en esta solución son 2 horas y el tiempo máximo son 2 semanas.
  - c. Retirar las láminas de la solución de lisis
  - d. Lavar las láminas con PBS 1X
  - e. Poner la cámara de electroforesis en la nevera si es posible o poner pilas de hielo alrededor para mantenerla fría.
  - f. Poner las láminas en la cámara de electroforesis para esto ubique la parte esmerilada hacia el cátodo y la parte con las células hacia el ánodo
  - g. Verter la solución de electroforesis previamente fría en la cámara, primero un lado, luego el otro y finalmente y con mucha suavidad la parte del medio. Para lo anterior poner la solución lentamente en uno de los dos lados luego de ser llenados estos.
  - h. Tapar la cámara y cubrirla de la luz por 30 minutos.
  - i. Pasados los 30 minutos, correr la electroforesis a 300mA constantes y 25V por 30 minutos.
  - j. Luego del tiempo transcurrido parar la corrida y retirar lentamente las láminas con mucho cuidado de la cámara de electroforesis para prevenir que se despegue la agarosa.
  - k. Poner con una pipeta de Pasteur gotas de solución de neutralización hasta cubrir toda la lámina. Dejar transcurrir 15 minutos.
  - l. Eliminar el exceso de la solución neutralizante de las láminas.

- i. Deshidratar las láminas con metanol durante 3 minutos si no serán leídas inmediatamente
- m. Poner 50 $\mu$ L de HydraGreen 5X en la lámina y cubrir con una laminilla
- n. Leer la lámina en un microscopio de fluorescencia en el objetivo 20X. Utilice un filtro de excitación de 515-560 nm.
- o. Tomar fotografías de 50 células
- p. Analizar las imágenes por medio del Software de su preferencia. Se sugiere el uso de ImageJ por medio del plugin Open Comet.
- q. Verifique el análisis realizado por el software, evidenciando si se tomó el núcleo en el espacio respectivo
- r. Realice la estadística respectiva

## ANEXO 2. PRUEBA DE NORMALIDAD

### Estadística OliveMoment 6h

	<b>CN</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>20 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	<b>40 <math>\mu</math>M</b>	<b>H2O2</b>
Mean	3.902	3.347	4.245	3.336	4.907	23.14
Std. Deviation	2.226	2.886	6.698	1.726	5.129	20.67
Shapiro-Wilk normality test						
W	0.9540	0.6401	0.3919	0.8692	0.6452	0.8494
P value	0.3537	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

### Estadística TailMoment 6h

	<b>CN</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>20 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	<b>40 <math>\mu</math>M</b>	<b>H2O2</b>
Mean	3.949	3.766	4.942	3.236	6.317	45.71
Std. Deviation	3.373	5.313	11.88	2.685	9.291	45.11
Shapiro-Wilk normality test						
W	0.8689	0.5982	0.3409	0.8464	0.6237	0.8342
P value	0.0061	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

### Estadística OliveMoment 12h

	<b>CN</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>20 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	<b>40 <math>\mu</math>M</b>	<b>H2O2</b>
Mean	5.516	4.247	5.077	4.978	6.710	5.871
Std. Deviation	0.8073	1.859	1.964	2.903	5.104	4.877
Shapiro-Wilk normality test						
W	0.9367	0.9658	0.9502	0.7027	0.8170	0.7305
P value	0.3779	0.5190	0.3988	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001



**Estadística TailMoment 12h**

	<b>CN</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>20 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	<b>40 <math>\mu</math>M</b>	<b>H2O2</b>
Mean	4.876	5.419	5.702	5.190	8.477	8.109
Std. Deviation	2.347	4.037	3.985	5.664	10.08	10.77
Shapiro-Wilk normality test						
W	0.8617	0.9127	0.8792	0.6458	0.7365	0.6326
P value	0.0203	0.0304	0.0208	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

**Estadística OliveMoment 24h**

	<b>CN</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>20 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	<b>40 <math>\mu</math>M</b>	<b>H2O2</b>
Mean	3.975	6.940	11.88	7.975	14.39	16.25
Std. Deviation	2.205	5.229	6.306	6.018	7.422	7.947
Shapiro-Wilk normality test						
W	0.9490	0.9026	0.9449	0.8950	0.9430	0.9631
P value	0.0593	0.0751	0.2966	0.0003	0.0304	0.2389

**Estadística TailMoment 24h**

	<b>CN</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>20 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	<b>40 <math>\mu</math>M</b>
Mean	3.952	9.898	19.34	13.63	25.31
Std. Deviation	3.202	9.824	11.34	13.63	16.84
Shapiro-Wilk normality test					
W	0.8886	0.8386	0.8515	0.8517	0.9038
P value	0.0007	0.0072	0.0057	< 0.0001	0.0014

**Estadística OliveMoment 48h**

	<b>CN</b>	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	<b>20 <math>\mu</math>M</b>	<b>30 <math>\mu</math>M</b>	<b>40 <math>\mu</math>M</b>	<b>H2O2</b>
Mean	1.733	2.850	3.264	5.294	14.12	19.26
Std. Deviation	0.9271	1.454	3.443	7.825	17.29	12.34
Shapiro-Wilk normality test						
W	0.9416	0.7400	0.5807	0.5123	0.7390	0.8962
P value	0.0143	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

**Estadística TailMoment 48h**

	<b>CN</b>	<b>10 μM</b>	<b>20 μM</b>	<b>30 μM</b>	<b>40 μM</b>	<b>H2O2</b>
Mean	0.8727	2.246	3.424	8.230	25.60	39.06
Std. Deviation	0.6986	2.520	6.326	18.25	36.82	28.42
Shapiro-Wilk normality test						
W	0.9260	0.5266	0.4876	0.4556	0.7151	0.8965
P value	0.0035	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001