



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación de la actividad anti-inflamatoria mediante modelos experimentales basados en el embrión de pez cebra. Aplicación a compuestos presentes en la Alimentación

Cristina Alexandra Arteaga Almeida

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIDAD DE TOXICOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y QUÍMICA TERAPÉUTICA

FACULTAD DE FARMACIA

**“Evaluación de la actividad anti-inflamatoria mediante modelos
experimentales basados en el embrión de pez cebra. Aplicación a
compuestos presentes en la Alimentación”**

CRISTINA ALEXANDRA ARTEAGA ALMEIDA

Barcelona 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

“Evaluación de la actividad anti-inflamatoria mediante modelos experimentales basados en el embrión de pez cebra. Aplicación a compuestos presentes en la Alimentación”

Doctoranda:

CRISTINA ALEXANDRA ARTEAGA ALMEIDA

DIRECTOR

TUTOR

Dr. Jesús Gómez Catalán

Dr. Juan María Llobet Mallafré

Barcelona 2017

“Il n’est pas nécessaire d’espérer pour entreprendre, ni de réussir pour persévérer”

“No hace falta esperar para empezar, ni lograr para perseverar”

Guillaume D’orange-Nassau

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el departamento de Farmacología, Toxicología y Química Terapéutica de la facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona y ha sido financiada por:

Proyecto

AGL2013-49083-C3-1-R

Secretaria Nacional de Educación Superior Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador:

Beca SENESCYT

Proyectos de Transferencia

FBG 300155 y FBG 307471

AGRADECIMIENTOS

“Nadie triunfa solo”

Frase muy conocida, inspirada en la obra “manos” de Albrecht Dürer.

Ésta frase dice mucho para mí, y en éste momento más aún, realizar una tesis doctoral es un trabajo personal, que conlleva trabajo y esfuerzo, pero durante su realización, son muchas las personas que son parte de la misma, por ésta razón, mi agradecimiento a todos quienes directa o indirectamente contribuyeron para realizar éste trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a todos quienes conforman el departamento de Farmacología, Toxicología y Química terapéutica. De manera muy especial al Dr. Jesús Gómez Catalán, por ser mi director de tesis, su apoyo, guía y confianza durante todo éste tiempo, han permitido culminar con éste trabajo doctoral.

De igual manera mi agradecimiento al Dr. Joan M. Llobet Mallafré, Dr. Miguel Rodamilans, Dra. Marta Barenys, Dra. Nuria Boix y a todos los profesores miembros del departamento, con quienes he tenido una excelente relación, sin embargo, con la Dra. Nuria Boix hemos compartido como colegas de laboratorio, ya que en mis inicios compartió sus conocimientos, enseñándome lo necesario para trabajar con pez cebra.

Mi agradecimiento más profundo al Dr. Miguel Rodamilans, por tener siempre las palabras adecuadas en cada circunstancia, por compartir el laboratorio día tras día, y por ser el “pepito grillo” que a veces necesitamos escuchar, aunque no lo hacemos.

Agradezco de manera especial a la Dra. Rosa M. Lamuela-Raventós, por permitir que esta tesis doctoral se desarrollara como parte del proyecto conjunto (AGL2013-49083-C3-1-R). Mi reconocimiento y agradecimiento al doctorando José Fernando Rinaldi de Alvarenga, por su colaboración con los ensayos de cuantificación de carotenos y polifenoles.

De manera especial, muchas gracias Verónica Palomera, doctoranda del departamento de Farmacología, por tu paciencia y ayuda a la hora de realizar ensayos de expresión génica, tu amistad y apoyo han sido muy importantes para mí.

Un agradecimiento al personal de estabulario de la Facultad de Biología, Jordi Guinea y Antonio, por encargarse del cuidado y mantenimiento de los peces.

Por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido a toda mi familia, a los que están, y a los que ya no pueden compartir éste logro académico conmigo, siempre están presentes en mi mente y corazón.

Gracias infinitas mi amor, Alberto Bustillos, por motivarme, apoyarme y caminar junto a mí todo éste tiempo. Ahora que veo el camino recorrido, sé que no ha sido fácil, pero juntos lo hemos logrado, gracias a mi niño Alejandro, por ser la razón que motiva mi vida, por regalarme esa sonrisa hermosa que alegra mis días.

Muchas veces la motivación para alcanzar nuevos objetivos en la vida, se inspira en los anhelos de personas especiales. En éste caso, el de mis padres, aunque ya no estés aquí papá. Quiero creer que estás feliz por éste logro, que también es tuyo. Mientras tanto lo comparto, dedico y celebro con mi madre, porque gracias a su labor abnegada e incansable y a su apoyo incondicional cuando más lo he necesitado, hoy puedo ver ésta etapa de mi vida superada, gracias infinitas mami.

A mis tías, Hna. Evita; Hna. Georgina y Hna. Enma Almeida, gracias a su vocación de religiosas, han inculcado en mí, valores como la constancia, respeto y humildad, que me han ayudado a ser mejor persona.

Como no agradecer a mis padres políticos Dr. Alcides Bustillos y Sra. Nelly Ortiz por su incondicional ayuda, sobre todo siendo mis garantes, requisito necesario para obtener mi beca y poder realizar mis estudios doctorales.

Gracias a la Dra. Yolanda Cajal, Marina Jha y familia, María José y Silvio Arteaga, Marcel Leyton, María Cañas por los momentos que me han brindado y palabras de apoyo, que han hecho que momentos difíciles sean más llevaderos. La lista es interminable, pero gracias a los amigos de siempre y a los que se han sumado en el transcurso de ésta etapa de mi vida.

Finalmente, debo reconocer y agradecer al Economista Rafael Correa Delgado, ex presidente de la república del Ecuador, por su gestión para invertir en educación superior y apoyar la formación de estudiantes de doctorado, mediante el programa de becas a través de la Secretaría Nacional de educación superior de ciencia y tecnología SENESCYT.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ACRÓNIMOS.....	XI
RESUMEN	XIII
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Sistema inmune.....	3
1.1.1 Inmunidad Innata y Adaptativa	3
1.1.2 Células del sistema inmune innato	4
1.1.3 Mecanismos de reconocimiento de la inmunidad innata	7
1.1.4 Inflamación.....	9
1.1.5 Tipos de Inflamación y enfermedades crónicas	10
1.1.6 Migración leucocitaria.....	11
1.1.7 Citoquinas.....	12
1.1.8 Fármacos anti-inflamatorios.....	13
1.2 Fagocitosis como fuente celular de radicales libres.....	17
1.2.1 Especies reactivas de Oxígeno (ROS).....	19
1.2.2 Estrés Oxidativo y estado de Oxidación.....	20
1.2.3 Tipos de antioxidantes.....	23
1.2.4 Método para evaluar la respuesta de neutrófilos a la inflamación.....	25
1.2.4 Métodos para evaluar el estrés oxidativo	26
1.2.5 Pez cebra como organismo modelo.....	27
1.2.7 Pez cebra como modelo de inflamación	28
1.2.8 Pez cebra como modelo de estrés oxidativo	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo general	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 Diseño Experimental.....	37
3.1.1 Mantenimiento de la colonia de peces adultos para la obtención de embriones y larvas juveniles	37
3.1.2 Exposición de embriones y larvas juveniles a los compuestos naturales y fármacos antiinflamatorios.....	39
3.1.3 Evaluación de la actividad anti-inflamatoria	43
3.1.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos naturales con el modelo de estrés oxidativo	47
3.1.5 Evaluación de la expresión génica producida por la inflamación.....	50

CONTENIDO

3.1.6	Análisis de la permeabilidad de carotenoides por HPLC DAD-UV.....	52
3.2	Análisis estadístico.....	54
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
4.1	Resultados de migración de neutrófilos en larvas de pez cebra.....	57
4.1.1	Efecto de la variedad de lipopolisacáridos en la migración de neutrófilos.....	57
4.1.2	Cinética de migración de neutrófilos.....	58
4.1.3	Migración de neutrófilos expuestos a controles anti-inflamatorios, no anti-inflamatorios e inhibidores de enzimas NADPH oxidasas.....	60
4.1.4	Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra, expuestas a compuestos fenólicos del vino tinto.....	65
4.1.5	Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a compuestos fenólicos del sofrito de tomate.....	67
4.1.6	Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a carotenoides del sofrito de tomate.....	71
4.1.7	Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a flavonoides.....	73
4.1.8	Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a una mezcla de polifenoles y carotenos.....	75
4.1.9	Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a extracto de sofrito de tomate.....	76
4.2	Resultados de estrés oxidativo en embriones de pez cebra.....	78
4.2.1	Curva del inductor del estrés oxidativo Tert-butil hidroperóxido (tBOOH).....	78
4.2.2	Efecto de la naringenina sobre el estrés oxidativo.....	80
4.2.3	Efecto de la Oleuropeína sobre el estrés oxidativo.....	81
4.2.3	Efecto de la rutina sobre el estrés oxidativo.....	82
4.2.4	Efecto de la Cianidina sobre el estrés oxidativo.....	83
4.2.5	Efecto del ácido clorogénico sobre el estrés oxidativo.....	84
4.2.6	Efecto de la apigenina sobre el estrés oxidativo.....	85
4.2.7	Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo.....	86
4.2.8	Efecto de la curcumina sobre el estrés oxidativo.....	87
4.2.9	Efecto de (-)- Epigallocatequina Galato (EGCG) sobre el estrés oxidativo.....	88
4.2.10	Efecto del β -Caroteno 25 mM sobre el estrés oxidativo.....	89
4.2.11	Efecto del β -Caroteno 10 mM sobre el estrés oxidativo.....	90
4.2.12	Efecto del licopeno sobre el estrés oxidativo.....	91
4.2.13	Efecto de la astaxantina sobre el estrés oxidativo.....	92
4.2.14	Efecto de la apocinina sobre el estrés oxidativo.....	93
4.3	Análisis de expresión génica.....	98
4.4	Análisis de permeabilidad de carotenoides en el pez cebra, analizado por HPLC-DAD/UV.....	101

CONTENIDO

5. CONCLUSIONES	107
5.1 Conclusiones del objetivo general	107
5.2 Conclusiones de los objetivos específicos	107
6. BIBLIOGRAFÍA.....	111

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Protección y respuesta frente a la invasión microbiana.....	3
Figura 2.-Tipos de leucocitos.....	5
Figura 3.-La unión PRR-PAMP.....	8
Figura 4.-Signos cardinales de la inflamación.....	10
Figura 5.-Proceso de activación de neutrófilos.....	12
Figura 6.- Esquema de la vía del ácido araquidónico.....	15
Figura 7.- Estructura química de diferentes clases de flavonoides.....	16
Figura 8.- Procesos metabólicos intracelulares en el proceso de fagocitosis.....	18
Figura 9.- Esquema del desarrollo embrionario del pez cebrá.....	28
Figura 10.- Acuario y filtro de pez cebrá.....	37
Figura 11.- Acuario de reproducción.....	38
Figura 12.- Huevos de pez cebrá, huevo no fecundado, anómalo y fecundado.....	39
Figura 13.- Larva de pez cebrá despigmentada.....	43
Figura 14.- Corte de aleta caudal en larva de pez cebrá despigmentada de 4dpf.....	44
Figura 15.-Macro diseñada con el programa ImageJ.....	45
Figura 16.- Diagrama de migración de neutrófilos en larvas de pez cebrá.....	46
Figura 17.- Esquema de la exposición de embriones de pez cebrá al tBOOH.....	47
Figura 18.- Efectos del inductor del estrés oxidativo (tBOOH) en embriones de pez cebrá.....	48
Figura 19.- Migración de neutrófilos en larvas expuestas a diferentes variedades de lipopolisacáridos.....	58
Figura 20.- Migración de neutrófilos a diferentes tiempos de incubación.....	59
Figura 21.-Migración de neutrófilos de larvas tratadas con compuestos anti-inflamatorios.....	61
Figura 22.-Migración de neutrófilos, expresada en porcentaje, respecto a su respectivo control.....	62
Figura 23.-Migración de neutrófilos, comparando la migración entre los grupos tratados.....	62
Figura 24.-Migración de neutrófilos en larvas expuestas a compuestos fenólicos del vino tinto.....	66
Figura 25.-Migración de neutrófilos en larvas expuestas a polifenoles del sofrito del tomate.....	67
Figura 26.-Modelo hipotético del papel anti-inflamatorio de los flavonoides del extracto de <i>J.platyphylla</i>	71
Figura 27.-Migración de neutrófilos en larvas expuestas a compuestos carotenoides.....	73
Figura 28.-Migración de neutrófilos en larvas expuestas a otros compuestos flavonoides.....	74
Figura 29.-Porcentaje de migración de neutrófilos en larvas expuestas a una mezcla de carotenos y flavonoides.....	75
Figura 30.-Porcentaje de migración de neutrófilos en larvas expuestas a un extracto de sofrito.....	76
Figura 31.-Curva de letalidad y anomalías morfológicas de la exposición de embriones de pez cebrá al tBOOH.....	78
Figura 32.-Curva de letalidad de embriones de pez cebrá a Naringenina.....	80
Figura 33.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebrá a Naringeina.....	80
Figura 34.-Curva de letalidad de embriones de pez cebrá a la Oleuropeína.....	81

CONTENIDO

Figura 35.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra a la Oleuropeína.	81
Figura 36.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra a la Rutina.	82
Figura 37.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra a la Rutina.	82
Figura 38.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra a la Cianidina.	83
Figura 39.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra a la Cianidina.	83
Figura 40.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra al Ácido Clorogénico.	84
Figura 41.-Curva de anomalías morfológicas de la exposición de embriones de pez cebra al Ácido Clorogénico.	84
Figura 42.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra a la Apigenina.	85
Figura 43.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra a la Apigenina.	85
Figura 44.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra al Resveratrol.	86
Figura 45.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra al Resveratrol.	86
Figura 46.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra a la Curcumina.	87
Figura 47.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra a la Curcumina.	87
Figura 48.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra a la (-)- Epigallocatequina Galato (EGCG).	88
Figura 49.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra a la (-)- Epigallocatequina Galato (EGCG).	88
Figura 50.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra al Beta-Caroteno 25µM.	89
Figura 51.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra al Beta-Caroteno 25µM.	89
Figura 52.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra al Beta-Caroteno 10 µM.	90
Figura 53.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra Beta-Caroteno 10 µM.	90
Figura 54.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra al Licopeno.	91
Figura 55.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra al Licopeno.	91
Figura 56.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra a la Astaxantina.	92
Figura 57.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra a la Astaxantina.	92
Figura 58.-Curva de letalidad de embriones de pez cebra a la apocinina.	93
Figura 59.-Curva de anomalías morfológicas de embriones de pez cebra a la apocinina.	93
Figura 60.-Expresión del Gen IL-6.	99
Figura 61.-Expresión del Gen TNF-α.	99
Figura 62.-Expresión del Gen IL-1β.	100
Figura 63.- Cromatograma de carotenoides.	102
Figura 64.- Representación gráfica de la concentración de carotenoides presentes en larvas de pez cebra.	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Oxígeno activo y especies relacionadas	19
Tabla 2.- Producción de Especies Reactivas de Oxígeno	20
Tabla 3.- Determinantes del estado antioxidante en humanos	22
Tabla 4.-Sistemas de defensa in vivo contra el daño oxidativo	23
Tabla 5.- Polifenoles.....	40
Tabla 6.- Carotenos	41
Tabla 7.- Compuestos del vino tinto.....	41
Tabla 8.- Sustancias de control, anti-inflamatorias, no anti-inflamatorias e inhibidoras de enzimas NADPH oxidasas	42
Tabla 9.- Criterios de evaluación morfológica de los embriones de pez cebra.....	49
Tabla 10.- Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.	50
Tabla 11.- Componentes encontrados en la muestra de sofrito utilizada para realizar ensayo de migración de neutrófilos.....	77
Tabla 12.- Efecto de los compuestos flavonoides y carotenoides frente al inductor de estrés oxidativo (tBOOH).....	94
Tabla 13.- Identificación de caroteno en larvas de pez cebra.....	102
Tabla 14.- Concentración de carotenos en larvas de pez cebra.	103

ACRÓNIMOS

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Anti-inflamatorios no esteroideo
ALI	Lesión pulmonar aguda
Aman	Amantadina
Apo	Apocinina
AR	Artritis reumatoide
COX-1	Ciclooxigenasa uno
COX-2	Ciclooxigenasa dos
COXs	Ciclooxigenasas
COXIBEs	Anti-inflamatorios no esteroideos selectivos para COX
CT ₄	Leucotrienos
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dox	Doxepina
dpf	Días post fertilización
DPI	Dibenzodolium
EC ₅₀	Concentración efectiva 50
EO	Estrés oxidativo
GC/MS	Cromatografía de gases/espectrometría de masas
hpf	Horas post fertilización
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC DAD UV	Cromatografía líquida de alto resolución con detección DAD UV
HPLC MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con espectrometría de masas en tándem (MS / MS)
IkB	Inhibidor de kB
IL-1 β	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
Ind	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LC ₅₀	Concentración letal 50
LOXs	Lipoxigenasas
LPS	Lipopolisacárido
MPO+	Mieloperoxidasa positivas
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-kB	Factor nuclear kappa
NO	Óxido nítrico
NRS	Especies reactivas de nitrógeno
NSAID's	Non steroidal anti-inflammatory drugs

CONTENIDO

ORAC	Ensayo de capacidad de absorbanca de radicales de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PFA	Paraformaldehído
PGE ₂	Prostaglandinas lipídicas inflamatorias
PGI ₂	Prostaciclina
PMN	Polimorfonucleares
PRR	Pattern recognition receptor
PTU	N-phenylthiourea
Px	Piroxicam
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAID's	Fármacos anti-inflamatorios esteroideos (Steroideals anti-inflammatory drugs)
SOD	Superóxido dismutasa
GSH	Glutación
GPX	Glutación peroxidasa
tBOOH	Tert-butil hidroperóxido
TLR	Receptor Toll-like
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TRAP	Ensayo de parámetros de antioxidantes de captación total de radicales (total radical trapping antioxidants parameter)

RESUMEN

Durante las últimas dos décadas se han realizado estudios que sugieren que la inflamación crónica, asociada a una situación de continuo estrés oxidativo, puede ser un factor etiológico en muy diversas patologías como el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurológicas y pulmonares. El pez cebra es un modelo ampliamente utilizado en diversos ámbitos de la biología experimental, incluyendo el estudio de mecanismos de patologías humanas y los mecanismos de las repuestas inmunitarias. El pez cebra presenta similitudes genéticas con humanos de un 70 a 80%. Al mismo tiempo, las respuestas oxidativas e inflamatorias pueden ser fácilmente inducibles, reproducibles y visualizadas en sus primeras etapas de desarrollo. Los ensayos realizados mediante embriones o larvas son ensayos *in vivo*, pero con muchas de las ventajas de los métodos *in vitro*. El principal objetivo de este proyecto ha sido evaluar la capacidad de modelos experimentales basados en el pez cebra para el *screening* de sustancias naturales presentes en la dieta con actividad anti-inflamatoria y anti-oxidante.

Concretamente, en este estudio, se han optimizado y aplicado dos modelos experimentales mediante embriones y larvas de pez cebra. En el primero se evalúa la actividad inhibitoria sobre la migración de neutrófilos en larvas. En el segundo se observa el efecto protector sobre el estrés oxidativo inducido por exposición a un agente oxidante en embriones. Se ha evaluado varios carotenoides, incluyendo el beta-caroteno, licopeno y astaxantina, compuestos fenólicos como naringenina, cianidina, curcumina, entre otros, así como un extracto de sofrito de tomate, uno de los principales ingredientes de la dieta mediterránea.

En el primer modelo, hemos optimizado los parámetros experimentales, usando larvas de pez cebra de 4 días post fertilización despigmentadas. Nuestros resultados mostraron que la mayoría de compuestos utilizados, incluido el sofrito de tomate disminuyen la migración de neutrófilos significativamente respecto del control. Los compuestos que presentaron mayor disminución de la migración fueron: ácido clorogénico (66.7%), cianidina (62.5%) respectivamente, mientras que los fármacos anti-inflamatorios (indometacina, piroxicam) y compuestos inhibidores de enzimas NADPH oxidasas

RESUMEN

(dibenzoidolium, apocinina) presentan porcentajes de reducción de la migración superiores al 70%. Por el contrario, no se observó ningún efecto al utilizar la amantadina conocido fármaco no anti-inflamatorio. Y en el caso del extracto de sofrito de tomate se reporta una disminución del 40% en la migración.

El segundo modelo fue previamente desarrollado en nuestro laboratorio por Boix, (2015). Hemos determinado el efecto protector sobre el estrés oxidativo con los mismos compuestos, en embriones de pez cebra de 0 – 48 horas post fertilización. Hemos observado que la mayoría de compuestos probados, presentan un efecto protector en la letalidad, provocada por el inductor del estrés oxidativo tert-butil hidroperóxido (tBOOH). Además, se observó un efecto protector frente a las anomalías morfológicas en los de casos de rutina, apigenina y curcumina.

Cabe mencionar que se realizaron estudios complementarios de permeabilidad de carotenoides en larvas de pez cebra mediante HPLC-DAD UV, así como análisis de expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) por real-time PCR. En el primer caso se comprobó que existe permeabilidad de carotenoides en larvas de pez cebra. Mientras que en el segundo caso no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles.

SUMMARY

During the last two decades, studies have been carried out suggesting that chronic inflammation, associated with a situation of continuous oxidative stress, can be an etiological factor in many different pathologies such as cancer, diabetes, cardiovascular, neurological and pulmonary diseases.

The zebrafish is a model widely used in various fields of experimental biology, including the study of mechanisms of human pathologies and mechanisms of immune responses. The zebrafish presents genetic similarities with humans of 70 to 80%. At the same time, oxidative and inflammatory responses can be easily inducible, reproducible and visualized in their early stages of development. Furthermore, the *in vivo* zebrafish embryos and larvae assays have many of the advantages presented in *in vitro* methods.

The principal aim of this work was to evaluate the anti-inflammatory and anti-oxidant activity of natural substances present in the diet, with experimental models based on these substances' screening on zebrafish. In this study, two experimental models were optimized and applied in zebrafish embryos and larvae. In the first model, the inhibitory effect on neutrophil migration in larvae was evaluated

In the second model, the protective effect on oxidative stress induced by exposure to an oxidizing agent was observed.

Several carotenoids have been evaluated, including beta-carotene, lycopene and astaxanthin, phenolic compounds such as naringenin, cyanidin, curcumin, among others, as well as tomato sauce extract, one of the main ingredients of the Mediterranean diet.

During the first model application, were used a 4 days' post-fertilization zebrafish larvae and were optimized the experimental parameters. Results showed that most of the compounds used, including tomato sauce (sofrito), significantly reduce neutrophil migration compared to control group.

The compounds that showed the greatest decrease on migration were: chlorogenic acid (66.7%), cyanidin (62.5%) respectively, while anti-inflammatory drugs (indomethacin,

RESUMEN

piroxicam) and NADPH oxidase inhibitor compounds (dibenzodolium, apocynin) reduced neutrophil migration over 70%.

In contrast, no effect was observed when using the known non-anti-inflammatory drug amantadine. And in the case of the tomato sauce extract, it reduced 40% neutrophil migration.

The second model was previously developed in same laboratory by Boix, (2015). Have been determined the protective effect on oxidative stress with the same compounds in 0-48 hours-post-fertilization zebrafish embryos.

It had been observed most compounds tested have a protective effect on the lethality, caused by the oxidative stress inducer tert-butyl hydroperoxide (tBOOH). In addition, a protective effect against morphological abnormalities was observed in cases of routine, apigenin and curcumin.

It had been performed complementary studies of carotenoid permeability in zebrafish larvae using HPLC DAD UV, as well as gene expression analysis of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) by real-time PCR.

In the first case it was verified that there is permeability of carotenoids in zebrafish larvae. In the second case, no significant differences were observed between the treated groups and the controls.

1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial y durante miles de años las plantas han sido la base de la medicina tradicional y siguen siendo la base para descubrir nuevos compuestos activos terapéuticos. La dieta juega un papel importante en mantener una respuesta inmune "óptima", de modo que la ingesta deficiente o excesiva puede tener consecuencias negativas sobre el estado inmune y la susceptibilidad del organismo a una amplia variedad de patologías. Diferentes estudios reportan a la dieta mediterránea como un modelo de alimentación saludable, caracterizada por contener verduras, tomate, frutas, pescado y aceite de oliva, que proporcionan importantes componentes dietéticos como carotenoides y compuestos fenólicos, que pueden contribuir a reducir el riesgo de desarrollar diferentes patologías. (Lindeberg et al, 2007; Pérez et al, 2009).

La inflamación surge como una respuesta del sistema inmune del organismo al daño celular y tisular, la inflamación involucra un componente celular y otro oxidativo. El componente celular implica el movimiento de leucocitos de los vasos sanguíneos hacia el tejido inflamado. Una vez que los leucocitos llegan al sitio de la inflamación, causado por una lesión de la membrana celular, los fosfolípidos se degradan a ácido araquidónico (AA) por la acción de fosfolipasas, el ácido araquidónico es metabolizado por la vía de ciclooxigenasa o lipooxigenasa, produciendo así prostaglandinas, leucotrienos y tromboexanos, mediadores inflamatorios necesarios en el proceso de inflamación.

El componente oxidativo está conformado por especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen los radicales hidroxilo (OH^\cdot), el anión superóxido (O_2^-), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que median el daño celular si se encuentran en exceso. Enzimas, membranas lipídicas y ADN de células y tejidos vivos, sufren daños irreversibles que están relacionados con enfermedades crónicas debido al estrés oxidativo producido (Kontogiorgis et al, 2010).

El presente estudio está enfocado en investigar, el posible efecto anti-inflamatorio y antioxidante que pueden ejercer los diferentes componentes naturales presentes en la dieta mediterránea, tanto en la cinética de la inflamación *in vivo*, así como el efecto protector sobre el estrés oxidativo. Empleando como modelo animal, larvas y embriones

INTRODUCCIÓN

de pez cebra (*Danio rerio*). Entre las múltiples ventajas que presenta el pez cebra, está su alta fecundidad, pequeño tamaño, rápido desarrollo extra uterino y la transparencia óptica de embriones y larvas. Además, presenta características favorables para su uso entre ellas su bajo coste tanto de mantenimiento, así como la necesidad de pequeñas cantidades de compuestos, los mismos que se disuelven en el medio circundante y son absorbidos a través del tracto gastrointestinal o a través de su piel, lo que permite una evaluación rápida de la actividad farmacológica *in vivo* (Goldsmith et al, 2004; Lawrence, 2007; Lieschke et al, 2008; Mathias et al, 2006)

1.1 Sistema inmune

El sistema inmune tiene como función principal la integridad biológica del individuo (homeostasis), y presenta tres líneas de defensa (Figura 1). La primera está formada por una serie de barreras mecánicas como la piel; químicas como el medio ácido del estómago y biológicas como los microorganismos simbiotes que protegen el organismo. Si estas barreras sufren una pérdida de continuidad, se activa la segunda barrera protectora que es el sistema inmune innato y posteriormente puede actuar la tercera línea de defensa que es el sistema inmune adaptativo (Doan, 2013).

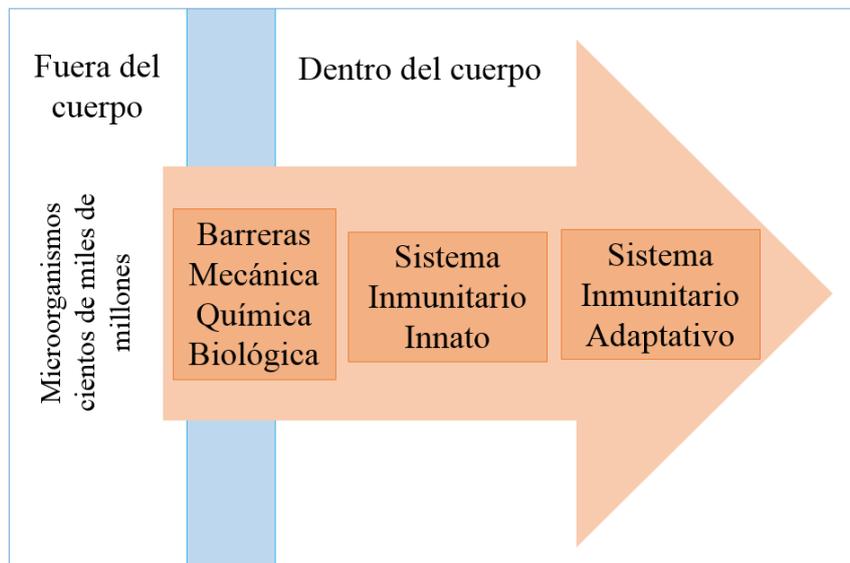


Figura 1.- Imagen adaptada de Doan, (2013). Protección y respuesta frente a la invasión microbiana.

1.1.1 Inmunidad Innata y Adaptativa

Inmunidad Innata: también llamada natural o nativa, consta de mecanismos celulares y bioquímicos que existen incluso antes de la infección y que pueden responder con rapidez a ella. Estos mecanismos pueden reaccionar con elementos generados por los microorganismos. Los principales componentes son:

INTRODUCCIÓN

- Barreras físicas y químicas: Epitelio y sustancias químicas antimicrobianas producidas en la superficie del epitelio.
- Células fagocíticas: neutrófilos y macrófagos y otras células linfocíticas innatas
- Proteínas sanguíneas y otros mediadores de la inflamación

El sistema inmunitario innato obstaculiza la entrada de microorganismos y elimina o limita el crecimiento de muchos de ellos capaces de colonizar tejidos. Los principales puntos de interacción entre el individuo y el medio externo son: la piel, pulmones, aparato digestivo y respiratorio, que se encuentra recubierto por epitelios continuos, que actúan como barreras para impedir la entrada de microorganismos procedentes del medio externo. Si logran atravesar esta barrera, se encuentran con las células de la inmunidad innata. La principal reacción del sistema celular innato es la inflamación (Abbas, 2015).

Inmunidad adaptativa: Este sistema puede reconocer un gran número de sustancias microbianas y otros tipos de moléculas, reaccionando frente a ellas. Ésta característica que permite distinguir diferentes sustancias, se denomina especificidad. Al mismo tiempo tiene la capacidad de responder de forma más intensa a exposiciones repetidas del mismo organismo, que se conoce como memoria. Los únicos elementos de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B. Los linfocitos son capaces de reconocer sustancias externas ajenas al organismo denominado antígeno, produciendo anticuerpos para defenderse de éstas sustancias (Abbas, 2015).

1.1.2 Células del sistema inmune innato

Los glóbulos blancos o leucocitos desempeñan la función de centinelas y defensores contra las infecciones mediante la vigilancia del medio interno. Se mueven por el organismo a través del sistema circulatorio (linfáticos y sanguíneo), y pueden salir y volver a entrar en éste sistema, para moverse a través de los tejidos corporales. Los leucocitos desempeñan diferentes en la defensa del organismo. Su clasificación se realiza según su linaje hematopoyético y morfología (número de lóbulos del núcleo y granulación citoplasmática) (Figura 2).

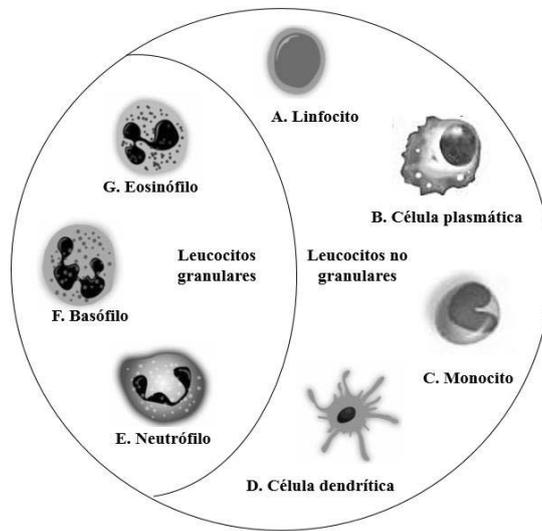


Figura 2.- Tipos de leucocitos. Figura adaptada de Doan 2013. A) Linfocitos T, B y linfocitos citolíticos naturales. B) Linfocitos B que aumentan de tamaño y se convierten en células secretoras de inmunoglobulinas se conocen como células plasmáticas. C) Los monocitos son células fagocíticas en la circulación y reciben el nombre de macrófagos cuando acceden a los tejidos. D) Las células dendríticas son células fagocíticas que disponen de extensiones citoplasmáticas en forma de ramas. E) Los neutrófilos tienen núcleos multilobulados y gránulos citoplasmáticos que se tiñen con colorantes neutros (pH). F) Los basófilos tienen núcleos bilobulados y gránulos citoplasmáticos que se tiñen con colorantes básicos (pH). G) Los eosinófilos tienen núcleos bilobulados y gránulos citoplasmáticos que se tiñen de colorantes ácidos (pH).

Leucocitos no granulares: tienen un solo núcleo no lobulado y un citoplasma que contienen pocos o ningún gránulo.

- **Linfocitos B:** los linfocitos B residen en la médula ósea y son capaces de sintetizar inmunoglobulinas. Junto con las **células plasmáticas**, son las únicas células capaces de realizar ésta síntesis
- **linfocitos T:** las células linfocíticas que migran al timo, donde culminan su proceso de diferenciación, se conocen como linfocitos derivados del timo estas células tienen papeles específicos en la función inmunitaria adaptativa.
- **linfocito NK:** forma parte de un tercer grupo de células diferentes a los linfocitos B y T. Es el linfocito citolítico natural, reciben ésta denominación, debido a su capacidad de destruir células del anfitrión anómalas.

INTRODUCCIÓN

- **Monocitos y Macrófagos:** son células mononucleares. Son células que destruyen células extrañas y eliminan restos celulares mediante degradación enzimática. Los monocitos pasan de uno a dos días en la circulación, y a continuación atraviesan el endotelio vascular y entran en los tejidos de todo el cuerpo, donde se convierten en macrófagos. Tanto los monocitos como los macrófagos controlan de forma activa su entorno mediante la fagocitosis.
- **Células dendríticas:** predominantes en todo el organismo, especialmente en zonas que pueden ser una posible entrada de microorganismos, por ejemplo, piel, pulmones, tubo digestivo. Se denominan así por sus proyecciones citoplasmáticas en forma de ramas. Realizan activamente fagocitosis y toman muestras de líquidos extracelulares mediante macropinocitosis (proceso por el que sus proyecciones citoplasmáticas rodean e incorporan el líquido tisular, así como las moléculas y partículas contenidas en él). Estas células constituyen un importante sistema inmunitario innato.

Leucocitos Granulares: estas células tienen núcleos multilobulados y gránulos citoplasmáticos que contienen aminas (que se tiñen con colorantes básicos), proteínas básicas (que se tiñen con colorantes acidófilos o eosinófilos) o ambos, tinción neutra.

- **Eosinófilo:** recibe esta denominación por su afinidad con la eosina (colorante utilizado en histología), son granulocitos lobulados con gránulos citoplasmáticos que contienen proteínas básicas.
- **Basófilos o mastocitos:** son células lobuladas se encuentran en cantidades reducidas en la sangre periférica o en su forma residente en tejidos, conocida como mastocitos. Estas células contienen aminas y se tiñen con colorantes básicos. Son importantes en las reacciones alérgicas, en reacciones inflamatorias locales e inmunidad adaptativa.
- **Neutrófilos:** son la población de células leucocitarias más abundante en la sangre. También se denominan células polimorfonucleares (PMN) debido al variable número de segmentos nucleares que poseen (2 a 5). Presenta granulaciones citoplasmáticas finas ricas en peroxidasa y fosfatasa alcalina. Los neutrófilos son eficaces en la destrucción de bacterias y fagocitar cuerpos extraños. Un aumento en el número de neutrófilos en sangre periférica suele indicar una infección aguda (Doan, 2013).

1.1.3 Mecanismos de reconocimiento de la inmunidad innata

Las células de la inmunidad innata emplean diferentes mecanismos de reconocimiento, los cuales median el reconocimiento de estructuras moleculares presentes en grupos de microorganismos. Estas estructuras moleculares se denominan patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMP) del inglés *pathogen-associated molecular pattern* y a los receptores que los reconocen se los denomina receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del inglés *pattern recognition receptor* Figura.3

Las células de la inmunidad innata emplean diversos PRR, que pueden expresarse en la superficie celular o intracelular de la célula de inmunidad innata. Sin embargo, los PRR de nuestro interés son los receptores tipo toll (TLR). Los TLR constituyen una familia de proteínas que reconocen y se unen a los PAMP propios de los microorganismos. De los TLR identificados hasta el momento se conoce que el TLR4 tiene la capacidad de reconocer lipopolisacáridos (LPS), componente de la membrana externa de bacterias gramnegativas, responsables de la inducción de cuadros inflamatorios. También se conoce que el TLR2 reconoce peptidoglucanos de bacterias grampositivas y lipopéptidos presentes en numerosas bacterias.

El reconocimiento de los PAMP por los TLR expresados en las células de inmunidad innata conducen a la activación de vías de señalización, que dan lugar a la producción de un amplio conjunto de mediadores inflamatorios, como: especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), quimiocinas y citoquinas (Fainboim, 2005; Doan, 2013).

INTRODUCCIÓN

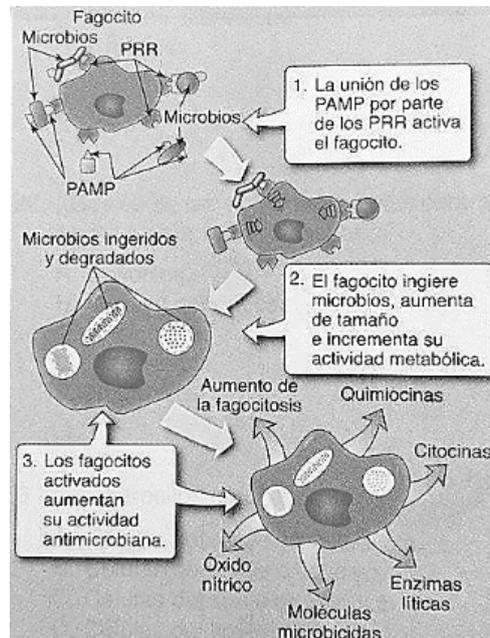


Figura 3.- La unión PRR-PAMP activa los fagocitos. El reconocimiento y la unión de los PAMP existentes en la superficie de los microbios por parte de los PRR en la superficie de los fagocitos, activa éstos para que ingieran y degraden los microbios, figura obtenida de Doan, (2013).

Aunque la teoría de los PRR explica la respuesta inmune a las bacterias y otros patógenos, no explica la respuesta inmune a trasplantes y tumores, ni la disfunción observada en las enfermedades autoinmunes. El descubrimiento de las células presentadoras de antígeno (APC) permitió resolver problemas inmunológicos del antiguo modelo. Ahora se sabe que las APC discriminan lo “propio” y lo “no propio”, además de patógenos evolutivamente distantes, mediante los PRR (Janeway, 2013)

Recientemente, Matzinger, (2002) postuló la “teoría del peligro” la cual sugiere que las APC además de ser activadas por los PAMP de microorganismos patógenos, también son activadas por señales de peligro conocidas como *damage-associated molecular pattern* (DAMP), producidas por células infectadas, dañadas por toxinas o por daño mecánico entre otras causas, y que estas señales también son capaces de activar la respuesta inmune. Señales que nunca son emitidas por células saludables o que sufren muerte fisiológica.

1.1.4 Inflamación

La inflamación puede definirse de manera simple y concisa como la reacción de los tejidos vivos frente a una agresión, consistiendo en una serie de cambios en los sistemas de microcirculación local de los tejidos conectivos, todo ello conlleva a la neutralización y eliminación del agente nocivo y a reparar el daño tisular ocasionado. Los cuatro signos cardinales de la inflamación, fueron descritos en el siglo I A.C. por el médico romano Aulus Cornelius Celsus: enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor. Un quinto signo, fue añadido por el médico alemán Rudolph Carl Virchow en el siglo 19, la pérdida de la función (Figura 4), y postuló que la inflamación no puede ser representada como un solo proceso, sino que constituye varios procesos conectados entre ellos (Heidland et al, 2006; Lawrence et al, 2002).

Los cambios vasculares consisten en un aumento de la irrigación de un órgano o tejido, producto de una vasodilatación. La vasodilatación ocasiona el aumento de la temperatura, que tiene por objeto aumentar el flujo sanguíneo a la zona afectada, con lo cual, se asegura un aporte suficiente de células con capacidad defensiva.

Junto a esta vasodilatación, y de forma paralela se produce también un aumento de la permeabilidad capilar con lo que se favorece la salida del torrente circulatorio de proteínas, líquidos y células. Esta acción es potenciada por la presencia local de factores quimiotácticos que atraen al foco inflamatorio granulocitos y manocitos, de gran importancia en los procesos de defensa. Estos cambios en el sistema vascular local son los responsables de los signos de la inflamación (Martínez et al, 1982).

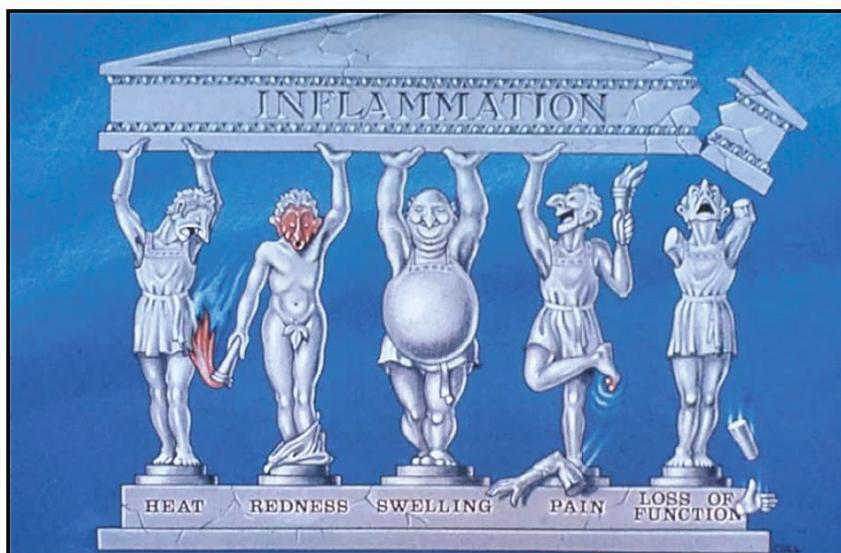


Figura 4.- Figura adquirida de Lawrence et al, (2002), signos cardinales de la inflamación. Esta caricatura indica a cinco griegos que representan los signos cardinales de la inflamación: calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de función. Que son tan apropiados hoy como lo fueron cuando fue descrito por primera vez por Celsus hace más de 2000 años. Ésta figura fue encargada por D.A.W. Y dibujado por P. Cull para el Medical Illustration Department at St Bartholomew's Medical College.

1.1.5 Tipos de Inflamación y enfermedades crónicas

El proceso inflamatorio puede clasificarse como agudo o crónico, según la naturaleza y la eficacia de la respuesta inicial. La inflamación aguda se define como transitoria y de respuesta inicial a una lesión. Es decir, es de inicio rápido y de corta duración, que dura unas horas o algunos días. Se caracteriza por la liberación de numerosos mediadores químicos, y conduce a la exudación de proteínas y de plasma (edema) y la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos. La inflamación aguda puede tener diferentes causas tales como: infecciones (bacterianas, virales, fúngicas, parasitarias, toxinas microbianas, necrosis tisular de diversas causas, isquemia, traumas, lesiones físicas y químicas). La importancia de este proceso inflamatorio se relaciona con la dificultad en la eliminación de los estímulos que lo activan. La persistencia de la inflamación aguda puede provocar un proceso inflamatorio crónico (Ribeiro et al, 2015).

Una inflamación exacerbada se considera un factor crítico en muchas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, la obesidad, la diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento (Santangelo et al., 2007). El estrés persistente del ambiente inflamatorio y oxidativo, causa daño a los tejidos epiteliales vecinos, lo que conduce a cambios en el funcionamiento fisiológico de los mismos. El mantenimiento de estos cambios durante un largo período de tiempo pueden conducir a la patogénesis de diversos trastornos autoinmunes, alterando innumerables vías de señalización (Shama et al, 2016; Srivastava et al, 2017).

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno conducen a la progresión de la respuesta inflamatoria en un ciclo sin fin. Por éste motivo, el estudio de moléculas procedentes de fuentes naturales, capaces de detener este ciclo, es de gran valor para frenar el proceso inflamatorio, evitando de ésta manera la utilización de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) que pueden causar numerosos efectos secundarios indeseados (Ribeiro et al, 2015)

1.1.6 Migración leucocitaria

La migración de células fagocíticas hacia los focos de infección ocurre en cuatro etapas secuenciales muy bien definidas, estas etapas se denominan: rotación o *rolling*, adherencia estable, diapédesis y migración como se puede observar en la Figura 5. Tras el reconocimiento del patógeno, en el foco de infección, se incrementa la permeabilidad vascular, ocasionando la marginación leucocitaria, permitiendo que los neutrófilos hagan contacto con el endotelio disminuyendo su velocidad, la adherencia es poco estable por lo que parece que la célula rueda sobre el endotelio. Para que la célula se detenga y pueda extravasarse se requiere de la interacción de otros mecanismos celulares que hacen que el neutrófilo se adhiera de forma estable. Seguidamente se produce el pasaje del neutrófilo entre células endoteliales y a través de la membrana basal, lo que se conoce como diapédesis. Tras atravesar la membrana, el neutrófilo se abre paso en el espacio intersticial (espacio entre células), siguiendo la gradiente de sustancias quimioatrayentes para llegar a su destino final, el foco de infección donde median funciones bactericidas.

INTRODUCCIÓN

Los neutrófilos migrados a la zona de infección ingieren a los microorganismos mediante el proceso de fagocitosis, proceso de ingestión del microorganismo en las vesículas de neutrófilos. Al ser activadas, destruyen los microorganismos fagocitados, mediante la acción de moléculas microbicidas como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el óxido nítrico (NO).

Los neutrófilos son un tipo de glóbulo blanco que pueden migrar hacia los sitios dañados y son considerados como el sello distintivo de la inflamación aguda. Por esta razón, el monitoreo del número y la actividad migratoria de los neutrófilos es una manera eficiente de evaluar las respuestas inflamatorias agudas (Chen et al, 2017; Ribeiro et al, 2015).

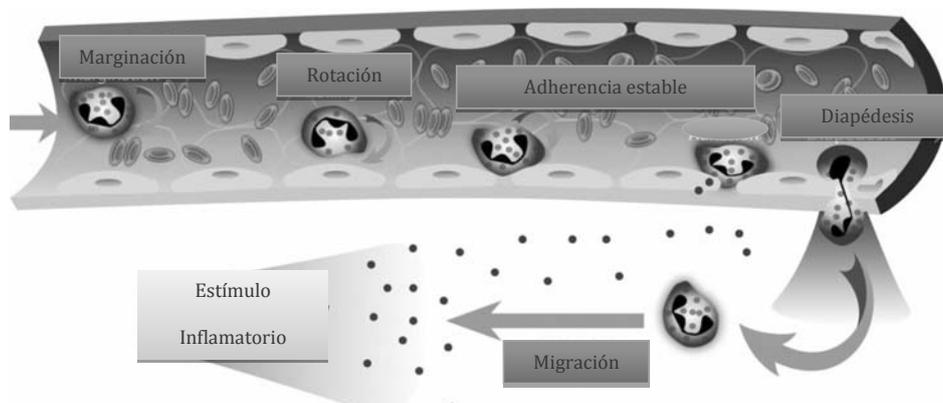


Figura 5.-Figura adaptada de Ribeiro et al, (2015). Proceso de activación de neutrófilos.

1.1.7 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, producidas durante la respuesta inmune, las citoquinas pueden ser proinflamatorias o anti-inflamatorias. Entre las principales citoquinas proinflamatorias se encuentran el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina uno (IL-1) e interleucina seis (IL-6), que son mediadores inflamatorios de la respuesta inmune. La mayoría de citoquinas son producidas por la activación de linfocitos y macrófagos, a pesar de que células endoteliales y epiteliales también pueden producir éstas proteínas.

TNF- α : La producción de ésta citoquina es estimulada por los PAMP y DAMP, los TLR pueden inducir la expresión del gen TNF, en parte por la activación del factor de transcripción NF- κ B.

IL-1: Existen dos formas de IL-1 llamadas IL-1 α e IL-1 β . La principal forma secretada es la IL-1 β . La transcripción de éste gen es inducida por el TLR, que activan la NF- κ B y AP-1. El TNF- α también puede estimular a los fagocitos a producir IL-1.

Estas citoquinas inducen la expresión de moléculas de adherencia en el tejido endotelial. Participan en la síntesis de otras citoquinas, como la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8), eicosanoides y NO. Estas citoquinas pro-inflamatorias son quimiotrayentes para los neutrófilos y los ayudan a adherirse a las células endoteliales para la migración, también estimulan la fagocitosis de los glóbulos blancos y la producción de prostaglandinas lipídicas inflamatorias como la (PGE2) (Ribeiro et al, 2015; Maroon et al, 2010; Leyva et al, 2016; Abbas, 2015)

1.1.8 Fármacos anti-inflamatorios

La respuesta inmunitaria se puede controlar mediante el uso de medicamentos u otras sustancias terapéuticas. La modulación de la respuesta inmune puede ser específica o inespecífica. El grupo de los anti-inflamatorios se pueden clasificar en: fármacos esteroideos (SAID's) del inglés *steroidal anti-inflammatory drugs*, anti-inflamatorios no esteroideos AINE o (NSAID's) del inglés *non steroidal anti-inflammatory drugs*, además algunos compuestos naturales presentan propiedades anti-inflamatorias.

- **Fármacos Esteroides**

Estos fármacos, específicamente los glucocorticoesteroides, poseen potentes efectos anti-inflamatorios e inmudepresores. Desde 1949 se los ha utilizado para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR). Actualmente se los utiliza frecuentemente para tratar de forma inespecífica varias enfermedades inflamatorias y otras enfermedades autoinmunitarias, la alergia y el asma (Doan, 2013).

INTRODUCCIÓN

- **Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE)**

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) se encuentran entre los medicamentos más prescritos en todo el mundo. Esta clase heterogénea de fármacos incluye la aspirina y varios otros agentes inhibidores de la enzima ciclo-oxigenasa (COX) o prostaglandina sintasa, que tiene dos isoformas: la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2), estas isoformas son responsables de la síntesis de tromboexanos y prostaglandinas. Los AINEs no selectivos son los más antiguos, y designados como tradicionales o convencionales, mientras que los AINEs selectivos para la COX-2 se designan COXIBEs (Batlouni, 2010). La capacidad de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) de interferir con la producción de prostaglandina durante la cascada inflamatoria es el mejor mecanismo conocido para el éxito anti-inflamatorio de estos medicamentos (Maroon et al, 2010)

Uno de los componentes principales implicado en la vía inflamatoria es la del ácido araquidónico (AA). Ésta vía inflamatoria es activada cuando la membrana celular es lesionada, activando la enzima fosfolipasa A₂, que hidroliza los fosfolípidos de la membrana celular, liberando AA en el citoplasma. Éste, a su vez, sirve de sustrato para dos vías enzimáticas: ciclo-oxigenasa (COX) y lipo-oxigenasa (LOX). Por la vía de la COX se generan diversas prostaglandinas (PGE₂, PGF₂), prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TXA₂) como se puede observar en la (Figura 6). Mientras que por la vía de la lipo-oxigenasa se forman leucotrienos, lipoxinas y otros productos. Las enzimas COX actúan de manera similar, la COX-1 es esencial para el mantenimiento del estado fisiológico normal de muchos tejidos, incluidos la protección de la mucosa gastrointestinal; control del flujo sanguíneo renal; homeostasia; respuestas autoinmunes; funciones pulmonares y del sistema nervioso central; cardiovasculares y reproductivas. La COX-2, inducida en la inflamación por varios estímulos como citoquinas, endotoxinas y factores de crecimiento, origina prostaglandinas inductoras, que contribuyen al desarrollo del edema, rubor y fiebre. La COX-2 se expresa también en las células vasculares endoteliales normales, que secretan prostaciclina en respuesta al estrés de cizallamiento. El bloqueo de la COX-2 produce la inhibición de la síntesis de prostaciclina (Batlouni, 2010)

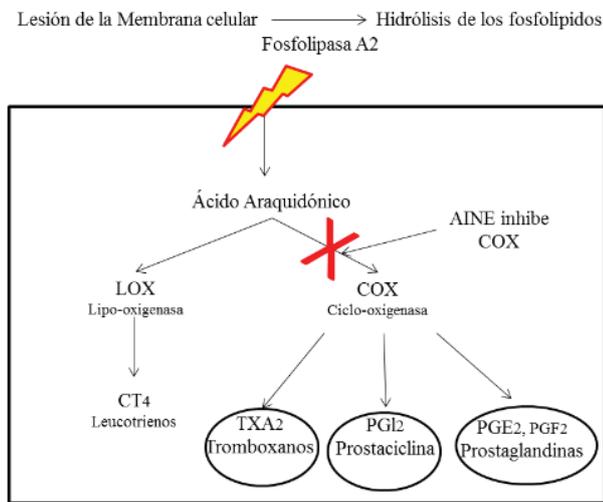


Figura 6.- Esquema de la vía del ácido araquidónico, adaptado de Maroon, (2010). Muestra que cuando se daña una membrana celular, la vía del ácido araquidónico se activa para iniciar la respuesta inflamatoria local mediante la producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Los AINEs pueden bloquear la acción de la COX y prevenir así la formación de mediadores inflamatorios derivados de COX.

Con la lesión tisular también se puede activar otra vía inflamatoria. La activación del factor nuclear kappa (NF- κ B). Ésta molécula actúa como factor de transcripción, controlando la transcripción de ADN y es fundamental en la respuesta inmune inflamatoria. Actúa como un interruptor para activar y desactivar la inflamación en el cuerpo, la NF- κ B tiene la capacidad de detectar estímulos nocivos, tales como agentes infecciosos, radicales libres y otras lesiones celulares, y posteriormente activar el ADN para producir citoquinas inflamatorias. Las proteínas NF- κ B están localizadas en el citoplasma de la célula y están asociadas con una familia de proteínas inhibitoras conocidas como inhibidor de κ B (I κ B). Las proteínas I κ B están normalmente unidas al (NF- κ B) y bloquean su señal de localización nuclear. Una vez que la proteína I κ B está libre como resultado de una lesión tisular, puede entrar en el núcleo celular y activar el ADN para amplificar la respuesta inflamatoria mediante la producción de citoquinas. Estudios realizados con aspirina, sugieren que ésta actúa tanto en las vías NF- κ B como en las COX (Maroon et al, 2010).

INTRODUCCIÓN

- **Anti-inflamatorios Naturales**

Las plantas producen miles de compuestos fenólicos y polifenólicos como metabolitos secundarios. Entre las sustancias naturales con propiedades anti-inflamatorias se encuentran los flavonoides, que son una subclase de polifenoles y son abundantes en la dieta humana. Son pigmentos naturales presentes en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas. Representan un grupo de sustancias del componente no energético de la dieta humana. Presentan una estructura común C₆-C₃-C₆ (Figura 7), que contiene dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos, normalmente organizada como un anillo heterocíclico oxigenado (Martínez et al, 2002; Leyva et al, 2016; Shama et al, 2016)

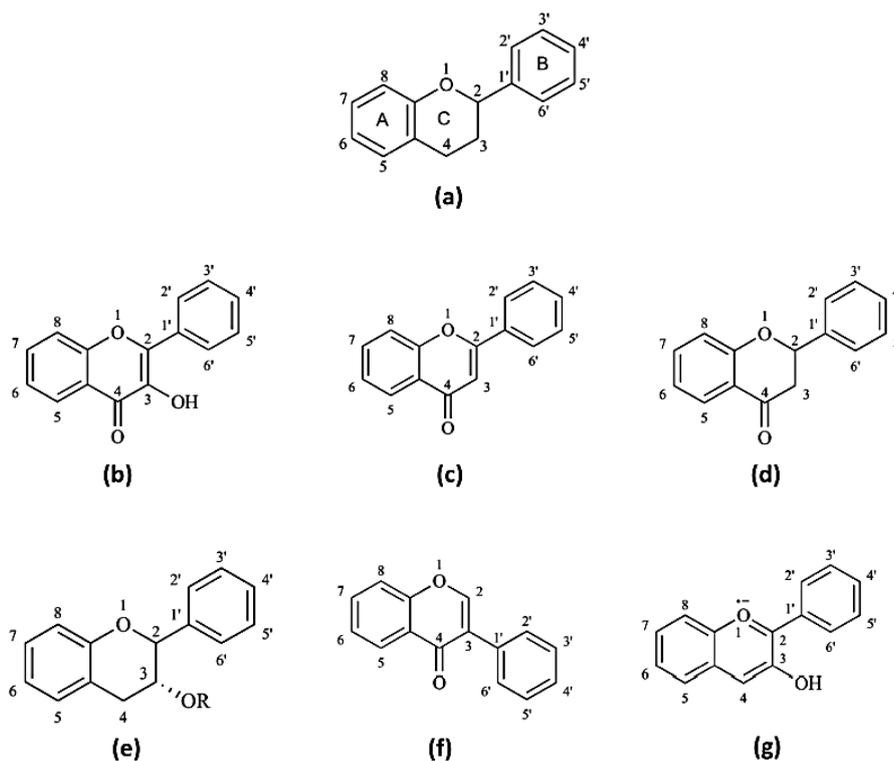


Figura 7.- Estructura química de diferentes clases de flavonoides: a) flavonoide; b) flavonol; c) flavona; d) Flavanona; e) flavanol, f) isoflavona; g) antocianidina (López et al, 2016)

La actividad de los flavonoides en la respuesta inflamatoria incluye 1: la inhibición de mediadores inflamatorios como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el óxido nítrico (NO), 2: la regulación de la actividad de las enzimas inflamatorias, tales como las ciclooxigenasas (COXs) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), 3: la reducción de los niveles de producción y expresión de citosinas y 4: la modulación de factores de transcripción, tales como el factor nuclear kappa (NF-kB) y la activación de la proteína (AP-1). Cuando la respuesta inflamatoria no está correctamente regulada, se produce un aumento de mediadores inflamatorios, que pueden facilitar la aparición de enfermedades crónicas, como, la artritis reumatoide, las enfermedades coronarias y el cáncer, entre otros. Existen pruebas que sugieren que las citoquinas inflamatorias pueden utilizarse como dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. El desarrollo de fármacos anti-inflamatorios eficaces y seguros debe ser una prioridad. Sin embargo, las tradicionales terapias anti-inflamatorias esteroideas o no esteroideas no son suficientes o se asocian con demasiados efectos secundarios. En los últimos años, los flavonoides han atraído el interés de la industria farmacéutica, debido a sus propiedades farmacológicas, probablemente por sus efectos antioxidantes y anti-inflamatorios (Ribeiro et al, 2015).

1.2 Fagocitosis como fuente celular de radicales libres

Se han identificado varias fuentes intracelulares de producción de radicales libres y oxidantes. Las fuentes biológicas más significativas de radicales libres son las células fagocíticas, por ejemplo, neutrófilos y monocitos. El principal sistema generador de radicales libres es el de la enzima oxidasa del fagocito, la función de ésta enzima es reducir el oxígeno molecular a especies reactivas de oxígeno (ROS) como los radicales superóxido. Todas las (ROS) derivan del anión superóxido (O_2^-), la enzima responsable de generar (O_2^-) es la NADPH oxidasa, que cataliza la reducción del oxígeno molecular utilizando la forma reducida del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) como dador de electrones Figura 8.



La producción de agentes oxidantes por los neutrófilos se inicia cuando la enzima NADPH oxidasa se activa. La mayor parte del anión superóxido (O_2^-) se elimina

INTRODUCCIÓN

rápidamente, en una reacción espontánea catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno es un oxidante muy estable que ejerce efectos tóxicos sobre los microorganismos. No obstante, las células fagocíticas producen ROS con mayor potencial oxidante como los oxidantes halogenados (Cl^+ , Br^- , I^-), producidos cuando la NADPH oxidasa cataliza la oxidación de haluros (cloruro, bromuro y yoduro) por el H_2O_2 y generados a partir de la enzima mieloperoxidasa (MPO) presente en los gránulos de los neutrófilos.

El H_2O_2 formado cumple un importante papel bactericida en presencia de yodo (I^-) y de la enzima mieloperoxidasa. Tiene un efecto lítico sobre las membranas de las células bacterianas. El producto no utilizado es degradado por la catalasa o por otros sistemas enzimáticos o agentes reductores.

Aparte de la generación de ROS en el interior de los neutrófilos, los fagocitos además contienen gránulos citoplasmáticos cargados de agentes antimicrobianos, que son liberados al medio extracelular durante la fagocitosis, en el caso de encontrar estímulos solubles o microorganismos no fagocitables (Peña, 1982; Pryor, 1984; Fainboim, 2005).

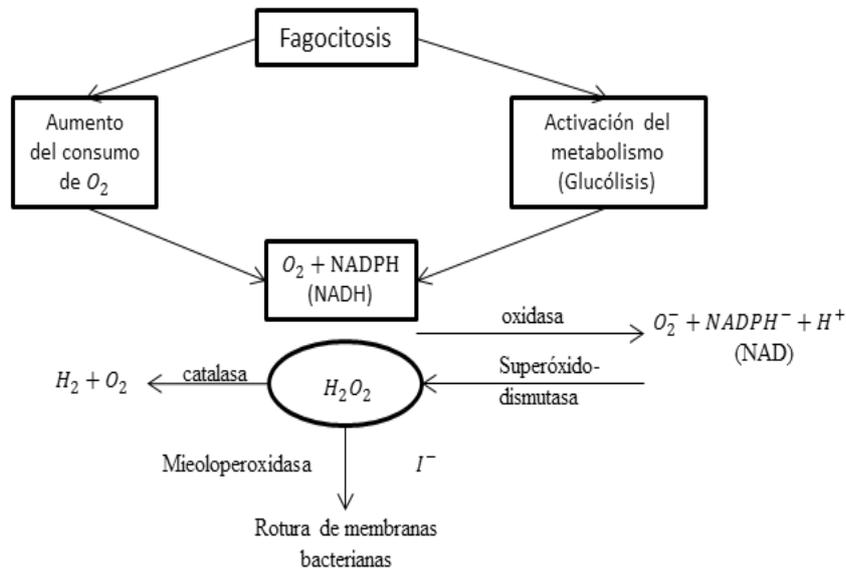


Figura 8.- Procesos metabólicos intracelulares en el proceso de fagocitosis. Esquema adaptado de Peña, (1982).

1.2.1 Especies reactivas de Oxígeno (ROS)

Los neutrófilos activados convierten el oxígeno molecular en especies reactivas de oxígeno (ROS) del inglés *reactive oxygen species*, que son sustancias oxidantes muy reactivas que destruyen microorganismos. El proceso por el cual se producen las ROS se denomina “estallido respiratorio”, porque se produce durante el consumo de oxígeno en la respiración celular (Fainboim, 2005). La generación de ROS, como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) bajo condiciones normales, representa un fenómeno común en todos los tipos de células aeróbicas (tabla 1). Además de las ROS, las células fagocíticas producen especies reactivas de nitrógeno (RNS), sobre todo óxido nítrico (NO) por la acción de la enzima llamada óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La iNOS es inducida en respuesta a la activación de los TLR. El óxido nítrico puede combinarse con el peróxido de hidrógeno generado por la oxidasa de los fagocitos para producir radicales peroxinitrito muy reactivos que eliminan microorganismos (Abbas, 2015). Sin embargo, el aumento de la producción o la disminución de estas especies, puede conducir a la modificación de sus niveles iniciales, situación denominada “estrés oxidativo”. En la última década se ha reconocido que las células tienen la capacidad de detectar pequeños cambios en su equilibrio redox intracelular y responder; cambiando la actividad de muchas enzimas y la expresión de un gran número de genes. Los efectos anteriormente mencionados pueden modular distintas vías de transducción de señales e influyen en las funciones celulares básicas, como la proliferación y diferenciación celular. La exposición a niveles aún más altos de estrés oxidativo puede inducir daño celular por apoptosis o necrosis (Grune, 2005).

Tabla 1.- Oxígeno activo y especies relacionadas

Radicales		No radicales	
O_2^-	Superóxido	H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$HO\cdot$	Radical hidroxilo	1O_2	Oxígeno singlete
HO_2	Radical hidroperóxido	$LOOH$	Hidroperóxido lipídico
$L\cdot$	Radical lipídico	$Fe=O$	Complejo hierro-oxígeno
LO_2	Radical lipídico peróxido	$HOCl$	Hipoclorito
$LO\cdot$	Radical alcóxido lipídico		
NO_2	Dióxido de nitrógeno		
NO	Óxido nítrico		

Fuente: Adaptado de Papas, (1999)

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres y las especies de oxígeno activo se generan a través de diversas fuentes extrínsecas e intrínsecas tales como luz, calor y metales. Se forman *in vivo* de varias maneras en diferentes momentos y sitios como se resume en la Tabla 2 (Papas, 1999)

Tabla 2.- Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

Especie reactiva de oxígeno	Formación
Superóxido HO_2 Radical hidropéroxido	Reducción enzimática y no enzimática de un electrón del oxígeno $O_2 + e \rightarrow O_2^- \leftrightarrow HO_2$
HO Radical hidroxilo	Radiólisis del agua, descomposición del peróxido de hidrógeno, catalizada por metal interacción de NO y superóxido
H_2O_2 Peróxido de hidrógeno	Dismutación de superóxido, oxidación de azúcares
$Fe=O$ Complejo hierro-oxígeno	Hemoglobina, mioglobina
1O_2 Oxígeno singlete	Oxidación fotosensibilizada, interacción bimolecular entre radicales peróxido, reacción de hipoclorito y peróxido de hidrógeno
NO_2 Dióxido de nitrógeno	Reacción del radical peróxido y NO, aire contaminado y fumar

Fuente: Adaptado de Papas, (1999)

1.2.2 Estrés Oxidativo y estado de Oxidación

Estrés Oxidativo

El oxígeno es esencial para la vida humana, pero al mismo tiempo es intrínsecamente peligroso para su existencia, ya que produce sustancias tóxicas como los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Dichas sustancias son oxidantes, inestables y reactivas, pueden reaccionar con cualquier clase de macromoléculas y producir daño celular. Sin embargo, el organismo dispone de mecanismos enzimáticos antioxidantes

como la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, además de sistemas antioxidantes procedentes de la dieta, para contrarrestar éstas sustancias oxidantes. La generación de (ROS), como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en condiciones normales, representa un fenómeno común de los organismos aeróbicos. Sin embargo, el aumento de la producción o la disminución de estas especies puede conducir a un desequilibrio, una situación llamada "estrés oxidativo", que se relaciona con el envejecimiento y con la degeneración del sistema inmune. Y la consecuente generación de patologías como cáncer, problemas cardiovasculares y diabetes tipo II. La alimentación está estrechamente relacionada con las defensas antioxidantes del organismo, una dieta adecuada permitirá que el organismo disponga de una defensa eficiente contra los procesos de oxidación (Sies et al, 1985; López et al, 2004)

Estado de Oxidación

El estado de oxidación es el resultado del desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y pro oxidantes. Este equilibrio es dinámico y en el organismo humano, probablemente se inclina ligeramente a favor de la oxidación, esencial para la producción de energía. El cuerpo se ha adaptado a este ligero desequilibrio que favorece la oxidación desarrollando mecanismos de reparación que incluyen varias enzimas tales como ligasas, nucleasas, polimerasas, proteinasas, fosfolipasa, entre otras. Cabe mencionar que más que cualquier otro factor, la dieta puede afectar directamente el estado de oxidación de manera positiva o negativa. Al suministrar antioxidantes y cofactores de antioxidantes endógenos, el sistema antioxidante puede ser reforzado. Por el contrario, algunos componentes de la dieta tales como ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y metales divalentes no unidos a proteínas, pueden oxidarse fácilmente o actuar como pro oxidantes, como se muestra en la tabla 3 (Papas, 1999).

INTRODUCCIÓN

Tabla 3.- Determinantes del estado antioxidante en humanos

	
Efecto antioxidante	Efecto Pro-oxidante
Factores Genéticos	Factores Genéticos
Dieta Vitaminas antioxidantes (A, C, E) Componentes antioxidantes de los alimentos y fitoquímicos Minerales, componentes de enzimas antioxidantes (Se, Zn, Cu, Mn, Fe) Alimentos antioxidantes	Dieta Lípidos especialmente ácidos grasos poli-insaturados Minerales divalentes (Cu, Fe) Nutrientes pro-oxidantes y fitoquímicos
Bebidas que contiene antioxidantes (vino)	Medioambiente Contaminantes Humo de tabaco Radiación UV
	Alcohol
	Lesiones, enfermedades y medicamentos (terapia de radiación)
Ejercicio	Etapa fisiológica: Prematuridad, envejecimiento
	Estrés: Psicológico y emocional

Fuente: Adaptado de Papas, (1999)

1.2.3 Tipos de antioxidantes

Con el fin de defenderse contra el daño de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS), los seres humanos y otros organismos vivos desarrollan poderosos y complejos sistemas antioxidantes. Por lo general actúan mediante la eliminación o inactivación de intermediarios químicos que producen radicales libres. Los antioxidantes se pueden producir en el cuerpo (endógenos) o pueden derivar de la dieta (exógenos).

Antioxidantes Endógenos

El organismo posee una serie de mecanismos para protegerse de la agresión de los radicales libres, estos mecanismos consisten en sistemas antioxidantes que pueden actuar a diferentes niveles.

Se denominan antioxidantes preventivos a aquellos que actúan como mecanismos primarios impidiendo la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

Los antioxidantes neutralizadores de radicales son responsables en la segunda línea de defensa e inhiben el inicio de la cadena oxidativa y/o rompen la propagación de la cadena. Las enzimas antioxidantes como las fosfolipasas, proteasas, las enzimas de reparación del ADN y las transferasas actúan como la tercera línea de defensa. Además, se genera el antioxidante apropiado y se transfiere al sitio correcto en el momento adecuado y a la concentración correcta cuando tiene lugar el estrés oxidativo (Papas, 1999)

Tabla 4.-Sistemas de defensa in vivo contra el daño oxidativo

Mecanismos primario	Mecanismo Secundario	Mecanismo terciario
Impiden la formación de radicales libres	Interrumpen la reacción de propagación de la peroxidación lipídica e inactivan las ROS	Reparan el daño causado a las moléculas, o las eliminan.
Transferrina (quelante del hierro)	Enzima superóxido dismutasa (SOD) Dismutación de superóxido en O ₂ y H ₂ O ₂	Enzimas, antioxidantes de las células

INTRODUCCIÓN

Lactoferrina (quelante del hierro)	Catalasa	Vit E, antioxidante de la membrana celular, que impide la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados
	Glutación peroxidasa (GPX) Protege contra hidroperóxidos	Plasma, antioxidante extra celular, contiene ácido úrico, bilirrubina, Vit E y C, y quelantes.
	Glutación (GSH) Principal antioxidante celular	
	Compuestos fenólicos	
	Vitamina E y C	

Fuente: Adaptado de Papas, (1999); López, (2004)

Antioxidantes Exógenos: Antioxidantes Naturales

Los compuestos fenólicos, representan una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana. De éstos compuestos, los flavonoides son los compuestos más estudiados y más abundantes. Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilos y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica. El valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día. La quercetina es el flavonol más conocido de la dieta y sus principales fuentes alimenticias son: el té negro, las cebollas, las manzanas y bebidas alcohólicas como vino y cerveza (Martínez et al, 2002)

1.2.4 Método para evaluar la respuesta de neutrófilos a la inflamación

Para entender la inflamación y la inmunidad, se necesita entender la biología de los neutrófilos. Los neutrófilos son células difíciles de manipular, por ello se emplean una serie de técnicas que permitan comprender su biología. Entre los modelos usados para investigar la biología de los neutrófilos están, la de neutrófilos humanos primarios purificados, líneas celulares del tipo neutrófilo, modelos murinos y el uso del pez cebra como un modelo *in vivo* de inmunidad (Papas, 1999).

- **Neutrófilos humanos primarios purificados**, la purificación de neutrófilos se realiza tradicionalmente por centrifugación de leucocitos a través de gradientes de densidad. Estos métodos producen poblaciones que son neutrófilos > 95%, y han permitido un amplio estudio de la función de estas células. Las técnicas para purificar neutrófilos implican la separación de granulocitos que comprenden eosinófilos y neutrófilos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sobre gradientes discontinuos de densidad.
- **Líneas celulares del tipo neutrófilo**, como resultado de la corta vida útil de los cultivos celulares primarios, se han desarrollado líneas celulares diferenciadas de tipo neutrófilo para estudiar procesos que se pueden confirmar posteriormente en neutrófilos primarios. Estas líneas celulares tienen la ventaja de que están disponibles sin depender del donante. En algunas circunstancias, también son transfectables, lo que permite la confirmación genética de los hallazgos farmacológicos. Ejemplos de líneas útiles incluyen la línea HL-60 ampliamente utilizada, así como las células PLB-985.
- **Modelos murinos**, los modelos murinos se han utilizado tradicionalmente cuando se necesita un modelo *in vivo* y genéticamente manejable en biología de neutrófilos de mamíferos. La alta homología y similitud entre los genomas de mamíferos, la biología celular y la fisiología han hecho de este, un sistema ampliamente utilizado. Los estudios en este campo han contribuido enormemente a la comprensión de muchos aspectos de la biología de los neutrófilos. Los métodos tradicionales han examinado modelos *in vivo* de artritis por transferencia de suero para inflamación, lesión pulmonar inducida por LPS, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Y estudios *ex vivo* de neutrófilos reclutados a sitios de inflamación permitiendo el

INTRODUCCIÓN

estudio de los neutrófilos inflamatorios migrados, en comparación con las células sanguíneas periféricas.

- **Modelo de pez cebra**, se ha utilizado como un modelo para el estudio del desarrollo embrionario de vertebrados, debido a la capacidad de observar fácilmente éste proceso. Los estudios de la biología del desarrollo, han innovado una gama de herramientas para la manipulación y visualización de procesos fisiológicos in vivo, lo que ha llevado a que el modelo de pez cebra sea ampliamente utilizado en todo el mundo (Henry et al, 2013)

1.2.4 Métodos para evaluar el estrés oxidativo

- **Capacidad total para eliminar radicales de oxígeno:** varios ensayos, tales como ensayo de capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC) del inglés *oxygen radical absorbance capacity* y ensayo de parámetros de antioxidantes de captación total de radicales (TRAP) del inglés *total radical trapping antioxidants parameter*, estiman la capacidad total de un plasma o tejido para limpiar radicales de oxígeno.
- **Cuantificación de hidroxi-alquenes formados durante la peroxidación lipídica:** Las peroxidaciones de lípidos *in vivo* generan el subproducto tóxico 4-hidroxinonenal y otros alquenes, que se pueden medir en muestras biológicas mediante Cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) y otros métodos cromatográficos.
- **Análisis por HPLC de hidroperóxidos lipídicos en plasma:** Se han establecido varios protocolos para medir hidroperóxidos lipídicos en plasma por HPLC, usando detección de quimioluminiscencia, y se pueden medir tanto hidroperóxidos de ésteres de colesterol como hidroperóxidos de fosfolípidos. Estos métodos son sensibles y tienen una buena especificidad química, pero requieren un alto nivel de competencia técnica para realizar mediciones en muestras biológicas.
- **Marcadores de ROS que atacan la tirosina:** La tirosina es fácilmente atacada por varios ROS, incluyendo peroxinitrito, hipoclorito y los radicales OH[•]. Las especies reactivas que causan nitración de los residuos de tirosina son liberados por neutrófilos activados. La nitrotirosina libre puede medirse por HPLC y puede detectarse en el plasma de individuos con artritis reumatoide.

- **Proteína-carbonilos:** El ensayo de carbonilo se ha empleado eficazmente para estudios de daño oxidativo in vitro a proteínas.
- **Cambios en la Expresión Genética:** El trabajo en animales experimentales indica cambios en la expresión génica del tejido después del estrés oxidativo (Papass, 1999)

1.2.5 Pez cebra como organismo modelo

Las aplicaciones de modelos de pez cebra se han vuelto cada vez más populares en diversos campos de la investigación biomédica y el desarrollo de fármacos. Tradicionalmente, muchos estudios toxicológicos han estado utilizando embriones y larvas de pez cebra para la caracterización inicial de peligros ambientales o posibles candidatos terapéuticos, antes de avanzar a modelos animales más complejos. Trabajos recientes demuestran las ventajas del pez cebra como modelo animal para elucidar la conexión entre los mecanismos oxidativos y los procesos inflamatorios relevantes para las primeras etapas de desarrollo de enfermedades crónicas. El pez cebra se caracteriza por su tamaño pequeño, un pez cebra adulto tiene una longitud de 30-40 mm y puede pesar entre 300 y 500 mg. Llegan a la edad fértil a los 3 meses y viven hasta 2 años en condiciones de laboratorio (agua a 28,5° C, ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas). Las hembras ponen hasta 200 huevos por apareamiento y los machos fertilizan los óvulos con espermatozoides ex vivo. Después de la fertilización, los embriones se desarrollan en un corión y luego eclosionan aproximadamente a las 48 horas post fertilización (hpf). Los embriones pueden ser sacados del corion manualmente, para el trabajo experimental en cualquier momento. Hasta el 5-6 días post fertilización (dpf) las larvas de pez cebra consumen los nutrientes del saco vitelino y luego comienzan la alimentación libre (Figura. 9). El mantenimiento del pez cebra es relativamente barato y se puede producir un gran número de animales para cada experimento (Fang et al, 2012)

Su extendido uso se debe a que presenta ventajas propias de los modelos invertebrados (pequeño tamaño, rápido ciclo vital, maduración y desarrollo externo, facilidad de mantención y manipulación genética), al mismo tiempo que presenta las ventajas de un vertebrado, por lo que dispone de un sistema inmune altamente desarrollado. Estas características convierten al pez cebra, especialmente en sus etapas de desarrollo embrionario, en un organismo idóneo para realizar estudios in vivo, usando el

INTRODUCCIÓN

organismo entero, lo que permite estudiar en detalle los procesos relacionados con el sistema inmune o la toxicidad considerando el ambiente formado por la interacción entre las diferentes células y tejidos del organismo (Crowhurst et al, 2002)

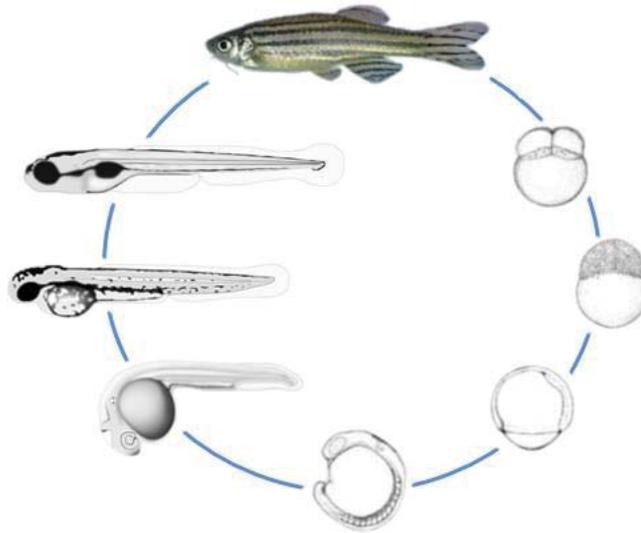


Figura 9.- Esquema del desarrollo embrionario del pez cebra <http://www.fishforpharma.com/why-zebrafish-17>

1.2.7 Pez cebra como modelo de inflamación

Al igual que los mamíferos, los teleósteos poseen varios tipos de granulocitos y un linaje separado de macrófagos. Los múltiples estudios realizados hasta el momento, indican que a nivel morfológico, funcional y molecular, el pez cebra, conserva las características esenciales de un sistema mieloide multi-linaje, que refuerza su utilidad como modelo para la comprensión y estudio del desarrollo de glóbulos blancos (leucocitos), particularmente los fagocitos. Aunque los invertebrados como *Drosophila* tienen células fagocíticas y un sistema inmune innato eficaz, carece de la complejidad de múltiples linajes de la mielopóiticos de los vertebrados y de un sistema inmune adaptativo. El granulocito más abundante en el pez cebra, es el neutrófilo, que se caracteriza por tener un núcleo segmentado multi lobular (2-3 lóbulos). Esta célula es similar al neutrófilo humano, que también tiene un núcleo de múltiples lóbulos y un

citoplasma heterofílico. En los mamíferos, los neutrófilos atraviesan varios estadios de desarrollo, durante los cuales las células se hacen más pequeñas y los núcleos se condensan, se retraen y se convierten en multi-segmentados. A medida que el neutrófilo madura, también lo hacen sus gránulos, expresando y acumulando varias enzimas necesarias para su función. La mieloperoxidasa es una enzima presente en los gránulos primarios de los neutrófilos de mamíferos y forma parte del sistema de defensa primario de la célula. En presencia de peróxido de hidrógeno, la mieloperoxidasa reacciona con diclorhidrato de bencidina para producir un precipitado diaminobencidina negro marrón. Los heterófilos de pez cebra tiñen fuertemente la actividad histoquímica de la mieloperoxidasa, lo que indica la presencia de la enzima peroxidasa dentro de la célula de los peces (Crowhurst et al, 2002). Varios estudios señalan que los polimorfonucleares neutrófilos son las células inmunes innatas más numerosas, siendo el leucocito dominante en larvas de pez cebra a los 2 días post fertilización (dpf), y en mamíferos adultos (Trede et al, 2004). En el proceso inflamatorio del pez cebra, así como en de los mamíferos, frente a una lesión o a una infección local, los primeros leucocitos que operan en los peces son macrófagos tisulares, y posiblemente mastocitos. Luego, si se liberan las señales para iniciar un proceso inflamatorio sistémico, las primeras células inflamatorias que llegan al sitio de la lesión son los neutrófilos, detectadas desde las 6 horas hasta los 4 días, un día después se encuentran monocitos que luego se diferencian en macrófagos. Las proteínas principales y los correspondientes genes implicados en la inflamación en mamíferos se han descubierto en peces: TNF- α , NF-kB, COX2, IL-1, IL-8 y otras quimiocinas. Varias vías de señalización aparecen conservadas. Por ejemplo, el LPS bacteriano induce la transcripción de IL-1, TNF- α y el iNOS en macrófagos por un mecanismo dependiente de NF-kB, y de secuencias típicas en mamíferos. Además de las quimiocinas de péptidos, los eicosanoides, en particular las lipoxinas, producidas por los macrófagos de los peces, parecen ser potentes quimioatrayentes para los leucocitos de peces. Estudios funcionales sugieren significativamente que los monocitos/macrófagos y neutrófilos poseen receptores para lectinas, complemento e inmunoglobulinas. Los macrófagos y los granulocitos neutrófilos, producen especies reactivas de oxígeno y H₂O₂ a través del estallido respiratorio, que parece implicar una NADPH oxidasa similar a la de los mamíferos. Sobre la infección, los macrófagos de los peces, como sus homólogos de mamíferos, expresan óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), dando lugar a una

INTRODUCCIÓN

producción aumentada de NO y de compuestos intermedios de nitrógeno reactivo (Hill et al, 2005)

1.2.8 Pez cebra como modelo de estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) presentan un papel dual en los seres vivos, ya que pueden producir efectos beneficiosos o perjudiciales dependiendo de los niveles en los que se presentan y las dianas en las que actúen. Generalmente, a concentraciones bajas, forman parte de sistemas de señalización celular y también están relacionados con respuestas celulares de defensa frente a agentes infecciosos. El embrión de pez cebra es un modelo animal que ha sido utilizado para el estudio de alteraciones y enfermedades relacionadas con los procesos oxidativos, ya que presenta genes y enzimas antioxidantes análogos a los sistemas de mamíferos. Por éste motivo, se ha utilizado el modelo de estrés oxidativo desarrollado en nuestro laboratorio por Boix, (2015). Que fundamenta su estudio en la inducción del estrés oxidativo (EO) mediante tert-butil hidroperóxido (tBOOH). Este compuesto tiene la capacidad de generar radicales butoxil a través de la reacción de Fenton (Fenton, 1894). Los radicales formados, favorecen la depleción intracelular de grupos tiol y de las reservas de glutatión y como consecuencia producen muerte celular. Nosotros utilizamos éste modelo para evaluar la actividad antioxidante de compuestos naturales *in vivo* con embriones de pez cebra (Boix, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar la actividad anti-inflamatoria de compuestos presentes en la dieta mediterránea, con especial atención compuestos presentes en el sofrito de tomate, mediante modelos experimentales basados en larvas de pez cebra.

2.2 Objetivos específicos

- Optimizar el modelo de actividad anti-inflamatoria basado en la medición de la migración de neutrófilos con larvas de pez cebra.
- Evaluar la actividad anti-inflamatoria, tanto de fármacos anti-inflamatorios, así como de compuestos no anti-inflamatorios conocidos y de las sustancias naturales presentes en la dieta mediterránea.
- Realizar ensayos adicionales de expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias, con los compuestos naturales que presenten mayor diferencia significativa respecto de los controles, en la migración de neutrófilos. Así como evaluar la permeabilidad de los compuestos naturales en larvas de pez cebra de 4dpf. Mediante técnicas de HPLC.
- Aplicar el ensayo de migración de neutrófilos a larvas expuestas a fracciones extraídas del sofrito del tomate, bien caracterizadas.
- Usar el modelo de estrés oxidativo en embriones de pez cebra Boix, (2015), Para evaluar el efecto protector de sustancias naturales, frente al estrés oxidativo.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño Experimental

En este apartado se describen los modelos experimentales utilizados en la realización de ésta tesis doctoral.

3.1.1 Mantenimiento de la colonia de peces adultos para la obtención de embriones y larvas juveniles

a) Mantenimiento de peces adultos

Los peces adultos se adquieren de un proveedor comercial (Pisciber BSF). Dos grupos de machos y hembras se mantienen en acuarios diferentes, con la finalidad de poner un grupo cada día, y permitir que el otro grupo descanse. Los acuarios (figura 10) tienen un sistema de filtración constante de agua estandarizada, según normativa ISO (*International Organization for Standardization*) 7346-1 y 7346-2 (ISO, 1998; 2mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.75mM NaHCO_3 ; 0.07 mM KCl). Las hembras adultas se diferencian de los machos por su abdomen abultado y plateado, los machos suelen ser más pequeños que las hembras. Los peces se mantienen en condiciones ambientales controladas como temperatura 28 ± 1 °C y un ciclo de luz constante de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los peces son alimentados dos veces al día, en la mañana comen artemia congelada comercial y por la tarde comida comercial para peces (Formula flake foods de Ocean Nutrition). Una vez por semana se controlan parámetros de calidad de agua de los acuarios como pH, nitritos y nitratos, todos con test comerciales.



Figura 10.- Acuario y filtro de pez cebra

b) Obtención de embriones de pez cebrá

El día anterior a la obtención de embriones, machos y hembras se transfieren a un acuario de reproducción (acuario con forma pirámide invertida, rejilla y separador) de 20 L de capacidad (Figura 11). De un lado se ponen las hembras y del otro el doble de peces machos. Se incorporan bolas de vidrio y plantas artificiales para estimular la puesta de los huevos. La puesta y fecundación de los huevos tiene lugar al siguiente día, una vez que se retira la separación y se encienden las luces. Bajo estas condiciones se obtienen entre 250 y 300 huevos que se recogen y limpian muy bien con agua estandarizada diluida 1:5 con agua des-ionizada para evitar el crecimiento de bacterias y protozoos. La selección de los huevos fecundados se realiza con un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168, Motic LTD). Éstos se clasifican en función del grado de desarrollo embrionario (Kimmel et al, 1995), y se emplean únicamente huevos fecundados y sanos, descartándose huevos no fecundados, con anomalías y membranas dañadas (Figura 12). Los procedimientos con el pez cebrá y embriones han sido autorizados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona, número de autorización o protocolo 7971 del Departament de Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (Procediment DAAM 7971).



Figura 11.- Acuario de reproducción.

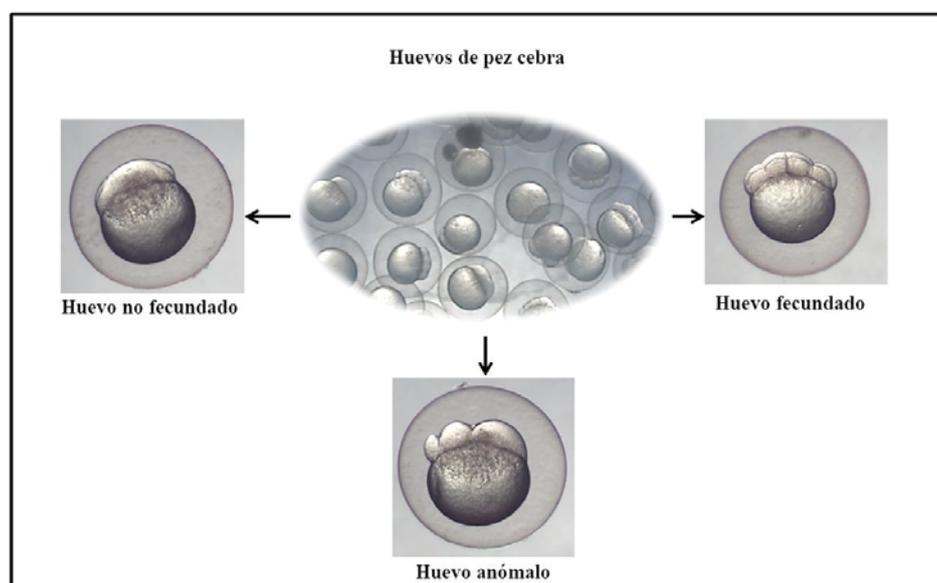


Figura 12.- Huevos de pez cebra, huevo no fecundado, anómalo y fecundado.

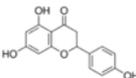
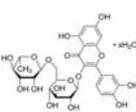
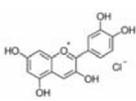
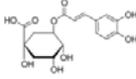
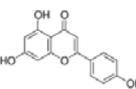
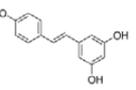
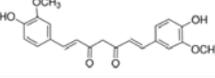
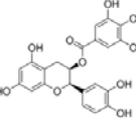
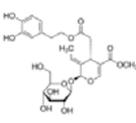
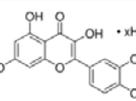
3.1.2 Exposición de embriones y larvas juveniles a los compuestos naturales y fármacos antiinflamatorios.

Todos los compuestos naturales y fármacos antiinflamatorios probados son de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones se preparan a partir de una solución madre preparada al 100% con dimetilsulfóxido (DMSO), a partir de aquí se hacen diluciones seriadas en medio Danieau's 0.3X (17.4 mM NaCl; 0.23 mM KCl; 0.12 mM MgSO₄·7H₂O; 0.18 mM Ca(NO₃)₂; 1.5 mM HEPES; pH 6.5) que no contengan más de un 1% (v/v) de DMSO para utilizar larvas juveniles (4 dpf), mientras que para utilizar embriones de 0 a 48 hpf, las soluciones sólo deben contener un 0.05% (v/v) de DMSO. Los diferentes compuestos a los que se expusieron los embriones y larvas de pez cebra están indicados en la Tabla 8. En el caso de los fármacos anti-inflamatorios se realizaron ensayos de *Range finding* para seleccionar las mejores concentraciones de trabajo, en el caso de los compuestos naturales. Se revisó bibliografía para determinar la mejor concentración de trabajo. Los compuestos naturales utilizados en el ensayo de migración de neutrófilos y en el ensayo de estrés oxidativo se muestran en las Tablas 5,6 y 7 en los que se indica el número CAS, familia y estructura química y el alimento donde se los puede encontrar.

MATERIALES Y MÉTODOS

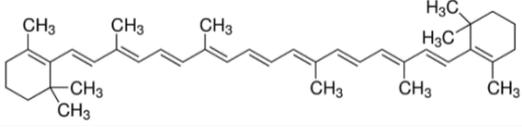
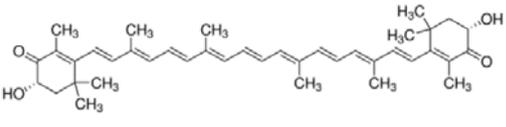
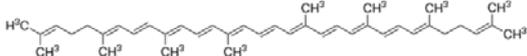
En la Tabla 8. Se muestran sustancias de control anti-inflamatorias y no anti-inflamatorias.

Tabla 5.- Polifenoles

Compuesto y Número CAS	Familia	Estructura química	Alimento
Naringenina 67604-48-2	Flavanona		Pomelo
Rutina 207671-50-9	Glucósido Flavonoide		Cítricos
Cianidina 528-58-5	Flavonoide		Moras, uvas, cerezas
Ácido Clorogénico 327-97-9	Ácido Fenólico		Café
Apigenina 520-36-5	Flavona		Perejil, apio y manzanilla
Resveratrol 501-36-0	Estilvenoide Fenol		Uvas, moras, arándanos, vino
Curcumina 458-37-7	Polifenol		Cúrcuma
ECGC Epigallocatequina galato 1257-08-5	Polifenol Flavonol		Té
Oleuropeína 32619-42-4	Polifenol		Olivas
Quercetina 849061-97-8	Flavonoide		cebollas

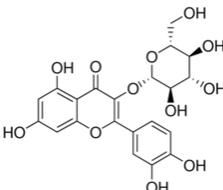
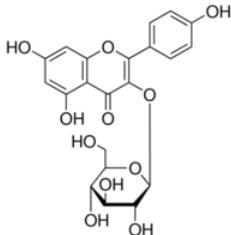
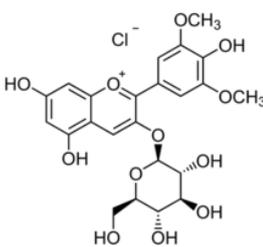
Fuente: Elaboración propia, estructuras químicas tomadas de: <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>

Tabla 6.- Carotenos

Compuesto	Familia	Estructura química	Alimento
β-Caroteno 7235-40-7	Carotenoide		Zanahoria Tomate
Astaxantina 472-61-7	Terpeno		Mariscos Micro algas
Licopeno 502-65-8	Caroteno		Tomate

Fuente: Elaboración propia, estructuras químicas tomadas de: <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>

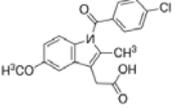
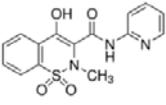
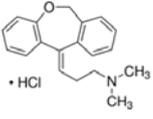
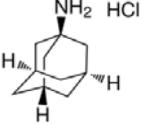
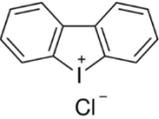
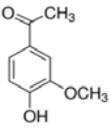
Tabla 7.- Compuestos del vino tinto

Compuesto	Número CAS	Estructura química	Alimento
Quercetin 3-β-Glucósido	482-35-9		Vino tinto
Kaempferol 3-Glucósido	480-10-4		
Malvidina 3-Glucósido	7228-78-6		

Fuente: Elaboración propia, estructuras químicas tomadas de: <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 8.- Sustancias de control, anti-inflamatorias, no anti-inflamatorias e inhibidoras de enzimas NADPH oxidasas

Compuesto	Número CAS	Tipo de sustancia	Estructura química
Indometacina	53-86-1		anti-inflamatorios
Piroxicam	36322-90-4		
Doxepina	1229-29-4		Anti-depresivo
Amantadina	665-66-7		Anti-viral
Dibenzoidolium	4673-26-1		Inhibidor de NADPH
Apocinina	498-02-2		

Fuente: Elaboración propia, estructuras químicas tomadas de: <https://www.sigmaaldrich.com/spain.html>

3.1.3 Evaluación de la actividad anti-inflamatoria

La metodología para evaluar la actividad anti-inflamatoria de compuestos naturales en larvas de pez cebra, se desarrolla en tres fases, la primera: obtención y despigmentación de las larvas, segundo: inducción de la inflamación y tercero: tinción de larvas para observar la migración de neutrófilos por análisis de imagen (Figura 16).

1) Obtención y despigmentación de larvas (Figura 13): seleccionar de 20 – 25 huevos fecundados por ensayo. Para despigmentar los embriones/larvas de 24 hpf, se cambia el medio por uno que contiene N-phenylthiourea (PTU) 0.2 mM. El PTU es usado comúnmente para inhibir la melanización o formación del pigmento negro en éstos peces. En el embrión de pez cebra, el PTU actúa específicamente inhibiendo la tirosinasa, una enzima clave en la vía melanogénica (Li et al, 2012). El efecto de inhibición del pigmento es reversible una vez que se retira la PTU del medio, por tal motivo, el medio donde se mantienen los embriones (medio Danieau's pH 7.4 más PTU 0.2 mM), se debe cambiar diariamente hasta el cuarto día, en el que se utilizarán las larvas despigmentadas.

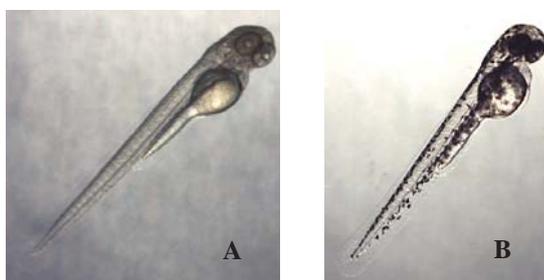


Figura 13.- Larva de pez cebra despigmentada. A) larva de pez cebra 4 dpf tratada con N-phenylthiourea 0.2 mM (PTU); B) Larva de pez cebra control. Vista con el microscopio estereoscópico (Motic SMZ-168, Motic LTD).

2) Inducción de la inflamación: Para inducir la inflamación se utilizan larvas de 4dpf despigmentadas, que se pre exponen durante una hora en la solución con la sustancia natural a estudiar, preparada en medio Danieau's al 1% de DMSO, a 28°C. posteriormente se procede a seccionar la aleta caudal para producir la lesión de las larvas de pez cebra (Figura 14). Se anestesian con Ethyl 3-aminobenzoate (Tricaína) a una concentración de 0.3 mM y finalmente se colocan las larvas en 1 mL de la

MATERIALES Y MÉTODOS

solución con la sustancia natural a estudiar (Danieau's al 1% de DMSO) más el lipolisacárido (LPS). El período de incubación total es de 8 horas a 28°C. Al finalizar el tiempo de incubación, las larvas se fijan en paraformaldehído al 4% (PFA) y se las deja toda la noche a 4°C más agitación.



Figura 14.- Corte de aleta caudal en larva de pez cebra despigmentada de 4dpf. A) Larva de pez cebra despigmentada de 4dpf B) Larva de pez cebra despigmentada de 4 dpf y corte de la aleta caudal.

3) Tinción y análisis de imagen: Para observar la migración de neutrófilos en las larvas tratadas, se deben preparar las larvas de la siguiente manera:

- Lavar las larvas de pez cebra con una solución PBS con tritón al 1% (PBST) y Tween 20 al 0.1%. Realizar dos lavados con ésta solución durante 10 minutos con agitación.
- Posteriormente adicionar 1 mL de solución del kit comercial de “Leucognost pox”, durante 5 minutos con agitación. Este kit sirve para la detección de la reacción de la peroxidasa en leucocitos. Las peroxidasas son catalasas lisosomales que transfieren hidrógeno desde un dador el 4-cloro-1-naftol a un peróxido, el peróxido de hidrógeno, oxidando al 4-cloro-1-naftol, Transformándolo en un colorante insoluble de color pardo negruzco, que se utiliza como indicador de la actividad peroxidasa. Todas las células maduras de la línea neutrofílica son claramente mieloperoxidasa positivas (MPO+). Por tanto, al realizar la tinción, se observan células teñidas en la zona de la lesión. A partir de las imágenes obtenidas, mediante un programa de ImageJ (Open source), se realiza el análisis que permite determinar la intensidad de las células mieloperoxidasas positivas.
- Finalmente, para observar la migración de los neutrófilos se preparan las muestras en portaobjetos cóncavos con una gota de glicerol, donde se introducirá una larva previamente lavada y tratada con la solución de Leucognost pox, en cada una de éstas cavidades. En cada una de éstas cavidades se retira el exceso de glicerol y se adicionan 10 µL de agarosa low gelling al 1% (A9414-5G Sigma). Dejar que la agarosa gelifique a 28°C y adicionar nuevamente una gota de agarosa. Las larvas

deben estar bien fijadas, para realizar las fotos en el microscopio (NIKON eclipse TS100) con un aumento 10X. Para analizar éstas imágenes con el programa ImageJ deben realizarse tres capturas de imagen con tres enfoques diferentes. Éste paso del procedimiento es muy importante, puesto que si las larvas no están bien fijadas, leves movimientos generan imágenes borrosas que no se pueden analizar.

- **Análisis de Imagen:** Una vez capturadas las imágenes, analizar con el programa ImageJ como se indica en la (Figura 15). El análisis de imagen consta de las siguientes fases: primero se obtiene una imagen única, a partir de tres imágenes capturadas con planos de enfoque diferentes. Luego se incrementa el contraste de la imagen, aplicando una transformación exponencial. Se aplica un “threshold” para eliminar el fondo y saturar la señal seleccionada. Finalmente se mide la intensidad integrada en la zona seleccionada.

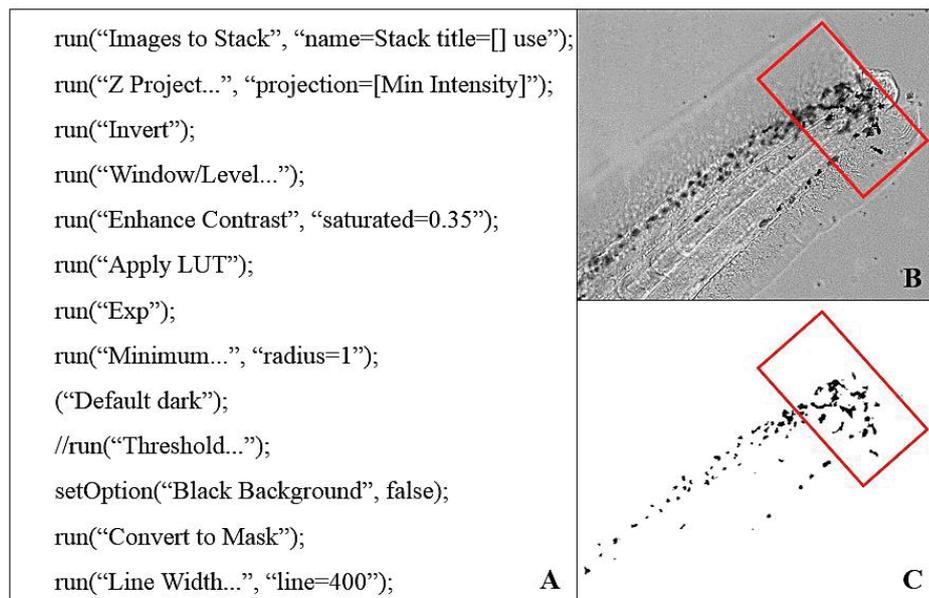


Figura 15.- A) Macro diseñada con el programa ImageJ, para analizar la intensidad de las células mieloperoxidasas positivas que migran a la zona lesionada; B) Imagen tomada con el microscopio NIKON eclipse TS100, aumento 10X; C) Imagen analizada con el programa ImageJ, la intensidad reportada es la que se encuentra dentro del área seleccionada (recuadro rojo).

MATERIALES Y MÉTODOS

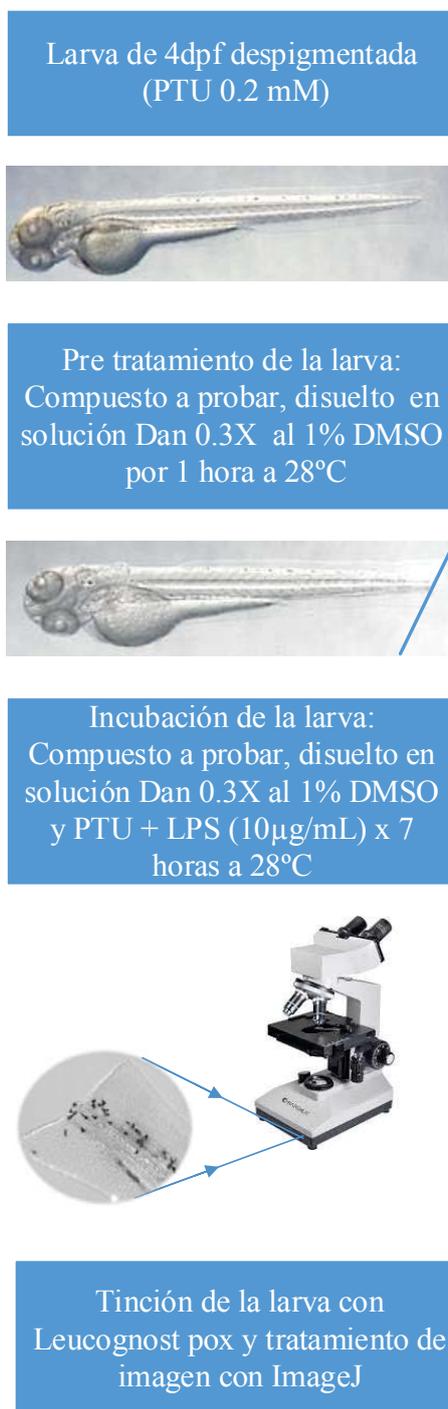


Figura 16.- Diagrama de migración de neutrófilos en larvas de pez cebra. Elaboración propia.

3.1.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos naturales con el modelo de estrés oxidativo.

Para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos naturales se utilizó el modelo desarrollado en nuestro grupo de investigación por Boix, (2015). El mismo se detalla a continuación:

- a) Realizamos una curva concentración-respuesta del inductor del estrés oxidativo tert-butil hidroperóxido (tBOOH), para lo cual se utilizan embriones de pez cebra de 0 a 48 hpf. En las primeras 24 hpf, los embriones se mantienen en medio Danieau's, posteriormente se renueva el medio con la solución de tBOOH, preparada a diferentes concentraciones desde 1 a 3.5 mM. Se utilizan 10 embriones por vial y un vial de control.
- b) Evaluación de la letalidad y de los efectos sobre el crecimiento y desarrollo embrionario. Para evaluar estos efectos de letalidad y anomalías morfológicas, se traspasan los embriones de los viales a una placa de 6 pocillos. La mayoría de embriones salen del corion espontáneamente a las 48 hpf, y los que no lo hacen se les ayuda a salir abriendo el corion con unas. La evaluación se realiza siguiendo los parámetros que se muestran en la Tabla N° 9. Para evaluar anomalías y letalidad de compuestos antioxidantes naturales, primero se exponen los embriones de 0 a 24hpf al compuesto antioxidante a una concentración única de 20 μ M, y a las 24hpf se renueva por el medio que contiene el inductor del estrés oxidativo el tBOOH (Figura 17 y 18).

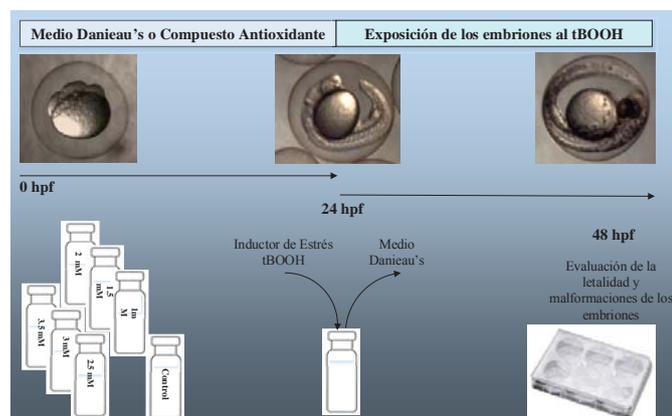


Figura 17.- Esquema de la exposición de embriones de pez cebra al inductor del estrés oxidativo tert-butil hidroperóxido tBOOH

MATERIALES Y MÉTODOS

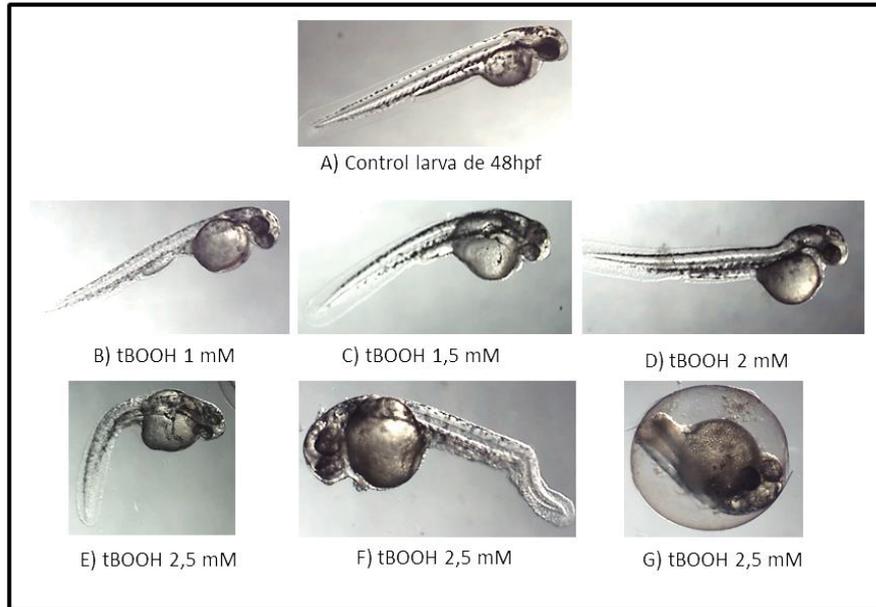


Figura 18.- Efectos del inductor del estrés oxidativo tert butil hidroperóxido (tBOOH) en embriones de pez cebra de 48 hpf. A) Embrión control, embrión bien pigmentado, sin flexiones y sin problemas cardiacos; B) Embrión expuesto a una concentración de 1 mM de tBOOH, problemas de movimiento, porque presenta problemas del saco vitelino grande, afectado a su forma cónica; C) Embrión expuesto a una concentración 1.5 mM de tBOOH, problemas de flexión de la médula espinal, saco vitelino deforme, sin forma cónica; D) Embrión expuesto a una concentración de 2 mM, problemas de flexión de la médula espinal y sin movilidad; E) Embrión expuesto a una concentración 2.5 mM de tBOOH, flexión completa de la médula espinal, saco vitelino grande, sin movilidad; F) Embrión expuesto a una concentración 3 mM de tBOOH; G) Embrión expuesto a una concentración 3.5 mM de tBOOH.

Tabla 9.- Criterios de evaluación morfológica de los embriones de pez cebra.

Parámetro de Evaluación	Anormalidad Morfológica	Desarrollo Normal
Flexión	No tiene cola, malformación de la notocorda Malformación de la médula espinal	Saco vitelino comienza a disminuir de tamaño de forma cónica
Sistema óptico	pigmentación anormal Asimetría de los ojos	Ojos pigmentados
Sistema ótico	Anormalidades de los otolitos	Vesícula ótica cercana al ojo
Cerebro	Necrosis cerebral	Formación destacada del cerebro
Corazón	Edema pericárdico y/necrosis	Latidos normales sin edemas o hemorragias
Cola	Cola corta, necrosis o hemorragia	Circulación de la sangre a la zona de la cola
Pigmentación	Ausencia de pigmentación en el cuerpo o solo en la cola	Pigmentación
Movimiento	Espasmos, movimientos circulares, ausencia de movimiento	Respuesta vigorosa frente a un estímulo de contacto

Fuente: Adaptada de Teixidó, (2013).

3.1.5 Evaluación de la expresión génica producida por la inflamación

- a) Extracción de RNA: Tras 4 días post fertilización (dpf), seleccionan de 30 a 35 larvas, en las que se induce inflamación por lesión (seccionando la aleta caudal y adicionando LPS) a cada grupo, y un control sin tratar. Todos los grupos se mantuvieron durante 8 horas de incubación antes de realizar la extracción de RNA. La extracción se realizó con el reactivo de Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de RNA (ng/ μ L), en las muestras fue medido en un NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) a 260 nm y la purificación fue determinada por el cociente de absorbancias a 260 nm versus 280 nm (A260/A280).
- b) La reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (*Reverse Transcription-Polymerase chain reaction* (RT-PCR), por sus siglas en inglés) fue desarrollada de la siguiente manera: 2 μ g of RNA mensajero (mRNA) fue transcrito inversamente usando el High Capacity (DNA complementario) cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Se utilizó la PCR en Tiempo Real para cuantificar la expresión del RNA mensajero de genes inflamatorios como la interleucina 6 y 1 (*IL-6* e *IL-1*) y el Tumor necrosis factor alfa (*TNF- α*). La expresión de los genes fue normalizada con actina para SYBR Green. Los oligonucleótidos utilizados están indicados en la Tabla 10 obtenidos de la bibliografía (Varela et al, 2012)

Tabla 10.- Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

Gen	GenBank	Secuencias Forward – reverse (5'-3')
IL-6	NC_007130.6	TCAACTTCTCCAGCGTGATG TCTTTCCTCTTTTCCTCCTG
TNF- α	NM_001024447.1	ACCAGGCCTTTTCTTCAGGT GCATGGCTCATAAGCACTTGTT
IL-1 β	NC_007121.6	TCCCCAAGTGCTGCTTATT AGGTTAAAACCGCTGTGGTCA
β -Actina	AL606585.1	CGAGCTGTCTTCCCATCCA TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG

Fuente: Adaptado de Varela 2012

- c) La PCR en tiempo real se llevó a cabo en el Step One Plus Detection System (Applied Biosystems) empleando el SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cada reacción contiene una mezcla de 7.5 μ L de cDNA, (concentración final de 2 μ g), más 0.75 μ L de cada oligonucleótido (concentración final de 100 nM), y 7.5 μ L of SYBR Green PCR Master Mix (2X). Los datos se analizaron usando el método comparativo de los ciclos threshold (Ct) ($\Delta\Delta$ Ct), en donde los niveles de actina fueron utilizados para normalizar las diferencias en las muestras. Cada muestra (n = 4-5) fue analizada por triplicado.

3.1.6 Análisis de la permeabilidad de carotenoides por HPLC DAD-UV

- a) Obtención del material para el test: se necesitan 200 embriones, los mismos que se mantienen en medio Danieau's hasta que tengan 4dpf, cambiando el medio cada día.
- b) Exposición a los carotenoides: exponer durante 12 horas a la solución de carotenoides. Previamente se preparan las soluciones individuales de carotenoides y luego se realiza una mezcla de todos los carotenoides. Se prepara 10 mL de cada solución a las siguientes concentraciones: astaxantina 10 μ M, licopeno 10 μ M y β -Caroteno 10 μ M. De los 30 mL totales, se emplean 15 mL para exponer las 200 larvas de pez cebra a 28°C, protegiéndolas de la luz. El resto de la solución de mezcla se conserva para extraer los carotenoides y analizarlo.
- c) Extracción de carotenoides en pez cebra: La extracción de carotenoides se realiza bajo luz con filtros UV, para evitar la isomerización de los compuestos. Se extraen muestras por triplicado de diferentes puestas. Para la extracción de carotenos en pez cebra se utiliza hexano con antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) y éter.
- d) Análisis de carotenoides: El análisis se basó en el procedimiento de Vallverdú et al, (2015). Se utilizó el sistema HP1100, Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania. Equipado con una bomba cuaternaria y un muestreador automático y acoplado con un detector de matrices de diodos DAD G1315B. La separación se llevó a cabo en una columna C₃₀ 250 x 4,6 mm, 5 μ m (YMC™, Water Co., Milford, MA, EE.UU.), con un caudal de 0,6 mL / min a 25°C. La fase móvil contiene: (A) metanol, (B) metil terbutil éter (MTBE) y (C) agua. Se utilizó un gradiente para separar los analitos en las siguientes condiciones: 0 min, 70% A; 10 min, 20% de A; 20 min, 6% de A; 21 min, 6% de A, 23 min, 70% de A, 33 min, 70% de A. El agua se mantuvo constante a 4% durante todo el análisis. El volumen de inyección fue de 20 μ L. Se usó un detector de Diode Array (DAD) en el intervalo de longitudes de onda de 350 a 600 nm y los cromatogramas se adquirieron a una longitud de onda de 450 nm. La identificación de los carotenoides se basó en el tiempo de retención, cromatografía con estándares, espectro de absorción UV / VIS: λ_{max} , estructura espectral fina (%III/II) e intensidad cis máxima (%AbAII) y espectro de masas. La cuantificación se realizó mediante HPLC-DAD UV, utilizando curvas de calibración externas para α -caroteno, β -caroteno y licopeno con seis niveles de concentración.

- e) También se analizó el extracto de sofrito de tomate, para determinar a qué concentración aproximada de sus componentes estaban expuestas las larvas de pez cebra en el ensayo de migración de neutrófilos. El extracto de tomate desgrasado se diluyó en 1 mL de DMSO y luego en medio Danieau's, con un factor de dilución 1:400. El análisis del extracto de sofrito de tomate se lo realizó de la misma manera que el análisis de carotenos.

3.2 Análisis estadístico

Para los ensayos de migración de neutrófilos, los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se analizaron con el programa Graph Pad 7.02 Software Inc. Con un análisis de varianza ANOVA de dos vías, test de comparación múltiple de Bonferroni, sin embargo, al tener una variabilidad intrínseca propia del modelo animal con el que trabajamos, se decidió presentar los resultados como porcentaje, donde los controles corresponden al 100% de la migración de neutrófilos. En todos los casos se consideran diferencias estadísticamente significativas a tres niveles de significancia, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Mientras que, para los ensayos de estrés oxidativo, los datos que se obtienen de la evaluación de la mortalidad y anormalidades morfológicas de los embriones tratados con tBOOH y sustancias naturales son tratados con Microsoft Excel y luego analizados con el programa Graph Pad 7.02 Software Inc. El programa genera las curvas de concentración-respuesta para letalidad y anormalidades morfológicas del inductor y de los compuestos naturales, indicando el valor de p y los valores de LC_{50} y EC_{50} . El efecto anti-oxidante o pro-oxidante está determinado por desplazamiento de la curva, un desplazamiento a la derecha indica un efecto protector del estrés oxidativo, mientras que un desplazamiento a la izquierda indica un efecto pro-oxidante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de migración de neutrófilos en larvas de pez cebra

4.1.1 Efecto de la variedad de lipopolisacáridos en la migración de neutrófilos

El uso de LPS para inducir una respuesta inflamatoria en pez cebra ha sido ampliamente probado en diferentes estudios, sin embargo, en nuestro ensayo se observó que las larvas tratadas con LPS de la variedad *Salmonella typhosa* presentan mayor diferencia significativa, ($p < 0.05$) respecto a las larvas tratadas con *Escherichia coli* y respecto del control, como se puede observar en la (Figura 19). Mientras que las larvas tratadas con LPS *Escherichia coli* no presentan diferencia significativa respecto del control. Estudios previos prueban la capacidad de los lipopolisacáridos comercialmente disponibles para inducir la reacción inmune innata en embriones de pez cebra.

Sin embargo, las diferencias que presentan los diferentes tipos de LPS utilizados en el ensayo de migración de neutrófilos, se deben a diferencias estructurales del LPS (Watzke et al, 2007).

(Rietschel et al, 1984) demostró que el LPS asilado de *Escherichia* y *Salmonella* presentan diferentes estructuras, comprobando variaciones en las cadenas de polisacáridos y también en el lípido A, considerado de gran importancia para la unión del LPS a sus receptores, entre los cuales se encuentra TLR4. Además, (Netea et al., 2001) determinaron las diferencias en el efecto endotóxico en ratones de LPS aislados de distintas enterobacterias, concluyendo que las diferencias entre LPS de *E. coli* y *S. typhimurium* radica en que el LPS de *E. coli* necesita TNF y linfotoxina (LT) como mecanismos centrales en el efecto de endotoxemia letal. Mientras que en el caso de LPS de *S. typhimurium* TNF y LT son parte de sus mecanismos de acción endotóxica, pero además éste efecto puede ser mediado a través de mecanismos que implican una variedad de citosinas proinflamatorias, entre las que se incluyen la interleuquina IL-1 e interferón IFN γ . Estos autores también determinaron que los dos tipos de LPS producen similares niveles de activación de TLR4.

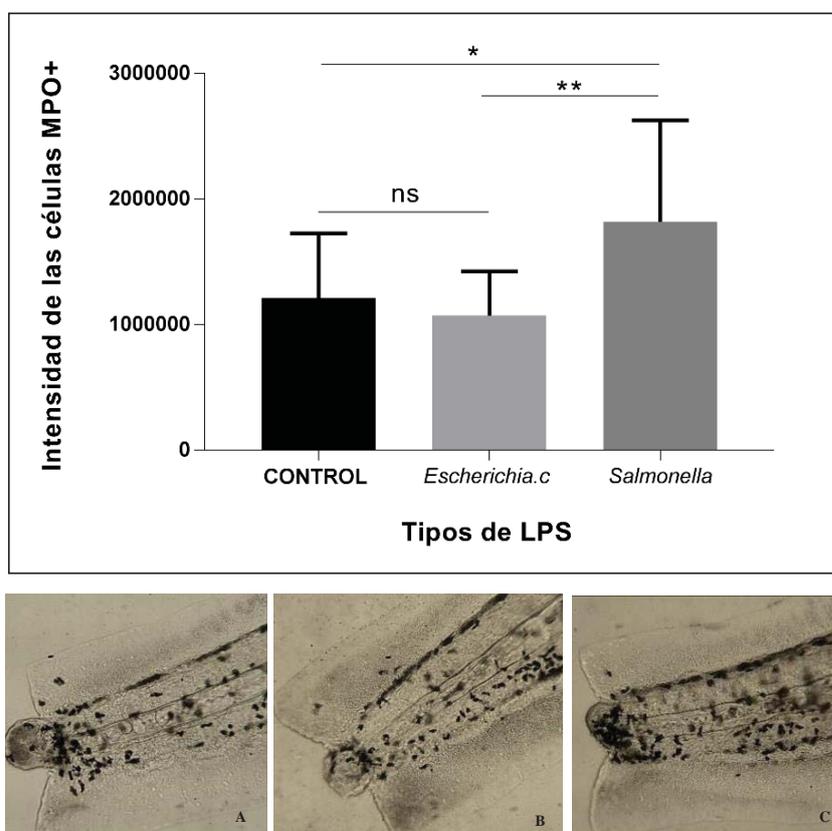


Figura 19.- Migración de neutrófilos en larvas expuestas a diferentes variedades de lipopolisacáridos (LPS). **A)** Imagen de larva control (sin LPS); **B)** Imagen de larva tratada con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS Ch) y **C)** Imagen de larva tratada con lipopolisacárido de *Salmonella Typhosa* (LPS S). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

4.1.2 Cinética de migración de neutrófilos

La quimiotaxis neutrofilica hacia los sitios de la inflamación, es esencial durante las respuestas inmunes normales a la lesión, a la infección del tejido y a las respuestas inmunes patológicas que conducen a la inflamación crónica. Los neutrófilos de pez cebra pueden identificarse mediante la expresión de la mieloperoxidasa (MPO) de neutrófilos, proteína específica, denominada también peroxidasa mioide específica. A partir del tercer día post fertilización (3 dpf), la expresión de la mieloperoxidasa (zebrafish zMPO) también puede observarse en las células sanguíneas circulantes.

Por lo tanto el reclutamiento y migración de éstos leucocitos en respuesta a una lesión tisular en larvas de pez cebra, es un indicador de una inflamación inducida (Mathias et al., 2009)

Con el fin de estandarizar nuestro test de migración de neutrófilos en larvas de pez cebra de 4 dpf, se diseñó un modelo cinético para determinar el número de horas necesario para observar la mayor cantidad de células mieloperoxidasa positivas migradas. En la Figura 20, se muestran diferencias significativas entre la intensidad de MPO+ de las larvas tratadas respecto de los controles a las 7, 8 y 9 horas de inducida la inflamación. Se concluyó que, para nuestro modelo, al igual que en estudios previos, 7 horas son las adecuadas para determinar la intensidad de células MPO+ en la zona de la lesión, De hecho, el número total de horas de tratamiento es de 8 horas, si incluimos la hora de pre-exposición con el producto a ensayar.

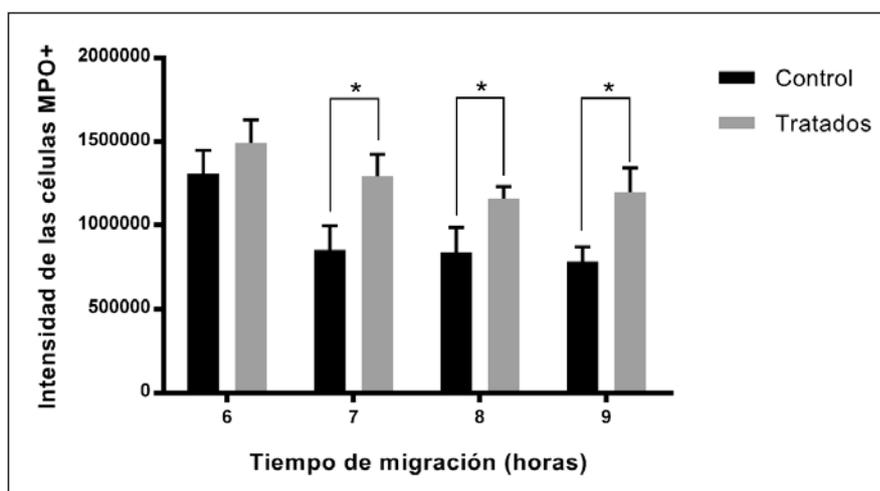


Figura 20.- Migración de neutrófilos a diferentes tiempos de incubación con LPS de salmonella typhosa. * $p < 0.05$

4.1.3 Migración de neutrófilos expuestos a controles anti-inflamatorios, no anti-inflamatorios e inhibidores de enzimas NADPH oxidasas

En la Figura 21, se pueden observar los resultados obtenidos al exponer larvas de pez cebra a diferentes compuestos bien conocidos por su efecto anti-inflamatorio, como la indometacina y el piroxicam. También se ha ensayado con productos no anti-inflamatorios, tales como la doxepina y la amantadina, y con productos inhibidores de enzimas NADPH oxidasas como el dibenzoidolium (DPI) y la apocinina. En la misma figura se compara cada grupo tratado con su respectivo grupo control.

La variabilidad propia del modelo y para su mejor comprensión presentamos los resultados en porcentaje como se muestran en la Figura 22 y 23, en la 22 se muestran las diferencias significativas entre los grupos tratados y controles, mientras que en la 23 se compara entre grupos tratados y se muestran las diferencias significativas obtenidas entre ellas.

Puesto que es fundamental determinar con precisión el porcentaje de inhibición con respecto al control, hemos mejorado la determinación de la migración de neutrófilos, mediante la aplicación del programa ImageJ (Open Source). Ésta herramienta nos permite una cuantificación precisa que nos garantiza la identificación específica de los neutrófilos que han migrado a la zona lesionada superior al modelo de Cordero et al, (2013).

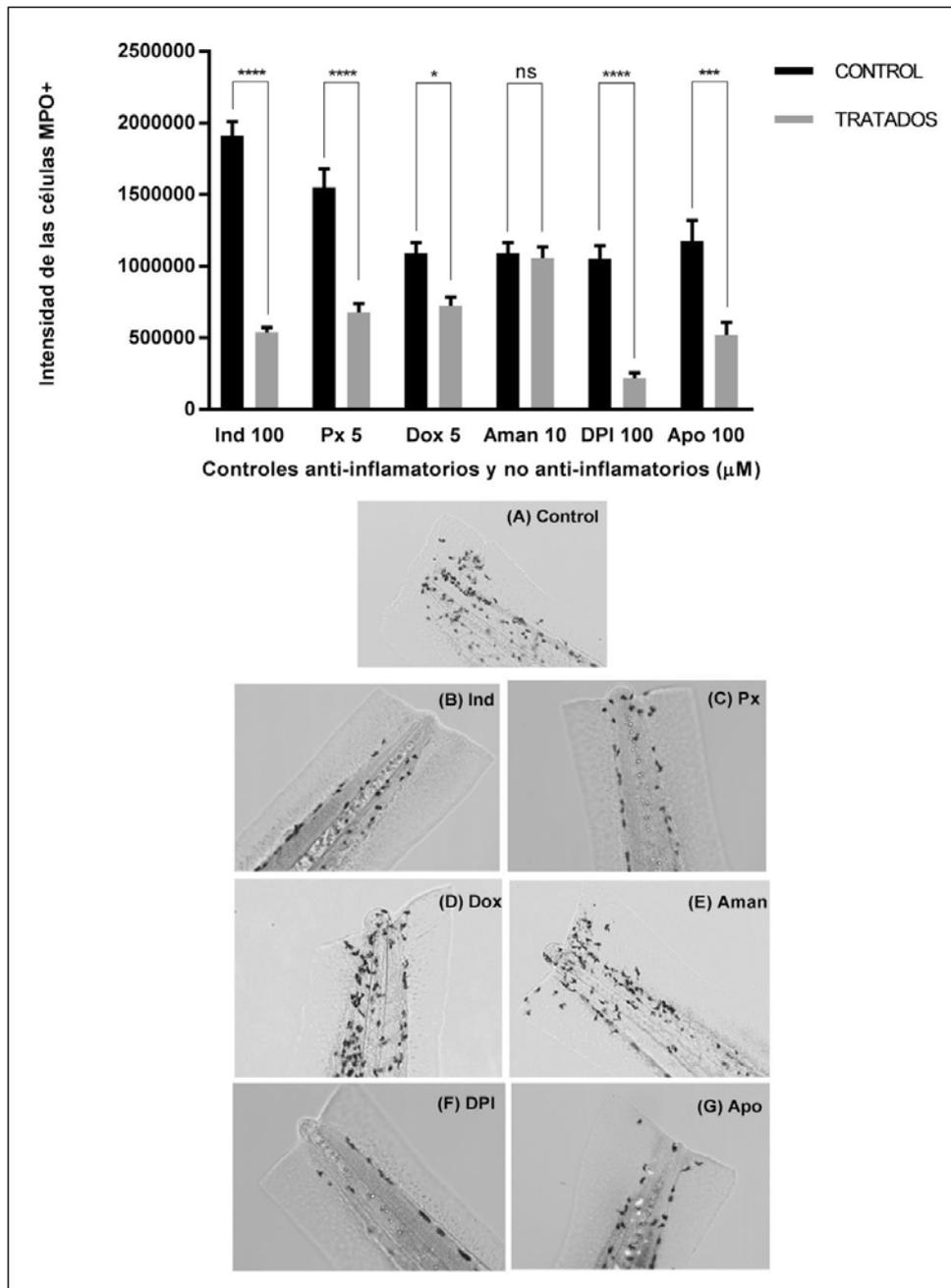


Figura 21.- Gráfica de migración de neutrófilos de larvas tratadas con compuestos anti-inflamatorios (A) Larva control, (B) Indometacina 100µM (Ind), (C) Piroxicam 5 µM (Px), no anti-inflamatorios como (D) Doxepina 5 µM (Dox) y la (E) Amantadina 10 µM (Aman), y a sustancias inhibidores de NADPH oxidasas (F) Dibenzodolium 100 µM (DPI) y (G) Apocinina 100 µM (Apo), respecto de su respectivo control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

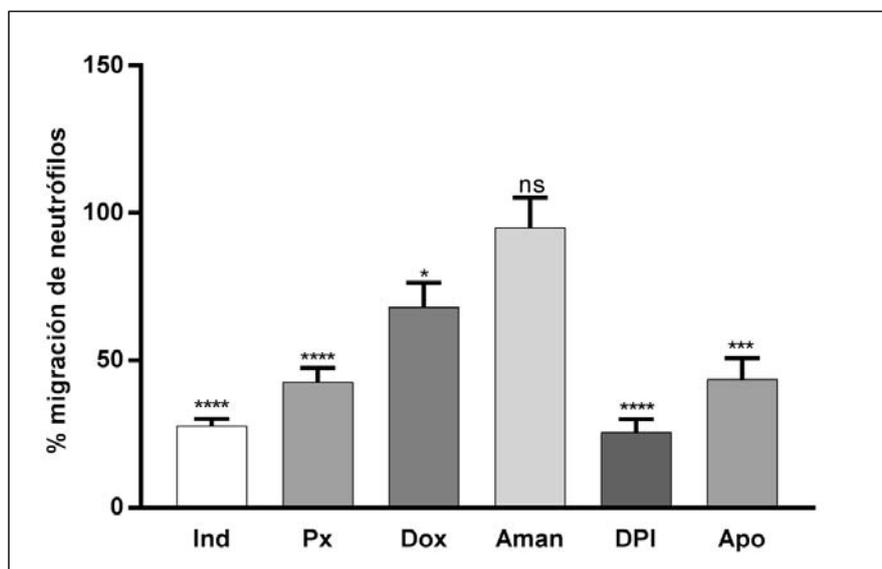


Figura 22.- Gráfica de migración de neutrófilos, expresada en porcentaje, respecto a su respectivo control, larvas expuestas a diferentes sustancias anti-inflamatorias como: la indometacina 100 μ M (Ind) 27.7%, Piroxicam 5 μ M (Px) 42.5%, larvas expuestas a compuestos no anti-inflamatorios como la doxepina 5 μ M (Dox) 66%, la amantadina 10 μ M (Aman) 95.4% y compuestos inhibidores de enzimas NADPH oxidasas como el dibenzodolium 100 μ M (DPI) 25.5% y Apocinina 100 μ M (Apo) 43.5%.

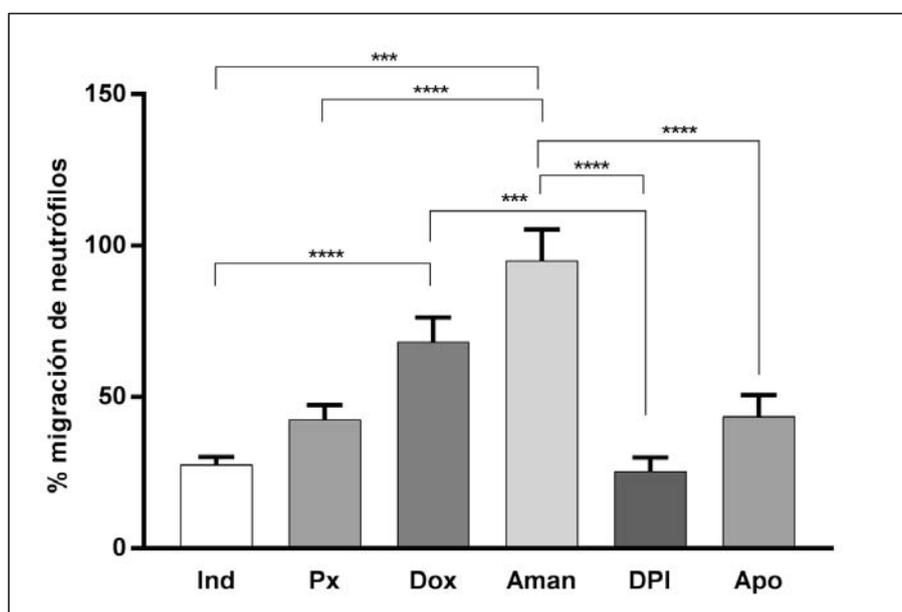


Figura 23.- Gráfica de migración de neutrófilos, comparando la migración entre los grupos tratados para establecer diferencias entre ellos, larvas expuestas a diferentes fármacos.

- **Efecto de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) en la migración de neutrófilos en larvas de pez cebra**

Los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) inhiben, ambas isoformas de la enzima ciclo oxigenasa (COX) (Rao et al, 2008). La isoforma COX-1 se expresa constantemente en la mayoría de tejidos, mientras que la COX-2 puede ser inducida por varios estímulos como citoquinas, prostaglandinas y productos bacterianos como el lipopolisacárido que contribuyen al desarrollo de edema, fiebre y enrojecimiento (Batlouni, 2010; Cryer et al, 1998).

Se han llevado a cabo diferentes estudios sobre la indometacina, en referencia a su capacidad de ser absorbida rápidamente desde el tracto gastrointestinal. La biodisponibilidad, tras la administración oral puede alcanzar el 100%, con concentraciones plasmáticas máximas entre las 0.9 ± 0.4 horas y 1.5 ± 0.8 horas tras administración única en condiciones de ayuno (Lucas, 2016).

Otros autores que han utilizado indometacina con modelos animales como el de pez cebra, mencionan la facilidad con la que los compuestos diluidos en estos medios son absorbidos por el pez a través de la piel y las branquias en las etapas embrionarias, y a través del sistema digestivo durante etapas larvares posteriores (Rubinstein, 2006).

Nuestros resultados de migración de neutrófilos en larvas de pez cebra, expuestas a indometacina, muestran un 27.7% de migración de neutrófilos respecto al control, mostrando su eficacia como anti-inflamatorio. En el caso del pez cebra en referencia al mecanismo de acción (fármaco estudiado ampliamente en modelos de mamíferos y humanos) podría deberse a un bloqueo de la vía de la COX.

En el caso del piroxicam, el porcentaje de migración de neutrófilos es de 42.5%. Cordero et al, (2013) utilizaron la misma sustancia, a una concentración de $100\mu\text{M}$. Al ensayar las concentraciones anteriormente citadas por éste autor se producía un 100% de letalidad. En nuestro caso la concentración máxima tolerable en nuestro ensayo fue de $5\mu\text{M}$.

- **Efecto de fármacos no anti-inflamatorios en la migración de neutrófilos en larvas de pez cebra**

La doxepina es un fármaco antidepresivo, al igual que otros antidepresivos, la doxepina tiene efectos anti-inflamatorios, algunos estudios donde se ha utilizado doxepina para tratar la dermatitis atópica lo confirman (Drake et al, 1994). Otros estudios sugieren que puede actuar como protector del estrés oxidativo (Ray et al, 2000). Sin embargo, como se puede observar en la figura 22, la migración de neutrófilos, en larvas de pez cebra tratadas con doxepina fue de 66%. Y aunque existe diferencia significativa, ésta no es tan representativa como la observada con los fármacos anti-inflamatorios ($p < 0.05$ vs. $p < 0.001$; Figura 21).

La amantadina por el contrario pertenece a un grupo de fármacos anti-virales, generalmente utilizada para tratar y prevenir la gripe tipo A. Se ha utilizado desde mediados de los años sesenta (Stiver, 2003).

En la Figura 22 se observa que las larvas tratadas con amantadina no presentan diferencia significativa respecto de su control, la migración de neutrófilos presentó un 95.4%. El resultado es el esperado, puesto que al no ser anti-inflamatorio no tiene efecto sobre la migración de neutrófilos.

Cordero et al, (2013) utilizan fármacos no anti-inflamatorios como la amantadina a concentraciones de 200 μ M, y no observan un efecto significativo en la migración de neutrófilos en pez cebra.

- **Efecto de compuestos inhibidores de la enzima NADPH oxidasa**

El DPI se ha utilizado en varios estudios, como inhibidor de la enzima NADPH oxidasa. Las enzimas NADPH oxidasas, están dedicadas exclusivamente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Durante la fagocitosis, los fagocitos activan las NADPH oxidasas para reducir el oxígeno molecular a anión superóxido, un precursor de especies reactivas de oxígeno (ROS) microbicida, junto con la oxidación de NADPH. El anión superóxido O_2^- generado a través de la reacción de NADPH oxidasa se convierte rápidamente en el interior de la célula en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por dismutación, en una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD).

Tras la lesión, las células en el margen de la herida de las larvas de pez cebra producen rápidamente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que sirve como una señal paracrina temprana a los leucocitos. Además estudios recientes asocian la producción de (H_2O_2) con la activación de la ruta inflamatoria NF-kB (Pase et al, 2012; Sumimoto, 2008; Wu et al, 2017; Vignais et al, 2002)

El ensayo con difenileneiodonio (DPI) mostró una inhibición significativa ($p < 0.0001$) de la migración de neutrófilos de 25.5% respecto a la migración de los controles.

También se utilizó la apocinina, un compuesto fenólico, aislado de la planta medicinal *Picrorhiza kurroa*, que también mostró inhibición significativa, pero menor que el DPI. La apocinina ha sido ampliamente utilizada para bloquear la actividad de la NADPH oxidasa in vitro. Algunos autores sugieren que la apocinina actuaría como antioxidante y no como inhibidor de la NADPH oxidasa en células no fagocíticas (Rabêlo et al, 2010; Dusing et al, 2005). En nuestro caso la apocinina presentó una migración de 43.5% respecto a los controles.

4.1.4 Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra, expuestas a compuestos fenólicos del vino tinto

Los flavonoides son compuestos fenólicos que forman parte de la dieta humana, se pueden encontrar en vegetales, frutas y en bebidas como el vino y la cerveza. En la actualidad se han identificado alrededor de 5000 flavonoides diferentes. El valor medio de ingesta de flavonoides es de 23mg/día. Diversos estudios muestran sus efectos anti-inflamatorios y el papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras patologías (Martínez et al, 2002)

En el caso del vino tinto, los flavonoides constituyen un grupo importante de compuestos polifenólicos que están directamente asociados con las propiedades organolépticas y promotoras de la salud de algunos compuestos del vino tinto (Magrone et al, 2010). El efecto beneficioso del vino tinto se ha atribuido a la presencia de compuestos polifenólicos incluyendo antocianinas, el vino tinto puede contener compuestos fenólicos flavonoides como la quercetina, quercetina 3- β -glucósido, kaempferol 3- β -glucósido y también pueden ser no flavonoides como la malvidina 3- β -glucósido que es una antocianina (Fernández et al, 2017). Un estudio reciente sugiere que varios flavonoides reducen la expresión del TNF- α y de la óxido nítrico sintetasa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

inducible (iNOS), probablemente porque interfiere con la vía NF- κ B, reduciendo así la liberación de citoquinas proinflamatorias (Magrone et al, 2009)

La quercetina es uno de los flavonoides más abundantes en bebidas como el vino tinto, varios estudios sugieren que la quercetina inhibe las enzimas inflamatorias ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa disminuyendo así los mediadores inflamatorios tales como prostaglandinas y leucotrienos (Anand et al, 2016).

Vallverdú et al, (2015) identificaron polifenoles en embriones de pez cebra previamente expuestos a un extracto de vino tinto. Teniendo en cuenta los resultados de éste trabajo, hemos utilizado algunos de estos compuestos para determinar su efecto sobre la migración de neutrófilos.

Los compuestos ensayados son: la quercetina 20 μ M presenta una migración de neutrófilos de 63%, quercetina 3- β Glucósido 20 μ M 51.6%, Kaempferol 3- β Glucósido 10 μ M 48.8% y Malvidina 3- β Glucósido 20 μ M 59.9%, las concentraciones de trabajo de éstos compuestos naturales ya estaban previamente determinadas (Figura 24).

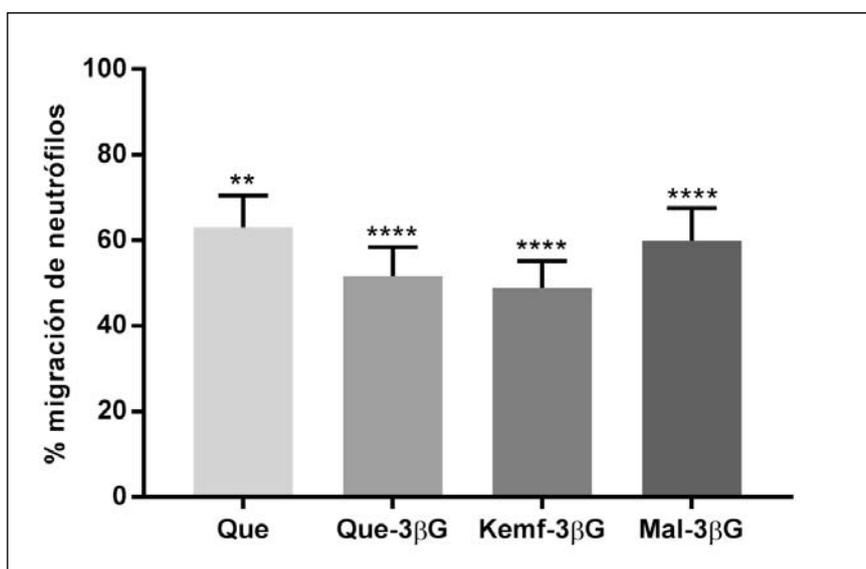


Figura 24.- Porcentaje de migración de neutrófilos en larvas expuestas a compuestos fenólicos del vino tinto, Quercetina 20 μ M (Que) 63%, Quercetina 3- β Glucósido 20 μ M (Que-3 β G) 51.6%, Kaempferol 3- β Glucósido 10 μ M (Kemf-3 β G) 48.8% y Malvidina 3- β Glucósido 20 μ M (Mal-3 β G) 59.9%, en ésta gráfica se compara cada grupo tratado respecto del control que representa el 100% de la migración.

4.1.5 Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a compuestos fenólicos del sofrito de tomate

Una parte significativa del trabajo de ésta tesis doctoral ha sido valorar los efectos anti-inflamatorios de los componentes del sofrito de tomate y del extracto del sofrito de tomate parte del proyecto conjunto con el grupo “Polifenoles naturales y otros componentes bioactivos presentes en los alimentos”. Se han probado algunos flavonoides que se muestran en la Figura 25, como: Naringenina 20 μM que reportó un 59.1% de migración de neutrófilos, la oleuropeína 150 μM con un 73.7%, (en el caso de la oleuropeína concretamente, se probó a concentraciones de 15 μM , al no se observaba ningún efecto significativo se decidió probar a concentraciones más altas descritas en bibliografía), la rutina 20 μM mostró 55.2%, la cianidina 20 μM con 37.5%, el ácido clorogénico 20 μM con 33.3%, la apigenina 20 μM con 48.6%.

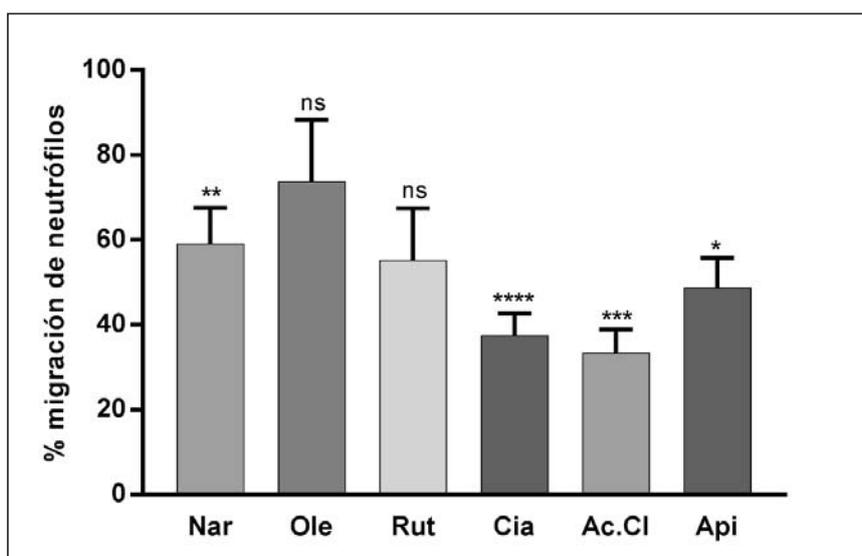


Figura 25.- Porcentaje de migración de neutrófilos en larvas expuestas a polifenoles del sofrito de tomate: Naringenina 20 μM (Nar) 59.1%, Oleuropeína 150 μM (Ole) 73.7%, Rutina 20 μM (Ru) 55.2%, Cianidina 20 μM (Cia) 37.5%, Ácido Clorogénico 20 μM (Ac.Cl) 33.3% y Apigenina 20 μM (Api) 48.6%. En ésta gráfica se compara cada grupo tratado respecto del control que representa el 100% de la migración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Maroon et al, (2010) sugieren que muchos compuestos naturales pueden actuar inhibiendo las vías inflamatorias de manera similar a los AINE. Además de la vía COX, muchos compuestos naturales actúan para inhibir las vías inflamatorias del factor nuclear- κ B (NF- κ B).

La naringenina pertenece a la clase de flavonoides llamados flavanonas. Estos compuestos son abundantes en cítricos como pomelos y naranjas, y también en tomates. Estudios realizados por Patel et al, (2014), asocian la naringenina con efectos beneficiosos en la osteoporosis, el cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Wang et al, (2014), estudiaron el efecto anti-inflamatorio de la apigenina en la lesión pulmonar aguda (ALI) inducida por lipopolisacárido (LPS), al inhibir la vía COX-2 y NF- κ B, en ratones. Sus resultados sugieren que el mecanismo de protección de la apigenina puede atribuirse en parte a la disminución de la producción de citoquinas pro inflamatorias a través de la inhibición de COX-2 y NF- κ B. El NF- κ B forma parte de una familia de factores de transcripción, que actúan como reguladores de mediadores pro inflamatorios. Se conoce que el NF- κ B es la clave de las vías de señalización de las expresiones de las citoquinas pro inflamatorias inducidas por LPS. El autor anteriormente citado sugirió que la apigenina inhiba la producción de TNF- α e IL-6 al interferir con la activación de NF- κ B. Éstos resultados, muestran que la apigenina regula negativamente NF- κ B sobre la lesión pulmonar aguda (ALI) inducida por LPS. También demostró en este estudio, que la apigenina inhibe el incremento de la actividad COX-2 inducida por LPS. Por lo tanto, sus resultados apoyan que la apigenina es beneficiosa para el tratamiento de la lesión pulmonar aguda (ALI).

La oleuropeína es uno de los compuestos fenólicos predominantes en el aceite de oliva, principal componente de la dieta mediterránea, proviene de la oliva (*Olea europaea*). Su alto contenido fenólico le confiere propiedades farmacológicas al aceite de oliva, al olivo y a sus hojas (Haris, 2010). Sin embargo, al utilizar éste compuesto con larvas de pez cebra no observamos diferencias significativas en la migración de neutrófilos respecto del control.

El ácido clorogénico es un compuesto fenólico, muy abundante en el café, representa el 98% del contenido fenólico total (Martini et al, 2016). El ácido clorogénico además de estar en el café crudo, también está en muchos tipos de semillas y frutas como las semillas de girasol y arándanos. También se ha detectado un menor contenido de ácido

clorogénico en las patatas, los tomates, las manzanas, las peras y las berenjenas, pero el consumo de estas fuentes representa de 5 al 10% respecto al ácido clorogénico procedente de la fuente de café. Tajik et al, (2017) menciona que entre las propiedades biológicas del ácido clorogénico además de sus efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, el ácido clorogénico es capaz de ejercer funciones esenciales en la regulación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos, así como en los trastornos relacionados con diabetes, enfermedad cardiovascular, obesidad, y cáncer.

La rutina es otro flavonoide polifenólico natural encontrado en semillas de trigo sarraceno, cítricos, verduras y bebidas como el vino y el té. Se le atribuyen una amplia gama de actividades biológicas y efectos farmacológicos, entre ellos como anti-inflamatorios. Los efectos beneficiosos de la rutina se deben a su alta actividad de eliminación de radicales y capacidad antioxidante (Chung et al, 2014)

Shen et al, (2002) estudiaron la actividad in vitro e in vivo de flavonoides como rutina, la wogonina y la quercetina sobre la producción de NO y prostaglandina E₂ inducida por lipopolisacáridos en macrófagos primarios peritoneales y ratones. Sus resultados in vitro mostraron que la quercetina y la wogonina eran capaces de inhibir la producción de NO y prostaglandina E₂ previamente inducidos con lipopolisacáridos, pero no observaron inhibición de los macrófagos tratados con rutina. Los resultados in vivo demostraron que la rutina, la quercetina y la wogonina suprimieron el NO inducido por lipopolisacáridos, pero no la producción de prostaglandina E₂.

Anteriormente Aherne et al, (2000). Realizaron estudios del efecto protector de flavonoides como la quercetina y la rutina en cultivos celulares tratados previamente con tert butil hidroperóxido y menadiona, sugiere que la rutina podía ser ineficaz.

Resultados similares a los obtenidos por otros autores lo vemos en nuestros ensayos, donde se observa que las larvas tratadas con rutina no presentan diferencias significativas respecto de los controles.

La cianidina es un flavonoide que pertenece a las antocianinas, las antocianinas son un pigmento hidrosoluble presente en muchas frutas y verduras.

Estudios realizados por Tsuda, (1996) demostraron que las antocianinas tienen actividad antioxidante y capacidad de eliminar el radical hidroxilo y superóxido in vitro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios realizados por Tsuda, (2002) demostraron que la administración oral a ratas de cianidina-3-glucósido (C3G) atenúa la respuesta inflamatoria a través de una disminución de la expresión iNOS y una supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias.

En nuestro caso la cianidina mostró una migración de neutrófilos de 37.5%. La inhibición superior al 60% indica que tiene un potencial anti-inflamatorio significativo respecto a otros flavonoides probados.

Investigaciones recientes Ambriz et al, (2016), explican el papel protector de flavonoides y compuestos lipófilos de la planta *Jatropha platyphylla* sobre la supresión de la inflamación inducida por lipopolisacáridos (LPS) en macrófagos. La unión de LPS al receptor TLR4 desencadena la generación de ROS a partir de NADPH oxidasa y mitocondrias. El estado REDOX mediada por ROS activa la translocación nuclear de NF- κ B. La activación de NF- κ B es dependiente de ROS y media la expresión de iNOS, así como la ciclooxigenasas. Tanto las actividades de COX-1 como COX-2 median la producción de prostaglandinas. Los extractos de *Jatropha platyphylla* (mezcla de flavonoides y compuestos lipófilos) ejercen propiedades anti-inflamatorias reduciendo la generación de ROS y NO en células RAF 264.7 de macrófagos inducidas por LPS. Además, los extractos de *J. platyphylla* inhiben tanto las actividades COX-1 como COX-2 (Ambriz-López et al, 2016).

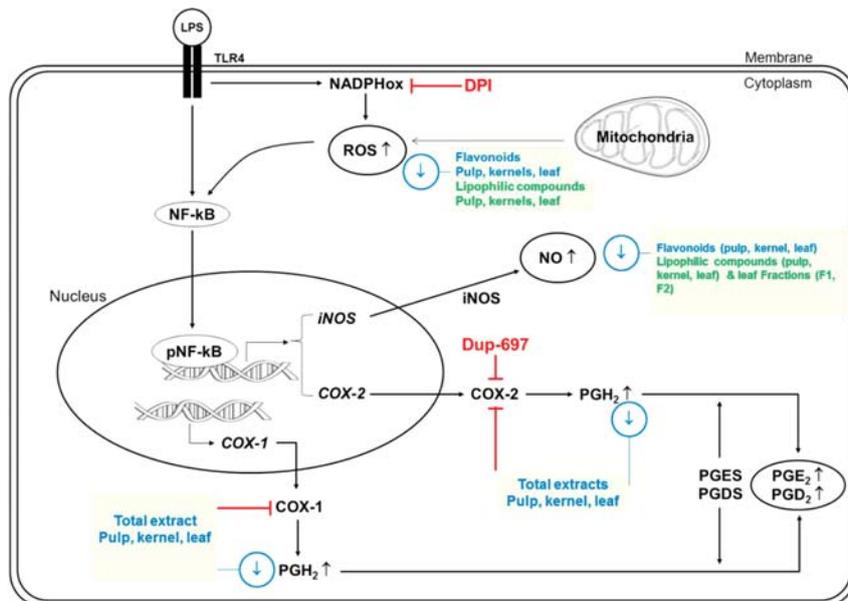


Figura 26.- Modelo hipotético que muestra el posible papel anti-inflamatorio de los flavonoides del extracto de *J.platyphylla* en la ruta del TLR. Figura extraída de Ambriz et al, (2016). La flecha negra indica un aumento en los mediadores inflamatorios cuando los macrófagos son estimulados con LPS. Las flechas azules de la misma figura indican la reducción de los niveles de ROS, NO y de prostaglandina por los flavonoides y el símbolo rojo en forma de T, indica la inhibición de la actividad proteica

4.1.6 Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a carotenoides del sofrito de tomate

Diferentes estudios describen diversos componentes bioactivos presentes en la dieta mediterránea, provenientes de productos vegetales, verduras, frutas, legumbres, aceite de oliva virgen y vino tinto, típico de este tipo de alimentación (Urquiaga et al, 2017). Otro producto de alto consumo es el sofrito de tomate, el mismo que se elabora con tomate (*Lycopersicon esculentum*) que sintetiza los pigmentos carotenoides bioactivos como el licopeno y β -caroteno. Los fuertes efectos antioxidantes y otros efectos beneficiosos *in vitro* e *in vivo* de los carotenos están asociados con su capacidad para actuar como captadores de radicales libres (Zhang et al, 2017).

Hemos ensayado los carotenoides más abundantes del sofrito del tomate para determinar el efecto sobre la migración de neutrófilos. Los resultados de éste ensayo se muestran en porcentajes de migración respecto del grupo control en la Figura 27: licopeno 20 μ M 55.4%, β -caroteno 25 μ M 59.6% y la astaxantina 20 μ M 44.6%. Las concentraciones para éste estudio se determinaron por revisión bibliográfica.

Los carotenoides son pigmentos responsables del color de frutos, flores y hojas. Por ejemplo los vegetales verdes contienen altas cantidades de carotenos y xantofilas; el licopeno es lipofílico de color rojo y está presente en tomates maduros, el color naranja de la zanahorias es causada por β -caroteno y el color rosa / rojo se debe a la astaxantina (Milani et al, 2016).

La mayor parte de investigaciones sobre los efectos saludables de la ingesta de tomate y productos de tomate se concentra en el licopeno (Heber et al, 2002). Varios estudios hablan de sus beneficios para la salud, sobretodo en la prevención del cáncer y problemas cardiovasculares. Además, el licopeno es considerado un componente natural carotenoides que puede prevenir enfermedades inflamatorias crónicas. Varios estudios han demostrado que el licopeno es estable en condiciones de tratamiento térmico y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

almacenamiento. El creciente número de estudios en modelos animales de inflamación y aterosclerosis sugieren que el licopeno del tomate puede actuar como un agente anti-inflamatorio (Palozza, et al 2010).

Entre los modelos animales utilizados, está el modelo de edema inducido por carragenano en pata de rata, para estudiar los efectos del licopeno en la inflamación local. Sus resultados sugieren que la administración de licopeno era útil en la modulación farmacológica de eventos inflamatorios. Puesto que el licopeno inhibió significativamente la formación de edema de la pata en dos dosis (25 y 50 mg / kg) (Bignotto et al, 2009)

Bai et al, (2005) examinaron la función reguladora in vitro e in vivo del β -caroteno sobre la producción de óxido nítrico (NO) y PGE₂, así como la expresión de NO, sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2, TNF- α e IL-1 β . Donde el β -caroteno inhibió la expresión y la producción de estos mediadores inflamatorios, tanto en células RAW264.7 estimuladas con LPS como en macrófagos primarios de manera dosis dependiente, así como en ratones administrados con LPS.

Estudios realizados anteriormente por Lee et al, (2003) demostraron que células RAW264.7 estimuladas con LPS y tratadas con astaxantina, inhibe la producción in vitro de NO y PGE₂, así como la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α y IL-1 β . Además, suprimió la activación de NF- κ B e iNOS. Estos resultados confirman que la astaxantina previene los procesos inflamatorios bloqueando la expresión de los genes proinflamatorios y consecuentemente suprimen la activación de NF- κ B.

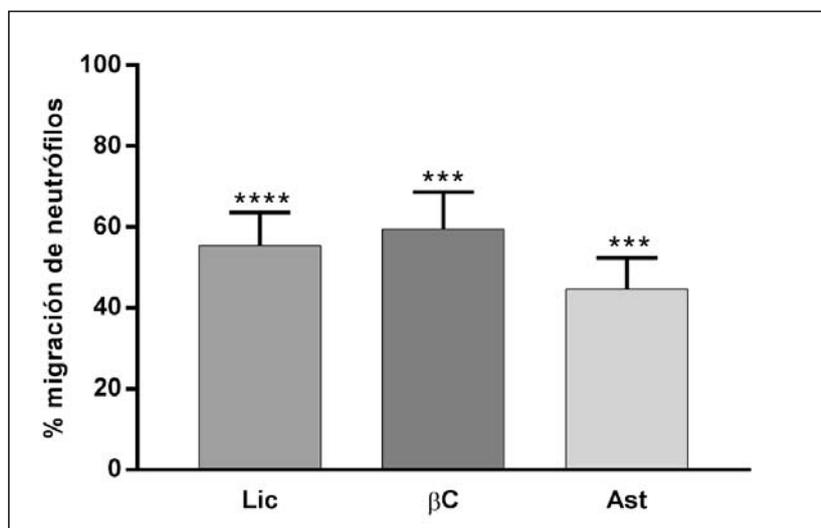


Figura 27.- Porcentaje de migración de neutrófilos en larvas expuestas a compuestos carotenoides: Licopeno 20 μM (Lic) 55.4%, Beta-Caroteno 25 μM (β C) 59.6% y Astaxantina 20 μM (Ast) 44.6%. En ésta gráfica se compara cada grupo tratado respecto del control que representa el 100% de la migración.

4.1.7 Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a flavonoides

Se ha analizado el efecto de flavonoides conocidos por sus efectos beneficiosos para la salud, tales como: resveratrol 20 μM 67.9% de migración de neutrófilos, (-) epigallocatequina galato 20 μM (EGCG) con 78.6% y curcumina 20 μM 54.50% (Figura 28).

La curcumina es un pigmento amarillo de origen natural derivado de la cúrcuma (*Curcuma longa*), planta de la familia del jengibre. Se ha utilizado tradicionalmente como una colora y condimento en productos alimenticios. La curcumina se ha utilizado durante mucho tiempo tanto en medicina ayurvédica (medicina tradicional originaria de la india), como en medicina china, como agente antiinflamatorio, para tratar trastornos digestivos y para mejorar la cicatrización de heridas (Maroon et al., 2010).

Chen et al, (2017) realizaron un estudio del efecto terapéutico de la tetrametilpirazina combinada con resveratrol y curcumina en la inflamación crónica, en un modelo de rata con artritis inducida por colágeno. Sus resultados mostraron que esta formulación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

podría proporcionar un nuevo tratamiento potente para la inflamación aguda y crónica sin efectos secundarios como la lesión gástrica que se produce en los AINE.

Los componentes del té verde contienen compuestos polifenólicos llamados catequinas, la epigalocatequina-3 galato (EGCG), es la catequina más abundante en el té verde. Sin embargo, estudios realizados muestran que la molécula de EGCG es hidrófila, con poca solubilidad en sistemas lipídicos, lo que, al menos parcialmente, explica su baja absorción por las células y su eficacia limitada en el entorno celular (Zhong et al, 2012).

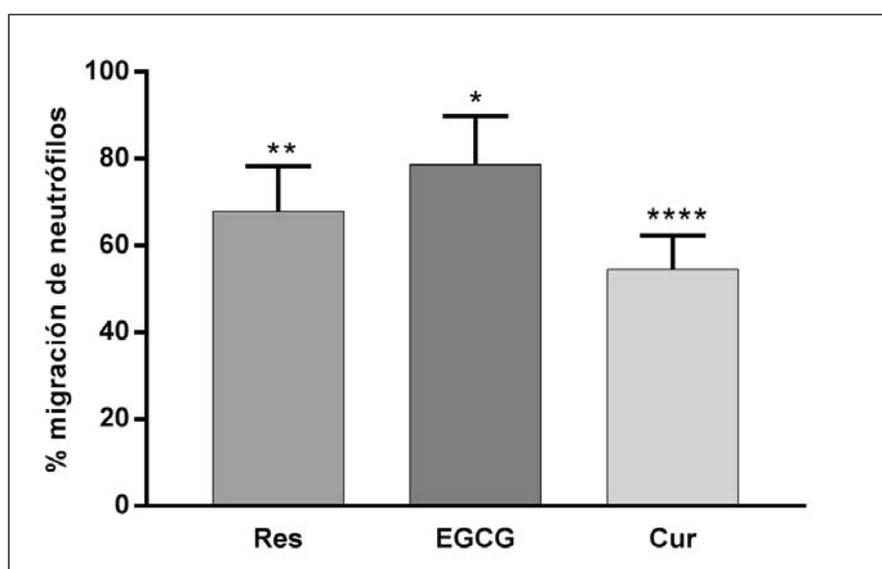


Figura 28.- Porcentaje de migración de neutrófilos en larvas expuestas a otros compuestos flavonoides: Resveratrol 20 μ M (Res) 67.9%, -(-) Epigalocatequina galato 20 μ M (EGCG) 78.6% y curcumina 20 μ M (Cur) 54.40%. En ésta gráfica se compara cada grupo tratado respecto del control que representa el 100% de la migración.

4.1.8 Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a una mezcla de polifenoles y carotenos

Para valorar si las mezclas de compuestos flavonoide y carotenos potenciaban el efecto sobre la disminución de neutrófilos, se analizaron las combinaciones de mezclas de aquellos compuestos que presentaron mayores diferencias significativas respecto del control, como la naringenina-licopeno y ácido clorogénico-licopeno.

Los resultados obtenidos al combinar naringenina-licopeno mostraron una migración del 50.3% y del ácido clorogénico – licopeno del 47.2% como se muestra en la Figura 29. Observamos que los porcentajes de migración de componentes individuales y mezclas en la migración de neutrófilos se mantienen entre el 50 y 60%.

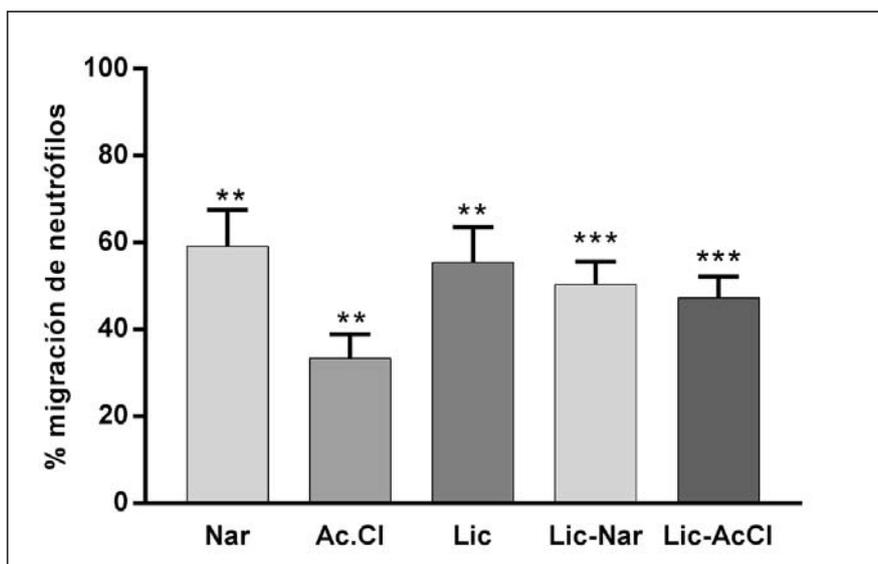


Figura 29.- Porcentaje de migración de neutrófilos en larvas expuestas a una mezcla de caroteno. Como el Licopeno 10 μ M (Lic) 55.4% y de flavonoides como la Naringenina 10 μ M (Nar) 59.1%, Ácido Clorogénico 10 μ M (Ac.Cl) 33.3%, combinación Licopeno-Naringenina 10 μ M (Lic-Nar) 50.3% y combinación Licopeno-Ácido Clorogénico (AcCl) 10 μ M 47.2%. En ésta gráfica se compara cada grupo tratado respecto del control que representa el 100% de la migración.

4.1.9 Migración de neutrófilos en larvas de pez cebra expuestas a extracto de sofrito de tomate

Se realizó un ensayo de migración de neutrófilos, exponiendo larvas de pez cebra a una muestra de extracto de sofrito desgrasada, que fue analizada por HPLC-DAD-UV y cuyos resultados se muestran en la Tabla 11.

La mayor parte de componentes presentes en la muestra de sofrito de tomate son carotenoides como el beta-caroteno y licopenos. La migración de neutrófilos en larvas de pez cebra, expuestas al extracto del sofrito de tomate fue del 60.2%. Como se puede ver en la Figura 30, el modelo de migración de neutrófilos se puede aplicar incluso a extractos de alimentos elaborados. El porcentaje de migración en el extracto, se encuentra en el mismo rango de migración que se observó con compuestos individuales que están entre el 50 y 60% de migración.

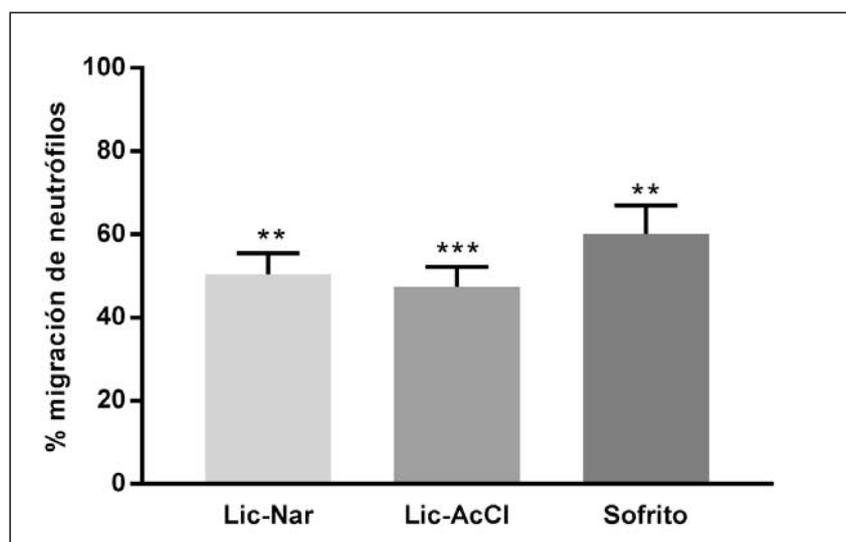


Figura 30.- Porcentaje de migración de neutrófilos en larvas expuestas a un extracto de sofrito que contiene una concentración de $0.03 \mu\text{M}$ de all-E- β -caroteno y $0.10 \mu\text{M}$ de all-E-licopeno muestra 60.2% de migración mientras que las combinaciones de caroteno y flavonoides, Licopeno-Naringenina $10 \mu\text{M}$ (Lic-Nar) 50.3% y combinación Licopeno-Ácido Clorogénico (AcCl) $10 \mu\text{M}$ 47.2%. En esta gráfica se compara cada grupo tratado respecto del control que representa el 100% de la migración.

Estudios anteriores para la determinación de compuestos bioactivos presentes en el sofrito de tomate mediterráneo han sido realizados por Vallverdú et al, (2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificaron 40 compuestos fenólicos y carotenoides. El número de componentes de estos resultados, se deben a que los sofritos analizados, tenían ingredientes adicionales como ajo, cebollas y aceite de oliva. Las concentraciones de compuestos bioactivos fueron superiores a los que normalmente se encuentran solo en tomates.

Tabla II.- Componentes encontrados en la muestra de sofrito utilizada para realizar ensayo de migración de neutrófilos

	Compuesto	Rt (min)	λ_{max} (nm)	%III/II	%Ab/AII	Extracto ($\mu\text{g/mL}$)
1	all- <i>E</i> -lutein	10.513	(420), 445, 476	40	14	4.99
9	all- <i>E</i> - α -carotene	16.393	425, 445, 475	68		2.12
11	Phytofluene	16.786	332, 349, 368	90		2.34
13	all- <i>E</i> - ζ -carotene	17.313	385, 401, 420	104		5.39
14	13- <i>Z</i> - β -carotene	17.906	(335), (347), 448, 470	28	32	3.10
15	all- <i>E</i> - β -carotene	18.946	(425), 453, 478	28		13.31
16	9- <i>Z</i> - β -carotene	19.706	(350), 426, 453, 480	28	28	5.71
20	15- <i>Z</i> -lycopene	23.106	(348), (362), 438, 461, 490	48	69	7.13
21	all- <i>E</i> - γ -carotene	23.406	(364), 438, 461, 491	58		2.35
22	13- <i>Z</i> -lycopene	23.886	(348), (362), 440, 466, 495	49	40	33.71
26	all- <i>E</i> -lycopene	31.286	447, 472, 503	74	0	43.10
27	5- <i>Z</i> -lycopene	31.893	(365), 446, 472, 503	74	5	69.68

rt (retention time); λ_{max} (wavelength); (%III/II) spectral fine structure; (%Ab/AII) peak cis intensity. n.d.(not detected). Z cis; E trans.

Las concentraciones de carotenoides en la muestra de sofrito de tomate calculadas a partir del análisis de HPLC-UV-DAD fueron de 0.03 μM para el all-*E*- β -caroteno y de 0.10 μM para all-*E*-licopeno.

4.2 Resultados de estrés oxidativo en embriones de pez cebra

4.2.1 Curva del inductor del estrés oxidativo Tert-butil hidroperóxido (tBOOH)

Nuestro grupo de investigación, desarrollo un modelo de estrés oxidativo en embrión de pez cebra, para evaluar la actividad protectora de sustancias antioxidantes. Boix et al, (2015). Éste modelo, permite evaluar el efecto anti oxidante de diferentes compuestos naturales presentes en la dieta mediterránea. En este test se induce el estrés oxidativo en embriones de pez cebra con el tert-butil hidroperóxido (tBOOH).

La exposición única de los embriones al tBOOH permite obtener una curva de letalidades y otra de anomalías morfológicas producidas por este producto (inductor), que permitirá, compararlo con las curvas que se obtendrán al exponer los embriones al compuesto natural y al tBOOH. El objetivo es evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos naturales, determinando así, si el compuesto tiene efecto protector frente al estrés oxidativo. Las curvas del inductor tBOOH se hacen periódicamente, aunque no se hace una para cada compuesto, por la cantidad de embriones que se necesitan. Cabe mencionar que en el modelo para evaluar el estrés oxidativo, se utilizaron los mismos compuestos carotenoides y fenólicos, utilizados en el ensayo de migración de neutrófilos (Figura 31).

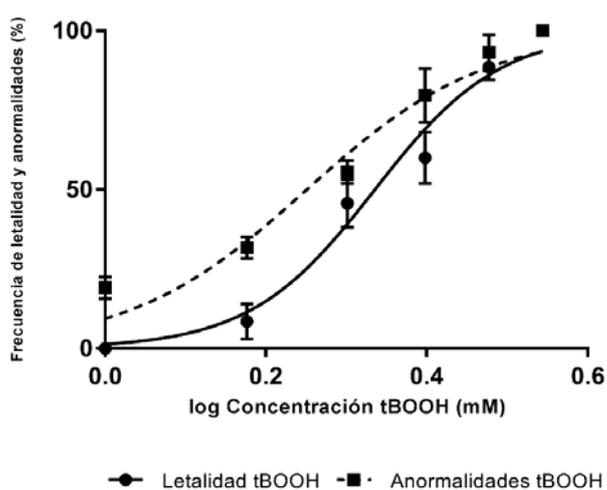


Figura 31.- Curva de concentración-respuesta para letalidad y anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al tBOOH.

Debido al creciente interés en la acción antioxidante de los flavonoides, se han estudiado diferentes compuestos presentes en la dieta mediterránea. Acker et al, (1996) demostraron que los flavonoides pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos de transición, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ; catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Martínez et al, (2002) mostraron que los flavonoides contienen en su estructura química un número variables de grupos hidroxilos fenólicos con excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere un gran poder antioxidante. Se les atribuye la capacidad de proteger, frente al daño oxidativo, así, como también de tener efectos terapéuticos sobre varias patologías como el cáncer y enfermedades cardiovasculares, al mismo tiempo se les atribuye un efecto anti envejecimiento. Los flavonoides presentan propiedades anti-radicales libres, especialmente focalizadas a la neutralización de los radicales hidroxilos y superóxido, especies altamente reactivas, implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica.

Los resultados se presentan en forma de gráficas de letalidad y anomalías morfológicas en porcentaje versus logaritmo de la concentración en mM.

Para determinar el efecto antioxidante de cada compuesto se comparan las curvas de mortalidad y anomalías morfológicas del tBOOH, frente a las curvas obtenidas al exponer los embriones de pez cebra a estos compuestos naturales. Si se produce un desplazamiento a la derecha se habla de un efecto anti oxidante, pero si la curva se desplaza a la izquierda, hablamos de un efecto pro oxidante. También se puede producir un solapamiento de las curvas si no hay efecto protector del compuesto natural sobre el estrés oxidativo.

A continuación se muestran los resultados en forma de gráfica de los distintos compuestos naturales ensayados.

4.2.2 Efecto de la naringenina sobre el estrés oxidativo

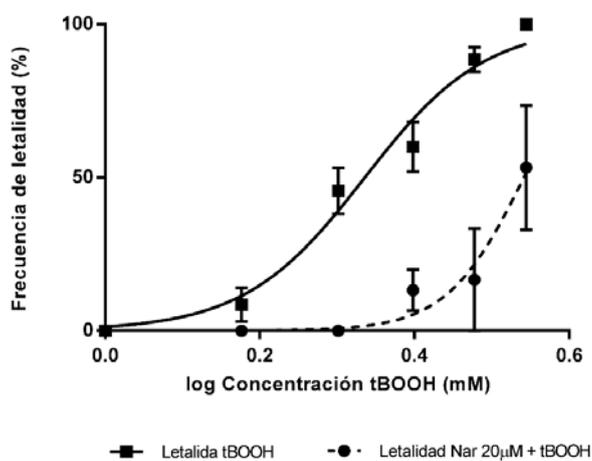


Figura 32.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a Naringenina (Nar) 20µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Nar + tBOOH)
<0,0001	2,17	3,48

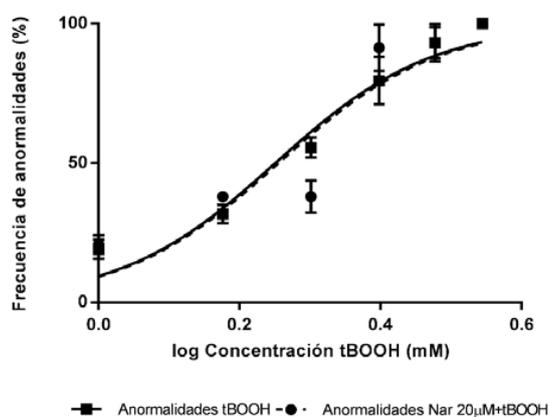


Figura 33.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a Naringenina (Nar) 20µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Nar + tBOOH)
≥0,05	1,78	1,80

4.2.3 Efecto de la Oleuropeína sobre el estrés oxidativo

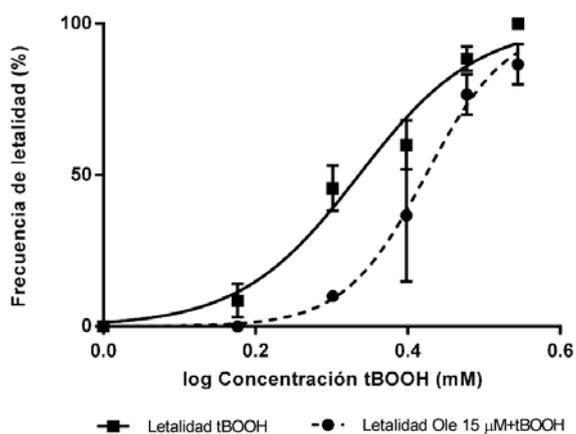


Figura 34.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Oleuropeína (Ole) 15µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Ole + tBOOH)
<0,0001	2,17	2,65

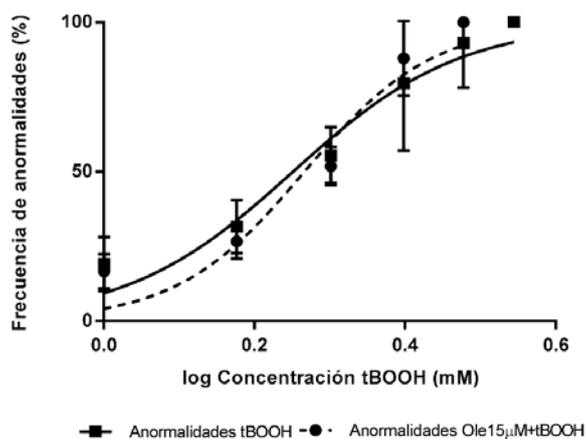


Figura 35.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Oleuropeína (Ole) 15µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Ole + tBOOH)
≥0,05	1,78	1,85

4.2.3 Efecto de la rutina sobre el estrés oxidativo

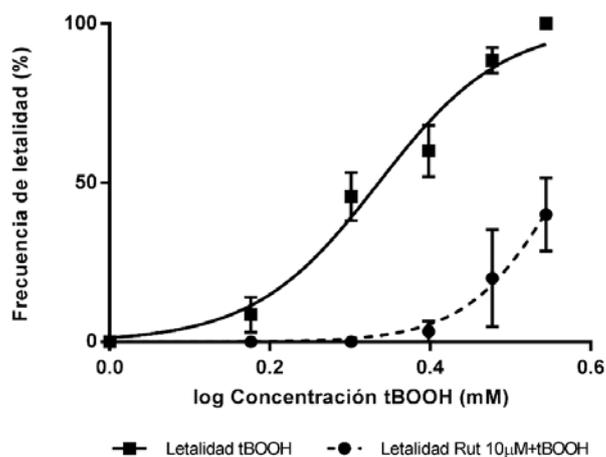


Figura 36.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Rutina (Rut) 10 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Rut + tBOOH)
<0,0001	2,17	3,68

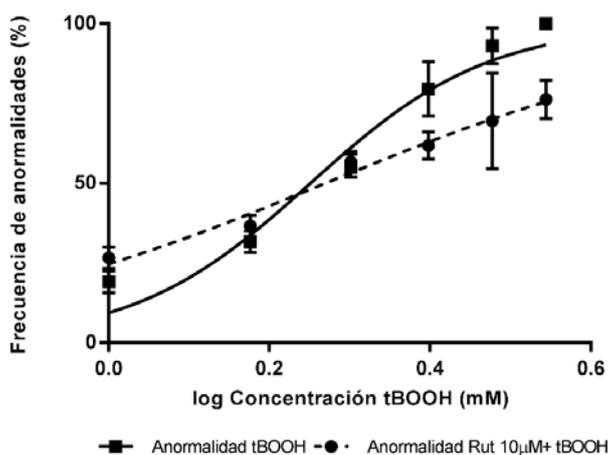


Figura 37.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Rutina (Rut) 10 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Rut + tBOOH)
<0,0008	1,78	1,86

4.2.4 Efecto de la Cianidina sobre el estrés oxidativo

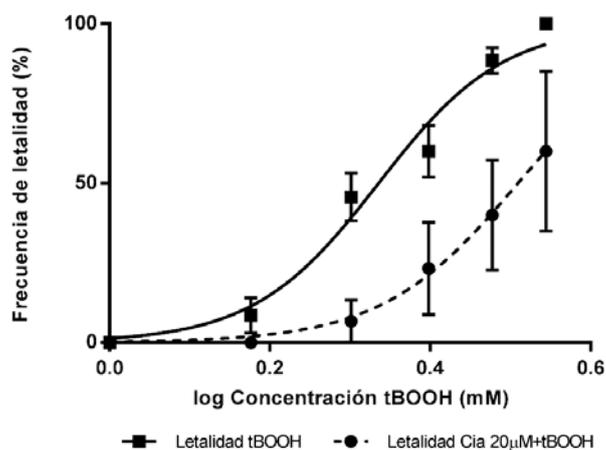


Figura 38.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Cianidina (Cia) 20 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Cia + tBOOH)
<0,0001	2,16	3.23

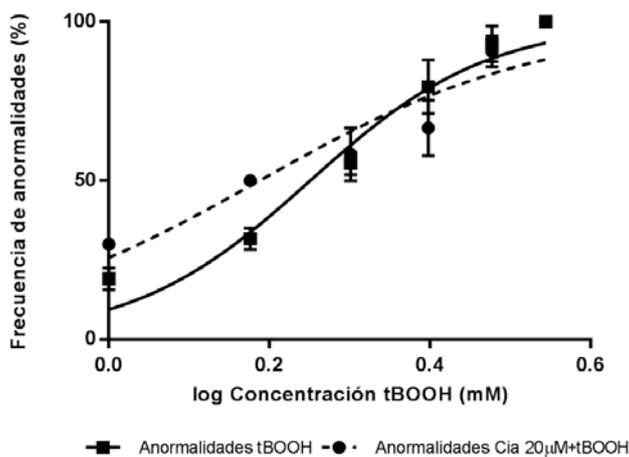


Figura 39.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Cianidina (Cia) 20 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Cia + tBOOH)
0,0479	1,78	1.54

4.2.5 Efecto del ácido clorogénico sobre el estrés oxidativo

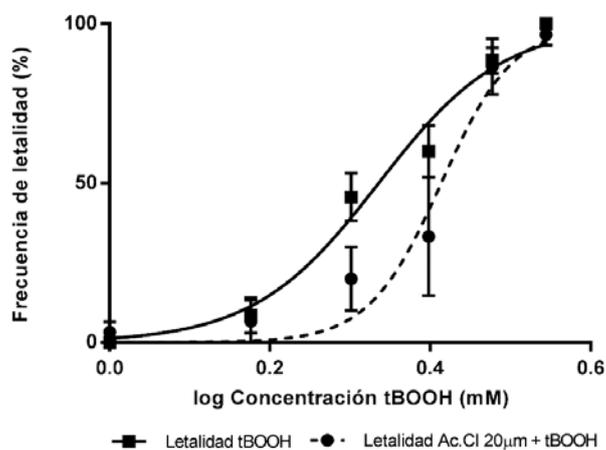


Figura 40.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Ácido Clorogénico (AcCl) 20 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (AcCl+tBOOH)
0,0028	2,17	2.59

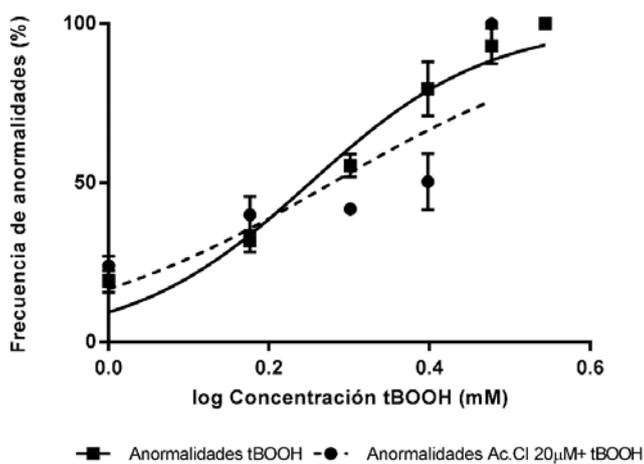


Figura 41.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Ácido Clorogénico (AcCl) 20 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (AcCl+tBOOH)
p≥0,05	1,78	1,90

4.2.6 Efecto de la apigenina sobre el estrés oxidativo

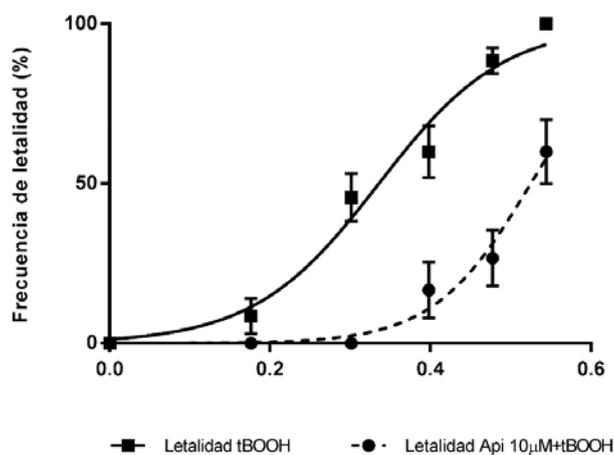


Figura 42.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Apigenina (Api) 10 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Api+tBOOH)
<0,0001	2,17	3,35

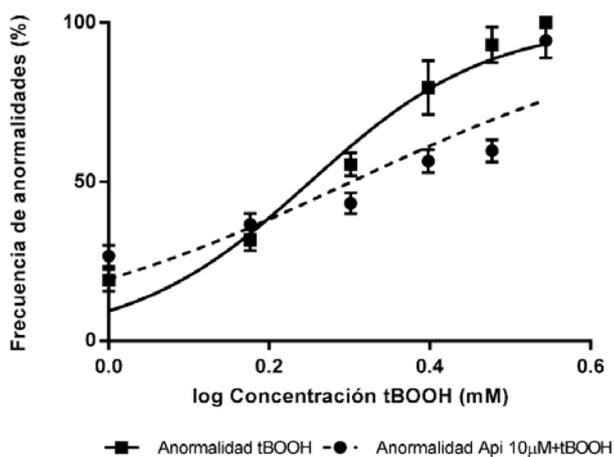


Figura 43.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Apigenina (Api) 10 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (Api+tBOOH)	EC ₅₀ (tBOOH)
0,0006	1,78	2,00

4.2.7 Efecto del resveratrol sobre el estrés oxidativo

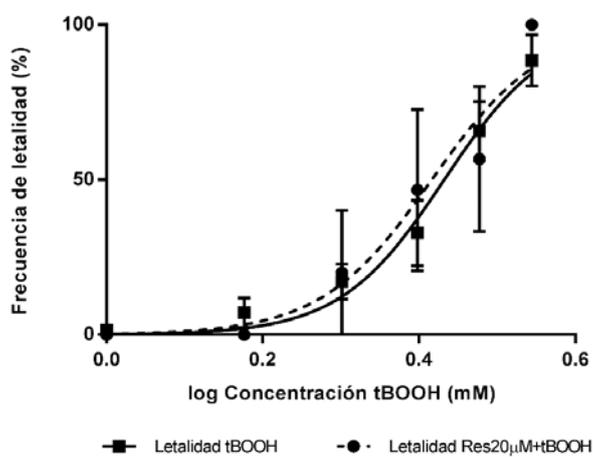


Figura 44.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Resveratrol (Res) 20 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Res + tBOOH)
p>0,05	2,71	2,61

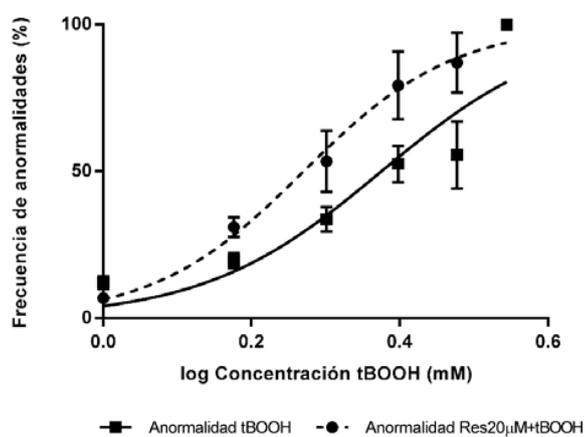


Figura 45.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Resveratrol 20 (Res) µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Res + tBOOH)
0,0023	2,37	1,86

4.2.8 Efecto de la curcumina sobre el estrés oxidativo

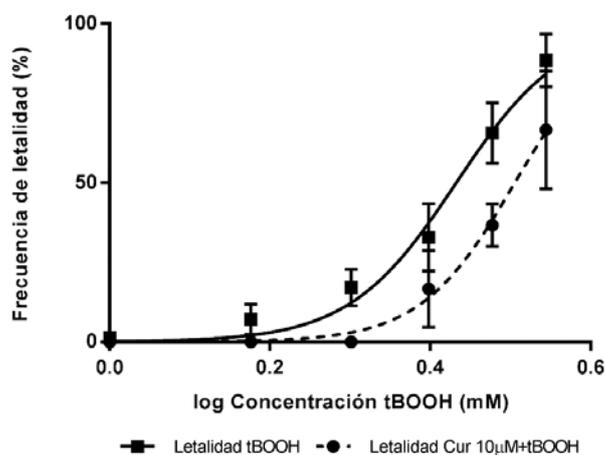


Figura 46.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Curcumina (Cur) 10 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Cur + tBOOH)
0,0048	2,71	3,20

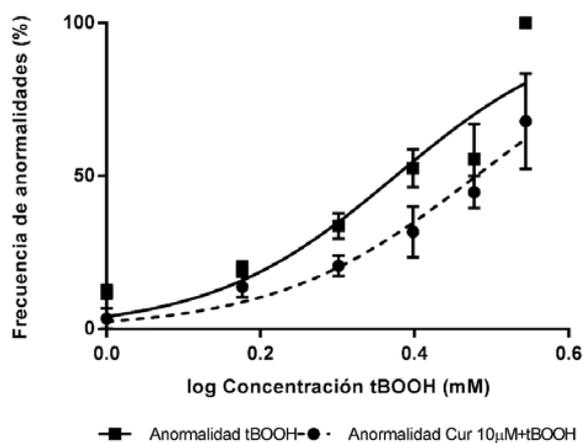


Figura 47.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Curcumina (Cur) 10 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Cur + tBOOH)
0,0065	2,37	3,02

4.2.9 Efecto de (-)- Epigallocatequina Galato (EGCG) sobre el estrés oxidativo

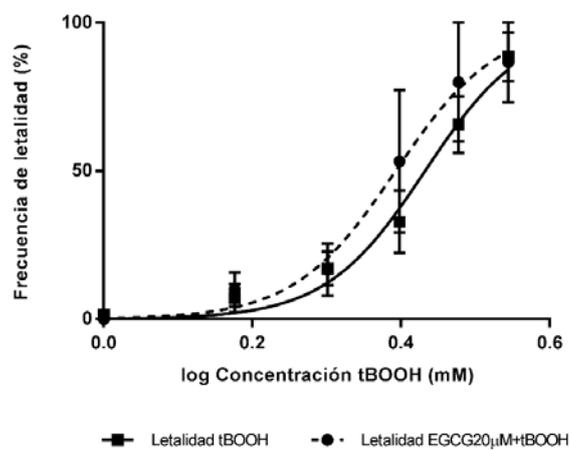


Figura 48.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la (-)- Epigallocatequina Galato (EGCG) 20 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (EGCG + tBOOH)
>0,05	2,71	2,47

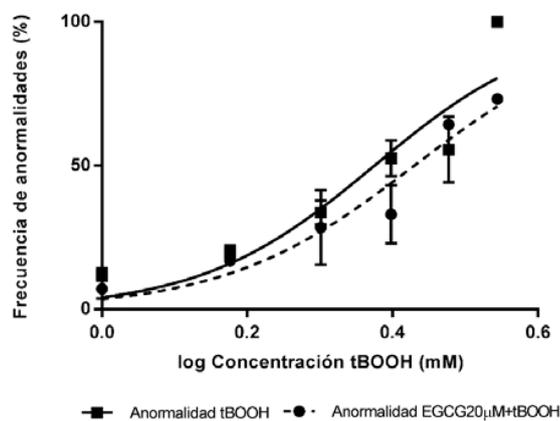


Figura 49.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la (-)- Epigallocatequina Galato (EGCG) 20 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (EGCG + tBOOH)
>0,05	2,37	2,69

4.2.10 Efecto del β -Caroteno 25 mM sobre el estrés oxidativo

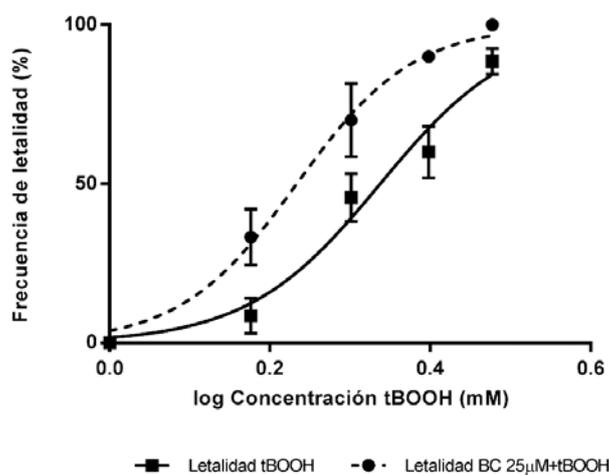


Figura 50.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Beta-Caroteno (BC) 25µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (BC + tBOOH)
0,0001	2,18	1,71

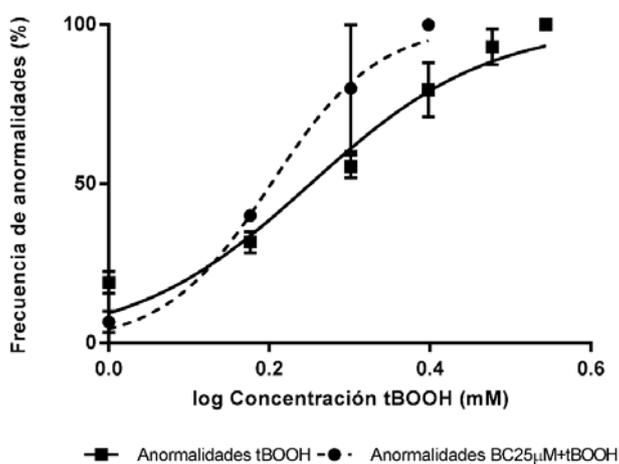


Figura 51.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Beta-Caroteno (BC) 25µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (BC + tBOOH)
0,0127	1,78	1,59

4.2.11 Efecto del β -Caroteno 10 mM sobre el estrés oxidativo

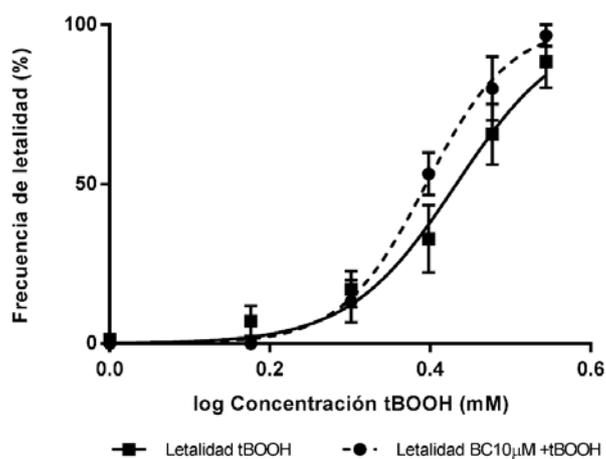


Figura 52.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Beta-Caroteno (β C) 10 μ M.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (BC + tBOOH)
>0,05	2,71	2,48

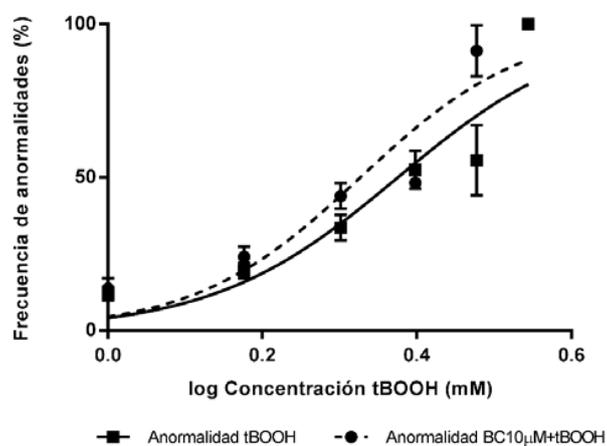


Figura 53.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra Beta-Caroteno (β C) 10 μ M.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (BC + tBOOH)
>0,05	2,37	2,12

4.2.12 Efecto del licopeno sobre el estrés oxidativo

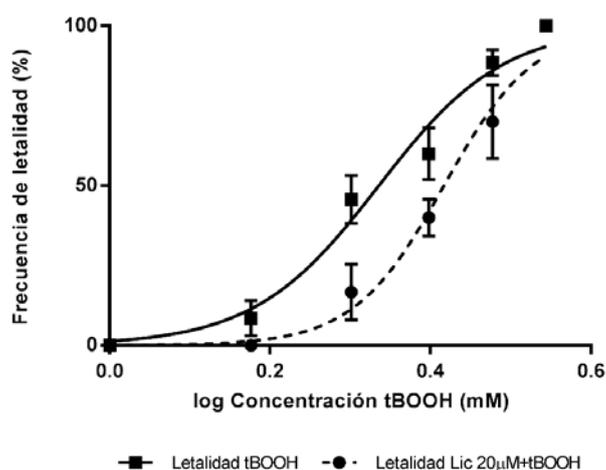


Figura 54.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Licopeno (Lic) 20 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Lic + tBOOH)
0.0003	2.17	2.61

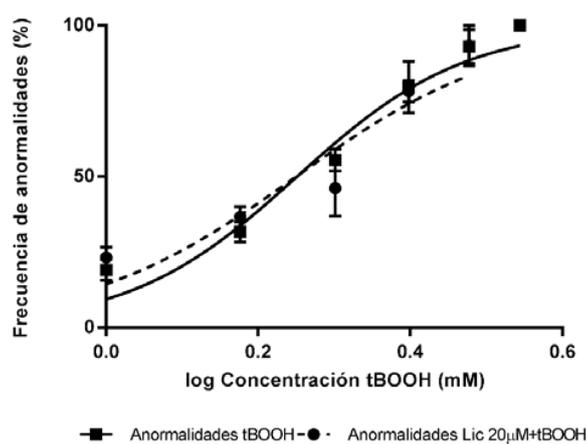


Figura 55.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra al Licopeno (Lic) 20 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Lic + tBOOH)
0.56	1.78	1.77

4.2.13 Efecto de la astaxantina sobre el estrés oxidativo

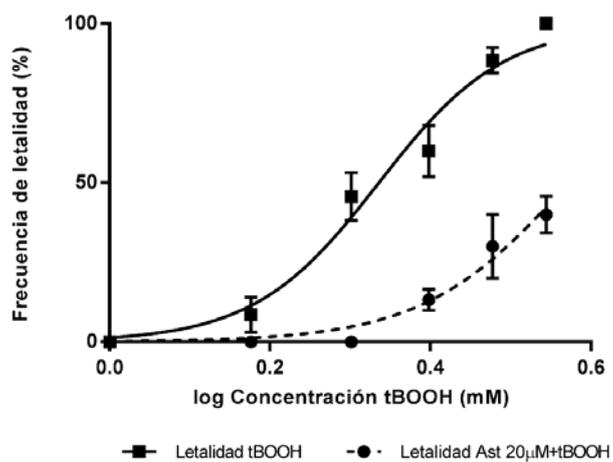


Figura 56.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Astaxantina (Ast) 20 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Ast + tBOOH)
<0,0001	2,17	3,73

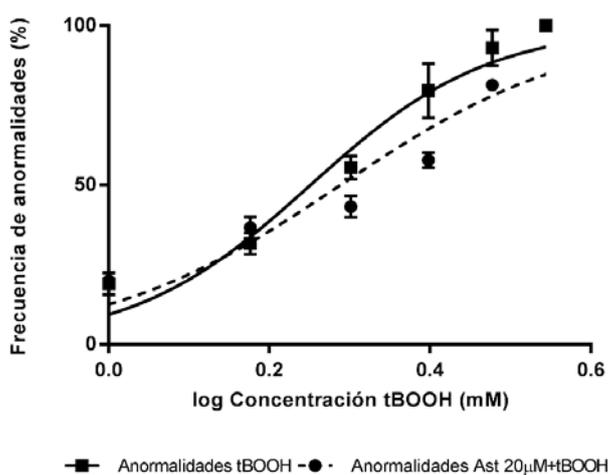


Figura 57.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la Astaxantina (Ast) 20 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Ast + tBOOH)
0,0506	1,78	1,94

4.2.14 Efecto de la apocinina sobre el estrés oxidativo

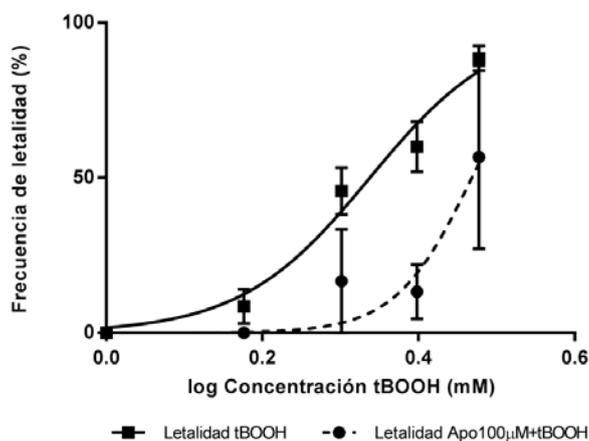


Figura 58.- Curva de concentración-respuesta para letalidad, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la apocinina (Apo) 100 µM.

Valor de p	LC ₅₀ (tBOOH)	LC ₅₀ (Apo + tBOOH)
<0,0001	2,17	2,94

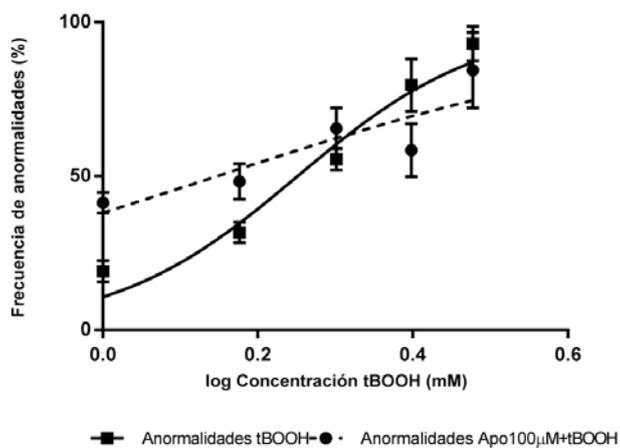


Figura 59.- Curva de concentración-respuesta para anomalías morfológicas, como resultado de la exposición de embriones de pez cebra a la apocinina (Apo) 100 µM.

Valor de p	EC ₅₀ (tBOOH)	EC ₅₀ (Apo + tBOOH)
0,0043	1,78	1,40

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla resumen 12, se observa que la mayoría de compuestos flavonoides y carotenoides utilizados, valorando la LC_{50} , presentan un efecto antioxidante. Sin embargo al valorar la EC_{50} de las anomalías morfológicas, solo la rutina, apigenina y curcumina muestran actividad antioxidante. Puede observarse un efecto pro oxidante de algunos compuestos ensayados, como el β -Caroteno ($25\mu\text{M}$), y en otros casos no presentan efecto (S/E) a concentraciones menores, como el β -Caroteno ($10\mu\text{M}$) y la (-)-Epigallocatequina Galato (EGCG).

Tabla 12.- Efecto de los compuestos flavonoides y carotenoides frente al inductor de estrés oxidativo (tBOOH)

Compuesto	Letalidad			Anormalidades morfológicas		
	LC_{50} (mM) tBOOH	LC_{50} (mM) (Compuesto+tBOOH)	Efecto	EC_{50} (mM) tBOOH	EC_{50} (mM) (Compuesto+tBOOH)	Efecto
Naringenina ($20\mu\text{M}$)	2.1	3.4	AOX	1.7	1.8	S/E
Oleuropeína ($15\mu\text{M}$)	2.1	2.6	AOX	1.7	1.8	S/E
Rutina ($10\mu\text{M}$)	2.1	3.6	AOX	1.7	1.8	AOX
Cianidina ($20\mu\text{M}$)	2.1	3.2	AOX	1.7	1.5	PRO
Ác. Clorogénico ($20\mu\text{M}$)	2.1	2.5	AOX	1.7	1.8	S/E
Apigenina ($10\mu\text{M}$)	2.1	3.3	AOX	1.7	2.0	AOX
Resveratrol ($20\mu\text{M}$)	2.7	2.6	S/E	2.3	1.8	PRO
Curcumina ($10\mu\text{M}$)	2.7	3.2	AOX	2.3	3.0	AOX
EGCG ($20\mu\text{M}$)	2.7	2.4	S/E	2.3	2.6	S/E
β -Caroteno ($25\mu\text{M}$)	2.1	1.7	PRO	1.7	1.5	PRO
β -Caroteno ($10\mu\text{M}$)	2.7	2.4	S/E	2.3	2.1	S/E
Licopeno ($20\mu\text{M}$)	2.1	2.6	AOX	1.7	1.7	S/E
Astaxantina ($20\mu\text{M}$)	2.1	3.7	AOX	1.7	1.9	S/E
Apocinina ($100\mu\text{M}$)	2.1	2.93	AOX	1.7	1.40	S/E

AOX: efecto anti-oxidante, PRO: efecto pro-oxidante, S/E: sin efecto porque no hay diferencia significativa., EGCG: (-)- Epigallocatequina Galato. Valores de LC_{50} y EC_{50} expresados en mM.

Como se mencionó anteriormente, entre las propiedades mejor descritas de los flavonoides, está la de su actividad antioxidante y su capacidad de eliminar radicales libres como hidroxilo ($OH\cdot$) y anión superóxido (O_2^-).

Los flavonoides inactivan y estabilizan los radicales libres gracias a su grupo hidroxilo (C3-OH) altamente reactivo y son capaces de quelar iones metálicos. Los radicales pueden generarse en diferentes situaciones, una de las más comunes, es la que se produce en la inflamación, a través de la producción del anión superóxido (O_2^-) por la NADPH oxidasa de leucocitos activados y la dismutasa, que produce un radical muy reactivo el radical hidroxilo ($OH\cdot$). También se generan radicales libres por la auto oxidación de los lípidos en situaciones de estrés oxidativo. En este proceso las especies reactivas y productos radicalarios, fuera de control, reaccionan con componentes bioactivos como proteínas (alterando receptores y enzimas celulares), ácidos nucleicos y lípidos (Ghedira, 2005).

Se sabe que el mecanismo mejor descrito y más conocido de los compuestos fenólicos, son sus propiedades antioxidantes y la modulación del estrés oxidativo para prevenir el daño de los lípidos celulares, proteínas y ADN. Directamente, pueden neutralizar el anión superóxido y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) como los radicales hidroxilo y peróxido (González et al, 2010). Además, pueden inhibir enzimas que generan grandes cantidades de ROS tales como NADPH oxidasa (Ursini et al, 1998)

Sin embargo, recientemente, los compuestos fenólicos han sido estudiados por su acción en la señalización celular, particularmente en la modificación de las vías de inflamación. Algunas de estas acciones pueden ser directas, como el bloqueo o disminución de la regulación de los receptores o factores de transcripción que conducen a la expresión génica pro inflamatoria, tales como los receptores de interleucina (IL) y Toll-like Receptor 4 (TLR4), el factor nuclear kappa B (NF-kB). Se han propuesto otros mecanismos secundarios de señalización como la modificación del balance redox de la célula.

Por los resultados obtenidos tanto en nuestros ensayos de migración de neutrófilos y de estrés oxidativo, empleando compuestos presentes en la dieta mediterránea, no podemos asegurar que los mecanismos de acción sean los mismos, puesto que cada compuesto responde de manera diferente a cada ensayo. La mayoría de los compuestos probados presentan inhibición de migración de neutrófilos, se destacan especialmente la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cianidina y el ácido clorogénico que presentan mayor inhibición de la migración respecto del control que otros compuestos. Mientras que en el ensayo de estrés oxidativo la rutina, apigenina y curcumina, presentan efecto protector del estrés oxidativo tanto para la letalidad como para las anormalidades morfológicas.

Cabe señalar que las concentraciones que se han empleado para realizar el ensayo de estrés oxidativo han sido similares a las concentraciones del ensayo de migración de neutrófilos, sin embargo en algunos casos las concentraciones son menores, puesto que los embriones tienen entre 2 y 48 hpf, en ésta etapa de desarrollo son más sensibles que larvas de 4 dpf. Por lo tanto se utilizaron concentraciones menores a 20 μM en aquellos compuestos que presentaron una alta letalidad.

En el caso de la naringenina, estudios *in vitro*, muestran la capacidad antioxidante y la actividad de eliminación de radicales de éste flavonoide, se ha demostrado que la naringenina tiene una mayor capacidad antioxidante y una mayor eficiencia para la eliminación de radicales hidroxilo y superóxido que la naringina. En un estudio realizado por Cavia et al, (2010) se señala que la naringenina tiene mayor efectividad en la protección contra el daño oxidativo a los lípidos, dosis dependiente.

El ácido clorogénico posee propiedades especiales, es capaz de disminuir el estrés oxidativo mediante la neutralización de radicales libres, actuando como quelante de metales, reduciendo la peroxidación lipídica e inhibiendo la actividad de la NADPH oxidasa (Clifford, 1999).

La actividad anti oxidante de la rutina, podría deberse a la presencia de anillos fenólicos y a grupos hidroxilos disponibles en su estructura química, los mismos que pueden donar hidrógeno y prevenir la oxidación (Lee et al, 2013). Así mismo, otros autores sugieren que la rutina tiene una potencia notable para donar electrones a los radicales libres reactivos convirtiéndolos en más estables y extinguiendo la reacción en cadena de los radicales libres (Yang et al, 2008).

Varios estudios manifiestan que los antioxidantes fenólicos pueden actuar como pro oxidantes bajo ciertas condiciones, incluyendo altas concentraciones de iones de metales de transición, pH alcalino y la presencia de moléculas de oxígeno (Blokina et al, 2003).

Di Tomo et al, (2012) realizaron estudios en células endoteliales humanas, que fueron expuestas a concentraciones fisiológicas de β -caroteno. Sus resultados mostraron que la

actividad antioxidante del β -caroteno y el licopeno se oponían al estrés oxidativo inflamatorio y al aumento de la biodisponibilidad vascular del óxido nítrico, lo que permitía efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares (ECV).

Sin embargo ensayos realizados en humanos mediante administración de β -caroteno sintético (trans), demostraron que una administración de dosis de β -caroteno superior a las ingeridas de frutas y hortalizas, puede desplazar la actividad antioxidante de los carotenoides a pro oxidante. La actividad pro oxidante del β -caroteno puede deberse a su (Ciccione et al, 2013).

4.3 Análisis de expresión génica

Estudios anteriores, señalan que los lipopolisacáridos bacterianos inducen genes implicados en la respuesta inmune innata en embriones del pez cebra (*Danio rerio*). Por lo tanto, la inflamación en los peces puede estimularse experimentalmente mediante inyección o inmersión en bacterias o lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Estas técnicas se han aplicado en peces adultos, embriones y en células de peces. Por lo tanto, utilizar la inmersión de larvas de pez cebra en soluciones de lipopolisacáridos (LPS), para inducir una respuesta inflamatoria potente y consistente, permite que se genere la expresión de citoquinas pro inflamatorias, citadas por Cordero et al, (2013); Yazawa et al, (2005). Watzke et al, (2007) mostraron que los LPS son capaces de inducir la expresión génica de citoquinas pro inflamatorias, como parte de la respuesta inmune innata en los embriones de pez cebra. También determinaron la expresión de citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina (IL-1 β) en embriones de pez cebra de 32 hpf expuestos a LPS. La expresión de citoquinas, por ejemplo, puede ser activada por LPS a través del receptor Toll-like TLR4 e implica la vía de señalización NF-kB. Sin embargo, Cordero et al, (2013) sugieren que la actividad anti-inflamatoria de productos naturales puede ejercerse a través de diversos mecanismos de acción, incluyendo la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α) y enzimas como ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LOX).

En nuestro caso, analizamos la expresión génica de tres citoquinas pro-inflamatorias, típicas de procesos inflamatorios como son la interleucina IL-1 β (Figura 62), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Figura 61) y la interleucina IL-6 (Figura 60), en larvas de pez cebra de 4dpf, mediante PCR. Observamos que el gen IL-6 presenta diferencias significativas entre los controles sin tratar y los controles inflamados. La expresión de éste gen, también se reduce al utilizar un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo como la indometacina en larvas inflamadas, mientras que las larvas tratadas con compuestos naturales no presentan diferencias significativas. En el caso de los genes TNF- α e IL-1 β , sólo se observa diferencia significativa entre los controles sin tratar e inflamados. Asumimos entonces, que el LPS que utilizamos potencia la respuesta inflamatoria en larvas de pez cebra, sin embargo, los componentes naturales analizados no inhiben la expresión de estos genes.

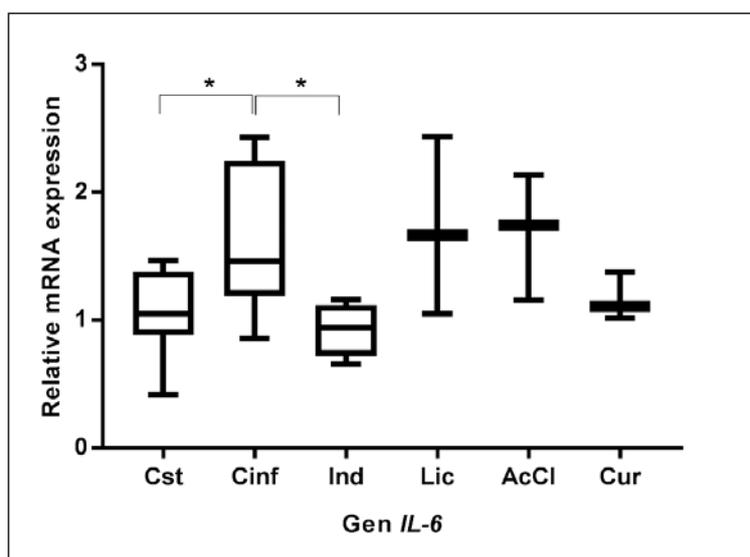


Figura 60.- Expresión del Gen IL-6 en controles sin tratar (Cst), controles inflamados (Cinf), larvas tratadas con indometacina (Ind) 100μM, licopeno (Lic) μM, ácido clorogénico (AcCl) μM y Curcumina (Cur) 20μM, *:p<0.05

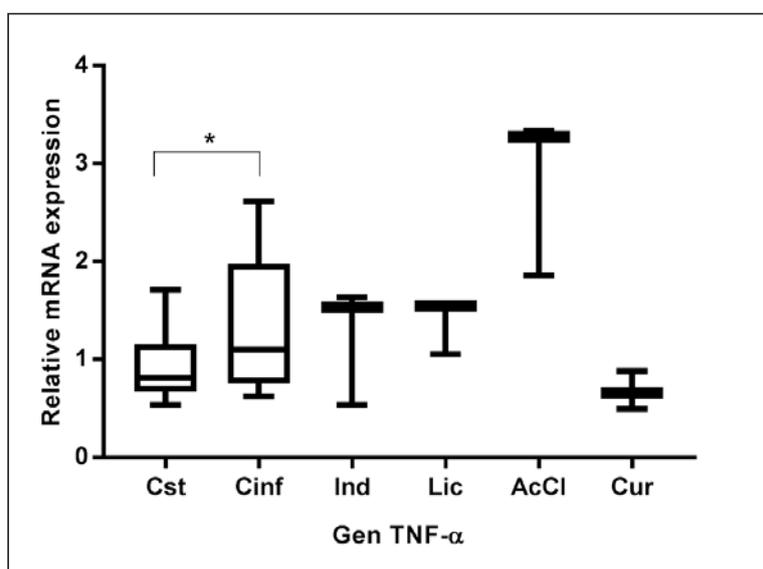


Figura 61.- Expresión del Gen TNF-α en controles sin tratar (Cst), controles inflamados (Cinf), larvas tratadas con indometacina (Ind) 100μM, licopeno (Lic) μM, ácido clorogénico (AcCl) μM y Curcumina (Cur) 20μM, *:p<0.05

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

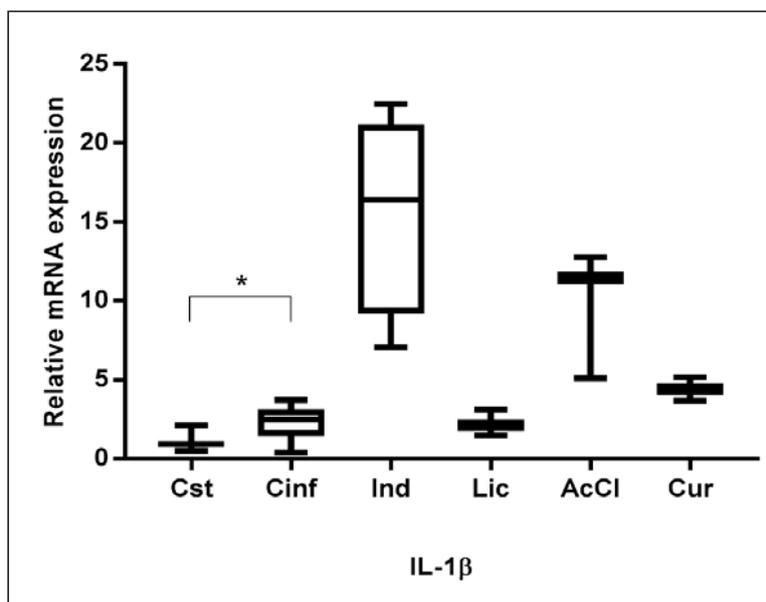


Figura 62.- Expresión del Gen *IL-1β* sin tratar (*Cst*), controles inflamados (*Cinf*), larvas tratadas con indometacina (*Ind*) 100 μ M, licopeno (*Lic*) μ M, ácido clorogénico (*AcCl*) μ M y Curcumina (*Cur*) 20 μ M, $*:p<0.05$

4.4 Análisis de permeabilidad de carotenoides en el pez cebra, analizado por HPLC-DAD/UV

Como estudio suplementario, para verificar que el efecto que se observa en la migración de neutrófilos en larvas de pez cebra, se debe a la exposición de compuestos presentes en el sofrito de tomate y a fracciones del extracto de sofrito, se realizó un análisis por cromatografía líquida de alto resolución (HPLC) con detección UV-DAD, con la finalidad de cuantificar carotenos en larvas de pez cebra Tabla 13. Análisis similares se realizaron anteriormente por Vallverdú et al, (2015), donde identificaron por primera vez compuestos fenólicos en embriones de pez cebra, expuestos a un extracto de vino tinto, utilizando el método HPLC acoplado a espectrometría de masas de alta resolución.

Vallverdú et al, (2015), también realizó un estudio del “Perfil de carotenoides de las salsas de tomate: Efecto del tiempo de cocción y del contenido de aceite de oliva virgen extra”. Donde determinó que los carotenoides predominantes en los productos de tomate están en la configuración (*all-E*), pero pueden formarse isómeros (*Z*) durante el procesamiento térmico. Resultados similares del análisis de una fracción de sofrito de tomate se puede observar en la Tabla 11, citada anteriormente. Nosotros también hemos analizado larvas de pez cebra expuestas a soluciones que contenían carotenos, como se muestra en la (Figura 64). Confirmamos que existe permeabilidad a carotenos, y además se observó una bioconcentración de éstos compuestos que se muestra en la tabla 14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13.- Identificación de caroteno en larvas de pez cebra.

	Compuesto	rt	λ_{max} (nm)	%III/II	%Ab/A _{II}
1	Todos- <i>E</i> -astaxantina	9.24	478	0	
2	No identificado	13.85			
3	15- <i>Z</i> - β -caroteno	14.34	340, (422), 450, 482	12	60
4	13- <i>Z</i> - β -caroteno	15.06	340, (422), 448, 470	16	37
5	all- <i>E</i> - β -caroteno	15.67	(420),452, 480	28	0
6	9- <i>Z</i> - β -caroteno	16.19	342, (420), 448, 472	21	19
7	Todos- <i>E</i> -licopeno	23.02	446, 473, 504	73	

rt (retention time); λ_{max} (wavelength); (%III/II) spectral fine structure; (%Ab/II) peak cis intensity. n.d.(not detected). Z cis; E trans.

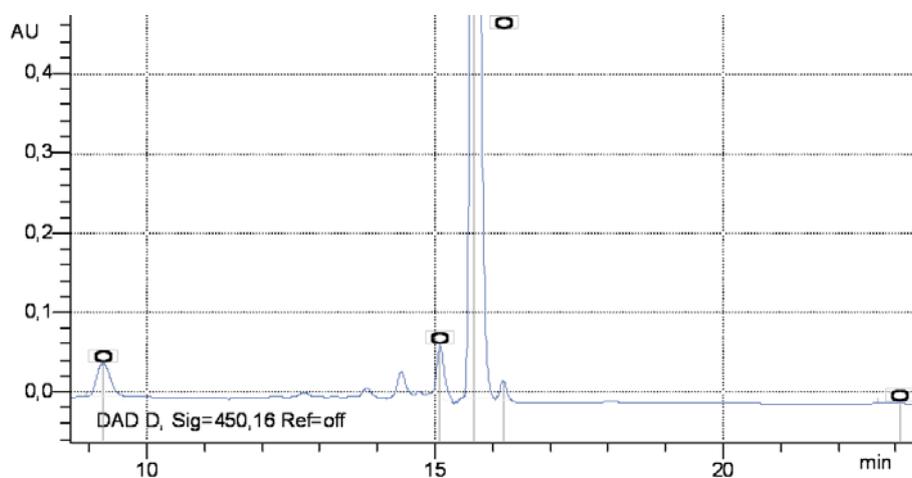


Figura 63.- Cromatograma

Tabla 14.- Concentración de carotenos en larvas de pez cebra.

	ug/mL		
	Astaxantina	BC	Licopeno
Pre	0,27	5,38	0,07
Post	0.24	3.57	0.08
	ug/g larva		
ZF	2,65	9,17	7,27

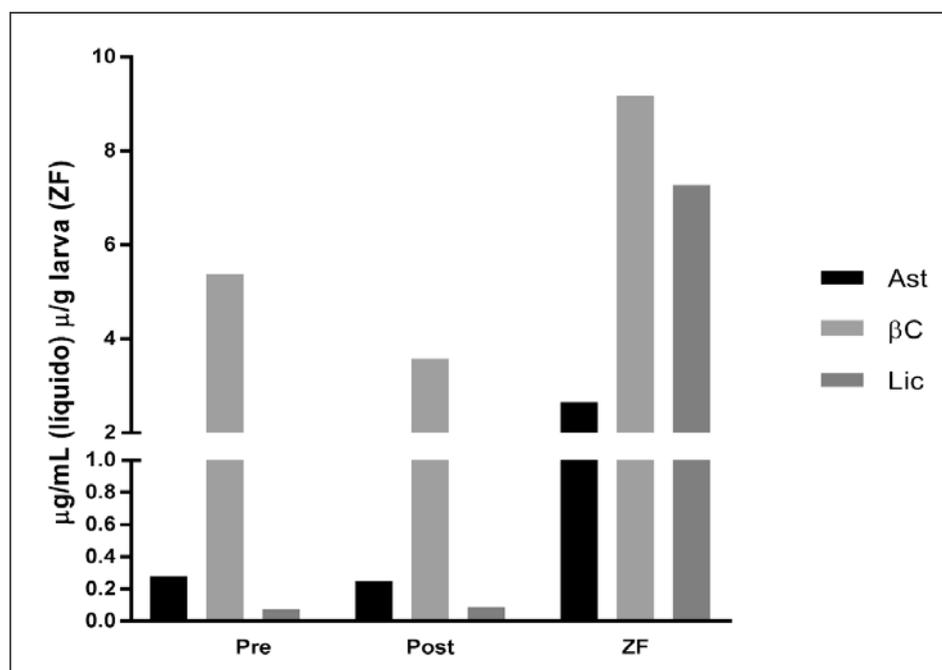


Figura 64.- Representación gráfica de la concentración de carotenoides presentes en larvas de pez cebra. Pre expuestos a los carotenoides, grupo (Pre) se refiere a la solución de carotenos antes de exponer las larvas en ésta solución, grupo (Post) indica la solución de carotenos analizada, después de haber expuesto las larvas en ésta solución, grupo (ZF) son las larvas de pez cebra expuestas a la solución de carotenos, la concentración de carotenos está expresada para las soluciones en µg/mL y en las larvas expresadas en µg/g larva, los carotenoides analizados han sido Astaxantina (Ast), Beta-caroteno (β-C) y el licopeno (Lic).

5. CONCLUSIONES

5.1 Conclusiones del objetivo general

Se ha estudiado la actividad anti-inflamatoria de una selección de compuestos de la dieta mediterránea, con especial atención compuestos fenólicos y carotenoides, presentes en el sofrito de tomate, mediante un método de migración *in vivo* de neutrófilos en larvas de pez cebra.

5.2 Conclusiones de los objetivos específicos

- Se ha adaptado y optimizado un método para la medición de la migración de neutrófilos *in vivo* en larvas de pez cebra. El método se ha demostrado fiable y repetitivo, aunque debido a la variabilidad de la respuesta individual, se requiere la utilización de un número elevado de larvas y al menos tres réplicas con diferentes puestas. La cuantificación de la migración, mediante análisis de imagen es reproducible y objetiva.
- Se ha aplicado el método a una selección de compuestos con actividad anti-inflamatoria conocida y algunos controles negativos. En conjunto la correlación entre actividad inflamatoria y la capacidad para inhibir la migración de los neutrófilos en larva de pez cebra es significativa $p < 0.05$ a $p < 0.001$
- Se ha aplicado el método a una selección de compuestos fenólicos y carotenoides presentes en la dieta mediterránea. Se ha observado un amplio espectro de actividad inhibidora de la migración de neutrófilos. En general los resultados se correlacionan con las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes conocidas de estas sustancias

CONCLUSIONES

- Se ha comprobado que la metodología es aplicable a mezclas de sustancias naturales y a fracciones extraídas del sofrito de tomate.
- La metodología desarrollada se ha complementado con estudios de permeabilidad, cuantificando la concentración de compuestos carotenoides en larvas expuestas a éstos compuestos, mediante el método de HPLC-UV-DAD, confirmándose que estas sustancias penetran y, en algunos casos, se bioconcentran.
- La metodología desarrollada, se ha complementado con ensayos de expresión génica de citoquinas pro inflamatorias en larvas expuestas a algunas de las sustancias naturales, que han mostrado mayor inhibición en la migración de neutrófilos. Los resultados obtenidos, no muestran diferencias significativas entre los diferentes grupos tratados y los controles.
- Los compuestos naturales ensayados se han evaluado también mediante un modelo experimental de actividad antioxidante *in vivo* en embriones de pez cebra. Aunque un mecanismo protector contra el estrés oxidativo puede contribuir al efecto anti-inflamatorio de algunos compuestos naturales, los resultados sugieren que otros mecanismos pueden jugar un papel relevante en la migración de neutrófilos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2015). Células y tejidos del sistema inmunitario. En A.K. Abbas. (Ed), *Inmunología celular y molecular*. (pp:13-22; 51-59). Barcelona. España: Elsevier Inc.
- Anand David AV., Arulmoli R., Parasuraman S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid, *Pharmacognosy Review*, 10:84-9.
- Acker Van, S. A. B. E., Van Den Berg, D., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331–342.
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2000). Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(6), 507–514.
- Ambriz-Pérez, D. L., Bang, W. Y., Nair, V., Angulo-Escalante, M. A., Cisneros-Zevallos, L., & Heredia, J. B. (2016). Protective Role of Flavonoids and Lipophilic Compounds from *Jatropha platyphylla* on the Suppression of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Macrophage Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(9), 1899–1909.
- Bai, S.-K., Lee, S.-J., Na, H.-J., Ha, K.-S., Han, J.-A., Lee, H., ... Kim, Y.-M. (2005). β -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Experimental & Molecular Medicine*, 37(4), 323–334.
- Batlouni, M. (2010). Artículo de Revisión Antiinflamatorios No Esteroides : Efectos Cardiovasculares , Cerebrovasculares y Renales Artículo de Revisión. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 94(4), 538–546.

BIBLIOGRAFÍA

- Bignotto, L., Rocha, J., Sepodes, B., Eduardo-Figueira, M., Pinto, R., Chaud, M., Mota-Filipe, H. (2009). Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. *The British Journal of Nutrition*, 102(2009), 126–133.
- Boix, N. (2015). Un model d'estrès oxidatiu en embrió de peix zebra. Aplicació per a l'avaluació de l'activitat protectora de substàncies antioxidants (tesis doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Cavia-Saiz, M., Busto, M. D., Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., & Muñoz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1238–1244.
- Chen, L., Liu, T., Wang, Q., & Liu, J. (2017). Anti-inflammatory effect of combined tetramethylpyrazine, resveratrol and curcumin in vivo. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-10.
- Chung, H., Jiann, J., Ming, L., Yi, C., & Hu, H. (2014). Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF-κB pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 69, 249–257.
- Cicccone, M., Cortese, F., & Gesualdo, M. (2013). Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1–11
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362–372.
- Cordero-Maldonado, M. L., Siverio-Mota, D., Vicet-Muro, L., Wilches-Arizábal, I. M., Esguerra, C. V., de Witte, P. A. M., & Crawford, A. D. (2013). Optimization and Pharmacological Validation of a Leukocyte Migration Assay in Zebrafish Larvae for the Rapid In Vivo Bioactivity Analysis of Anti-Inflammatory Secondary Metabolites. *PLoS ONE*, 8, 1-11

- Crowhurst, M. O., Layton, J. E., & Lieschke, G. J. (2002). Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *International Journal of Developmental Biology*, 46, 483-492
- Cryer, B., & Feldman, M. (1998). Selectivity of Widely Used Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *The American Journal of Medicine*, 104(98), 413–421.
- Doan, T., Melvold, R., Veselli, S., Waltenbaugh, C. (2013). El sistema inmunitario innato. En T.Doan. (Ed), *Inmunología*. (pp: 25-37). Illinois. EE.UU: Wolters Kluwer Health, S.A.
- Di Tomo, P., Canali, R., Ciavardelli, D., Di Silvestre, S., De Marco, A., Giardinelli, A., Pandolfi, A. (2012). β -Carotene and lycopene affect endothelial response to TNF- α reducing nitro-oxidative stress and interaction with monocytes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(2), 217–227.
- Drake, L. A., Fallon, J. D., & Sober, A. (1994). Relief of pruritus in patients with atopic dermatitis after treatment with topical doxepin cream. The Doxepin Study Group. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(4), 613–616.
- Dusting, G. J., Selemidis, S., & Jiang, F. (2005). Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 97–103.
- Fang, L., & Miller, Y. I. (2012). Emerging applications for zebrafish as a model organism to study oxidative mechanisms and their roles in inflammation and vascular accumulation of oxidized lipids. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 1411–1420
- Fainboim, L., y Geffner, J. (2005). Inmunidad innata: neutrófilos, macrófagos y células natural killer. En L. Fainboim. (Ed), *Introducción a la Inmunología Humana*.(pp:60-69). Buenos Aires. Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Fenton, H.J.H., 1984. LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society*, 65, 899–910.

BIBLIOGRAFÍA

- Fernandes, I., Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., De Freitas, V., Santos-Buelga, C., & Feliciano, A. S. (2017). Wine flavonoids in health and disease prevention. *Molecules*, 22(2), 292.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoides: Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*, 3(4), 162–169.
- Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(5), 504–512.
- González-Gallego, J., García-Mediavilla, M. V., Sánchez-Campos, S., & Tuñón, M. J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*, 104, 15-27.
- Grune, T. (Ed). (2005). Free Radicals and Diseases: Gene Expression, Cellular Metabolism and Pathophysiology. Netherlands. Amsterdam. IOS Press.
- Haris, O. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78(2), 133–154.
- Heber, D., & Lu, Q.-Y. (2002). Overview of Mechanisms of Action of Lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, 227(10), 920–923.
- Heidland, A., Rutkowski, P., & Bahner, U. (2006). *Jornal of Nephrology*. 19. 102-109.
- Henry, K. M., Loynes, C. A., Whyte, M. K. B., & Renshaw, S. A. (2013). Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 633-642.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19.
- Janeway, C. a. (2013). Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold spring harb symp quant biol. 1989. 54: 1-13. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(9), 4475–87.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253-310.

- Kontogiorgis, C. A. . b, Bompou, E.-M. ., Ntella, M. ., & Vanden Berghe, W. . d. (2010). Natural products from mediterranean diet: From anti-inflammatory agents to dietary epigenetic modulators. *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 9(2), 101–124.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1–20.
- Lawrence, T., Willoughby, D. A., & Gilroy, D. W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 787–795.
- Lee Suan, C. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 805–817.
- Lee, S.J., Bai, S., Lee, K., Namkoong, S., Na, H., Ha, K., ... Kim, Y. (2003). Astaxanthin Inhibits Nitric Oxide Production and Inflammatory. *Molecules and Cells*, 16(1), 97–105.
- Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Perez, D. L., & Basilio Heredia, J. (2016). Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-15.
- Li, Z., Ptak, D., Zhang, L., Walls, E. K., Zhong, W., Leung, Y. F., & Thummel, R. (2012). Phenylthiourea Specifically Reduces Zebrafish Eye Size. *Phenylthiourea Specifically Reduces Zebrafish Eye Size. PLoS ONE*, 7(6), e40132.
- Lieschke, G. J., Oates, A. C., Crowhurst, M. O., Ward, A. C., Layton, J. E., Lieschke, G. J., Layton, J. E. (2008). macrophages in embryonic and adult zebrafish Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish, 98(10), 3087–3096.
- Lindeberg, S., Jönsson, T., Granfeldt, Y., Borgstrand, E., Soffman, J., Sjöström, K., & Åhrén, B. (2007). A Palaeolithic diet improves glucose tolerance more than a Mediterranean-like diet in individuals with ischaemic heart disease. *Diabetologia*, 50(9), 1795–1807

BIBLIOGRAFÍA

- Lòpez, A., López, M. C., Lamuela. R., Mariné, A; Foz, M. (2004). Radicals lliures i espècies reactives d'oxigen. En A. López. (Ed), *Antioxidants i Salut*. (pp: 9-20). L'Hospitalet de Llobregat. España. ALTÉS arts gràfiques, SL.
- Lucas, S. (2016). the Pharmacology of Indomethacin. *American Headache Society*, 18(2), 436–446.
- Magrone, T., & Jirillo, E. (2010). Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 279–285.
- Maroon, J., Bost, J., & Maroon, A. (2010). Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical Neurology International*, 1(1), 80.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición. Hospitalaria*, 17(6), 271–278.
- Martini, D., Del Bo', C., Tassotti, M., Riso, P., Rio, D. Del, Brighenti, F., & Porrini, M. (2016). Coffee consumption and oxidative stress: A review of human intervention studies. *Molecules*, 21(8), 1-20.
- Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Yoo, S. K., Ranheim, E. A., & Huttenlocher, A. (2009). Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 1212-1217
- Mathias, J. R., Perrin, B. J., Liu, T.-X., Kanki, J., Look, A. T., & Huttenlocher, A. (2006). Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(6), 1281–1288.
- Matzinger, P. (2002). The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*, 296(5566), 301–305.
- Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2016). Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 174, 1290–1324.

- Netea, M. G., Kullberg, B. J., Joosten, L. A. B., Sprong, T., Verschueren, I., Boerman, O. C., ... Van der Meer, J. W. M. (2001). Lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia is mediated through different pathways. *European Journal of Immunology*, *31*(9), 2529–2538.
- Palozza, P., Parrone, N., Catalano, a, & Simone, R. (2010). Tomato lycopene and inflammatory cascade: basic interactions and clinical implications. *Current Medicinal Chemistry*, *17*(23), 2547–2563.
- Papas, A. (Ed). (1999). *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. London. England: CRC Press.
- Pase, L., Nowell, C. J., & Lieschke, G. J. (2012). In vivo real-time visualization of leukocytes and intracellular hydrogen peroxide levels during a zebrafish acute inflammation assay. *Methods in Enzymology*, *506*, 135-156.
- Patel, K., Singh, G. K., & Patel, D. K. (2014). A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, *10*, 1-13.
- Pérez-López, F. R., Chedraui, P., Haya, J., & Cuadros, J. L. (2009). Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas*, *64*(2), 67–79.
- Peña, J. M. (Ed). (1982). *Inmunología*. Madrid. España: Ediciones pirámide, S.A.
- Pryor, A.W. (Ed).(1984). *Natural Antioxidant in Human Health and Disease*. London. England: Academic Press.
- Rabêlo, L. a, Souza, V. N. De, José, L., & Sampaio, W. O. (2010). Artículo de Revisión Desbalance Redox : NADPH Oxidasa como un Objetivo Terapéutico en el Manejo Cardiovascular Artículo de Revisión. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, *94*(5), 666–675.
- Rao, P. N. P., Knaus, E. E., Road, T. P., & Jolla, L. (2008). Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond Drugs (NSAIDs), *North*, *11*(2), 81–110.

BIBLIOGRAFÍA

- Ray, S. K., Fidan, M., Nowak, M. W., Wilford, G. G., Hogan, E. L., & Banik, N. L. (2000). Oxidative stress and Ca^{2+} influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells. *Brain Research*, 852(2), 326–334.
- Ribeiro, Daniela., Freitas, Marisa., L. F. C. Lima, José., and E. F. (2015). Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. *Medicinal Research Reviews*, 5, 877–936.
- Rietschel, E. T., Zähringer, U., Wollenweber, H. W., Miragliotta, G., Musehold, J., Lüderitz, T., & Schade, U. (1984). Bacterial endotoxins: Chemical structure and biologic activity. *American Journal of Emergency Medicine*, 2(1), 60–69.
- Rubinstein, A. L. (2006). Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(2), 231–240.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 43(4), 394–405.
- Shama, J., Indika, & Burton-Freeman, B. M. (2016). Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (3), 419–444.
- Shen, S.-C., Lee, W.-R., & Lin, H.-Y. (2002). In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitricoxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*, 1–3(446), 187–194.
- Sies, H. (Ed). (1985). Oxidative stress: introductory remarks. London. England: Academic Press.
- Srivastava, S., Singh, D., Patel, S., & Singh, M. R. (2017). Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 502–517.
- Stiver, G. (2003). The treatment of influenza with antiviral drugs. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 168(1), 49–56.

- Sumimoto, H. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS Journal*, 275(13), 3249–3277.
- Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., & Enck, P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*, 1–30.
- Teixidó, E., Piqué, E., Gómez-Catalán, J., Llobet, J.M. (2013). Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicology in Vitro*, 27, 469–478.
- Trede, N. S., Langenau, D. M., Traver, D., Look, A. T., & Zon, L. I. (2004). The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*, 20(4), 367–379.
- Tsuda, Takanori., Horio Fumihiko., Osawa, T. (2002). Cyanidin 3-O-B-D-glucoside Suppresses Nitric Oxide Production during a Zymosan Treatment in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 48, 305–310
- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1996). Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical Pharmacology*, 52(7), 1033–1039.
- Urquiaga, I., Echeverría, G., Dussailant, C., & Rigotti, A. (2017). Origen, componentes y posibles mecanismos de acción de la dieta mediterránea. *Revista Medica de Chile*, 145(1), 85–95.
- Ursini, F., Zamburlini, A., Cazzolato, G., & Maiorino, M. (1998). Hypothesis Paper. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(2), 250–252.
- Vallverdú-Queralt, A., Alvarenga, J. F. R. De, Estruch, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (2013). Bioactive compounds present in the Mediterranean sofrito. *Food Chemistry*, 141(4), 3366–3372.

BIBLIOGRAFÍA

- Vallverdú-Queralt, A., Boix, N., Piqué, E., Gómez-Catalan, J., Medina-Remon, A., Sasot, G., Lamuela-Raventos, R. M. (2015). Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Chemistry*, *181*, 146–151.
- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., de Alvarenga, J. F. R., Torrado, X., & Lamuela-Raventos, R. M. (2015). Carotenoid profile of tomato sauces: Effect of cooking time and content of extra virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(5), 9588–9599.
- Varela, M., Dios, S., Novoa, B., & Figueras, A. (2012). Characterisation, expression and ontogeny of interleukin-6 and its receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental and Comparative Immunology*, *37*, 97-106.
- Vignais, P. V., & SCences, M. L. (2002). Cellular and Molecular Life Sciences The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *59*, 1428–1459.
- Wang, J., Liu, Y. T., Xiao, L., Zhu, L., Wang, Q., & Yan, T. (2014). Anti-Inflammatory Effects of Apigenin in Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory in Acute Lung Injury by Suppressing COX-2 and NF-κB Pathway. *Inflammation*, *37*(6), 2085–2090.
- Watzke, J., Schirmer, K., & Scholz, S. (2007). Bacterial lipopolysaccharides induce genes involved in the innate immune response in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, *23*, 901-905.
- Wu, S., Zhu, F., Hu, L., Xia, J., Xu, G., Liu, D., Lai, W. (2017). Development of a competitive immunochromatographic assay for the sensitive detection of amantadine in chicken muscle. *Food Chemistry*, *53*(2), 1080-1091.
- Yazawa, R., Hirono, I., Ohira, T., & Aoki, T. (2005). Induction of Japanese flounder TNF promoter activity by lipopolysaccharide in zebrafish embryo. *Marine Biotechnology*, *7*(3), 231–235.
- Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(6), 1060–1066.

BIBLIOGRAFÍA

- Zhang, H., Yin, M., Huang, L., Wang, J., Gong, L., Liu, J., & Sun, B. (2017). Evaluation of the Cellular and Animal Models for the Study of Antioxidant Activity: A Review. *Journal of Food Science*, 82(2), 278–288.
- Zhong, Y., Chiou, Y. S., Pan, M. H., & Shahidi, F. (2012). Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages. *Food Chemistry*, 134(2), 742–748.