



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

“Actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de extractos herbales como base para la elaboración de bebidas”

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

Lic. en Biotecnología Josué Manríquez Núñez

**Dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro, Qro.  
Diciembre 2015  
México



Universidad Autónoma de Querétaro  
 Facultad de Química  
 Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de extractos herbales como base para la elaboración de bebidas”

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

Lic. en Biotecnología Josué Manríquez Núñez

**Dirigido por:**

Dra. Minerva Ramos Gómez

**SINODALES**

Dra. Minerva Ramos Gómez  
 Presidente

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
 Secretario

M. en C. Luis Alberto Madrigal Pérez  
 Vocal

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz  
 Suplente

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez  
 Suplente



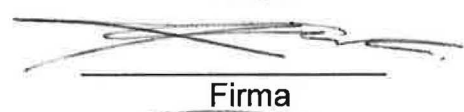

---

Firma




---

Firma




---

Firma




---

Firma





---

Firma




---

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
 Director de la Facultad




---

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
 Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
 Santiago de Querétaro, Qro.  
 Diciembre 2015  
 México

## RESUMEN

En México, el uso de plantas con fines terapéuticos es una práctica ampliamente utilizada y, en la actualidad, existe una creciente tendencia al uso de plantas y/o extractos y su incorporación a productos de consumo, como las bebidas. Esto genera un problema, ya que la mayoría de productos comercializados como funcionales no presentan estudios que respalden las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los extractos herbales utilizados en su elaboración. Por lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue evaluar las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de diferentes extractos herbales acuosos propuestos para la elaboración de bebidas funcionales, entre las que se incluyen: flor de Jamaica, hierbabuena, hierba del sapo y cocolmecha en un modelo *in vitro*. Para lo anterior, se empleó un cultivo de macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados con LPS (1 µg/mL) y los resultados indican que los extractos herbales de flor de jamaica y hierbabuena no mostraron un efecto citotóxico significativo en el intervalo de concentraciones de 2 a 50 mg/mL; mientras que, el extracto de cocolmecha mostró toxicidad a la concentración más alta. Por el contrario, el extracto de la hierba del sapo disminuyó significativamente la viabilidad a partir de la concentración de 6 mg/mL. En lo que respecta a la actividad antiinflamatoria, los resultados indican que el extracto de flor de Jamaica disminuyó la producción de nitritos (como un indicador de la concentración de ON) de manera dosis-dependiente, hasta en un 63.5%, no observándose efecto alguno con el extracto de hierbabuena. Los resultados anteriores son de gran relevancia, ya que las concentraciones de los extractos empleados en este estudio son relativamente elevadas, lo que podría sugerir la falta de toxicidad para los extractos acuosos de flor de jamaica, hierbabuena y cocolmecha. Los resultados de la cuantificación por qPCR sugieren que si bien los mecanismos antioxidantes pueden ser estimulados por los compuestos bioactivos presentes en los extractos de flor de jamaica y hierba buena, estos se ven afectados significativamente en presencia de un estímulo proinflamatorio; por lo anterior se podría inferir que el mecanismo está regulado por el complejo Nrf2/Keap1/Ikb. Sin embargo, es importante ampliar la evaluación de las propiedades biológicas de dichos extractos herbales que se tienen como candidatos para la elaboración de bebidas funcionales.

**Palabras clave:** Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), hierbabuena (*Mentha piperita*), cocolmecha (*Smilax cordifolia*), hierba del sapo (*Eryngium heterophyllum*), D3T, óxido nítrico.

## ABSTRACT

Plants constitute a primary and large source of preventive compounds against several human diseases, mainly those associated to oxidative stress and inflammatory processes. In Mexico, the therapeutic use of herbal preparations is a widely common practice and, nowadays, there is growing interest in their use as ingredients in functional foods, such as beverages. However, there is a lack of evidence-based research for most of the products commercially available to confirm the biological properties. Therefore, our objective was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory properties of the aqueous extracts of roselle flowers (*Hibiscus sabdariffa*), peppermint (*Mentha piperita*) leaves, *Smilax cordifolia* root and *Eryngium heterophyllum* leaves in mouse RAW 264.7 macrophages stimulated by bacterial lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL). Our results indicated the lack of toxicity exhibited by the aqueous extracts of roselle flowers and peppermint leaves at the doses evaluated (2 – 50 mg/mL); meanwhile, *Smilax cordifolia* root extract diminished cell viability at highest concentration. On the contrary, the aqueous extract of *E. heterophyllum* significantly decreased cell viability at a lower dose (6 mg/mL). On the other hand, the aqueous extract of roselle flowers showed a significant anti-inflammatory activity by decreasing the nitric oxide production in a dose-dependent manner (up to 63.5%), whereas no effect was observed with peppermint extract. In addition, we included a well-known inducer of various antioxidants and phase 2 enzymes, D3T (3H-1,2-dithiole-3-thione), and the results suggested that this thiole-thione compound also exhibits anti-inflammatory activity. Our results of lack of toxicity for the aqueous extracts of roselle flowers, peppermint leaves and *Smilax cordifolia* root at the doses evaluated are of major relevance, since we intend to use them in order to reduce the public health burden of chronic disease through natural resources consumed preferably as beverages. The results of the qPCR quantification show that even if the bioactive compounds present in the roselle flowers and peppermint extracts can stimulate the transcription of antioxidant genes, a significantly negative expression is observed in presence of a pro-inflammatory agent LPS; Thus suggesting that both effects might be modulated by the Nrf2/Keap1/Ikb complex. However, further studies are required in order to explore other biological properties and their mechanism of action.

**Key words:** roselle flowers (*Hibiscus sabdariffa*), peppermint (*Mentha piperita*), *Smilax cordifolia*, *Eryngium heterophyllum*, D3T, nitric oxide.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Quiero agradecer a la Dra. Minerva Ramos por todo su apoyo a lo largo de este camino, por su asesoría y consejos ya que no sólo me ayudó en lo académico sino también a crecer de forma personal; por brindarme la confianza de hacer y deshacer en su laboratorio, créame que eso es algo que contribuyo mucho para mi formación.

A los integrantes de mi comité, por sus aportaciones para la realización de este proyecto y siempre estar dispuestos a ayudarme en lo académico y personal.

Al M. en C. Luis Alberto Madrigal futuro Dr. ya que me permitió no solo conocerlo como asesor sino también como amigo y compañero.

A mis compañeros de laboratorio que aunque somos pocos nunca faltaron los buenos momentos, en lo que pueda apoyarlos en lo futuro ahí estaré.

A mis padres por siempre darme la oportunidad y la libertad de seguir en el camino que elegí, su apoyo siempre será pieza fundamental de este y todos los proyectos futuros que pueda realizar.

A mis hermanos Isaac, Abraham y Neftalí porque siempre están ahí para sacarme un ratito de lo que tengo que hacer y relajarme.

Compañeros míos, creo que recorrer estos dos años sin ustedes de ninguna manera hubiera sido lo mismo por lo cual les estoy muy agradecido; y por último a una persona que conocí en el posgrado, por estar conmigo y apoyarme a seguir adelante.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
2.1. Inflamación .....	2
2.1.1. Células y elementos en la inflamación .....	2
2.1.2. Inflamación aguda .....	3
2.1.3. Inflamación crónica .....	4
2.1.4. Medidores de inflamación.....	5
2.1.4.1. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	6
2.1.4.2. Interleucina-1 (IL-1) .....	7
2.1.4.3. Interleucina 6 (IL-6) .....	7
2.1.4.4. Ciclooxygenasa-2 (COX 2) .....	8
2.1.4.5. Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) .....	8
2.2. Estrés oxidativo .....	8
2.2.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	9
2.3. Estrés nitrosativo .....	10
2.3.1. Respuesta antioxidante .....	11
2.3.1.1 Hemo oxigenasa 1 (HO-1) .....	11
2.3.1.2. DT-diaforasa NAD(P)H: quinona óxido reductasa (NQO1).....	12
2.4. Moléculas relacionadas con inflamación y respuesta antioxidante ..	12
2.4.1. Factor potenciador de las cadenas ligeras kappa en células B activadas (NF- $\kappa$ B).....	13
2.4.2. Respuestas fisiológicas mediadas por NF- $\kappa$ B .....	13
2.4.3. Factor de regulación nuclear 2 (Nrf2) .....	15
2.4.4. Regulación de la actividad y expresión de Nrf2 por Keap1 .....	16
2.5. Actividad anti-inflamatoria de los fenoles presentes en los alimentos ..	20
2.5.1. Flor de Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ) .....	23
2.5.2. Hierbabuena ( <i>Mentha piperita</i> ) .....	24
2.5.3. Hierba del sapo ( <i>Eryngium heterophyllum</i> ).....	24
2.5.4. Raíz de cocolmea ( <i>Smilax cordifolia</i> ).....	25

<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>4.1. Objetivo general</b> .....	27
<b>4.1.1. Objetivos específicos</b> .....	27
<b>V. METODOLOGÍA</b> .....	28
<b>5.1. Diagrama experimental</b> .....	28
<b>5.2. Cultivo de macrófagos</b> .....	28
<b>5.3. Cinética de crecimiento</b> .....	29
<b>5.4. Tratamientos</b> .....	29
<b>5.5. Viabilidad celular</b> .....	30
<b>5.6. Extracción de RNA total en cultivo celular adherente</b> .....	32
<b>5.7. Obtención del DNAc</b> .....	34
<b>5.8. Reacción de PCR</b> .....	34
<b>5.9. Análisis estadístico</b> .....	35
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	36
<b>6.1. Cinéticas de crecimiento</b> .....	36
<b>6.2. Viabilidad y citotoxicidad celular</b> .....	36
<b>6.3. Inhibición de la producción de óxido nítrico (ON)</b> .....	41
<b>6.4. Reacción de PCR</b> .....	45
<b>6.5. Curvas de calibración y disociación de qPCR</b> .....	47
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	54
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	60
<b>8.1. Condiciones del cultivo de macrófagos</b> .....	60
<b>8.2. Cambio de medio para cultivo adherente</b> .....	60
<b>8.3. Transferencia de células</b> .....	61

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición fenólica de los extractos acuosos bajo estudio	22
2	Cuantificación de los genes evaluados por qPCR.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto del ON.....	11
2	Mecanismo de activación Ikk/NF- $\kappa$ B.....	15
3	Activación de elementos de respuesta antioxidante.....	16
4	Complejo Ikk-Keap1-Nrf2.....	20
5	Diagrama experimental.....	28
6	Cinética de crecimiento.....	37
7	Efecto de los extractos herbales y del D3T sobre la viabilidad celular de macrófagos.....	40
8	Efecto de los extractos herbales y del D3T sobre la viabilidad celular de macrófagos estimulados con LPS.....	41
9	Inhibición de la producción de ON por los extractos herbales	44
10	Extracción de RNA total.....	45
11	Amplificación de genes antioxidantes y pro-inflamatorios....	46
12	Curvas de calibración qPCR.....	47
13	Curvas de disociación de “primers”.....	49
14	Gráficos de cuantificación de RNAm de los genes antioxidantes y pro inflamatorios de diferentes tratamientos	51



## **I. INTRODUCCIÓN**

Los procesos inflamatorios, así como el estrés producidos por un exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO) sin un proceso regulatorio adecuado, son condiciones que anteceden a cuadros inflamatorios agudos y crónicos que pueden derivar en enfermedades crónico degenerativas tales como: cáncer, aterosclerosis, asma, enfermedades autoinmunes, diabetes, obesidad, entre otras.

Investigaciones a través de los años han generado información sobre genes regulados por factores de transcripción relacionados con procesos inflamatorios, como el factor potenciador de las cadenas ligeras kappa en células B activadas (NF-kB). Por esta razón, la inhibición/regulación de mediadores y citocinas pro-inflamatorias se ha propuesto como una estrategia alternativa para la prevención o tratamiento de varias enfermedades inflamatorias.

En nuestro país varias de estas afecciones van en aumento; por ello, es importante generar estrategias que contribuyan a la disminución de este tipo de desórdenes. Una alternativa importante es el uso de plantas con propiedades terapéuticas; éstas pueden ser empleadas en distintas formas para diseñar productos con valor agregado, conocidos como alimentos funcionales. Una línea de alimentos funcionales en constante desarrollo es la referente a bebidas funcionales, con un aumento aproximado del 6% anual; ésta ofrece un marco bastante amplio para la incorporación de extractos herbales con actividad antiinflamatoria y/o antioxidante.

La información que derive de esta investigación y futuros proyectos es importante para generar evidencia sobre los beneficios de diferentes extractos herbales, así como para validar la seguridad y efectividad del uso “tradicional” de estos y proponer nuevas fuentes naturales con potencial antiinflamatorio y/o antioxidante.

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1. Inflamación**

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector, cuyo objetivo es defender al organismo de la lesión iniciada por microorganismos, toxinas, alérgenos, entre otros factores (Zulet, 2007). Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son, en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y por tanto, altamente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, además, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes (Gallin, 1989; Male y col., 1991; Roit y col., 1992).

#### **2.1.1. Células y elementos en la inflamación**

De forma esquemática, el proceso inflamatorio se puede dividir en cinco etapas:

- Liberación de mediadores. Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el macrófago, u otras células del sistema inmune, bajo la actuación de determinados estímulos.
- Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
- Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de

mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso (homeóstasis).

- Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

Contrario a lo que se cree, la inflamación es una respuesta protectora, cuyo principal objetivo es librar al organismo del elemento causante del daño celular y de las consecuencias de ese daño, con formación de células y tejidos necróticos. Sin la inflamación, las infecciones se diseminarían y las heridas no cicatrizarían. Por otro lado, la inflamación no controlada adecuadamente es la base de las reacciones de hipersensibilidad y enfermedades crónicas (Enciso y Arroyo, 2011).

### **2.1.2. Inflamación aguda**

La inflamación aguda es una respuesta rápida a un agente lesivo, microorganismo y a otras sustancias extrañas. Esta respuesta está diseñada para liberar leucocitos (precursores de los macrófagos) y proteínas plasmáticas en los sitios de lesión; en el foco lesivo, los leucocitos eliminan los agentes lesivos y comienzan el proceso de digerir y eliminar el tejido necrótico.

Existen diferentes estímulos que activan mecanismos de inflamación aguda, de los que podemos mencionar:

- Infecciones (bacterianas, víricas, fúngicas, parasitarias) se encuentran dentro de las causas más comunes y médicamente importantes de inflamación.
- Traumatismos (contusos y penetrantes) y agentes físicos o químicos (lesión térmica, radiación, sustancias corrosivas) lesionan las células del huésped y desencadenan reacciones inflamatorias.
- Necrosis tisular, incluida la isquemia.
- Reacciones inmunes (hipersensibilidad) frente a sustancias ambientales o contra el huésped (autoinmune).

Dado que estos estímulos para las respuestas inflamatorias no pueden eliminarse, estas reacciones tienden a ser persistentes, tienen con frecuencia características de inflamación crónica lo que las convierte en causa importante en la morbilidad y mortalidad. Cada uno de estos estímulos puede inducir reacciones con características distintivas, pero todas las reacciones inflamatorias tienen las mismas características básicas.

Los leucocitos activados, en especial los macrófagos, secretan una amplia variedad de citocinas que estimulan el proceso inflamatorio, por lo que también son capaces de dañar tejidos sanos (consecuencias patológicas de la inflamación) (Robbins, 2008).

### **2.1.3. Inflamación crónica**

La inflamación crónica es un proceso inflamatorio de duración prolongada (semanas, meses y años) en el que la inflamación activa, la lesión tisular y la cicatrización suceden simultáneamente. En contraste con la inflamación aguda, que puede distinguirse por cambios vasculares, edema y un filtrado predominante de neutrófilos, la inflamación crónica se caracteriza por:

- Infiltración con células mononucleares, como neutrófilos.
- Destrucción tisular, en gran medida inducida por los productos de las células que promueven la respuesta inflamatoria.
- Reparación, que implica la proliferación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y fibrosis (Cotran, 2011).

La inflamación aguda puede progresar a un estado de inflamación crónica; esta transición se produce cuando no puede regularse la respuesta aguda, ya sea por la persistencia del agente lesivo o por interferencia con el proceso de reparación normal.

Los macrófagos son las células dominantes en la inflamación crónica, son células tisulares derivadas de los monocitos de la sangre circulante. Los macrófagos se

hallan normalmente diseminados de modo difuso en la mayoría de los tejidos conjuntivos y órganos. En todos los tejidos, los macrófagos actúan como filtros para la materia particulada, microbios y células senescentes, así como de centinelas para alertar a los componentes específicos del sistema inmune frente a los agentes lesivos (Cotran, 2011).

Después de su activación, los macrófagos secretan una amplia variedad de productos biológicamente activos o mediadores de inflamación que, si no son regulados apropiadamente, pueden dar lugar a lesión tisular y fibrosis (característicos de inflamación crónica). Estos productos incluyen:

- Proteasas ácidas y neutras; las proteasas neutras están implicadas también como mediadores de daño en la inflamación aguda.
- Especies reactivas de oxígeno (ERO) y óxido nítrico (ON)
- Citocinas como la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), como también una variedad de factores de crecimiento que influyen en la proliferación celular (Robbins, 2008).

#### **2.1.4. Medidores de inflamación**

Los mediadores pueden ser producidos localmente por células en el sitio de la inflamación o pueden estar circulando en plasma (liberados por el hígado). Estos mediadores derivados de células del sistema inmune principalmente, se encuentran regularmente contenidos en gránulos intracelulares y son liberados en respuesta a un estímulo o se sintetizan *de novo* (prostaglandinas y citocinas); Algunos de estos mediadores tienen actividad enzimática directa, tóxica o ambas (proteasas lisosómicas y ERO).

Dentro de los mediadores del proceso inflamatorio más importantes podemos mencionar a IL-1 y TNF- $\alpha$ , los cuales son producidos por macrófagos activados, células cebadas, células endoteliales y algunos otros tipos de células. Su función principal en la inflamación es la activación endotelial, que da como resultado el

reclutamiento de leucocitos; TNF- $\alpha$  aumenta también la trombogenicidad del endotelio que produce agregación y activación de neutrófilos.

Aunque TNF- $\alpha$  y IL-1 son secretados por macrófagos y otras células en los sitios de inflamación, pueden entrar a circulación y actuar en sitios diferentes para inducir la reacción de fase aguda sistémica que es asociada a infecciones y enfermedades inflamatorias (Robbins, 2008).

#### **2.1.4.1. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

El TNF fue identificado inicialmente como mediador de la necrosis tumoral en el suero de ratones tratados con lipopolisacárido (LPS) produciendo necrosis hemorrágica y completa regresión de tumores transplantados; también se le ha detectado en muerte de células tumorales *in vivo* (Valencia, 2002).

Originalmente, el término TNF se refería a dos citocinas fuertemente relacionadas, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ , ambas interactúan con los mismos receptores desplegando una amplia variedad de respuestas inmunológicas y han sido relacionadas como mediadores patogénicos de enfermedades en humanos (Tracey y Cerami, 1994; Sacca y col., 1998).

Las células B y T producen cantidades significativas de TNF- $\alpha$ , pero es primordialmente producida por monocitos o macrófagos, siendo los macrófagos activados la principal fuente celular. La cantidad de TNF- $\alpha$  producido depende del estado de activación de la célula y el tipo de estímulo. La activación de macrófagos por LPS da como resultado una fuerte inducción de TNF; la tasa de transcripción se incrementa considerablemente tanto en RNAm (incremento de un 50% a 100%) como en secreción de la proteína (Wilson y col., 1997).

El TNF- $\alpha$  es causante de una gran variedad de respuestas celulares y orgánicas dentro de las que se incluye fiebre, daño tisular, necrosis, anorexia, inducción de otras citocinas, moléculas inmunoreguladoras, de proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Liu y col., 1996).

#### **2.1.4.2. Interleucina-1 (IL-1)**

La IL-1 es una citocina pro-inflamatoria y pleiotrópica que induce de manera local y sistémica mecanismos contra infecciones o agentes lesivos. Esta citocina promueve la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, las cuales en conjunto con quimiocinas, estimulan la infiltración de células inmunocompetentes e inflamatorias (Dinarello, 2009).

La IL-1 causa fiebre, vasodilatación, disminución en la presión arterial y un incremento en la sensibilidad al dolor; por lo anterior, su actividad puede considerarse un mediador central en la inflamación aguda y crónica; lo que representa un blanco terapéutico importante (Dinarello, 2004). La expresión de IL-1 está regulada a nivel transcripcional por NF- $\kappa$ B que también es responsable de la expresión de TNF- $\alpha$ ; así mismo, la IL-1 y TNF- $\alpha$  pueden activar a NF- $\kappa$ B creando un círculo vicioso característico de la inflamación crónica (Feldmeyer y col., 2010).

El receptor antagónico de la IL-1 es un inhibidor de su actividad. Este antagonista se fija al receptor de membrana de la IL-1 prácticamente con la misma afinidad que la citocina. El resultado final es el bloqueo de la actividad biológica de la IL-1; sin embargo, el bloqueo no se traduce en la disminución de la mortalidad en experimentos con pacientes que presentan choque séptico (Fisher y col., 1994).

#### **2.1.4.3. Interleucina 6 (IL-6)**

La IL-6 es una citocina circulante que secretan diferentes células, incluidas los macrófagos y linfocitos activados (Yudkin y col., 2000). La inflamación es el estímulo principal de la producción de IL-6, pero existen otros como el humo del tabaco y la acumulación de tejido adiposo (Harris y col., 1999).

La síntesis hepática de la proteína C reactiva (PCR) está en gran medida regulada por la IL-6 (Pasulka y col., 1985; Roytblat y col., 2000), que se cree representa el principal regulador de la respuesta hepática en la fase aguda durante estímulos dolorosos como trauma, infección, intervenciones y quemaduras.

Por otra parte, la obesidad contribuye al mantenimiento de un estado de inflamación crónica y en los últimos años se ha reportado que la IL-6 plasmática esta relacionada con el grado de obesidad y la resistencia a la insulina (Bastard y col., 2002). Se ha demostrado en humanos una correlación significativa entre los niveles circulantes de IL-6 y el incremento en la resistencia a la insulina, sugiriendo una participación en la resistencia por la alteración de la señalización en hepatocitos al inhibir la autofosforilación del receptor de insulina (Senn y col., 2002).

#### **2.1.4.4. Ciclooxygenasa-2 (COX-2)**

La COX-2 es una enzima que limita la tasa de producción de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TxB) a partir de ácido araquidónico libre. Esta enzima no se expresa normalmente, pero aparece rápidamente tras la exposición de la célula a agentes, como LPS o citocinas proinflamatorias, y regula la producción de los prostanoideos que participan en la inflamación (Prado, 2009).

COX-2 está generalmente regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional, aunque también puede ser regulada por la tasa de síntesis/degradación de la proteína; el promotor de COX-2 en humanos contiene múltiples sitios de unión a factores transcripcionales, incluyendo factores moleculares como la IL-6 y NF- $\kappa$ B. (Prado, 2009).

#### **2.1.4.5. Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)**

El óxido nítrico (ON) se sintetiza a partir de la L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés) (Geller y Billiar, 1998). La isoforma inducible de esta enzima (iNOS) no requiere  $\text{Ca}^{2+}$  para su función y se expresa en diversos tipos celulares, principalmente macrófagos y células endoteliales. La iNOS permite que las células liberen grandes cantidades de ON en respuesta a citocinas como el interferón gamma (IFN $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  y IL-1 (Nathan, 1994).

## **2.2. Estrés oxidativo**



El cuerpo humano mantiene un balance de *redox* (óxido-reducción) constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes y los sistemas antioxidantes. La pérdida de este balance lleva a un estado de estrés oxidativo, caracterizado por un aumento en los niveles de RL y ERO, que no alcanza a ser compensado por los sistemas antioxidantes induciendo daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; esto ocurre principalmente en patologías degenerativas y/o procesos inflamatorios (Beckman y B.N., 1998; Carrillo Calvillo y Bear Sandoval, 2004).

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos (algunos veces siendo la causa primaria y en otros agudizando las complicaciones) en los cuales se ve altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, cáncer, entre otras.

### **2.2.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)**

Los organismos en condiciones aeróbicas tienen la característica de generar formas parcialmente reducidas de oxígeno ( $O_2$ ) que comúnmente se conocen como ERO (Di Mascio y col., 1991). Son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos entre los que podemos mencionar la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones y reacciones de oxidación, entre otras, siendo la primera la principal fuente de EROs.

En condiciones normales, la célula metaboliza la mayor parte del oxígeno con la formación de agua sin formación de intermediarios nocivos; sin embargo un pequeño porcentaje del metabolismo forma dos intermediarios altamente tóxicos, los cuales son radicales libres (anión superóxido e hidroxilo). En situaciones donde exista una mayor actividad metabólica (etapas de crecimiento y desarrollo o procesos inflamatorios) ocurre una mayor demanda tisular de oxígeno, lo que conlleva a una mayor generación de especies oxidantes (Avello y Suwalsky, 2006).

La acumulación de estos radicales modifican el funcionamiento normal de las células, debido a la modificación en el estado redox dentro de la célula o directamente alterando biomoléculas como proteínas y el material genético. Lo que puede derivar en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas.

### **2.3. Estrés nitrosativo**

El óxido nítrico (ON), uno de los factores relajantes del musculo liso vascular, es un monóxido de nitrógeno y radical libre producido a partir del aminoácido L-arginina por un grupo de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS) (Guzmán y col., 2006). Existen tres isoenzimas con esa actividad: la neuronal (nNOS o tipo 1), la inducible (iNOS o tipo 2) y la endotelial (eNOS o tipo 3) (Bredt y Snyder, 1994; Stuehr, 1997).

A excepción de la iNOS, todas las NOS son constitutivas, es decir, se encuentran presentes en cantidades constantes en los tejidos. Además de su efecto vasorrelajante, el ON tiene otros efectos tanto fisiológicos como patológicos, los cuales dependen de la reacción en que participa, las moléculas con que reacciona y el tipo de célula donde actúa. Por otro lado, el tipo de reacciones en las que el ON participa depende de las concentraciones con respecto al tiempo en un ambiente químico específico. Es importante señalar que, a diferencia de otras moléculas de señalización, la inactivación del ON depende sólo de su reactividad química con otras moléculas (Figura 1). Se pueden clasificar los efectos biológicos del ON en dos: los efectos directos producidos de la reacción con moléculas blanco y los efectos indirectos, los cuales se producen por la interacción de compuestos reactivos derivados del ON con otras moléculas. Los efectos indirectos del ON se presentan cuando éste se encuentra en concentraciones de hasta 10  $\mu\text{M}$  por periodos prolongados (generalmente producidos por la iNOS) (Guzmán, 2006).

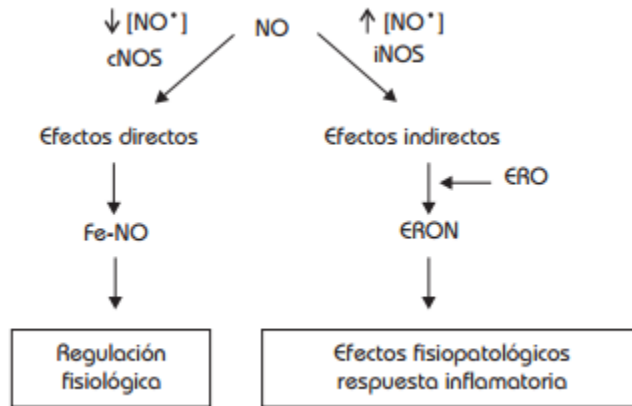


Figura 1. Efecto del ON (Guzmán, 2006)

### 2.3.1. Respuesta antioxidante

La exposición a las ERO producidas por una diversa cantidad de procesos fisiológicos o ambientales ha llevado al organismo a desarrollar numerosos mecanismos de defensa (Cadenas, 1997). Los organismos se protegen contra el estrés oxidativo inducido por las ERO con mecanismos que pueden ser preventivos, de reparación, defensas físicas y defensas antioxidantes. Estos últimos son de los más importantes y están compuestos por enzimas antioxidantes como la hemo oxigenasa 1 (HO-1), DT-diaforasa NAD(P)H: quinona óxido reductasa (NQO1); otros mecanismos son los no enzimáticos entre los que se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatión reducido (GSH), carotenoides, flavonoides y entre otros antioxidantes. En condiciones normales, existe un equilibrio entre las ERO y las defensas antioxidantes esto mantiene las condiciones necesarias para la supervivencia y buen funcionamiento de las células.

#### 2.3.1.1 Hemo oxigenasa 1 (HO-1)

La hemo oxigenasa (HO) cataliza la conversión del grupo hemo en biliverdina,  $\text{Fe}^{2+}$  y monóxido de carbono. En mamíferos, se ha descrito la expresión de al menos dos isoformas funcionales de HO codificadas por genes diferentes, cuyas secuencias de aminoácidos son idénticas sólo en 43% (Maines, 2005) y se

denominan HO-1 y HO-2. La expresión de la HO-1 se induce principalmente como respuesta a su sustrato, el grupo hemo, y también por una gran variedad de estímulos, entre los que se encuentran: medicamentos, metales, radiación ultravioleta, hipoxia, hiperoxia, isquemia, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y depleción de glutatión entre otros (Orozco, 2008). Como varios de los estímulos que inducen la expresión de la HO-1 son pro-oxidantes y se ha encontrado evidencia que indica que la inducción de HO-1 provee de efecto protector en modelos *in vitro* e *in vivo* asociados al estrés oxidativo, se ha considerado que la activación del gen de HO-1 representa un mecanismo de defensa celular (Soares, 2009).

#### **2.3.1.2. DT-diaforasa NAD(P)H: quinona óxido reductasa (NQO1)**

La quinona oxidoreductasa (NQO1) es una enzima capaz de reducir quinonas a hidroquinonas (Ross y col., 2000), utiliza como donadores de electrones para este mecanismo NADPH o NADH indistintamente (Hosoda y col., 1974).

La capacidad de la NQO1 para realizar esta reducción es esencial en su función como antioxidante y en la protección contra sustancias tóxicas, el mecanismo de reacción evita la formación de intermediarios semiquinónicos, estos son normalmente inestables y tienden a reaccionar con el oxígeno con facilidad (Lind y col., 1990).

La expresión de NQO1 se regula principalmente por el factor de transcripción Nrf2 (Jaiswal, 2000), la inducción puede deberse a la acción de diversos genes en respuesta a situaciones mediadas por agentes xenobióticos, oxidantes, luz ultravioleta o radiaciones ionizantes (Jaiswal, 2004).

#### **2.4. Moléculas relacionadas con inflamación y respuesta antioxidante**

Dentro del efecto de mediadores y regulación de proceso inflamatorio se encuentran algunas de las moléculas que son parte fundamental de la evaluación antiinflamatoria de los compuestos herbales que serán parte del estudio. Entre éstas se puede mencionar las siguientes proteínas o factores de transcripción:

#### **2.4.1. Factor potenciador de las cadenas ligeras kappa en células B activadas (NF-κB)**

Este factor participa principalmente en la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa a distintos niveles. En *Drosophila*, por ejemplo, se ha encontrado que transcribe genes con actividad bactericida o fungicida (Gonzalez y Levine, 1994). En experimentos con mamíferos se ha observado que tiene una participación importante en los procesos inflamatorios, la respuesta a estrés, la diferenciación y activación de células inmunes como linfocitos T y B.

#### **2.4.2. Respuestas fisiológicas mediadas por NF-κB**

La variedad de señales que puede activar este factor es reflejo de la cantidad de eventos con que se ha relacionado. Los más estudiados son aquellos relacionados con citocinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , los estímulos mitogénicos (inducen mitosis celular) como ésteres de forbol (PMA, por sus siglas en inglés), los relacionados con agentes infecciosos como lipopolisacárido bacteriano (LPS, constituyente de la membrana externa de bacterias Gram negativas) y expresión de antígenos virales.

Se ha descrito que NF-κB puede ser activado por eventos relacionados con daño celular como radiación ultravioleta (UV) o estrés oxidativo (Schmidt, 1995), exposición a metales (Goebeler, 1995) y fenómenos particulares como el aumento de los niveles citoplásmicos de calcio. La activación de NF-κB es sensible en muchos casos al estado redox o a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes; por lo tanto, NF-κB puede ser regulado por el estado de oxidorreducción general de la célula (Li y Karin, 1999).

La activación o la sobreexpresión del factor NF-κB se asocia con cáncer y metástasis, por el papel de este factor de transcripción en la regulación de la progresión del ciclo celular. NF-κB es importante en el desarrollo normal del ciclo celular e interviene en la regulación de la ciclina D1, también importante en muerte celular. Algunos tumores expresan de forma constitutiva la activación de NF-κB

(Baldwin, 1996; Orłowski y Baldwin, 2002). Así, un número considerable de esquemas terapéuticos anticancerosos tienen como clave la modulación de la actividad de NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B responde a una gran cantidad de señales y activa también una importante cantidad de genes (Sen y Baltimore, 1986). Es importante tener en cuenta que NF- $\kappa$ B forma parte de la familia Rel, que se fijan a las proteínas  $\kappa$ B del ADN.

NF- $\kappa$ B se presenta de forma inactiva ligado a su inhibidor I kappa B (I  $\kappa$ B) dentro del citoplasma o como forma activa dentro del núcleo. Los distintos dímeros de NF- $\kappa$ B presentan actividades transcripcionales y la capacidad de los dímeros de reconocer las distintas zonas  $\kappa$ B del ADN, explica que las subunidades de NF- $\kappa$ B puedan regular la expresión de distintos genes (Lee y Burckart, 1998). La activación de NF- $\kappa$ B se realiza bajo la actuación de ERO, citocinas, estrés, estímulos químicos (agentes quimioterápicos, agentes oxidantes) e inhibidores de Ser/Tyr-fosfatasa.

La vía de señalización I $\kappa$ k/NF- $\kappa$ B juega un papel fundamental en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, una de las funciones de NF- $\kappa$ B es promover la supervivencia celular a través de la expresión de genes específicos, los que inhiben intermediarios en el mecanismo de apoptosis tanto en células normales como en células de cáncer.

El mecanismo de activación IKK/NF- $\kappa$ B contribuye a que los procesos inflamatorios deriven en patologías como el cáncer, esto basado en los múltiples genes que activa NF- $\kappa$ B para la supervivencia y proliferación celular. Recientemente, se ha establecido una estrecha relación entre la activación de NF- $\kappa$ B y cáncer, la asociación de NF- $\kappa$ B con la evolución de procesos inflamatorios a tumores (incluido el proceso de metástasis) está bien documentada en modelos animales. La vía de activación de NF- $\kappa$ B dependiente de IKK $\beta$  es una relación a nivel molecular crítica entre procesos inflamatorios y cáncer de colon en ratones.

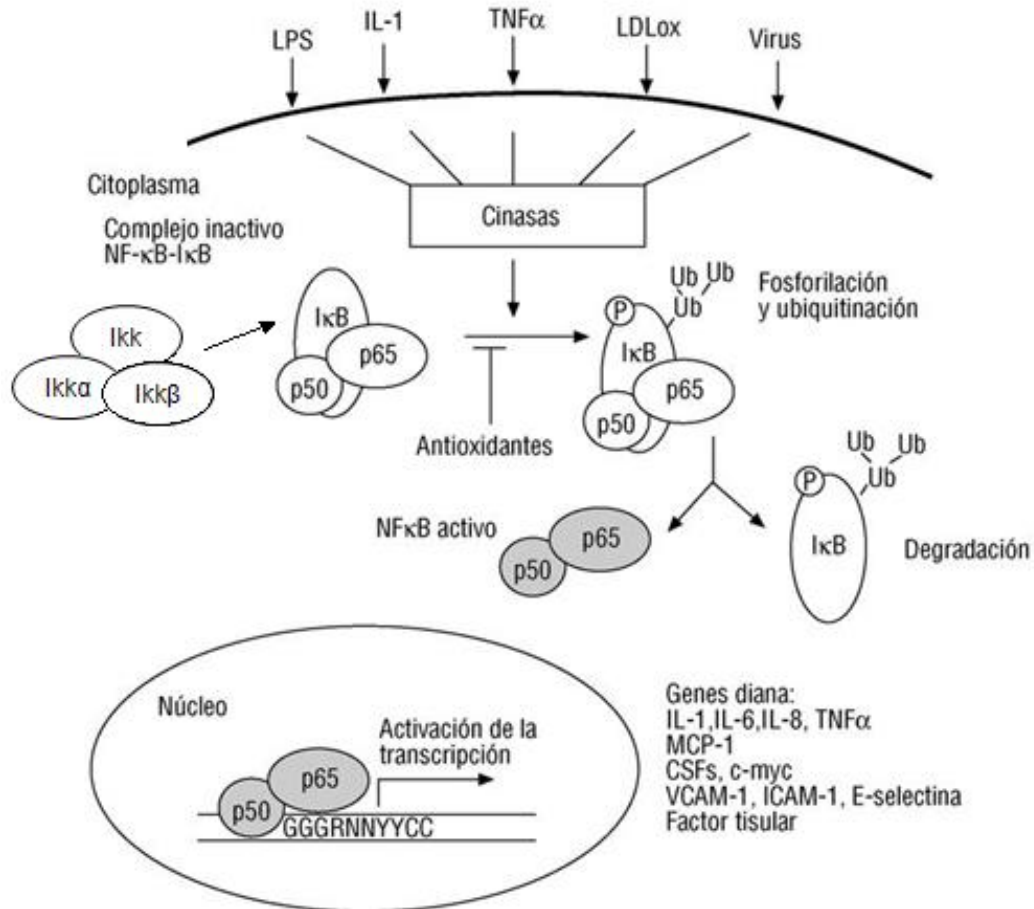


Figura 2. Mecanismo de activación IKK/NF-κB. Adaptado de Martínez-González y col., 2001; Jun-Li y col., 2013.

### 2.4.3. Factor de regulación nuclear 2 (Nrf2)

El factor de transcripción Nrf2 regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia conservada altamente específica en el ADN conocida como ARE (por sus siglas en inglés, Antioxidant Response Element), la translocación de Nrf2 al núcleo para la activación de ARE puede darse por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa.

La actividad de Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con la proteína de asociación ECH tipo kelch 1 (Keap1). Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra varias patologías como el

cáncer, la toxicidad hepática (causada por un incremento de ERO) y la inflamación.

Se ha sugerido que el incrementar la actividad de Nrf2 pudiera llegar a ser un método para combatir el cáncer y otras enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Sin embargo, se ha observado que la activación constitutiva de Nrf2, debido a mutaciones en Keap1, es una característica en células de cáncer de pulmón, sugiriendo que la expresión inducida y constante de los genes activados por Nrf2 favorece la supervivencia celular y la prevalencia de células de cáncer (Taguchi y col., 2011).

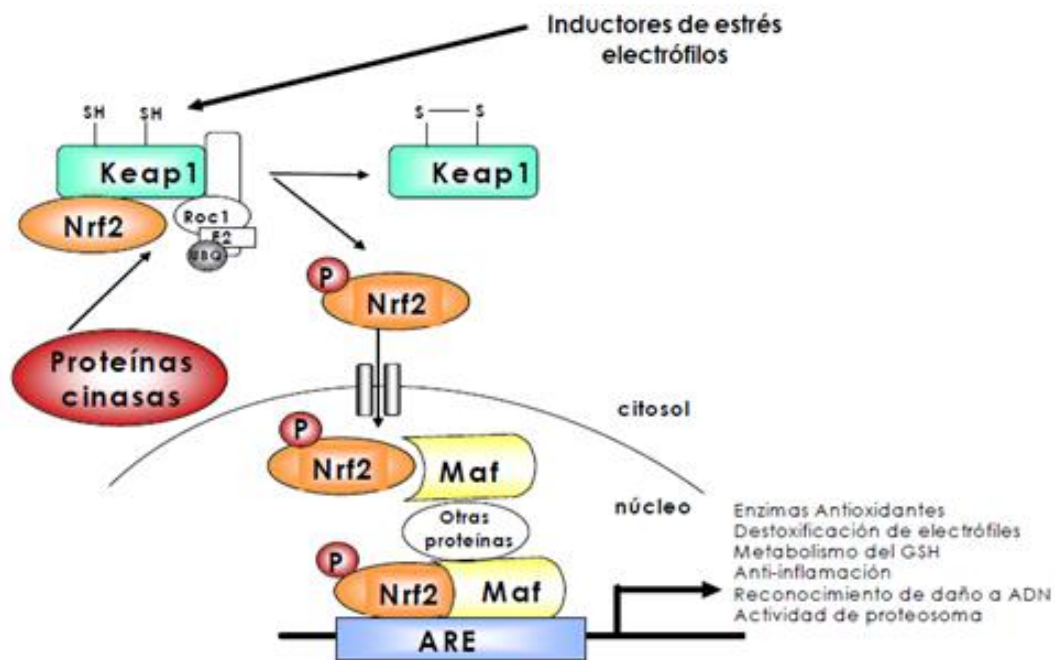


Figura 3. Activación de elementos de respuesta antioxidante por Nrf2 (Königsberg, 2007)

#### 2.4.4. Regulación de la actividad y expresión de Nrf2 por Keap1

Al realizar análisis sobre diversas secuencias de Nrf2 en varias especies, se encontraron seis dominios bien conservados llamados Neh (Nrf2-ECH homologous domain) (Itoh y col., 1995). Al principio se pensó que estos dominios



tenían la función de contribuir a la actividad molecular de Nrf2; investigaciones posteriores demostraron que en algunos de estos sitios se anclan proteínas que regulan la actividad de Nrf2, siendo este el caso de Keap1.

Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, no se encuentra libre y activo todo el tiempo. La célula debe conservar un determinado estado redox para mantener la homeostasis, cambios en el estado redox pueden modificar la actividad de diversas enzimas y factores de transcripción (Königsberg, 2007). A pesar de que es relativamente sencillo encontrar niveles constitutivos de ARNm de Nrf2, resulta difícil detectar la proteína madura, lo que sugiere su rápida degradación dentro de la célula. La vida media de Nrf2 se ha estimado en un tiempo menor a 20 minutos en macrófagos y en varias líneas celulares.

Un análisis de la actividad de Nrf2 usando dos sistemas de hibridación en levadura (Itoh y col., 1999), llevaron a la identificación de la proteína Keap1, quien suprime hasta un 80% la translocación nuclear de Nrf2 y por lo tanto la actividad transcripcional de Nrf2. Esta interacción se ha confirmado *in vitro* y en sistemas celulares de mamíferos.

El uso de inhibidores del proteosoma indica que la degradación de Nrf2 ocurre mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma (Kobayashi y col., 2006). Esto indicaría que la célula sintetiza y degrada a Nrf2 de manera sistemática, por lo que el control primario de su función radica en su distribución subcelular, más que en síntesis *de novo* (Kensler y Wakabayashi, 2007).

Estudios posteriores demostraron que la sola interacción de Keap1 (por medio del dominio Kelch) con Nrf2 (vía Neh2) es insuficiente para mantener a Nrf2 en el citosol y se ha reportado que Keap1 se asocia al mismo tiempo con el citoesqueleto (Itoh y col., 1999). Keap1 forma un complejo estructural con Nrf2 y los filamentos de actina (Kang y col., 2004), todo esto indica que el complejo

Keap1-Nrf2 se forma y se retiene en el citosol mediante interacciones con el citoesqueleto (Kensler y col., 2007).

Estudios *in vitro* usando Keap1 recombinante y el dominio Neh2 indicaron que el complejo Keap1-Nrf2 se forma en una proporción 2:1 (Wakabayashi y col., 2004). Posteriormente, se observó que Keap1 se encuentra como homodímero y de esta manera es como se une a un Nrf2, mediante dos sitios de reconocimiento con diferente afinidad en el dominio Neh2 (motivos DLG, baja afinidad, y ETGE, alta afinidad). El reconocimiento por ambos sitios tiene importancia fisiológica, ya que se ha demostrado que la delección del motivo DLG (con una afinidad dos órdenes de magnitud menor que ETGE) obstaculiza la ubiquitinación dependiente de Keap1 y la degradación por el proteosoma de Nrf2 (Tong y col., 2006; Kensler y col., 2007).

#### **2.4.5. Keap 1 y su relación con la activación de NF- $\kappa$ B**

La activación de NF- $\kappa$ B está dada en gran medida por el desarrollo y/o progresión del cáncer debido a la regulación de genes involucrados en la proliferación y crecimiento celular, apoptosis, angiogénesis y metástasis. Estudios recientes proponen que cambios genómicos en Keap1 incrementan la tumorigénesis y varias moléculas río abajo relacionadas con NF- $\kappa$ B se ven beneficiadas en diferentes tipos de cáncer, lo que significa que NF- $\kappa$ B está relacionado con la pérdida de la capacidad de Keap1 para limitar el desarrollo de tumores.

Diversos estudios indican que IKK $\beta$  contribuye en el desarrollo de resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. Así mismo, la fosforilación en Ser/Thr en los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1-2, por sus siglas en inglés) juega un papel importante en la resistencia a la insulina, debido al desacoplamiento de la vía de señalización río abajo del receptor IR (White, 2003). Se ha reportado IKK $\beta$  fosforila a IRS1 en múltiples residuos de Ser (Gao y col., 2002).

Otro mecanismo importante por el cual IKK $\beta$  promueve resistencia a la insulina es través de la inducción de citocinas pro-inflamatorias en diferentes tipos de células, especialmente macrófagos (Arkan y col., 2005). La sobre expresión de IKK $\beta$  en hepatocitos causa inducción local y sistémica de genes pro-inflamatorios y de resistencia a la insulina aún en ausencia de obesidad (Cai y col., 2005). Por otro lado, ratones con alteración genética de Ikk $\beta$  en hepatocitos muestran una menor expresión de citocinas pro-inflamatorias y mejora en la producción de glucosa hepática a través de la insulina (Arkan y col., 2005). Estos estudios sugieren que la resistencia a la insulina asociada a obesidad está mediada por la producción de citocinas pro-inflamatorias a través de la actividad de IKK $\beta$ .

La IKK $\beta$  ha sido identificada como otra molécula importante para el complejo Keap1-Cul3 (Figura 4). Se ha visto que IKK $\beta$  promueve la tumorigénesis mediante la fosforilación de supresores de tumores, por lo que se considera una cinasa oncogénica. IKK $\beta$  puede regular la vía de NF-kB teniendo como blanco la proteína inhibitoria Ikb $\alpha$  para la degradación-inactivación del complejo Keap1-Cul3-Bbx en cáncer en humanos lo que resulta en la activación de NF-kB y la inducción de la expresión de Keap1. Esto tiene una implicación clínica muy importante para el tratamiento y prevención de cáncer asociado con inflamación, esto porque el complejo formado por Keap1 pudiera estar generando un equilibrio en los procesos antiinflamatorios y antioxidantes, si se encuentra activo favorecería la vía antioxidante y contribuiría a la regulación de la expresión de citocinas pro inflamatorias por parte de NF-kB.

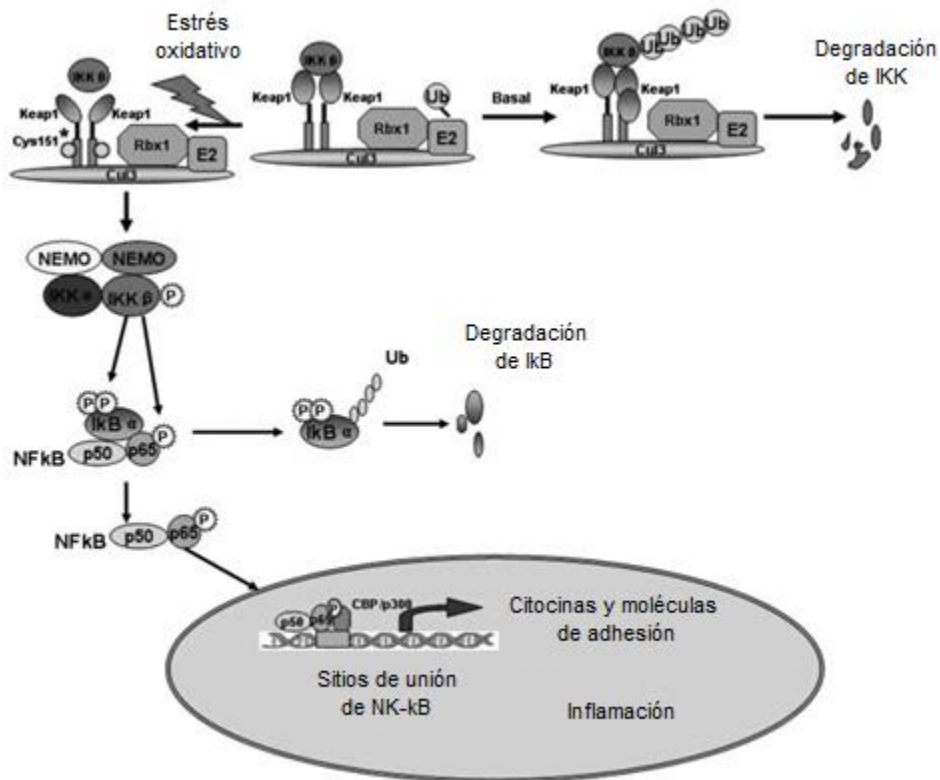


Figura 4. Complejo Ikk-Keap1-Nrf2. Adaptado de Hui y col., 2012.

## 2.5. Actividad anti-inflamatoria de los fenoles presentes en los alimentos

Los flavonoides son la clase predominante de los fenoles presentes en los alimentos, en composición son aproximadamente dos terceras partes de los fenoles consumidos en la dieta humana. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos consumen compuestos fenólicos a diario. El consumo promedio es de 25 mg a 1 g al día dependiendo del tipo de dieta (variedad de frutas y vegetales, granos, té, especias) (Hagerman y col., 1998; Robbins, 2003).

El té se ha usado como bebida de consumo diario y como medicina por cientos de años en China. Esta bebida posee efectos antipiréticos y diuréticos, actividad antioxidante, antimutagénica y anticancerígena, así como también la capacidad para capturar los radicales libres y oxígeno activo, contrarrestando el daño

oxidativo sobre el ADN e inhibiendo la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La ingesta regular de té mejora la capacidad antioxidante *in vivo* y, por lo tanto, disminuye la incidencia de ciertos tipos de enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer y la obesidad (Roedig y Gordon, 1997).

Por otro lado, en hierbas aromáticas tales como salvia (*Salvia officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), ginkgo (*Ginkgo biloba*), artemisa (*Artemisia absinthium*), aloe (*Aloe barbadensis*), valeriana (*Valeriana officinalis*), diente de león (*Taraxacum officinale*), lavanda (*Lavandula officinalis*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), orégano (*Origanum vulgare*), mejorana (*Origanum majorana*), perejil (*Petroselinum sativum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), albahaca (*Ocimum basilicum*), laurel (*Laurus nobilis*), sauco (*Sambucus nigra*), azafrán (*Crocus sativus*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*), diferentes miembros de la familia *Mentha*, entre otras, se ha estudiado la actividad antioxidante y antiinflamatoria así como la composición polifenólica. Cada hierba tiene una composición fenólica diferente por lo que sus propiedades también resultan diferentes. La actividad antioxidante de los flavonoides se incrementa con el número de grupos hidroxilo sustituyentes del anillo B, específicamente en el carbono tres. En este sentido, existe una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de las hierbas, por lo tanto, las hierbas son una buena fuente de antioxidantes naturales (Proestos y col., 2005).

Actualmente, en el grupo de trabajo se están llevando a cabo diversas estrategias para el aprovechamiento de materiales vegetales o hierbas ampliamente consumidas por la población mexicana, con el propósito de incorporarlas o emplearlas como base en la elaboración de bebidas funcionales. Así, materiales vegetales como la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), hierbabuena (*Mentha piperita*), albahaca morada (*Ocimum sanctum*), hierba del sapo (*Eryngium heterophyllum*) y tejocote (*Crataegus mexicana*), entre otros, se están estudiando como parte del proyecto titulado “Desarrollo de bebidas, a base de extractos naturales para el control de la obesidad y sus problemas asociados”, a cargo de la

Dra. Rosalía Reynoso Camacho (FOMIX-QRO-CONACYT) y actualmente se está elaborando una bebida a base de flor de Jamaica, con parte de los datos derivados de este proyecto se deriva la siguiente tabla de compuestos fenólicos:

Cuadro. 1 Composición fenólica de los extractos acuosos bajo estudio

Compuestos fenólicos	Jamaica	Hierbabuena	Hierba del sapo	Cocolmeca
<b>Ácidos fenólicos</b>				
Ác. clorogénico	2.7 ± 0.2	2.1 ± 0.1	2.7 ± 0.2	DLD
Ác. gálico	DLD	5.6 ± 0.4	8.1 ± .6	8.2 ± 0.7
Ác. cumárico	3.1 ± 0.2	8.2 ± 0.5	DLD	DLD
Ác. cafeico	14.3 ± 1.1	6.6 ± 0.5	13.2 ± 1.1	14.7 ± 1.2
Ác. sinápico	11.3 ± 0.9	DLD	24.9 ± 1.0	19.4 ± 1.6
Ác. elágico	10.8 ± 0.8	6.5 ± 0.5	5.4 ± 0.4	DLD
Ác. rosmarínico	4.6 ± 0.3	34.3 ± 3.5	20.8 ± 1.7	80.4 ± 6.4
<b>Flavonoides</b>				
Epicatequina	8.8 ± 0.7	5.7 ± 0.4	11.4 ± 0.9	9.7 ± 0.8
Galato de galocatequina	DLD	3.4 ± 0.1	DLD	DLD
Hesperidina	61.4 ± 0.4	137.1 ± 12.2	10.5 ± .5	215.1 ± 17.2
Galato de epigalocatequina	28.4 ± 2.2	DLD	5.5 ± 0.4	6.8 ± 0.5
Rutina	101.6 ± 8.1	51.1 ± 3.9	148.6 ± 12.0	62.0 ± 5.0
Vanillina	13.3 ± 1.1	6.1 ± 0.3	6.9 ± 0.6	12.6 ± 1.0
Naringenina	61.7 ± 4.9	5.6 ± 0.8	7.2 ± 0.9	8.3 ± 0.8
Quercetina	6.0 ± 0.5	3.2 ± 0.6	5.6 ± 0.5	4.3 ± 0.2
Resveratrol	DLD	3.5 ± 0.1	6.1 ± 0.5	9.1 ± .8
<b>Antocianinas</b>				
Cianidina	6.1 ± 0.4	DLD	DLD	DLD
Pelargonidina	2.2 ± 0.1	DLD	DLD	DLD
Peonidina	4.8 ± 0.2	DLD	DLD	DLD
Malvidina	0.8 ± 0.0	DLD	DLD	DLD

Diversos estudios *in vitro* han demostrado la capacidad antioxidante de extractos de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), medida a través de ensayos como FRAP, DDPH, 2-deoxirribosa y peroxidación lipídica (Sakar y col., 2014), entre otros métodos. Estudios en animales y humanos también han evaluado el posible efecto terapéutico de extractos de la flor de Jamaica sobre estrés oxidativo, perfil de lípidos, hipertensión, aterosclerosis y nefrotoxicidad (Ademiluyi y col., 2013; Sabzghabae y col., 2013; Guardiola y Mach, 2014), entre otras afecciones.

Aunque existe evidencia acerca del potencial terapéutico de la flor de Jamaica en el tratamiento de la hipertensión e hiperlipidemia (Hopkins y col., 2013), aún no se tienen claros los mecanismos moleculares de su acción antioxidante. Por lo anterior, es importante para el grupo de trabajo la evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de estos materiales vegetales o hierbas.

### **2.5.1. Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)**

La flor de Jamaica pertenece a la familia de las malváceas, es originaria de África y produce flores anualmente las cuales consisten en un cáliz de color rojo-purpura. La flor de Jamaica es cultivada en regiones tropicales a lo largo del mundo tales como India, Filipinas, Malasia, Senegal y México (Domínguez y col., 2008). De manera general, los cálices se secan en un proceso que tradicionalmente consiste de exponerlos a luz solar al aire libre (Meza y col., 2009). Estudios fitoquímicos indican que los cálices contienen ácidos orgánicos (tartárico, cítrico, málico), glucosidos y compuestos fenólicos en su mayoría antocianinas (Wong y col., 2002).

El uso más común para la flor de Jamaica consiste en la extracción de sólidos solubles mediante agua caliente para obtener una infusión aromática. Esta infusión tiene diversas aplicaciones, sirve como ingrediente en salsas, postres, mermeladas y como bebida, así como colorante en otros alimentos (Simonetti, 1991).

Los compuestos fenólicos son de los metabolitos más abundantes obtenidos de las flores de Jamaica, son solubles en agua y confieren a la infusión un carácter aromático característico. Estos compuestos fenólicos, en conjunto con algunos carbohidratos, forman los diferentes tipos de glucósidos presentes en la infusión (Muchuweti y col., 2007; Vatterm y col., 2005). La función de estos compuestos parece estar involucrado en el mecanismo de defensa de la planta contra estrés ambiental o biológico (insectos, bacterias, hongos, virus) y también protegen a la planta de la radiación UV (Johnson, 2003). Por otra parte, los compuestos

fenólicos están relacionados con la prevención de enfermedades generadas por procesos inflamatorios (Faudale y col., 2008).

### **2.5.2. Hierbabuena (*Mentha piperita*)**

La hierbabuena pertenece a la familia de las *Lamiaceae* con alrededor de 32 especies. La hierbabuena es la más conocida debido a su valor comercial ya que de ella se extrae mentol, éste es utilizado en la elaboración de diferentes productos como medicamentos, dulces, licores, entre otros (Díaz y col., 2003).

Es una planta que crece en climas húmedos y templados en espacios con buena iluminación lo que es fundamental para su desarrollo óptimo. Aunque es sensible a las bajas temperaturas, la planta es más resistente al frío que a las altas temperaturas, esto porque posee raíces superficiales (Quintero, 1985).

Los principales metabolitos presentes en la hierbabuena incluyen: Aceites volátiles, monoterpenos, ácido caféico, flavonoides y taninos (McKay y Jeffrey, 2006). La especie *Mentha piperita* contiene la mayor cantidad de polifenoles por lo que es la más usada para la obtención de infusiones (Nickavary col., 2008).

### **2.5.3. Hierba del sapo (*Eryngium heterophyllum*)**

La hierba del sapo pertenece a la familia *Umbelliferae*; se caracteriza por ser una hierba de 40 cm a 1 m de altura con hojas asperas, rígidas y espinosas. Esta planta es originaria de México, presente en climas seco, semiseco y templado; crece en terrenos de cultivo abandonados, de riego o temporal. Con frecuencia se utiliza contra la tos, para lo cual se recomienda preparar una infusión y beberla tres veces al día; asimismo se recomienda esta infusión contra la bilis, diarrea, dolor de estómago, fiebre, golpes, entre otras afecciones.

Carece de estudios experimentales que convaliden sus atribuidas propiedades terapéuticas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).



#### **2.5.4. Raíz de cocolmecha (*Smilax cordifolia*)**

*Smilax cordifolia* es conocida de forma común como: cocolmecha y zarzaparrilla de indias. Sus sinónimos son los siguientes: *Smilax acutifolia*, *Smilax glaucocarpos* y *Smilax schiedeana*.

Planta medicinal utilizada en el sureste mexicano (Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo) para aliviar inflamaciones tanto internas como externas.

Aunque existe bastante información en internet sobre la raíz de cocolmecha es difícil encontrar fuentes bibliográficas científicas de ésta. El género *Smilax* perteneciente a la familia *Smilacaceae* consta de unas 200 plantas con diversos estudios sobre sus propiedades y la mayoría de estos están relacionados con actividad antiinflamatoria.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El uso de plantas con fines terapéuticos es una práctica ampliamente utilizada en nuestro país. En la actualidad existe una creciente tendencia al uso de plantas con efectos benéficos a la salud y su incorporación a productos de consumo. Esto genera un problema, ya que la mayoría de productos comercializados como funcionales no presentan estudios que respalden las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los extractos herbales utilizados en su elaboración.

Tomando en cuenta el punto anterior es necesario establecer un conjunto de procedimientos y pruebas que permitan la evaluación de la activación de mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes de extractos herbales. Las pruebas que se proponen tienen como base que los compuestos generen una respuesta antioxidante y/o antiinflamatoria al aplicarlos en un cultivo celular. Los macrófagos son utilizados ampliamente en proyectos similares, dado que estas células expresan los mecanismos inflamatorios y antioxidantes de forma activa y responden a una amplia gama de estímulos.

Al evaluar las diferencias en la expresión de mecanismos antioxidantes y proteínas pro-inflamatorias en diferentes condiciones: basal, extractos herbales, D3T como promotor de mecanismos antioxidantes y reto con LPS; se pueden demostrar efectos benéficos de los extractos herbales empleados. Por ello estas pruebas se proponen para la evaluación de diversos extractos herbales que se tienen como candidatos para la elaboración de productos funcionales y para investigaciones posteriores, contribuyendo así a la identificación y evaluación de compuestos con capacidad antiinflamatoria o con función inmunomoduladora.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de diversos extractos herbales en macrófagos murinos.

#### **4.1.1. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de diferentes extractos herbales sobre los mecanismos antiinflamatorios en macrófagos murinos estimulados con LPS.
- Evaluar el efecto de diferentes extractos herbales sobre los mecanismos antioxidantes en macrófagos murinos.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1. Diagrama experimental

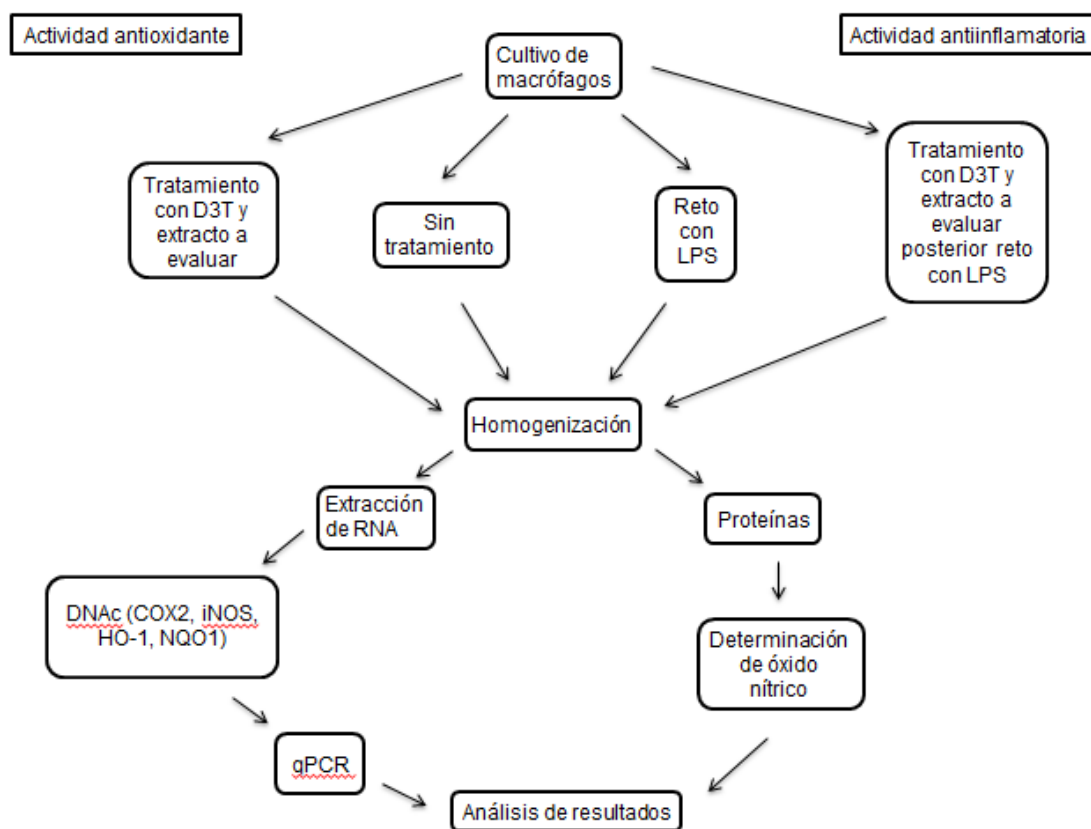


Figura. 5 Diagrama experimental

### 5.2. Cultivo de macrófagos

Se emplearon macrófagos de ratón de la línea celular RAW 264.7 (ATCC) cultivados en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con 10% de suero fetal bovino (FBS) adicionado con 1% de penicilina/estreptomicina, incubadas a 37 °C en una atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>. El mantenimiento del cultivo celular se realizó de acuerdo a los protocolos del laboratorio de alimentos funcionales a cargo de la Dra. Nuria Rocha, Unidad de Posgrado e Investigación del Tecnológico de Durango (Anexos 8.1, 8.2, 8.3).

### **5.3. Cinética de crecimiento**

Previamente a la aplicación de los tratamientos, se realizaron pruebas para determinar la cinética del cultivo, con el fin de conocer su tiempo de duplicación y así establecer condiciones adecuadas para la experimentación. El protocolo para la evaluación de la cinética de crecimiento se realizó de acuerdo a los protocolos del laboratorio de alimentos funcionales a cargo de la Dra. Nuria Rocha, Unidad de Posgrado e Investigación del Tecnológico de Durango.

Se sembraron  $1 \times 10^4$  células/600  $\mu$ L en placa de 96 pozos, se despegaron las células de la hilera correspondiente al día 1 y se contaron en cámara de Neubauer. Se repitió el proceso de despegue y conteo hasta un total de 6 días. Se realizó la captura y análisis de los datos para el diseño de la gráfica de crecimiento.

### **5.4. Tratamientos**

Se aplicaron diferentes tratamientos a fin de evaluar la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, iNOS, entre otros) y de mecanismos antioxidantes (HO-1, NQO1, GSH) resultado de la activación de NF-kB y Nrf2 correspondientes.

Se empleó un control positivo con dietil-3-tiona (D3T), debido a que se ha reportado ampliamente que contribuye a la respuesta antioxidante y antiinflamatoria (Nho y O'Dwyer, 2004). El uso de este control positivo se incluyó también como referencia para comparar contra los tratamientos con extractos herbales.

Tratamiento control negativo: En una placa de 12 pozos se colocó una concentración celular de  $1 \times 10^5$  en 1 mL de medio DMEM (por cada pozo) sin ninguno de los tratamientos y se incubó por 24 horas; esto para tener una referencia de la actividad basal de ambos mecanismos en las células.

Tratamiento con LPS: En una placa de 12 pozos se colocó una concentración celular de  $1 \times 10^5$  con medio de cultivo adicionado con  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS dejándose incubar por 24 horas. Este experimento tuvo como propósito el evaluar la expresión de citocinas pro-inflamatorias inducidas por la exposición a LPS, así como la liberación de nitritos al medio para la evaluación de ON.

Tratamiento control positivo: En una placa de 12 pozos se colocó una concentración celular de  $1 \times 10^5$  con medio de cultivo adicionado con 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mM de D3T dejándolo incubar por 24 horas (Nho y O'Dwyer, 2004).

Tratamiento D3T/extracto contra LPS: En una placa de 12 pozos se colocó una concentración celular de  $1 \times 10^5$  con medio de cultivo adicionado con 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mM de D3T ó 2, 4, 6, 8, 10, 25 y 50 mg/mL de extracto a evaluar; las placas se incubaron durante 1 hora; posteriormente, se retiró el medio para aplicar nuevamente los tratamientos en medio con  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS y se incubaron por 24 horas adicionales (Fang y col., 2013).

## **5.5. Viabilidad celular**

Se realizó una prueba de viabilidad celular para determinar el intervalo de dosis en que pudiera presentarse citotoxicidad por los diferentes tratamientos; el experimento se realizó en placas de 96 pozos con una concentración celular de  $1.5 \times 10^3$  células en  $200 \mu\text{L}$  de medio por pozo.

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de bromuro de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio (MTT), basado en la reducción metabólica del reactivo realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul oscuro llamado formazán. Esta prueba permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas; la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

La técnica se realizó de acuerdo al protocolo del laboratorio de alimentos funcionales a cargo de la Dra. Nuria Rocha, Unidad de Posgrado e Investigación del Tecnológico de Durango.

Posterior al tratamiento se aspiró el medio y se realizaron dos lavado con PBS 1x. Se adicionaron 100  $\mu$ L de medio de cultivo y 100  $\mu$ L de MTT (previa preparación). Las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Posteriormente, se retiró el medio y se agregaron 200  $\mu$ L de DMSO. La lectura de la absorbancia se midió a 570 nm.

## **5.6. Extracción de DNA en cultivo celular adherente**

Se realizó una extracción de DNA genómico, esto con la finalidad de validar los primers que se usaron para la cuantificación por qPCR. La extracción realizó con el siguiente protocolo:

- Centrifugar las células a 13000 rpm por 5 minutos (precipitación del contenido celular).
- Desechar el sobrenadante.
- Resuspender la pastilla en 100  $\mu$ L de solución de lisis, posteriormente se agregaron perlas de vidrio (50% del volumen aproximadamente).
- Mezclar en vortex por 2 minutos e inmediatamente colocar en hielo durante 2 minutos (repetir 3 veces).
- Agregar 500  $\mu$ L de cloroformo, 500  $\mu$ L de fenol y 20  $\mu$ L de TE. Mezclar con vortex suave y colocar en hielo.
- Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos.
- Rescatar el sobrenadante en un tubo nuevo, agregar 500  $\mu$ L de etanol y 500  $\mu$ L de isopropanol, mezclar suavemente por inversión.
- Incubar en congelador por 10 min.
- Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos, posteriormente eliminar el sobrenadante y poner la pastilla a secar.
- Lavar la pastilla con etanol (3 veces) y para finalizar resuspender la pastilla en agua destilada estéril.

Al finalizar el protocolo de extracción se verificó la integridad del material por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

## 5.7. Extracción de RNA total en cultivo celular adherente

Homogenización de las muestras:

- Se elimina el medio de cultivo centrifugando las células a 5000 rpm por 5 minutos.
- Se realizó un lavado del pellet con 1 mL de agua DEPC.
- Se resuspenden las células 1 mL de TRIzol.
- Se homogenizó la muestra a 3500 rpm durante 7 segundos y se colocó en hielo inmediatamente.
- Posterior a la homogenización, la muestra se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo estéril.

Separación:

- Incubar la muestra homogenizada durante 5 minutos a temperatura ambiente, permitiendo así la disociación de los complejos de proteínas nucleares.
- Adicionar 200 µL de cloroformo, tapar perfectamente el tubo.
- Agitar fuertemente durante 15 segundos.
- Incubar por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y en posición vertical.
- Centrifugar las muestras a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
- Después de centrifugar, la mezcla se separa en una fase inferior roja, fase de fenol cloroformo, en una interfase y en una fase incolora superior, la cual contiene exclusivamente el ARN.

Precipitación:

- Transferir la fase acuosa cuidadosamente a un nuevo tubo estéril (puede separarse igualmente la fase orgánica para posterior purificación de ADN o proteínas).
- Adicionar 500 µL de isopropanol a la fase acuosa por cada 1 mL de TRIzol usado en la homogenización.
- Incubar el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente y en posición vertical.



- Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- El ARN debe observarse precipitado antes de la centrifugación como un pellet parecido a un gel.

#### Lavado:

- Remover el sobrenadante cuidadosamente y eliminarlo.
- Adicionar 1 mL de etanol al 75% al pellet para lavarlo.
- Mezclar por agitación.
- Centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos a 5 °C.
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.

#### Disolución:

- Secar a temperatura ambiente, colocando el tubo con el ARN sobre una toalla de papel estéril.
- Adicionar 50 µL de agua DEPC.
- Disolver el RNA por pipeteo suave.

#### Tratamiento con DNAsa y almacenamiento:

- Se agregan a la muestra de RNA 1 µL de DNAsa y 5 µl de buffer
- Incubar a 37 °C durante 20 minutos, al terminar se agregan 2 µL de EDTA 0.02 M estéril y se incuba a 75 °C por 10 minutos.

Puede almacenarse a -20 °C para evaluaciones posteriores (Chomczynski y Sacchi, 1987; Sambrook y Russell, 2001).

Al finalizar el proceso de extracción se verificó la integridad del material por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

## 5.8. Obtención del DNAc

La obtención del DNAc se llevó a cabo siguiendo el protocolo M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen.

Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de la extracción de RNA total en un tubo nuevo estéril y se añadió 1  $\mu\text{L}$  de random primers (200 ng), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix 10 mM y 12  $\mu\text{L}$  de agua DEPC. La reacción se incubó a 65 °C por 5 minutos y después se colocó en hielo durante 1 minuto.

Posteriormente se adicionó al tubo de reacción 4  $\mu\text{L}$  de 5X First-strand buffer y 2  $\mu\text{L}$  de 0.1 M DTT, se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se incubó a 37 °C por 2 minutos.

Al terminar la incubación se adicionó al tubo de reacción 1  $\mu\text{L}$  de M-MLV RT, se mezcló cuidadosamente por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente a 37 °C por 50 minutos y finalmente a 70 °C por 15 minutos para terminar la reacción.

El DNAc puede usarse inmediatamente para reacción de PCR o guardarse a una temperatura de -30 °C a -10 °C hasta su uso (Sambrook y col., 1989).

## 5.9. Reacción de PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) de Thermo scientific.

El kit contiene los siguientes elementos:

- Maxima Hot Start *Taq* DNA Polymerase que es una polimerasa modificada químicamente mediante la adición de grupos termolábiles que bloquean residuos de aminoácidos específicos. Esto permite que la enzima este inactiva a temperatura ambiente, evitando así la extensión inespecífica por alineamiento de los “primers” o dímeros de los mismos, lo que resulta en una mayor especificidad para la amplificación.

- Maxima SYBR Green qPCR Buffer, especialmente optimizado para el análisis por qPCR utilizando SYBR Green I. Contiene KCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lo que proveen una alta especificidad para el alineamiento de los “primers”.
- SYBR Green I es un colorante que emite una señal fluorescente al unirse intercaladamente en la doble hélice del DNA, en qPCR la señal fluorescente aumenta proporcionalmente a la concentración de DNA sintetizado. La longitud de onda de excitación y emisión máxima para el SYBR Green I es de 494 nm y 521 nm, respectivamente, lo que lo hace compatible con cualquier equipo utilizado para cuantificación en tiempo real.

Antes de iniciar con el protocolo se deben agitar suavemente por vortex todas las soluciones del kit.

Se colocaron los siguientes reactivos en un tubo eppendorf estéril de 0.5 mL a temperatura ambiente: 12.5  $\mu\text{L}$  de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 0.8  $\mu\text{L}$  de cada “primer”, 1  $\mu\text{L}$  de DNAC y finalmente se completa la reacción con agua DEPC hasta un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , se mezcla todo cuidadosamente por pipeteo.

Las reacciones se colocaron en el equipo Rotor-Gene Q QUIAGEN programado con las siguientes condiciones:

- 10 minutos a 95 °C para abrir las cadenas de DNAC
- 30 ciclos: 15 segundos a 95 °C (desnaturalización), 30 segundos a 60 °C (alineamiento), 1 minuto a 72 °C (extensión).
- 10 min a 72 °C y reducir la temperatura a 4 °C tiempo indefinido.

La reacción puede almacenarse a -20 °C hasta su análisis (Innis y col., 1990).

### **5.10. Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como las medias  $\pm$  el error estándar (EE) o desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnett ( $P < 0.05$ ). Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico GraphPad.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las plantas constituyen la fuente principal y más abundante de compuestos bioactivos con potencial benéfico contra varias enfermedades crónicas degenerativas, principalmente aquellas relacionadas con estrés oxidativo e inflamación. Estos compuestos pertenecen a diversas clases químicas, que incluyen ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, estilbenos, alcaloides, ácidos orgánicos y triterpenos, entre otros. A estos compuestos se les atribuyen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por lo anterior, en el grupo de trabajo se tiene el interés de evaluar las propiedades biológicas e identificar extractos herbales que se tienen como candidatos para la elaboración de productos funcionales y para investigaciones posteriores.

### **6.1. Cinéticas de crecimiento**

De manera inicial se realizaron pruebas para determinar la cinética de crecimiento y el tiempo de duplicación (td), obteniendo como resultado un td de 56.24 horas para los macrófagos RAW 264.7 (Figura 6). Esto con el fin de determinar los tiempos mínimos para la evaluación de los extractos herbales acuosos y el D3T sobre la proliferación y viabilidad celular de la línea celular.

### **6.2. Viabilidad y citotoxicidad celular**

Se realizó una prueba indirecta de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT para determinar la cantidad de células metabólicamente activas o vivas con diferentes concentraciones de los extractos herbales acuosos (2, 4, 6, 8, 10, 25 y 50 mg/mL) y D3T (0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ M), para finalmente seleccionar la concentración de los tratamientos en niveles no tóxicos para la célula (Figura 7).

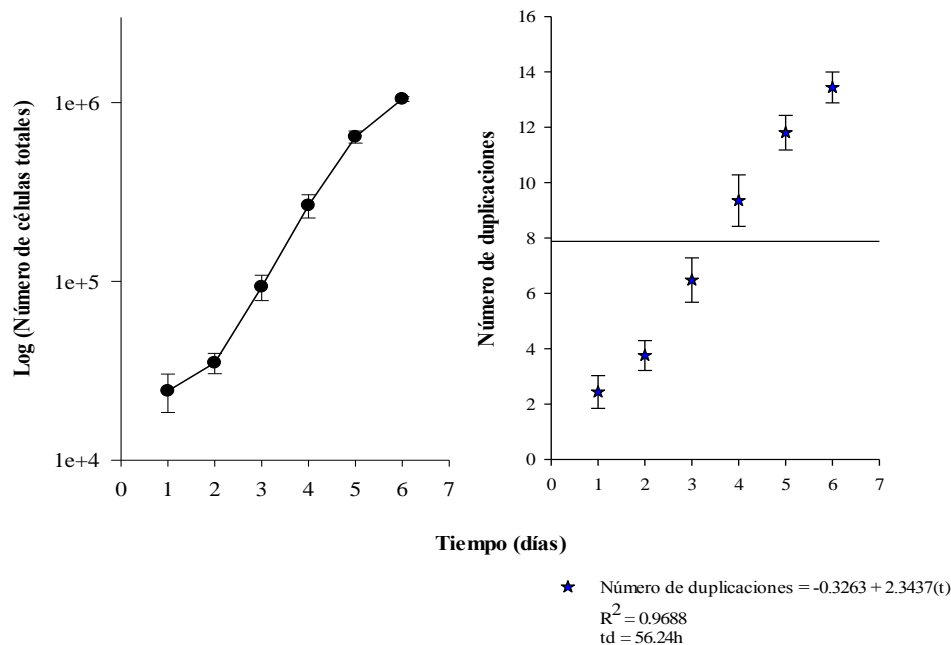


Figura. 6 Cinética de crecimiento y número de duplicaciones de macrófagos murinos RAW 264.7 en un periodo de 6 días.

Los resultados indican que los extractos herbales acuosos de flor de jamaica y hierbabuena no mostraron un efecto citotóxico significativo en el intervalo de concentraciones de 2 a 50 mg/mL. Por el contrario, si se observó una disminución significativa en la actividad metabólica de las células con el tratamiento con el extracto de la hierba del sapo a partir de 6 mg/mL, disminuyendo en un 51% con respecto al control ( $P < 0.05$ ). De manera interesante, se observó un aumento en la viabilidad de las células tratadas con el extracto herbal de cocolmecha en el intervalo de concentraciones de 2 a 10 mg/mL; sin embargo, se observó una disminución significativa a partir de la concentración de 50 mg/mL.

Debido a la toxicidad mostrada por las diferentes concentraciones del extracto de hierba del sapo en la línea celular de macrófagos, se decidió no incluirlo para posteriores etapas de este estudio.

Los resultados anteriores son de gran relevancia, ya que las concentraciones anteriores son relativamente elevadas, lo que podría sugerir la falta de toxicidad

para los extractos acuosos de flor de jamaica, hierbabuena y cocolmeca. En este sentido, estudios previos con extractos de flor de Jamaica tampoco muestran toxicidad en diversas líneas celulares (células periféricas mononucleares humanas, macrófagos humanos U937 o cultivo primario de hepatocitos); sin embargo, el intervalo de concentraciones reportado ( $<0.2$  mg/7mL) es menor al empleado en nuestro estudios (Tseng y col., 1997; Beltrán-Debón y col., 2010; Okoko y Ere, 2012).

De acuerdo a un estudio realizado en dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 resistentes y no-resistentes a adriamicina o doxorubicina), el extracto acuoso de hierbabuena mostró el menor efecto citotóxico, evaluado por la prueba de MTT, en comparación con extractos de especies de la familia Lamiaceae (Berdowska y col., 2013). De manera similar, el intervalo de concentraciones evaluado en dicho estudio (8 – 2000 mg/L) fue menor al empleado en nuestro estudio.

En lo que respecta a la evaluación en líneas celulares, en este estudio se reporta por primera vez el efecto de los extractos acuosos de hierba del sapo y cocolmeca sobre la viabilidad celular (medida por la prueba de MTT) en macrófagos murinos.

Con respecto al D3T, los resultados indican que no se observó un efecto citotóxico significativo en el rango de concentraciones de 0.1 a 10  $\mu$ M. Estos resultados concuerdan con estudios previos empleando diversas líneas celulares normales y tumorales y con concentraciones en el intervalo empleado en nuestro estudio (0.1 – 100  $\mu$ M) (Doherty y col., 1998; Zhu y col., 2008; Jia y col., 2009; Dong y col., 2011).

La estimulación de macrófagos con LPS se ha empleado como una herramienta útil para la evaluación de las propiedades antiinflamatorias de diversos compuestos, entre los que incluyen fármacos y compuestos naturales. Por lo anterior, fue importante descartar un efecto sinérgico o antagónico con los extractos herbales (Figura 8). Para lo anterior, se realizó la misma prueba de

citotoxicidad en macrófagos RAW 264.7 de ratón estimulados con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y tratados con las diferentes concentraciones de los extractos herbales acuosos (2, 4, 6, 8, 10, 25 y 50  $\text{mg}/\text{mL}$ ) y D3T (0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ).

De manera similar, los resultados indican que los extractos herbales acuosos de la flor de jamaica y la hierbabuena no mostraron un efecto citotóxico significativo en el intervalo de concentraciones de 2 a 50  $\text{mg}/\text{mL}$ , adicional al tratamiento con LPS. Tampoco se observó efecto alguno con el tratamiento con D3T.

De acuerdo a un estudio realizado en macrófagos murinos RAW 264.7, el extracto metanólico de la flor de Jamaica tampoco disminuyó la viabilidad de macrófagos estimulados con LPS (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el intervalo de concentraciones de 0.01 a 0.5  $\text{mg}/\text{mL}$  (Kao y col., 2009).

No se encontraron reportes en la literatura para los extractos de la hierbabuena, la hierba del sapo y la cocolmea en macrófagos murinos estimulados con LPS.

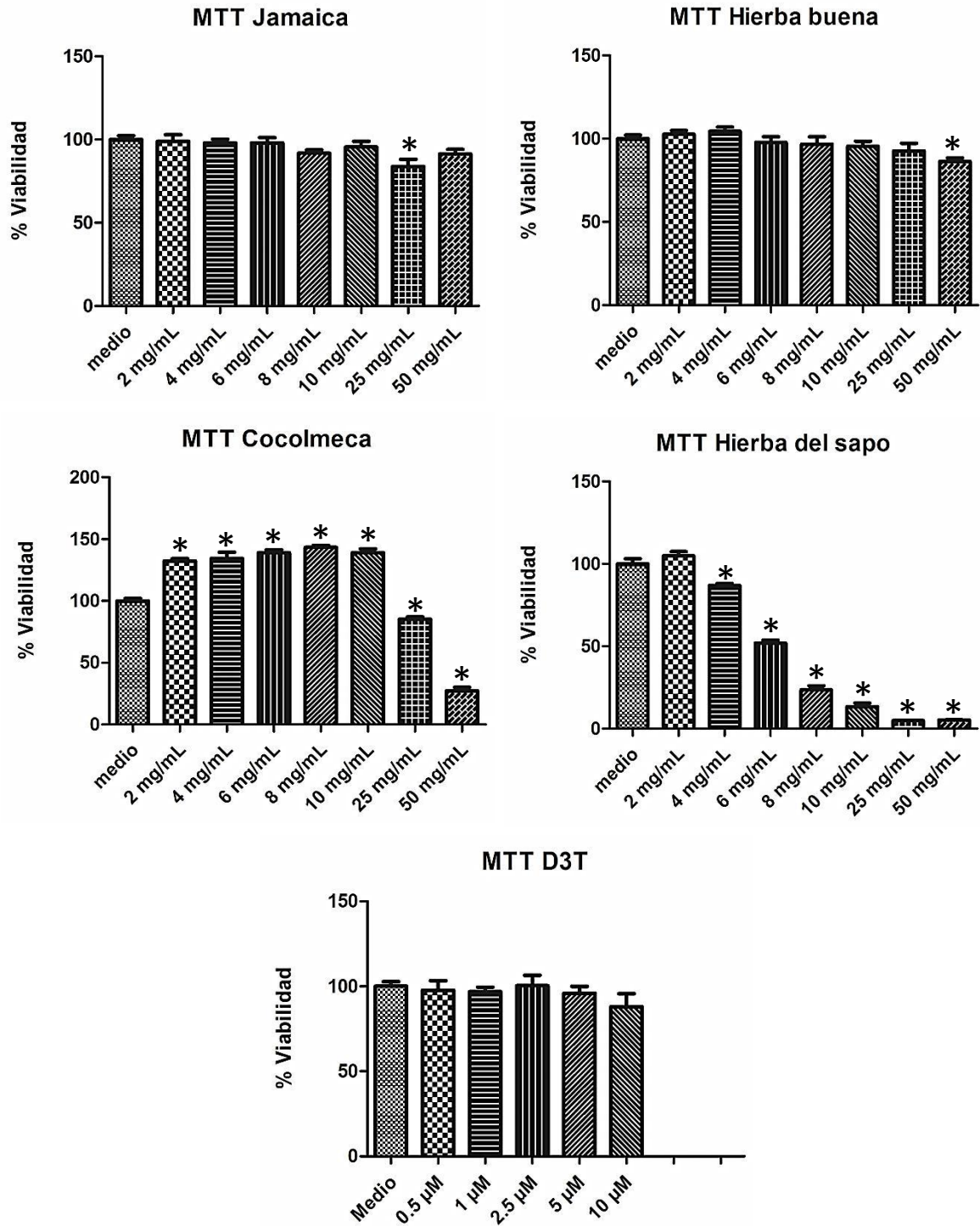


Figura 7. Efecto de los extractos herbales y del D3T sobre la viabilidad o actividad metabólica en macrófagos RAW 264.7 de ratón. Se evaluaron diferentes concentraciones de extractos (2, 4, 6, 8, 10, 25 y 50 mg/mL) y D3T (0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ M), empleando el ensayo de MTT. \*Indica diferencia significativa con respecto al control por la prueba de Dunnett ( $P < 0.05$ ).



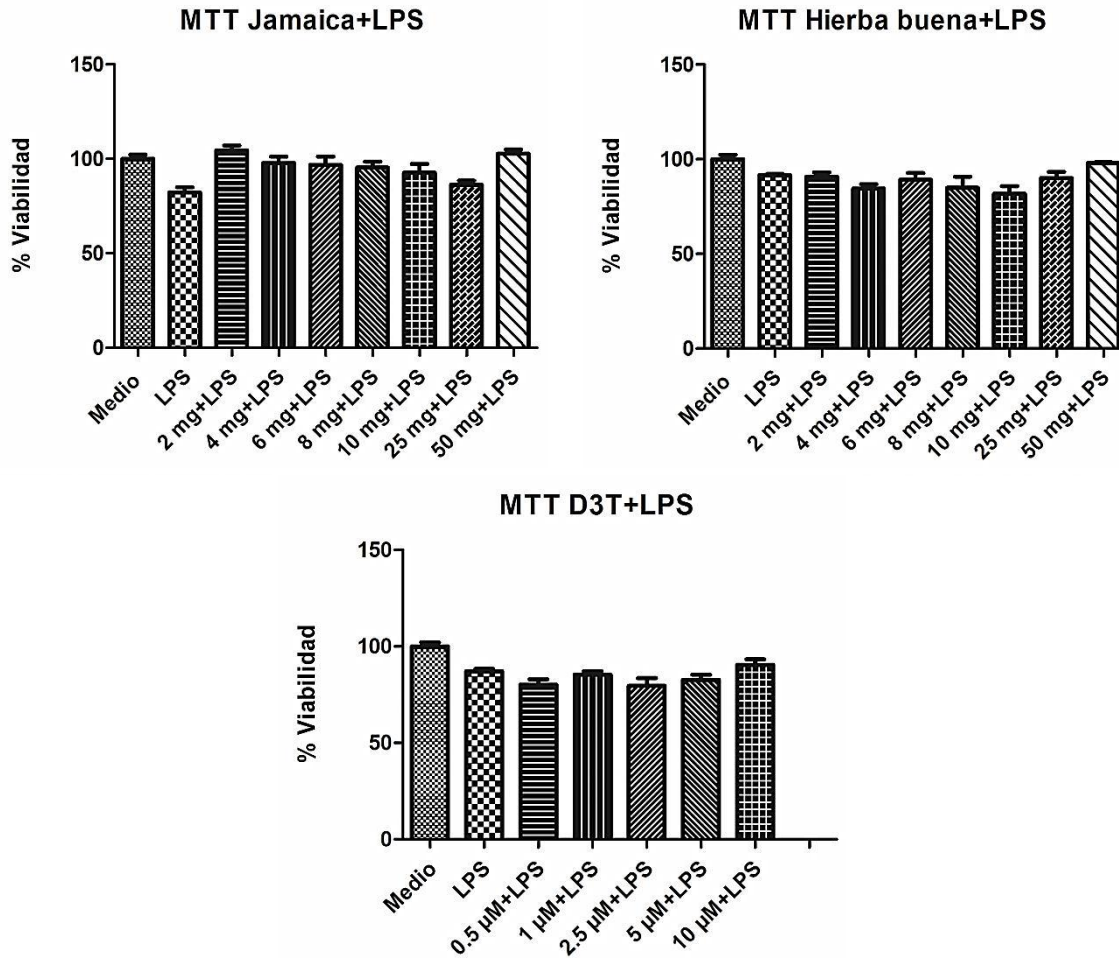


Figura 8. Efecto de los extractos herbales y del D3T sobre la viabilidad o actividad metabólica en macrófagos RAW 264.7 de ratón estimulados con LPS (1 µg/mL) tratados por 24 h. Se evaluaron diferentes concentraciones de extractos (2 – 50 mg/mL) y D3T (0.5 – 10 µM), empleando el ensayo de MTT. No se encontró diferencia significativa con respecto al control por la prueba de Dunnett ( $P > 0.05$ ).

### 6.3. Inhibición de la producción de óxido nítrico (ON)

Como se mencionó anteriormente, la producción de ON en macrófagos estimulados con LPS (Jin y col., 2015), se ha empleado como una herramienta útil para la evaluación de las propiedades antiinflamatorias de diversos extractos herbales. En la Figura 9 se muestra el efecto de las diferentes

concentraciones de los extractos herbales acuosos (2, 4, 6, 8, 10, 25 y 50 mg/mL) y D3T (0.5, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ M). Los resultados indican una tendencia de disminución en la producción de nitritos (como un indicador de la concentración de ON) conforme se incrementó la concentración del extracto de flor de Jamaica, lo que no pudo observarse con el extracto de hierbabuena. El máximo porcentaje de inhibición se observó a la mayor concentración de extracto de flor de Jamaica (63.5%). De manera similar, el compuesto D3T mostró la misma tendencia inhibitoria sobre la producción de ON, donde el mayor porcentaje de inhibición (38.2%) se obtuvo a la mayor concentración.

Diversos estudios han demostrado la inducción de la iNOS por el LPS a través del receptor TLR4, incrementando los niveles de ON en macrófagos murinos (Jin y col., 2015). Así mismo, se ha comprobado que diversos extractos o compuestos naturales afectan esta vía disminuyendo la producción de ON.

De acuerdo al estudio realizado por Kao y colaboradores (2009), el extracto metanólico de la flor de Jamaica disminuyó significativamente la producción de ON por macrófagos estimulados con LPS (0.1  $\mu$ g/mL) en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 0.5 mg/mL, lo que se relacionó con la inhibición en los niveles de expresión de la proteína iNOS a estas mismas concentraciones.

El efecto observado en el presente trabajo con los extractos de flor de Jamaica y hierbabuena está posiblemente relacionado con la actividad antiinflamatoria de los compuestos presentes en estos extractos (Cuadro 1). De acuerdo a la literatura, el ácido rosmarínico inhibió la producción de ON en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (1  $\mu$ g/mL) en un 17% a la concentración de 2.67  $\mu$ M (Huang y col., 2009). Por su parte, la flavanona hesperidina (0 – 200  $\mu$ M) mostró una inhibición muy pobre, casi indetectable, sobre la producción de ON en macrófagos inducidos con una concentración de LPS más elevada (10  $\mu$ g/mL) (Harasstani y col., 2010); sin embargo, se ha reportado que la hesperidina tiene la capacidad de neutralizar o atrapar los radicales

peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Kim y col., 2004). En cuanto a la rutina, Su y colaboradores (2014) encontraron que este flavonoide inhibió en un 20% la producción de ON en macrófagos estimulados con LPS (100 ng/mL) a una concentración de 80  $\mu$ M. Por su parte, Wang y Mazza (2002) evaluaron diversas antocianinas a la concentración de 250  $\mu$ M, como la cianidina y la malvidina y sus derivados glucósidos, la pelargonidina, la peonidina y la delphinidina, observando porcentajes de inhibición de la producción de ON del 20 al 70% en macrófagos estimulados con LPS/IFN- $\gamma$  (10 ng/mL y 10-50 unidades/mL, respectivamente). En general, estos estudios indican el potencial antiinflamatorio de los extractos de Jamaica y de hierbabuena incluidos en nuestro estudio.

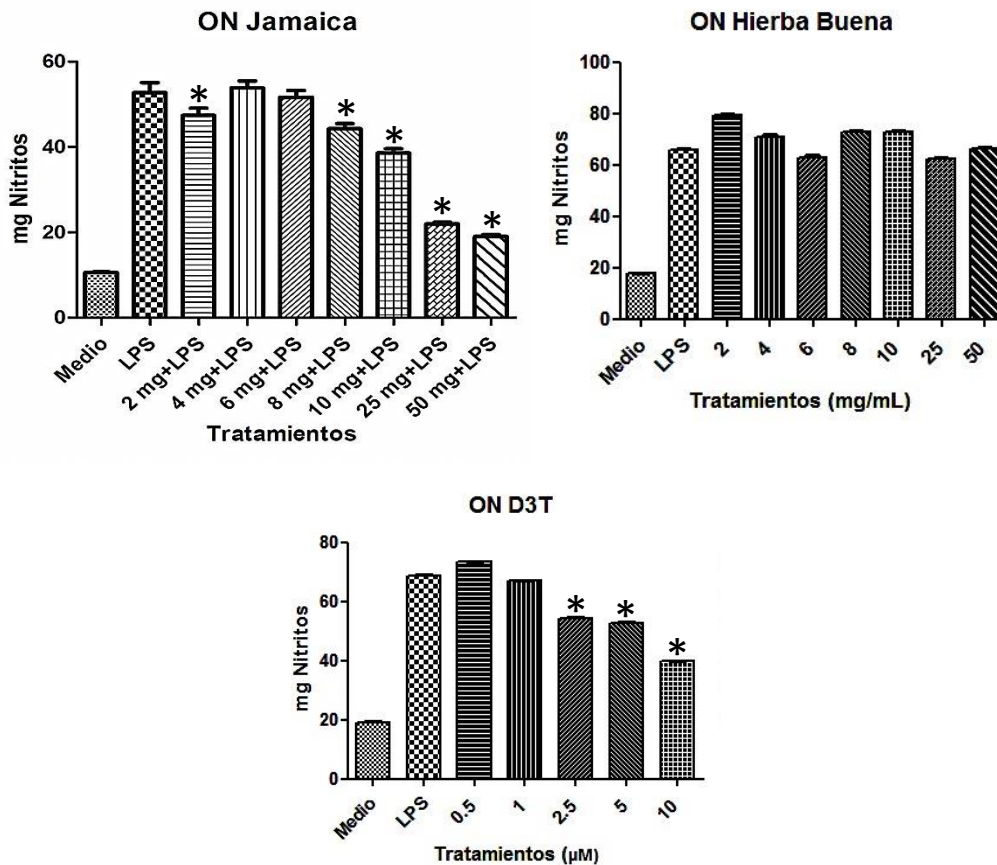


Figura 9. Inhibición de la producción de ON por los extractos acuosos de la flor de jamaica y la hierbabuena. Determinación de la producción de nitrito (como indicador de la concentración de ON) en macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS (1 µg/mL) tratados por 24 h. \*Indica diferencia significativa con respecto al tratamiento con LPS por la prueba de Dunnett ( $P < 0.05$ ).

A fin de identificar si los extractos de flor de Jamaica o hierbabuena por sí misma inducían una respuesta inflamatoria en las células, se realizó un ensayo en los macrófagos RAW 264.7 sin LPS con las diferentes concentraciones de los tratamientos por 24 h. Como anteriormente se había observado en el laboratorio, los resultados mostraron que no hubo un incremento en la producción de ON en las células no estimuladas con LPS. Tampoco se observó efecto alguno con el tratamiento con D3T a las dosis evaluadas.

Estudios realizados mediante la identificación de genes diferencialmente expresados demostraron que el D3T, conocido inductor de sistemas antioxidantes tanto *in vivo* como *in vitro*, también modula vías relacionadas con la respuesta inmune e inflamatoria (Huang y col., 2006). Nuestros resultados de la inhibición de la producción de NO en macrófagos estimulados confirman esta actividad antiinflamatoria del D3T.

#### 6.4. Reacción de PCR

Posterior a la obtención del DNAc se llevaron a cabo diferentes reacciones de PCR, esto con la finalidad de verificar la amplificación de los “primers” que se emplearon en las curvas de calibración del qPCR.

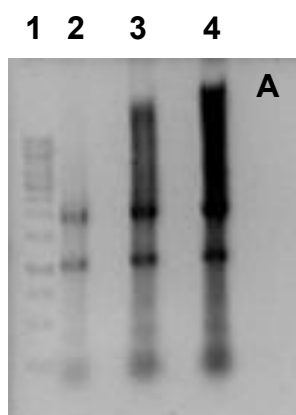


Figura. 10 Extracción de RNA total. Carril 1 corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder, los carriles 2, 3 y 4 corresponden a diferentes tiempos de homogenización 7, 10 y 15 segundos respectivamente.

Se optimizó el protocolo de extracción de RNA total para la línea celular RAW 264.7, se emplearon diferentes tiempos de homogenización para la extracción y al término de la misma se comprobó la integridad del material con una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la Figura. 10 se puede observar que si bien el material producto de la extracción es mayor conforme aumenta el tiempo de homogenización se ve mermada la integridad del mismo. Por lo que el tiempo de 7

segundos se consideró como la mejor condición para la extracción del RNA total para los experimentos posteriores.

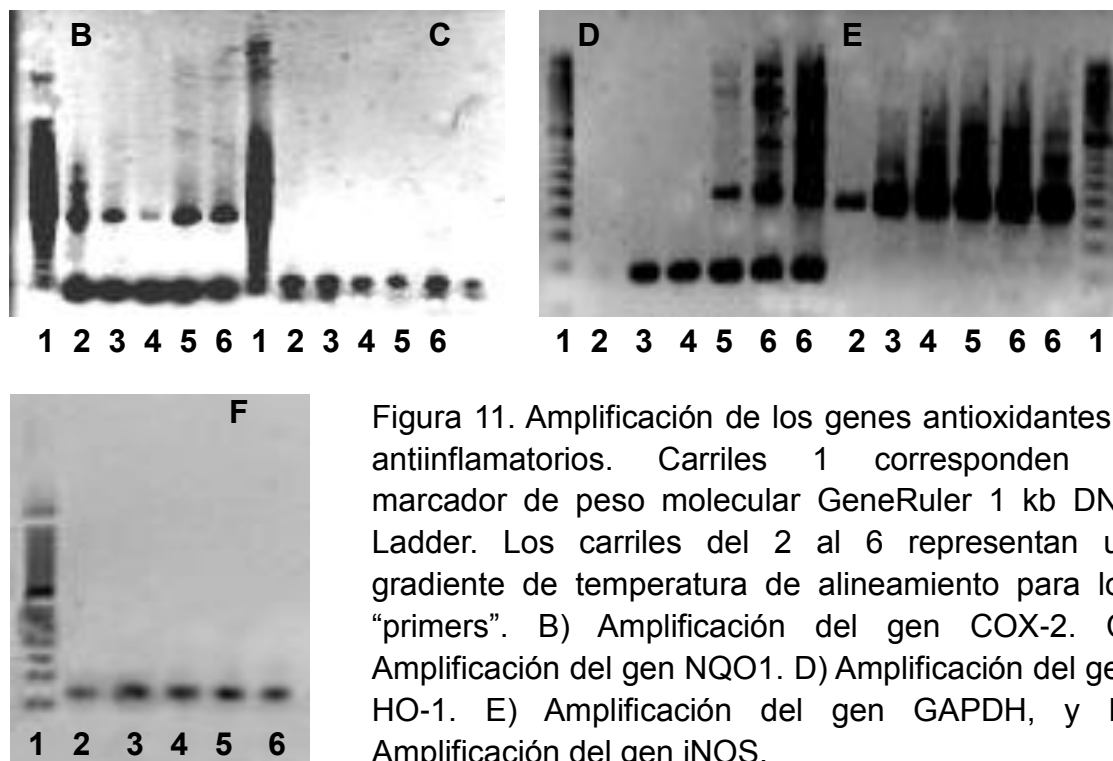


Figura 11. Amplificación de los genes antioxidantes y antiinflamatorios. Carriles 1 corresponden al marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Los carriles del 2 al 6 representan un gradiente de temperatura de alineamiento para los “primers”. B) Amplificación del gen COX-2. C) Amplificación del gen NQO1. D) Amplificación del gen HO-1. E) Amplificación del gen GAPDH, y F) Amplificación del gen iNOS.

La amplificación de los genes con los “primers” específicos concuerda con lo reportado por Ming y col. (2014) para los genes HO-1 y COX2 (Figura. 11 imágenes B y D carril 4), en donde reportan una temperatura óptima para el alineamiento de 60 °C. Al realizar la optimización de los “primers” se encontró que para iNOS y NQO1 (Figura. 11 imágenes C y F carril 5) la temperatura óptima es de 64 °C y para GAPDH (Figura. 11 imagen E carril 2) de 68 °C.

Las temperaturas de alineamiento para los genes iNOS, NQO1 y GAPDH fueron seleccionadas en base a la integridad del producto obtenido así como a la amplificación de un solo producto.

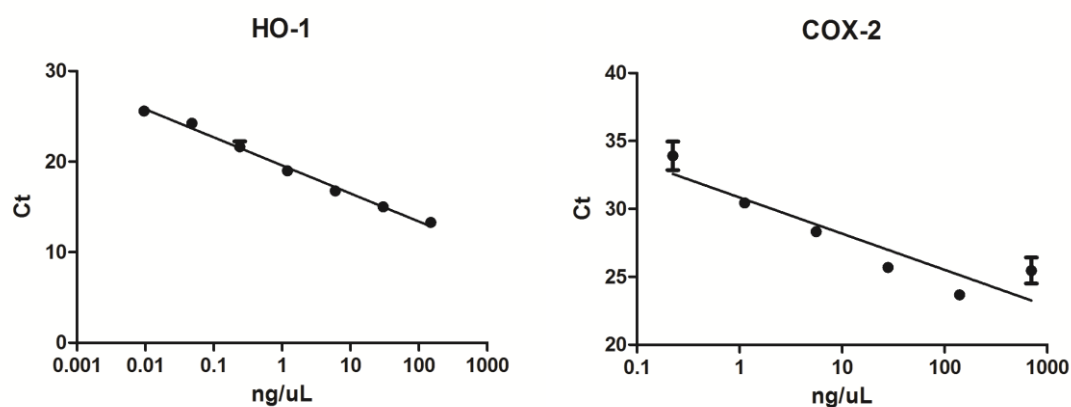
Los pesos moleculares de los genes son los siguientes:

- COX2: 989 pb (DNA Genómico)
- NQO1: 203 pb (DNA Genómico)
- GAPDH: 470 pb (mRNA)
- HO-1: 217 pb (mRNA)
- iNOS: 1886 pb (DNA Genómico)

### 6.5. Curvas de calibración y disociación de qPCR

Una vez realizada la verificación de los “primers” se realizaron las curvas de calibración correspondientes para el equipo de qPCR, esto con el fin de poder evaluar las diferencias en la expresión de genes antioxidantes (NQO1 y HO-1) y pro inflamatorios (iNOS y COX-2).

Como resultados se muestran las gráficas correspondientes a las curvas de calibración así como las curvas de disociación, estas últimas son importantes para verificar la amplificación de un solo producto de PCR.



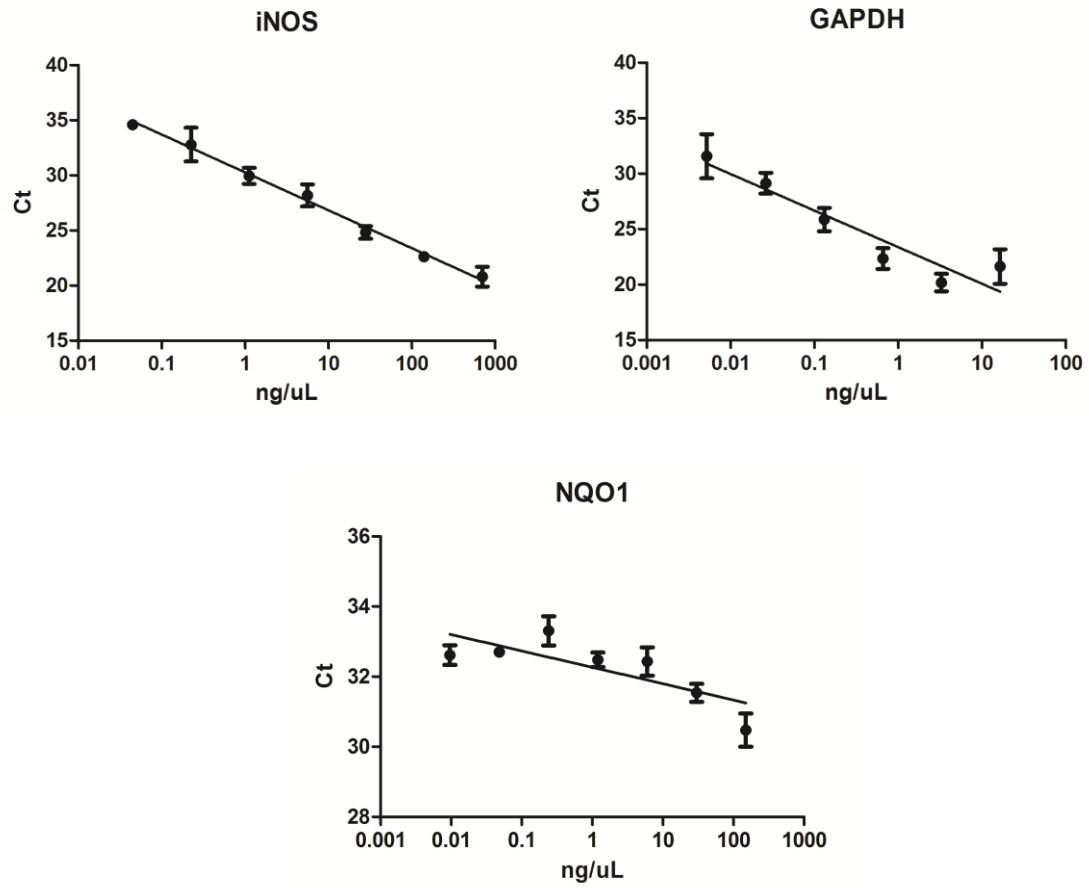
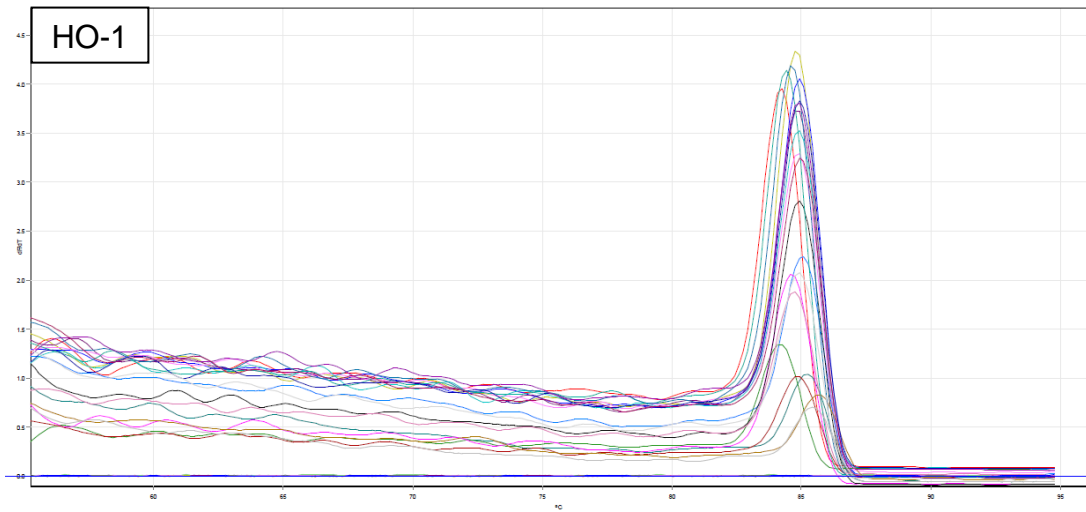
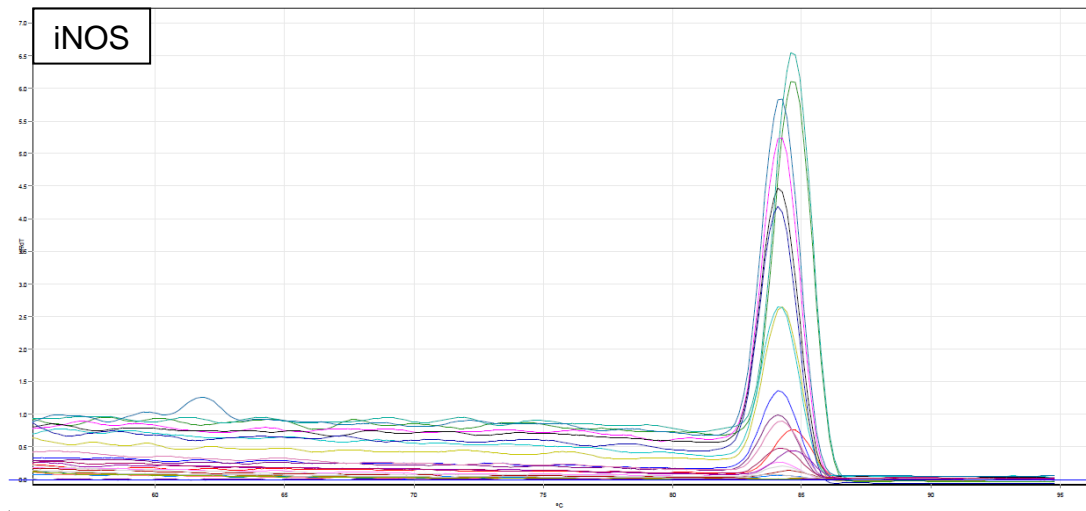
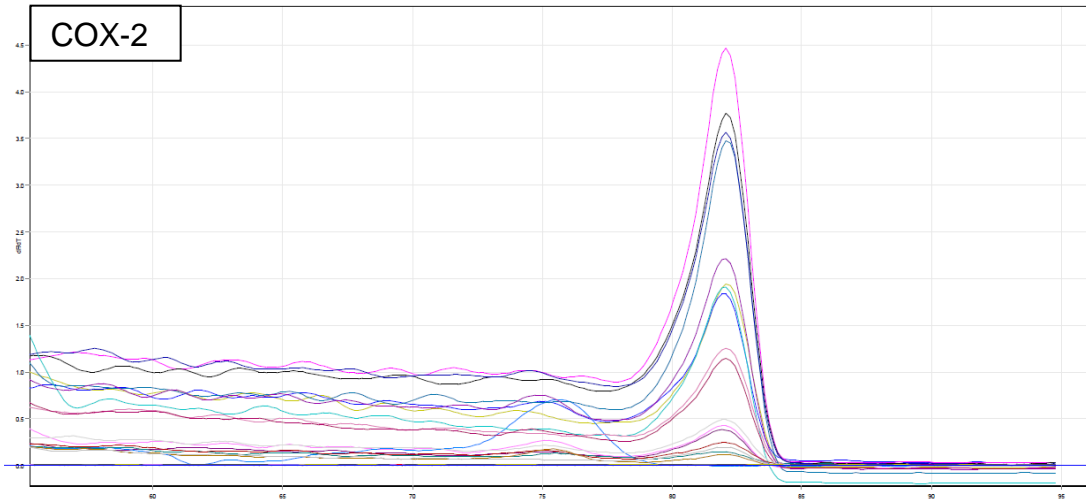


Figura. 12 Curvas de calibración para qPCR de los diferentes genes antioxidantes y pro-inflamatorios.





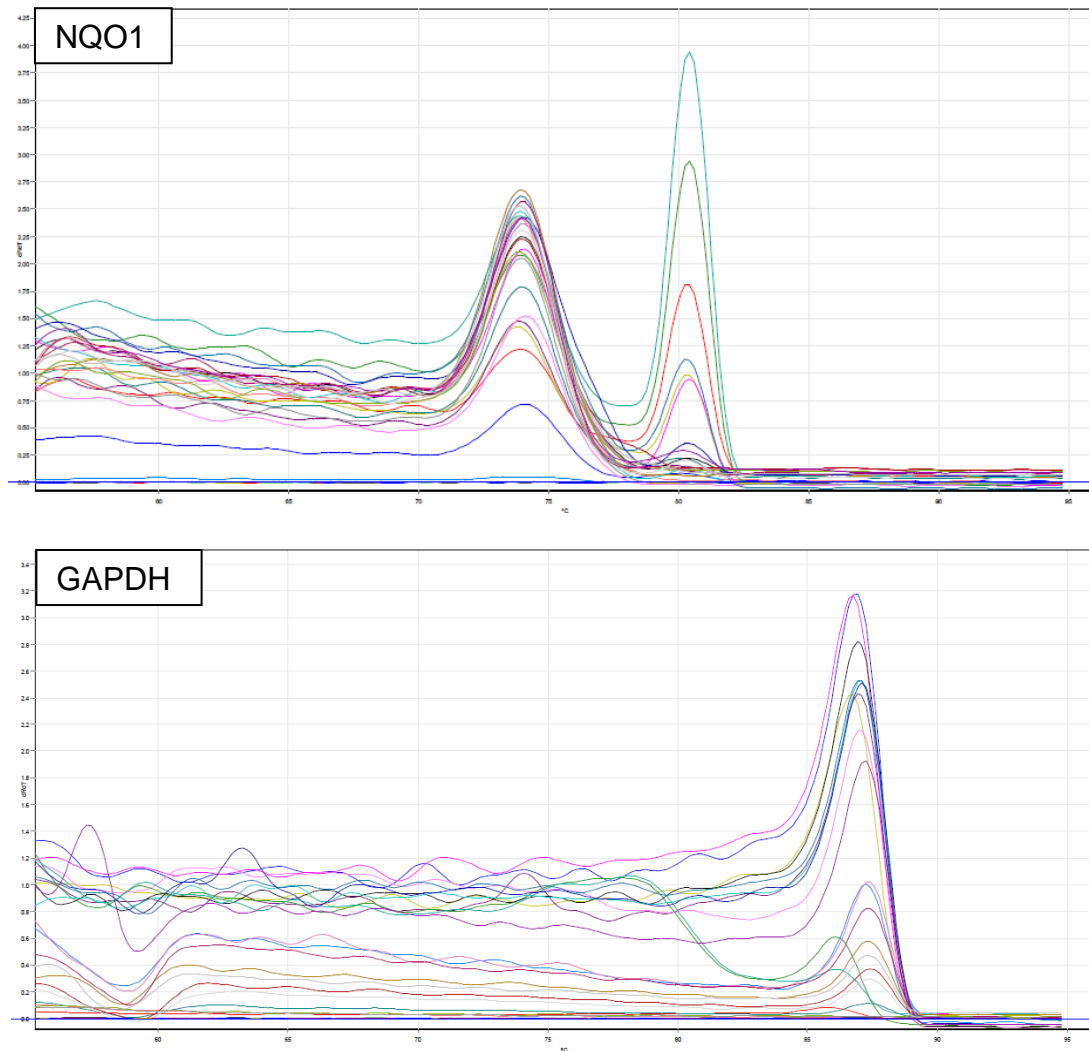


Figura. 13 Graficas de disociación de “primers”, en las gráficas se observa que existe un único producto de PCR por cada par de “primers”, excepto para el gen NQO1.

Las curvas de disociación para los genes HO-1, COX2, iNOS y GAPDH muestran un solo pico de disociación, lo que indica la amplificación de un solo producto. La curva de disociación para NQO1 muestra dos picos de disociación, esto pudiera deberse a la formación de “primer dimers” o a la amplificación de otro producto. Sin embargo, en la verificación en gel de agarosa no se observa alguna otra banda que pudiera sugerir la amplificación de otro producto de PCR. Esto podría explicarse por la amplificación del gen NQO2 el cual tiene un peso similar a NQO1 y es activado por la misma región promotora ARE (Long y Jaiswal, 2000; Wang y Jaiswal, 2006).

## 6.6. Cuantificación por qPCR de RNAm

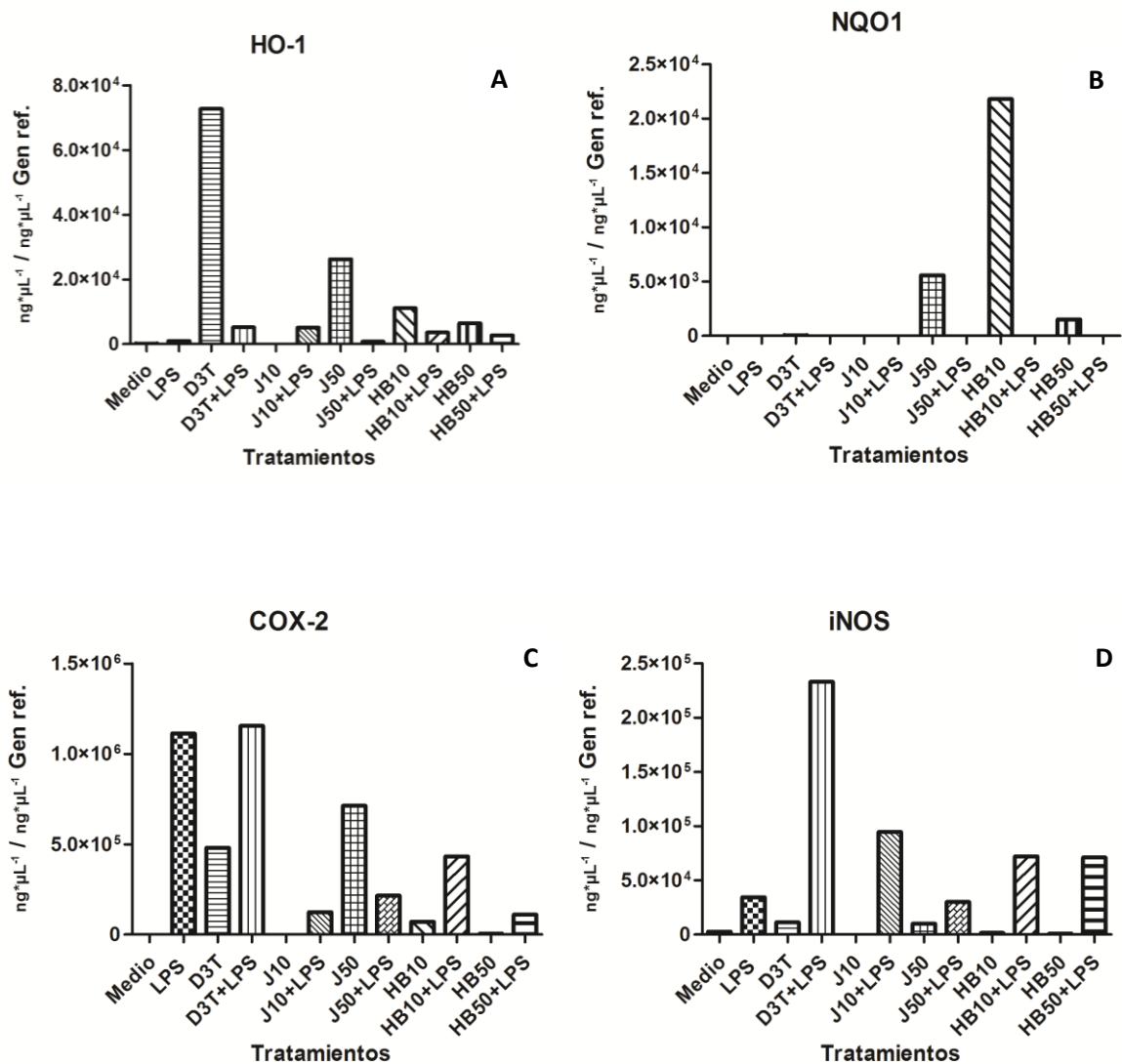


Figura 14. Gráficos de cuantificación de RNAm de los genes antioxidantes: A) NQO1 y B) HO-1), y pro-inflamatorios C) COX-2 y D) iNOS) a partir de macrófagos murinos RAW 264.7 tratados con o sin LPS (1 µg/mL por 24 h) y los diferentes extractos (J: flor de Jamaica; HB: hierbabuena) a dos concentraciones (10: 10 mg/µL; 50: 50 mg/µL). Tratamientos: Medio, LPS, D3T, D3T+LPS, J10, J10+LPS, J50, J50+LPS, HB10, HB10+LPS, HB50, HB50+LPS. Los resultados se expresan en ng\*µL/ng\*µL del gen de referencia (GAPDH).

Los resultados de la cuantificación de genes antioxidantes (HO-1 y NQO-1) por qPCR en macrófagos tratados muestran que existe un incremento en la transcripción de estos genes con respecto a las células que no recibieron tratamiento alguno. El gen que codifica para la enzima HO-1 es un gen inducible mayormente por estrés oxidativo, lo que sugiere que compuestos como D3T y extractos como los de flor de jamaica y hierba buena en realidad promueven la transcripción de elementos de respuesta antioxidante (HO-1 y NQO-1) al generar un cambio en el ambiente electrofílico intracelular promoviendo la liberación de Nrf2 de la proteína Keap1 (Wakabayashi y Col., 2004; Kobayashi y Col., 2006).

Lo anterior difiere de la hipótesis en la que los compuestos “antioxidantes” y bioactivos presentes en los extractos herbales confieren un “ambiente antioxidante” al neutralizar las ROS; sin embargo, esta hipótesis se deriva de estudios que determinan la capacidad antioxidante de los mismos en condiciones no fisiológicas (RE y Col., 1999; Ramos y Col., 2008). Por otra parte, es importante señalar que las diferencias en la composición de los extractos generan respuestas variadas en la transcripción de los genes antioxidantes, siendo HO-1 mayormente inducida por el extracto de jamaica y NQO-1 por la hierba buena.

Al activar la vía inflamatoria con LPS se puede observar una disminución en la transcripción de los genes antioxidantes con los tratamientos, NQO-1 resulta por debajo del límite de detección en la mayoría de tratamientos excepto D3T; los tratamientos que generan una mayor expresión de HO-1 (D3T y J50) muestran una disminución del mas de 90% al ser incubados con LPS, esto puede estar relacionado a que al activarse la vía inflamatoria por LPS la proteína Keap1 libera a IκB que a su vez activa a NF-κB, esto deja más Keap1 libre para unirse al factor de transcripción Nrf2 por lo que se vería afectada la inducción de la respuesta antioxidante.

Si bien la inducción de genes pro inflamatorios como iNOS y COX-2 es notable al incorporar LPS en los tratamientos, particularmente los resultados para iNOS no arrojan información concluyente relacionada a la disminución en la producción de ON por los tratamientos con D3T y J50.

Con todo lo anterior podemos concluir que si bien existen diferentes plantas utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de síntomas y/o enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios, es necesario hondar más en los mecanismos que mitigan los efectos de dichos procesos y las dosis requeridas para lograr el efecto deseado.

De las plantas evaluadas en este proyecto, la flor de jamaica se perfila como un buen candidato en la formulación de bebidas funcionales. Los resultados obtenidos indican que tiene un potencial antiinflamatorio considerable y tiene la ventaja de ser una planta de uso regular en la población mexicana, por lo que su incorporación en una bebida funcional sería relativamente sencilla en cuanto a características sensoriales se refiere.

Es necesario evaluar si la combinación de estos extractos pudiera potenciar los efectos benéficos sobre la disminución en la respuesta inflamatoria, de esta manera se podrían formular productos más eficaces.

Cuadro. 2 Cuantificación de los genes evaluados por qPCR

<b>Tratamientos sin LPS (ng*µL/ng*µL Gen de referencia)</b>				
	<b>HO-1</b>	<b>NQO-1</b>	<b>COX-2</b>	<b>iNOS</b>
<b>Medio</b>	101.87	DLD	283.51	2797.07
<b>LPS</b>	965.27	0.045	1112589.18	34436.36
<b>D3T</b>	72700	39.6	481200	11400
<b>J10</b>	5.51	DLD	56.37	3.75
<b>J50</b>	26203.94	5592.1	712559.21	10118.42
<b>HB10</b>	11111.11	21805.55	71861.11	1541.66
<b>HB50</b>	6408.97	1522.42	5728.23	749.34
<b>Tratamientos con LPS (ng*µL/ng*µL Gen de referencia)</b>				
	<b>HO-1</b>	<b>NQO-1</b>	<b>COX-2</b>	<b>iNOS</b>
<b>D3T</b>	5134.35	1.64	1155259.49	233166.33
<b>J10</b>	5082.21	DLD	124816.98	94625.77
<b>J50</b>	794.32	DLD	215646.52	30087.96
<b>HB10</b>	3535.26	DLD	433396.06	72184.47
<b>HB50</b>	2684.72	DLD	110965.62	71198.3

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Asikainen, T., Raivio, K., Saksela, M., & Kinnula, V. (1998). Expression and developmental profile of antioxidant enzymes in human lung and liver. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (19), 942-949.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, *II*(494), 161-172.
- Baldwin, A. J. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*(14).
- Beckman, K., & B.N., A. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*(78), 547-581.
- Bognar, E., Sarszegi, Z., Szabo, A., Debreceni, B., & Kalman, N. (2013). Antioxidant and Anti-inflammatory effects in RAW264.7 Macrophages of Malvidin, a major red wine polyphenol. *PLoS ONE*, *8*(6).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*(28), 25-30.
- Bredt, D., & Snyder, S. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*(63), 175-195.
- Brigelius-Flohé, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.*(27), 951-965.
- Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, *6*(4), 391-397.
- Carrillo Calvillo, J., & Bear Sandoval, I. (2004). Biomarcadores, inflamación, estrés oxidativo. lípidos y aterotrombosis Aterosclerosis: Un proceso inflamatorio. *Arch. Cardiol. Méx.*, *74*(2).
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method f RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156-159.
- Di Mascio, P., Murphy, M., & Sies, H. (1991). Antioxidant defense system: the rol of carotenoids, tocopherols and tiols. *Am J Clin Nutr*(53), 194-200.
- Dinarello, C. (2004). Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.*(4), 378-385.

- Dinarelo, C. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.*(27), 519-550.
- Edmonds, M., Vaughan, M., & Nakazato, H. (1971). Polyadenylic Acid Sequences in the Heterogeneous Nuclear RNA and Rapidly-Labeled Polyribosomal RNA of HeLa Cells: Possible Evidence for a Precursor Relationship. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68(6), 1336-1340.
- Enciso, E., & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An. Fac. med.*, 72(4), 231-237.
- Fang, L., Sha, L., Hua-Bin, L., Gui-Fang, D., Wen-Hua, L., & Xiang-Rong, X. (2013). Antiproliferative activities of tea and herbal infusions. *Food Funct.*(4), 530-538.
- Feldmeyer, L., Werner, S., French, L., & Beer, H.-D. (2010). Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *European Journal of Cell Biology*(89), 638-644.
- Fisher, C., Dhainaut, J., & Opal, S. (1994). Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. *JAMA*(271), 1835-1843.
- Gallin, J. (1989). *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press.
- Gebhard, F., Pfetsch, H., & Steinbach, G. (2000). Is interleukine 6 an early marker of injury severity following major trauma humans? *Arch Surg*(135), 291-295.
- Goebeler, M. (1995). Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *J. Immunol*, 155(5).
- Gonzalez-Crespo, S., & Levine, M. (1994). Related target enhancers for dorsal and NF-kappa B signaling pathways. *Science*, 264(5156), 255-258.
- Gurpreet, K., Mohammad, A., & Sarwar, M. (2007). *Quercus infectoria* galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages. *Chemico-Biological Interactions*(171), 272-282.
- Guzmán Grenfell, A., Velázquez González, A., & Sierra Vargas, M. (2006). Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial . *Revista de Endocrinología y Nutrición* , 14(4), 227-232.

- Harris, T., Ferruci, L., Tracy, R., Corti, M., Wacholder, S., & Ettinger Jr., W. (1999). Association of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med*(106), 506-512.
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., & White, T. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications . *Academic Press, San Diego, CA*.
- Inoko, H., & Trowsdale, J. (1987). Linkage of TNF genes to the HLA-B locus. *Nucleic Acids Res*(15), 8957-8962.
- Itoh, K., Igarashi, K., Hayashi, N., Nishizawa, M., & Yamamoto, M. (1995). Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol. Cell. Biol*.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., & Igarashi, K. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*(13), 76-78.
- Kang, M., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S., & Yamamoto, M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(101:20), 46-51.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*(47), 89-116.
- Kensler, T., & Wakabayashi, N. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*(47).
- Kinnula, V., Crapo, J., & Raivio, K. (1995). Biology of disease generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Laboratory Investigation* (73), 3-19.
- Kobayashi, Kang, M., Watai, Y., Tong, K., Shibata, T., Uchida, K., & Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of keap. *Mol Cell Biol*(26), 221-229.
- Königsberg, M. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26, 18-25.
- Lebowitz, R., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Dionne, L., Lu, N., . . . Matzuk, M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in



- mitochondrial seperoxide-deficient mice . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*(93), 9782-9787.
- Lee, J., & Burckart, G. (1998). Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol*, 38(11), 981-993.
- Li, B., Abdalrahman, A., Lai, Y., Janicki, J., Ward, K., Meyer, C., . . . Cui, T. (2014). Dihydro-CDDO-trifluoroethyl amide suppresses inflammatory responses in macrophages via activation of Nrf2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*(444), 555-561.
- Li, N., & Karin, M. (1999). Is NF-kappa B the sensor of oxidatve stress? *Faseb*, 13(10).
- Liu, Z., Hsu, H., Goedde, D., & Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: NK activations is not linked to apoptosis while NF-kB activations prevents cell dead. *Cell*(87), 565-576.
- Male, D., Champion, B., Cooke, A., & Owen, M. (1991). *Advance immunology* (Segunda ed.). New York: Gower London.
- Orlowski, R., & Baldwin, A. (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med*. 8(8), 385-389.
- Pasulka, P., Bristian, B., & Blackburn, G. (1985). Obesity and erythrocyte sedimentation rates. *Ann Intern Med*. 103(2), 304.
- Peng, L., Peng, X., Jian, D., Hui , P., Clewell, R., Wang, A., Peng, S., Qu, W., Zhang, Q., Andersen, M., & Pi, J. (2013). Keap1 silencing boosts lipopolysaccharide-induced transcription of interleukin 6 via activation of nuclear factor kB in macrophages. *Toxicol Applied Pharmacol*, 272(3), 697-702.
- Ramos, E., Catañeda, B., & Ibañez, L. A. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev Acad Peru Salud*, 15, 42-46.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pananala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 26(9-10), 1231-1237.
- Robbins, S., Cotran , R., & Kumar, V. (2008). *Patología humana* (Octava ed.). Elsevier Saunders.

- Roit, I., Brostoff, J., & Male, D. (1992). *Inmunologia* (Segunda ed.). Barcelona: Salvat.
- Roytblat, L., Rachinsky, M., Fisher, A., Greemberg, L., Shapira, Y., & Douvdevani, A. (2000). Raised Interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res.* 8(9), 73-75.
- Sacca, R., Cuff, C., Lesslauer, W., & Ruddle, N. (1998). Differential activities of secreted lymphotoxin- $\alpha$ 3 and membrane lymphotoxin- $\alpha$ 1b2 in lymphotoxininduced inflammation: critical role of TNF receptor 1 signaling. *J. Immunol.* 160(1), 485-491.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Tercera ed.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Springs Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, K. (1995). The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol.*, 2(1), 13-22.
- Schriner, S., Linford, N., Martin, G., Treuting, P., Ogburn, C., Emond, M., Coskun, P., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D., & Rabinovitch, P. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science.* 308(5730), 1909-1911.
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer binding protein Nf-kappa B by posttranslational mechanism. *Cell.* 47(6), 921-928.
- Stuehr, D. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 37, 339-359.
- Tobwin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. USA,* 9, 4350-4354.
- Tong, K., Kobayashi, A., Katsuoka, F., & Yamamoto, M. (2006). Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *J. Biol Chem.* 387(10-11), 1311-1320.
- Tracey, K., & Cerami, A. (1994). Tumor necrosis factor: Pleiotrophic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med.* 45, 491-503.

- Tsan, M. (2001). Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice. *Int J Mol Med.* (7), 13-19.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A., Holtzclaw, W., Kang, M., & Kobayashi, A. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified inducers. *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 94(7), 3195-3199.
- Wilson, A., Symons, J., McDowell, T., & McDevit, H. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*(94), 3195-3199.
- Yamamoto, T., Maruyama, W., Kato, Y., Yi, H., Shamoto-Nagai, M., Tanaka, M., Sato, T., & Naoi, M. (2002). Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 109(1), 1-13.
- Yudkin, J., Kumari, M., Humphries, S., & Mohamed-Ali, V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?. *Atherosclerosis.* 148(2), 209-214.

## **VIII. ANEXOS**

### **8.1. Condiciones del cultivo de macrófagos**

Macrófagos de ratón- línea celular Raw 264.7

Medio: DMEM con 10% de FBS (ATCC), adicionado con penicilina (100 U/ml) o estreptomycin (100 mg/mL)

Atmosfera: 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>

(Bognar y col., 2013; Peng y col., 2013; Li y col., 2014).

El medio de crecimiento para cultivo celular debe tener un pH óptimo, generalmente es suplementado con antibióticos y sustancias nutritivas y debe ser esterilizado por filtración y mantenido a temperatura no mayor de 4°C.

### **8.2. Cambio de medio para cultivo adherente**

El objetivo del cambio de medio es renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y células muertas, este procedimiento debe realizarse cada 48 horas para asegurar el desarrollo adecuado del cultivo, realizando los siguientes puntos (Laboratorio de alimentos funcionales a cargo de la Dra. Nuria Rocha, Unidad de posgrado e investigación del tecnológico de Durango):

- Revisar el estado de las células al microscopio antes de realizar cualquier procediendo.
- Colocar la caja Petri sobre un acrílico de forma inclinada (colocar un lado del acrílico sobre otra caja Petri sin cultivo).
- Aspirar el medio con una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío adaptado. En caso de que no se cuente con bomba de vacío o no esté funcionando, el medio se aspira con una pipeta de 10 mL estéril.
- Desinclinan las cajas y dar un lavado con 10 mL de PBS 1X estéril y a 37°C, agitar ligeramente durante 10 segundos aproximadamente.
- Aspirar el PBS del mismo modo que se aspiró el medio de cultivo.
- Agregar 10 mL de medio fresco estéril a 37°C

### 8.3. Transferencia de células

Las células pueden cultivarse más tiempo si se transfieren regularmente, así se evita la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular.

Este procedimiento es de gran importancia en el cultivo celular ya que las células al duplicarse van saturando la superficie de la caja Petri impidiendo que las nuevas células se adhieran o tengan una adecuada disposición de los nutrientes; para mantener un cultivo en buen estado, este debe estar pre-confluyente.

Para despegar las células en un cultivo adherente se requiere de una peptidasa, como la tripsina, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis, además de un agente quelante como el EDTA, que forma complejos con iones de metales pesados que pudiesen estar formando uniones entre las membranas celulares.

Para transferir las células de una caja ya pre-confluyente a varias cajas, ya sea para mantener un “stock” o para realizar diversos tratamientos, se deben seguir los siguientes pasos (Laboratorio de alimentos funcionales a cargo de la Dra. Nuria Rocha, Unidad de posgrado e investigación del tecnológico de Durango):

- Revisar el cultivo al microscopio.
- Colocar la caja Petri sobre el acrílico de forma inclinada y aspirar el medio con una pipeta Pasteur conectada al sistema de vacío adaptado, si no se cuenta con sistema de vacío o no esté funcionando, el medio se aspira con una pipeta de 10mL estéril.
- Bajar la caja Petri del ángulo inclinado y agregar 10mL de verseno al 0.02% estéril a 37°C.
- Aspirar el verseno inmediatamente del mismo modo que se aspiró el medio de cultivo.
- Agregar 5 mL de tripsina estéril a 37°C, dejar actuar aproximadamente 30 segundos.
- Aspirar la tripsina dejando una ligera capa que cubra la superficie de la caja Petri.

- Incubar de 3 a 5 minutos.
- Al sacar de la incubadora mover la caja Petri dando ligeros golpes cuidadosamente para favorecer el despegue de las células, cuando se observé este desprendimiento, verificar al microscopio la separación.
- Agregar inmediatamente 10mL de medio de cultivo fresco, resuspender hasta recuperar todas las células y colocarlas en un tubo Corning de 50mL estéril.
- Para contar las células, se toma una alícuota de 10 $\mu$ L de suspensión celular y se coloca en un tubo Eppendorf, con otra punta se toman 10 $\mu$ L de azul tripano y se homogeniza; colocar 10 $\mu$ L de muestra en una lámina para conteo celular.
- Calcular el número de células que se desee sembrar.