



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS PROPIEDADES ANTI-INFLAMATORIAS DE
EXTRACTOS DE MORA (*Rubus glaucus B.*) DEL ECUADOR

AUTORA

Carolina Alexandra De Sucre Crausaz

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS PROPIEDADES ANTI-INFLAMATORIAS DE
EXTRACTOS DE MORA (*Rubus glaucus* B.) DEL ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

PhD. Nikolaos Kyriakidis

Autora

Carolina Alexandra De Sucre Crausaz

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Estudio *in vitro* de las propiedades anti-inflamatorias de extractos de mora (*Rubus glaucus B.*) del Ecuador, a través de reuniones periódicas con la estudiante Carolina Alexandra De Sucre Crausaz, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Nikolaos Kyriakidis

Doctor en Inmunología

C.I: 1758747842

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Estudio *in vitro* de las propiedades anti-inflamatorias de extractos de mora (*Rubus glaucus B.*) del Ecuador, de la estudiante Carolina Alexandra De Sucre Crausaz, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

José Miguel Álvarez Suarez

Doctor en Alimentación y Salud

C.I: 1756653372

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Carolina Alexandra De Sucre Crausaz

C.I: 1716769920

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mi mamá por la oportunidad de estudiar y convertirme en profesional.

A los miembros del Centro de Investigación UDLA por su apoyo, así como al PhD José Miguel Álvarez por la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

Finalmente, quiero expresar mis más grandes y sinceros agradecimientos al PhD Nikolaos Kyriakidis por su dirección, conocimientos y enseñanzas que me permitieron desarrollar este proyecto y crecer como profesional.

DEDICATORIA

A mi mamá María Elena Crausaz por su amor, paciencia y sacrificio que me han impulsado a cumplir un sueño más; gracias por inculcar en mí los valores y principios que me han formado como persona, al igual que por ser un ejemplo de esfuerzo y valentía toda mi vida.

A mi tío Fernando De Sucre por su amor, confianza y apoyo incondicional sin el cual no me hubiera sido posible llegar hasta aquí.

RESUMEN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* B.), originaria de los andes, es considerada como uno de los frutos rojos más comercializados en Sudamérica por su delicioso sabor dulce. En Ecuador se la encuentra de forma silvestre o cultivada, y se consume en jaleas, jugos o simplemente el fruto. El interés por la mora, al igual que otros frutos rojos, ha incrementado por contener compuestos bioactivos que se han encontrado ligados a potenciales beneficios para la salud, por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. En este proyecto se planteó estudiar las propiedades antiinflamatorias de la mora de Ambato en células RAW 264.7 (macrófagos de ratón) mediante el análisis de la expresión génica relativa de varios genes asociados con el proceso de inflamación, y otros relacionados con el estrés oxidativo. Para ello se utilizaron macrófagos de ratón, los cuales obtienen actividad pro-inflamatoria en un proceso llamado polarización M1 estimulada por ligandos de TLRs. Los macrófagos fueron sometidos a 5 tratamientos distintos en los que fueron estimulados con, un agente pro-inflamatorio conocido como LPS, que actúa como ligando de TLR4, activando vías de señalización que desencadenan la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias; además del agente antiinflamatorio (extracto de la mora). Adicionalmente, se realizó RT-qPCR para el análisis de la expresión génica relativa, donde se utilizaron *primers* de 8 diferentes genes (TNF- α , IL-1b, NF κ b, OGG1, iNOS, SOD1, SOD2m, CAT). Los resultados obtenidos revelaron una actividad antiinflamatoria preventiva por parte de la mora, al disminuir significativamente los niveles de expresión del gen NF- κ B, así como al exhibir esta tendencia en la expresión de otros genes, con respecto al tratamiento donde las células fueron estimuladas primero con extracto de mora por 24 horas y posteriormente con LPS por 24 horas más.

ABSTRACT

The andean blackberry (*Rubus glaucus* B.), native to the Andes, is considered one of the most commercialized red fruits in South America for its delicious sweet taste. In Ecuador it is found in wild or cultivated form, and is consumed in jellies, juices or simply as fruit. Interest in this berry, like other red fruits, has increased because of its bioactive compounds that have been linked to potential health benefits due to their anti-inflammatory and antioxidant properties. In this project we investigated the anti-inflammatory properties of blackberry in *RAW 264.7* (mouse macrophages) cells by analyzing the relative gene expression of several inflammation and oxidative stress associated genes. To do so, murine macrophages were used, capable to demonstrate a pro-inflammatory phenotype in a process called M1 polarization stimulated by TLRs ligands. The macrophages underwent 5 different treatments in which they were stimulated with a pro-inflammatory agent known as LPS, which acts as a TLR4 ligand, activating signaling pathways that trigger the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines; in addition to the anti-inflammatory agent (blackberry extract). Additionally, RT-qPCR was performed for relative gene expression analysis, using *primers* for 8 different genes of interest (TNF- α , IL-1b, NFkb, OGG1, iNOS, SOD1, SOD2m, CAT). Our results revealed that the andean blackberry has a preventive, anti-inflammatory activity significantly decreasing NF- κ B expression levels, as well as exhibiting an anti-inflammatory tendency in the expression of other genes in cells initially stimulated for 24 hours with blackberry extract followed by 24 hours of LPS treatment.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivo general y objetivos específicos	4
1.4 Justificación de la investigación	5
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Conformación química de la mora.....	6
2.1.1 Polifenoles	6
2.1.2 Flavonoides	7
2.1.3 Antocianinas	9
2.1.4 Taninos	10
2.1.5 Carotenoides.....	12
2.1.6 Vitaminas	12
2.2 Inflamación.....	13
2.2.1 Eventos celulares.....	14
2.2.1.1 Macrófagos.....	15
2.2.1.1.1 Reconocimiento de macrófagos	15
2.2.1.1.2 Efectos de activación de los macrófagos	16
2.2.1.1.3 Mecanismos efectores de los macrófagos en la inflamación	17
2.2.1.1.3.1 Citosinas.....	18
2.2.1.1.3.2 Estrés Oxidativo	18
2.2.1.1.3.3.1 Especies reactivas de oxígeno	19
3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS	19
3.1. Población y muestra	19
3.1.1. Población	19
3.1.2. Muestra.....	19
3.2. Preparación de muestras	20
3.3. Cultivo celular.....	20
3.4. Estimulación con LPS y extractos de frutos.....	20

3.4.1. Sembrado celular.....	20
3.4.2. Tratamientos de estimulación con LPS y extractos de frutos	21
3.5. Extracción de ARN.....	21
3.6. Tratamiento con DNasa.....	22
3.7. Expresión génica por RT-qPCR.....	23
3.7.1. Análisis de la expresión génica relativa de los genes de interés ..	23
3.8. Evaluación estadística de los resultados.....	23
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Efecto de la mora en la expresión del gen NF- κ B en macrófagos <i>RAW 264.7</i>	24
4.2. Efecto de la mora en la expresión de los genes pro-inflamatorios IL-1 β y TNF α en macrófagos <i>RAW 264.7</i>	25
4.3. Efecto de la mora en la expresión del gen iNOS en macrófagos <i>RAW 264.7</i>	26
4.4. Efecto de la mora en la expresión de los genes SOD1 y SOD2m en macrófagos <i>RAW 264.7</i>	27
4.5. Efecto de la mora en la expresión del gen OGG1 en macrófagos <i>RAW 264.7</i>	29
4.6. Efecto de la mora en la expresión del gen CAT en macrófagos <i>RAW 264.7</i>	30
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
5.1 Conclusiones	31
5.2 Recomendaciones.....	31
REFERENCIAS	33
ANEXOS	43

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En los últimos años, ha existido un creciente interés por los alimentos funcionales, y los beneficios que estos pueden proporcionar a la salud humana. Consecuentemente, varios frutos han sido estudiados por su potencial como fuente de compuestos bioactivos (Costa, García, Jimenez, y Silva, 2013, p. 541). Los frutos rojos como fresas, arándanos y zarzamoras, constituyen una de las principales fuentes de polifenoles en la dieta, en especial los ácidos benzoicos y cinámicos, flavonoides, catequinas, taninos y antocianinas (Fuentes et al., 2016). Estudios *in vitro* han demostrado que las antocianinas encontradas en las bayas tienen potenciales propiedades anticancerígenas incluyendo antioxidantes y antiinflamatorias, que se asocian con la capacidad de contrarrestar el desarrollo de varias afecciones causadas por el estrés oxidativo, como la obesidad, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Ramirez, Zambrano, Sepúlveda, Kennelly y Simirgiotis, 2014, p. 106). Por esta razón, se entiende que la dieta juega un papel preventivo importante, y como resultado, existe un incremento en la demanda de estos alimentos para suministrar antioxidantes y antiinflamatorios exógenos (Nardi et al., 2016, pp. 1239-1241).

Los países tropicales cuentan con una gran variedad de frutas conformadas por estos compuestos valiosos. En este sentido, se puede mencionar a la mora de castilla (*Rubus glaucus* B.), originaria de los andes y nativa del clima frío; es considerada como uno de los frutos rojos más comercializados en Sudamérica (Cancino, García y Villamizar, 2015, p. 8). En Ecuador se la encuentra de forma silvestre o cultivada, y se consume en jaleas, jugos o simplemente el fruto. Esto se debe a que resulta bastante atractiva, gracias a su sabor dulce, aroma, y color, el cual se ve atribuido a su alto contenido de antocianinas (Kaume, Howard y Devareddy, 2012, p. 5717). Estudios sobre su composición han brindado datos importantes en relación al contenido de compuestos bioactivos,

reportando, por ejemplo, un total de 1.478 g/kg de contenido de antocianinas (Rojas y Correa, 2006, pp.117-122). Adicionalmente, diferentes partes de la planta han sido utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades antioxidantes. A pesar de dichos reportes, se considera que las investigaciones acerca del potencial antioxidante y antiinflamatorio que este fruto puede contribuir a la salud, son limitadas.

La inflamación es una de las primeras respuestas, poco específica, producidas por el sistema inmune innato ante infecciones o lesiones tisulares, con el fin de atraer más células del sistema inmune al foco de la infección, y potenciar la respuesta inmune (León et al., 2016, p. 48). Es una respuesta rápida pero controlada, por lo que se considera eficaz y apropiada, mientras el proceso inflamatorio se encuentre regulado correctamente y mantenga localizadas, tanto las células activadas, como los mediadores pro-inflamatorios, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-6 (IL-6), y la interleucina-1 β (IL-1 β). La producción alta de estos mediadores se ha visto estrechamente relacionada con la activación propagada de macrófagos y la consiguiente patogénesis de algunas enfermedades crónicas (Álvarez-Suarez et al., 2017, pp. 46-48) Cuando el organismo no es capaz de eliminar el agente causante de la infección o la lesión tisular durante la inflamación aguda, se produce lo que se conoce como inflamación crónica, que involucra la acción de macrófagos, linfocitos T ayudadores y/o linfocitos T citotóxicos, y células plasmáticas (Marinovic, 2008, pp. 2-4).

Los macrófagos son células del sistema inmune que tienen como función promover la inflamación por medio de la producción de citosinas y quimiocinas, además de fagocitar al patógeno y presentar el antígeno. Normalmente se encuentran presentes en todos los tejidos, eliminando desechos celulares para mantener la homeostasis e integridad, y ayudan a reparar el daño en los tejidos mediante la síntesis de matriz extracelular. Al ser activados por citoquinas, o por macromoléculas provenientes de microbios (entre otros, el lipopolisacárido o LPS de las bacterias Gram negativas), los macrófagos obtienen actividad pro-

inflamatoria en un proceso llamado polarización M1, generando una respuesta rápida y no específica mediante la secreción de enzimas, la producción de especies reactivas de oxígeno y citoquinas (Lech y Anders, 2013, pp. 989-991). Durante una inflamación crónica, una vez activados, los macrófagos pueden producir daño en el tejido por cuatro mecanismos principales: inducción de síntesis de metaloproteasas, producción de ácido araquidónico, metabolitos de óxido nítrico, y de especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya acumulación produce estrés oxidativo (Rosando-Pérez y Mendoza-Núñez, 2007, p. 63). Si el estrés oxidativo resulta muy persistente, la inflamación crónica puede llegar a producir daños en el ADN (Marinovic, 2008, pp. 3-4). Por lo tanto, inhibir la respuesta inflamatoria que resulta excesiva, se ha presentado como una manera de disminuir el daño relacionado con el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es un proceso que se caracteriza por el desequilibrio bioquímico de la producción de radicales libres, en relación a antioxidantes favoreciendo a los primeros; ya sea por la falta de dichas defensas, o por el aumento de radicales libres, afectando así a la homeostasis del organismo, y causando daño a nivel celular, tisular o sistémico (Sies, Berndt y Jones, 2017, p. 717). Por esta razón, se asocia a este mecanismo con la evolución de varias enfermedades crónicas como el Alzheimer, la artritis y la diabetes (Rosando-Pérez y Mendoza-Núñez, 2007, p. 59).

1.2 Planteamiento del problema

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son la causa número uno de mortalidad en el mundo, y sobre todo en los países en vías de desarrollo. Según los datos de la World Health Organization (WHO) (2016), se estimó que el 73% de las muertes en el Ecuador fueron por ECNT; con un 24% para enfermedades cardiovasculares, 17% cáncer, 8% diabetes, 5% enfermedades respiratorias, y 19% otras ECNT. Siendo una de las principales causas fisiopatológicas para las ECNT, se considera necesario buscar soluciones para

contrarrestar la inflamación y el estrés oxidativo subsiguiente, que podrían encontrarse en la ingesta de alimentos ricos en compuestos bioactivos capaces de actuar como antiinflamatorios y antioxidantes.

El poco consumo de frutas y verduras conlleva a varias situaciones desfavorables en relación a la nutrición, principalmente a la ingesta insuficiente de estas sustancias biológicamente activas como: compuestos fenólicos, carotenoides, glucosinolatos, etc. (Ondarza y Higuera, 2016, pp. 1-4). Se ha demostrado que la ingesta insuficiente de estas sustancias, forma parte de los diez principales factores de riesgo relacionados con la mortalidad atribuible (World Health Organization [WHO], 2013). En el Ecuador se utilizan tan solo la tercera parte de las especies vegetales disponibles para la alimentación y la mayoría de personas no consumen los más de 400 gramos de frutas y verduras al día recomendados para mejorar la salud y reducir el riesgo de ciertas enfermedades no transmisibles (WHO, 2019). Algunos frutos, en especial los frutos rojos como la mora, no se consideran un alimento con importante potencial benéfico para la salud, por la escasa información acerca de sus propiedades. Dicha falta de conocimiento ha limitado la tradición del consumo frecuente de estas fuentes naturales de compuestos bioactivos (Moya, 2013, pp. 4-7). En este sentido, se considera necesario investigar las propiedades antiinflamatorias que podrían encontrarse en la mora.

1.3 Objetivo general y objetivos específicos

Objetivo general:

Estudiar las propiedades anti-inflamatorias de extractos de mora del Ecuador en macrófagos de ratón, estimulados con LPS.

Objetivos específicos:

- Inducir una respuesta inflamatoria en macrófagos de ratón (células RAW).

- Determinar la dosis y tiempo óptimos de extractos de mora, para producir una respuesta antiinflamatoria potente.
- Investigar la capacidad antiinflamatoria de extractos de mora, a través de experimentos de estimulación de células RAW (macrófagos de ratón).

1.4 Justificación de la investigación

El Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad, reconocido mundialmente por su riqueza con respecto a las plantas, así como la variedad de frutos que se pueden encontrar. Como se mencionó anteriormente, las frutas y verduras son esenciales para la salud, y el consumirlos diariamente en suficiente cantidad podría ayudar a prevenir enfermedades importantes con alta tasa de mortalidad, como lo son las enfermedades crónicas no transmisibles. Según cálculos realizados por la World Health Organization (WHO) (2013, pp. 1-2), se podrían salvar 1.7 millones de vidas cada año si se incrementara el consumo de estos alimentos ricos en compuestos bioactivos, con propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias, como se sospecha ser el caso de la mora andina.

Varios estudios se han basado en la correlación inversa que existe entre el consumo de frutas y el riesgo de enfermedades crónicas. En este sentido, se ha demostrado la capacidad antiinflamatoria y protectora *in vitro* de algunos extractos de frutos rojos contra el daño celular mediado por la inflamación, tras estimular las células con los extractos y posteriormente con el agente pro-inflamatorio (Lee et al., 2014, pp. 404-405). Sin embargo, también se desea observar los efectos que estos pueden tener al realizar un estímulo simultáneo de los mismos, así como al estimular las células con el agente pro-inflamatorio antes del antiinflamatorio.

Por esta razón, surge la necesidad de profundizar los estudios sobre las propiedades potencialmente antiinflamatorias que puede poseer la mora,

justificando y permitiendo fomentar su consumo constante en la dieta, como fuente natural de compuestos biológicamente activos para la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades relacionadas con una inflamación exagerada y/o crónica, y con el estrés oxidativo subsiguiente.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Conformación química de la mora

2.1.1 Polifenoles

Los compuestos fenólicos o polifenoles son las sustancias más numerosas del reino vegetal, con más de 8000 estructuras descritas (Bravo, 2009, p. 317). Son un grupo de moléculas solubles en agua, que se encuentran conformadas por varios grupos fenólicos. Se producen por el metabolismo secundario de las plantas, y están involucrados en varios de sus procesos, como el crecimiento, la pigmentación, y las reacciones de defensa, entre otras. Los polifenoles pueden clasificarse según la cantidad de anillos fenólicos que poseen y en función a los elementos que presenten dichos anillos. En este sentido, se dividen en dos grupo principales: los flavonoides y los no flavonoides (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012, pp. 77-78). Para la mora de castilla se ha reportado una cantidad total de polifenoles de 2.66 mg GAE/g FW (Alarcón-Barrera et al., 2018, pp. 229).

Los polifenoles son el grupo más estudiado gracias a su actividad antioxidante, que se ve atribuida a su capacidad de captar radicales libres, actuar como quelantes de metales, e inhibir la lipoxigenasa (Quiñones, et al., 2012, p. 77). Además, se ha observado que son capaces de impedir que las células cancerígenas sigan proliferando, e interactúan con la membrana lipídica al comportarse como una barrera física en contra de radicales hidrosolubles. Para inhibir los radicales libres en la oxidación lipídica, los polifenoles donan un

electrón de su grupo hidroxilo (OH⁻); o se estabilizan gracias a su estructura aromática por resonancia del radical resultante. Sin embargo, también pueden actuar como agentes prooxidantes, por lo que, los compuestos fenólicos solo se pueden clasificar como antioxidantes si cumplen con dos condiciones: que el sustrato que se va a oxidar se encuentre a una concentración mayor que la de los polifenoles que van a retrasar, o prevenir, la oxidación provocada por un radical libre; y que, tras secuestrar al radical, este sea estable y no sea capaz de actuar en la oxidación. Esta actividad antioxidante varía según el grupo y la solubilidad en fase lipídica o acuosa del compuesto fenólico (Bravo, 2009, p. 327).

2.1.2 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos conformados por dos anillos aromáticos de 6 carbonos (A y B), unidos a un anillo heterociclo oxigenado de 3 carbonos (C), con un doble enlace entre C2 y C3 (Figura 1) (Wang, Li, y Bi, 2018, pp. 12-14). Las diferentes clases de flavonoides (antocianidinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavanoles y taninos condensados), varían en el patrón de sustitución del anillo C, así como en su grado de oxidación; mientras que los compuestos dentro de estas clases, se diferencian en los patrones de sustituciones de los anillos A y B. Los anillos bencénicos se han visto asociados con el potencial antioxidante de los flavonoides en las plantas (Quiñones et al., 2012, pp. 78-79).

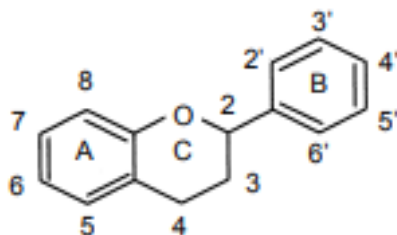


Figura 1. Estructura química básica de los flavonoides

Adaptado de (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras y Tuñón., 2002, p. 272)

Los mecanismos antioxidantes principales de los flavonoides pueden incluir el (1) inhibir enzimas, o quelar elementos involucrados en la producción de radicales libres, suprimiendo la formación de especies reactivas de oxígeno; así como (2) buscar y reducir radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno (Wang et al., 2018, p. 16). Ciertos flavonoides pueden absorberse por la membrana celular y de esta manera protegerla de los radicales libres. Además, al ser hidrosolubles y liposolubles, pueden traspasar la barrera hematoencefálica, protegiendo a las células del cerebro. Por otro lado, contribuyen al aumento de la efectividad de las células NK (Natural Killer cells) del sistema inmune, combatiendo la inflamación. Esto se explica por su acción inhibitoria del factor de transcripción NFκB, el cual activa la expresión de citosinas proinflamatorias; o por inhibir la actividad enzimática del metabolismo del ácido araquidónico (Pietta, 2000, pp. 1036-1041).

Los flavonoides más comunes en las bayas son la quercetina, el kaempferol, y la myricetina; los cuales han probado ser importantes para la regulación de la concentración intracelular del glutatión, contribuyendo a la inducción del sistema antioxidante en las células (Kaume et al., 2012, p. 5718). En la mora de castilla se ha encontrado 1.25 mg CE/g FW del contenido total de flavonoides (Alarcón-Barrera et al., 2018, p. 229).

2.1.3 Antocianinas

Las antocianinas están compuestas por antocianidinas, formadas por dos anillos (A y B) que se encuentran unidos por una cadena de 3 carbonos. Las variaciones, tanto de la cantidad como de la orientación de sus grupos hidroxilos, en el anillo B dan lugar a 19 tipos diferentes de antocianidinas, de las cuales 6 son comúnmente encontradas en las plantas: pelargonidina, delphinidina, cianidina, peonidina, malvidina, y petunidina (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, y Galán-Vidal, 2009, pp. 360-361). En la mora se encuentran diferentes tipos de cianidinas (Tabla 1), siendo la cinidina 3-dioxaloylglucosida exclusiva para este tipo de fruto. Al ser pigmentos hidrosolubles ubicados en las vacuolas de las células, las antocianinas confieren los colores rojos, rosas, purpuras, azules y naranjas, de frutos, flores y hojas. Los dobles enlaces absorben la luz a 500 nm, causando pigmentos visiblemente rojos para el ojo humano; mientras que el incremento de hidroxilación produce tonalidades más oscuras, acercándose al azul (Kaume et al., 2012, pp. 5717-5718). La mora de castilla es de color rojo brillante, y pasa a ser morado oscuro cuando madura. Para este fruto se ha reportado un contenido total de antocianinas de 0.49 mg PgEq/g FW (Alarcón-Barrera et al., 2018, p. 229).

Tabla 1.

Antocianinas presentes en la mora

Cianidina 3-glucósido	Cianidina 3-arabinósido
Cianidina 3-galactósido	Malvidina 3-arabinósido
Cianidina 3-xilósido	Perlargonidina 3-glucósido
Cianidina 3-dioxalyl-glucósido	Cianidina 3-(6-malonil) glucósido
Cianidina 3-rutinósido	Cianidina 3-(3-malonil) glucósido
Cianidina 3-soforosido	Cianidina 3-dioxaloilglucósido
Cianidina 3-glucosilrutinosido	Cianidina 3-arabinósido

Malvidina 3-arabinosido

Adaptado de (Kaume et al., 2012, p. 5718)

Las antocianinas juegan un papel importante en la prevención de varias enfermedades, al poseer actividad antiinflamatoria y antioxidante. Sin embargo, la propiedad antioxidante de las antocianinas está directamente relacionada con su estructura química, aumentando proporcionalmente según la cantidad de grupos hidroxilos. Las que contienen grupos 3', 4'-dihidroxi quelan iones metálicos con mayor rapidez, formando complejos estables. Además, la actividad antioxidante de las antocianinas depende de orientación de sus anillos, la cual determina la habilidad de donar un átomo de hidrogeno a un radical libre, y su capacidad de tolerar un electrón no apareado (Miguel, 2011, pp. 10-12).

2.1.4 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua, encontrados en muchas bayas. Se caracterizan por formar complejos insolubles con proteínas, ácidos nucleicos, alcaloides, o polisacáridos; lo que además causa que generen un sabor particular, conocido como gusto tánico. Basándose en su estructura se clasifican en dos grupos: hidrolizables (ET y galotaninos) y condensados (proantocianidinas) (Kaume et al., 2012, p. 5719).

Los taninos hidrolizables están formados por un núcleo de glucosa estratificado con ácido fenolcarboxílico como el ácido gálico, en cuyo caso se les conoce como galotaninos; o si contienen ácido hexahidroxidifénico, se les llama elagitaninos. Las plantas son capaces de formar estos o una mezcla de ambos tipos. En la mora se han identificado taninos hidrosolubles de tipo elagitaninos (Tabla 2) (Koleckar et al., 2008, pp. 439-441).

Tabla 2.

Taninos presentes en la mora

Sanguiin H-6	galoil-HHDP glucosa
--------------	---------------------

<p>Lambertanina C Pedunculagina galoil-bis-HHDP glucosa Sanguiin H-10 isomero Sanguiin H-6 menos residuo de ácido gálico Lambertianina C menos residuo de ácido gálico</p>	<p>Sanguiin H-2 Sanguiin H-6 más residuo de ácido gálico Ácido elágico Castalagina / vescalagina Conjugados de pentosa de ácido metil elágico</p>
---	---

Adaptado de (Kaume et al., 2012, p. 5718)

Por otro lado, los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas, que son oligómeros y polímeros de flavonoides formados por núcleos de flavan-3-ol o catequinas. Se clasifican a las proantocianidinas según su patrón de hidroxilación en prodelfinidinas, procianidinas y propelargonidinas. En las bayas se han encontrado dos tipos principales: propelargonidinas y procianidinas. (Vázquez-Flores, Álvarez-Parrilla, López-Díaz, Wall-Medrano, y de la Rosa, 2012, pp. 88-90). En la mora de castilla se ha identificado un contenido total de taninos de 0.95 mg TAEq/g FW (Alarcón-Barrera et al., 2018, p. 229)

Los taninos cuentan con actividad antioxidante por ser capaces de eliminar radicales libres, al donar electrones para promover una estructura más estable, y como resultado, menos dañina. Esta propiedad aumenta por el alto grado de hidroxilación de sus anillos aromáticos, así como por tener un mayor peso molecular. Además, inhiben a la sintetasa de óxido nítrico, reduciendo la producción de NO, así como otras enzimas prooxidativas. Las proantocianidinas protegen a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) frente a la oxidación, la cual las modifica provocando lesiones ateroscleróticas (Koleckar et al., 2008, pp. 439-441).

2.1.5 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos lipófilos, responsables de las coloraciones rojas, amarillas y naranjas de frutas y vegetales. En la actualidad, se han identificado aproximadamente 750 tipos, formados por 8 isoprenoides. Según su conformación química, se clasifican en dos grupos: xantófilas, las cuales cuentan con oxígeno como grupo funcional (zeaxantina y luteína); y carotenos, que no contienen grupos funcionales, solo cadena de hidrocarburo (licopeno, α -caroteno y β -caroteno). Los carotenoides, sean xantófilas o carotenos, pueden exhibir una estructura cíclica en uno o ambos extremos como el β -caroteno; o acíclica como el licopeno (Moo-Huchin et al., 2017, pp. 605-606). Los que cuentan con anillo β -ionona no sustituido (α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y β -caroteno), son capaces de convertirse en vitamina A. Por otro lado, el licopeno carece de esta actividad pero es un potente antioxidante; lo que protege al sistema celular y ayuda a disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Saini, Nile, y Park, 2015, pp.735-736). Para la mora de castilla se ha reportado un contenido total de β -caroteno de 91.71 ug/100 g FW, así como un contenido total de luteína de 538.66 ug/100 g FW (Alarcón-Barrera et al., 2018, p. 229).

La actividad antioxidante de los carotenoides se encuentra en su capacidad de escindir radicales peroxilo, especies reactivas de oxígeno, y oxígeno molecular. Esto se debe a que pueden neutralizarlos por aceptación de electrones, gracias a sus enlaces dobles conjugados (Saini et al., 2015, pp. 736-737)

2.1.6 Vitaminas

La vitamina C, también conocida como ácido ascórbico, es un compuesto soluble en agua que no puede ser producido por el cuerpo humano, pero que ejerce varias funciones en este. Resulta fundamental para la biosíntesis de colágeno, neurotransmisores y carnitina, así como la absorción del hierro. Estas funciones se derivan de sus propiedades como agente quelante y reductor, al ser donante de electrones; lo que al mismo tiempo le confiere

actividad antioxidante (Lizcano, Dávila, y Hernández, 2019, p. 155). La vitamina C actúa como antioxidante al romper cadenas en la peroxidación de lípidos, ya que es capaz de reaccionar con radicales peroxilo; o a partir de la reducción del radical α -tocoeroxilo, generando Vitamina E (α -tocoferol), otro antioxidante (Padayatty et al., 2003, p. 19). Estudios han demostrado que la ingesta de vitamina C también puede reducir los niveles de citosinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-6 y TNF- α (Ellulu, Rahmat, Patimah, Khaza, y Abed, 2015, p. 3406). En la mora de castilla se ha reportado un contenido total de vitamina C de 92.92 mg/100 g FW (Alarcón-Barrera et al., 2018, p. 229).

2.2 Inflamación

El sistema inmune de los mamíferos es un sofisticado mecanismo de defensa en contra de agentes infecciosos y lesiones tisulares, que se divide en innato y adaptativo. La inflamación es una de las primeras respuestas producidas por el sistema inmune innato, con el fin de potenciar la respuesta inmune. Entre los principales procesos dentro de una respuesta inflamatoria se encuentra el incremento de flujo sanguíneo, aumento de permeabilidad capilar, el reclutamiento y movilización celular hacia el foco de la inflamación, todas acciones mediadas por citosinas y quimiocinas secretadas inicialmente por células del sistema innato que residen en el tejido infectado o dañado (León et al., 2016, p. 48). Estas células que incluyen los macrófagos y los neutrófilos una vez reconocen moléculas de patógenos (PAMPs) o señales de daño tisular (DAMPs) se activan y empiezan a secretar citosinas y quimiocinas proinflamatorias. La inflamación aguda se caracteriza por producir calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor, y deterioro de las funciones; lo que se debe a la vasodilatación, el aumento del flujo sanguíneo subsiguiente, el aumento de la permeabilidad vascular que conduce a una acumulación de líquido en el espacio extracelular y distorsión del tejido.

Sin embargo, cuando esta no se elimina el patógeno la inflamación persiste por un largo periodo de tiempo y se produce lo que se conoce como inflamación

crónica. La inflamación crónica se caracteriza por la infiltración local de macrófagos y linfocitos, daño tisular, y reparación por fibrosis y angiogénesis (Mittal, Siddiqui, Tran, Reddy, y Malik, 2014, p. 1127).

2.2.1 Eventos celulares

Las respuestas inmunes siguen una serie de eventos que involucra tres pasos: reconocimiento, activación y mecanismos efectores. El reconocimiento por parte de las células es necesario para detectar al agente causante de la inflamación o el daño tisular, así como para reclutar más células y desencadenar una respuesta inmediata. Una vez los receptores de patrones de la célula se unen con sus ligandos respectivos la célula se activa con el fin de desencadenar sus mecanismos efectores, es decir el conjunto de mecanismos que usa para conducir a la eliminación del patógeno y/o la reparación del daño tisular. (Wu y Chen, 2014, p. 1).

En el proceso inflamatorio intervienen varias células conocidas como leucocitos; entre las que se encuentran los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, y las células cebadas), macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, las células fundamentales para el desencadenamiento de la inflamación son los macrófagos residentes en el tejido afectado y los neutrófilos reclutados, conjuntamente denominados células inflamatorias. El reclutamiento de los leucocitos al foco de la inflamación se realiza mediante quimiotaxis, migración, adhesión y diapédesis. Las células ubicadas en el centro de la infección, liberan quimiocinas que atraen y citosinas que activan más células del sistema inmune innato. Por lo general los leucocitos se encuentran circulando en los vasos sanguíneos, pero al iniciar el proceso inflamatorio, gracias a la acción de varias moléculas de adhesión, estos se unen a las paredes endoteliales y atraviesan el vaso, en un fenómeno que se conoce como diapédesis. Adicionalmente, para llegar al foco de la infección se debe romper la membrana basal del endotelio por medio de metaloproteinasas (eg. MMP9).

Al llegar al sitio de la infección, los monocitos se diferencian en macrófagos, y junto con los neutrófilos y las células dendríticas, fagocitan al agente causante de la infección. Para esto, los leucocitos reconocen al patógeno, lo engloban y endocitan, formando en su interior lo que se conoce como fagolisosoma. Esta estructura contiene diferentes enzimas que les permiten degradar al patógeno (Newton et al., 2012, pp. 1-3). Normalmente, después de realizar su función, los neutrófilos se someten a apoptosis exponiendo partes del patógeno degradado para potenciar la respuesta inmune.

Por otro lado, en una inflamación crónica existe involucramiento de macrófagos y linfocitos T los cuales infiltran el tejido infectado propagando el proceso inflamatorio (Kolaczowska y Kubes, 2013, pp. 160-161). Los macrófagos son las células dominantes de la inflamación crónica, cuya acumulación persiste por un reclutamiento permanente y la proliferación local de los mismos. De esta manera, la inflamación local propagada y mal controlada durante una inflamación crónica genera lesión tisular (Marinovic, 2008).

2.2.1.1 Macrófagos

Los macrófagos realizan funciones indispensables en la inmunidad innata, desempeñando un rol central en la inflamación. Contribuyen a la eliminación de patógenos o células dañadas por medio de la fagocitosis y su posterior degradación, y también ayudan a la activación del sistema inmune adaptativo por medio de la presentación de antígeno (Wynn y Vannella, 2016, p. 450).

2.2.1.1.1 Reconocimiento de macrófagos

Las células del sistema inmune innato son capaces de reconocer un amplio espectro de patógenos incluyendo virus, hongos, parásitos y bacterias, así como daño celular. El reconocimiento de ambos, patógenos y daño celular o tisular, esta mediado por receptores de reconocimiento de patrones

moleculares (PRR, pathogen recognition receptors). Estos reconocen estructuras moleculares ampliamente compartidas por diferentes patógenos, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o moléculas propias expuestas solo en el caso de daño celular, llamadas alarminas o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Tras dicho reconocimiento, los PRRs empiezan un programa de señalización que desencadena las respuestas defensivas del sistema inmune para eliminar al patógeno o reparar el tejido (Takeuchi y Akira, 2010, p. 637).

Los receptores de tipo Toll (TLRs) son los que mejor se han caracterizado, y se sabe que reconocen una amplia gama de PAMPs. Los TLRs son proteínas transmembrana formadas por repeticiones ricas en leucina (LRRs), las cuales median el reconocimiento de los PAMPs. Se los encuentra expresados en las superficies de las células o asociados a vesículas intracelulares. Existen diferentes tipos de TLRs que reconocen diferentes PAMPs, como el TLR4 que es capaz de detectar el lipopolisacárido (LPS), un componente estructural de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Tras reconocer el PAMP respectivo, los TLRs reclutan moléculas adaptadoras, y desatan eventos de señalización que culminan en la activación del factor de transcripción NF- κ B. Este, a su vez, activa la transcripción de genes que codifican para citosinas inflamatorias, quimiocinas, IFN tipo I y péptidos antimicrobianos (Moresco, LaVine, y Beutler, 2011, p. 1).

2.2.1.1.2 Efectos de activación de los macrófagos

Los macrófagos son células capaces de experimentar activación clásica M1 o pro-inflamatoria, estimulada por ligandos de TLRs e IFN- γ ; así como activación alternativa M2 o pro-fibrótica, estimulada por IL-4 e IL-13. Durante una infección, los macrófagos exhiben el fenotipo pro-inflamatorio (M1). Dichos macrófagos producen óxido nítrico y radicales libres de oxígeno en sus fagolisosomas secretan quimiocinas para atraer a otras células inmunes y citosinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), la

interleucina-1b (IL-1b) y la interleucina-6 (IL-6) para ayudar el acceso de la células reclutadas al sitio de la infección y activar procesos de destrucción de los microorganismos invasores. Sin embargo, también pueden dañar a los tejidos cercanos por medio de la producción aberrante y propagada de ROS, síntesis de metaloproteinasas, producción de NO por parte de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y NADPH, y ácido araquidónico (Lech y Anders, 2013, pp. 989-991). En consecuencia, se relaciona a los macrófagos M1 con varias enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes. Por lo tanto, estas respuestas deben ser estrechamente controladas para impedir que ocurra daño colateral grave en el tejido (Murray y Wynn, 2011, p. 729). En estos casos las células sobre expresan varias enzimas protectoras o reparadoras, principalmente OGG1 que repara daños en el el ADN mediante escisión de base en los residuos 8-oxoG, así como las superóxido dismutasas SOD1 y SOD2m, que destruyen radicales libres al convertirlos en peróxido de hidrogeno y oxígeno molecular (Wang et al., 2018, p. 628). Adicionalmente, se expresa la enzima catalasa (CAT) que transforma el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno molecular (Glorieux y Calderon, 2017, pp. 1095-1097).

Además de actuar en la respuesta pro-inflamatoria y antimicrobiana, los macrófagos se encuentran involucrados en la reparación del tejido. Estos pueden exhibir un fenotipo antiinflamatorio (M2) por la estimulación de IL-4, IL-13. Antagonizan la actividad de los macrófagos M1, desempeñando funciones de cicatrización y restauración del homeostasis del tejido por medio de la secreción de las citosinas profibróticas clásicas (IL-10 y TGF- β). De la misma manera, favorecen a la regeneración tisular al: promover la diferenciación de los fibroblastos, estimular la síntesis de colágeno e incrementar la expresión de inhibidores de metaloproteinasas que impiden la degradación de la matriz extracelular. Estudios han demostrado que los dos fenotipos son intercambiables (Wang, Liang, y Zen, 2014, p. 3).

2.2.1.1.3 Mecanismos efectores de los macrófagos en la inflamación

2.2.1.1.3.1 Citosinas

La respuesta inflamatoria se encuentra orquestada por varias citosinas, entre las cuales las más importantes son las pro-inflamatorias (IL-6, IL-1b y TNF-a). Los macrófagos son las principales células productoras de citosinas en la inflamación crónica. Al secretar IL-1, favorecen a la destrucción del tejido al aumentar la expresión de metaloproteasas, permitiendo el paso de los leucocitos a través de las paredes de vasos sanguíneos. Además, dificulta la reparación tisular al inhibir la síntesis de proteoglicanos y colágeno (Takeuchi y Akira, 2010, p. 805). Un tipo de citoquinas conocidas como quimiocinas, son altamente específicas para leucocitos y los reclutan hacia el tejido inflamado.

2.2.1.1.3.2 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo hace referencia a la acción de radicales libres que afectan a las células, cuando existe un desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos antioxidantes. Esto provoca danos que conllevan a cambios bioquímicos y fisiológicos, causando deterioro y muerte celular. Este desequilibrio podría asociarse a un déficit en el mecanismo antioxidante o a una proliferación descontrolada de radicales libres (Coronado, Vega, Gutiérrez, Vázquez, y Radilla, 2015, p. 207).

2.2.1.1.3.3 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas inestables y altamente reactivas por tener uno o más electrones no apareados. Pueden donar o aceptar un electrón de otras moléculas, comportándose como oxidantes o reductores, siendo dañinas para lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. Cuando estos componentes que son muy importantes para la célula se oxidan, pierden sus funciones normales, y la acumulación de estos daños puede causar la muerte celular. Se puede producir diferentes tipos de daño oxidativo en el ADN:

cambio en las bases nitrogenadas, ruptura de la estructura azúcar-fosfato, de una o las dos hebras, y por la formación de uniones cruzadas. El producto de oxidación más común del ADN es la lesión de la base 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG). Los radicales libres tienen una vida media corta, por lo cual actúan cerca del lugar donde se forman (Wojtunik-Kulesza Oniszczyk, Oniszczyk, y Waksmundzka-Hajnos, 2016, pp. 40-42).

2.2.1.1.3.3.1 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno, o ROS, son metabolitos del oxígeno que ha sido parcialmente reducido, adquiriendo gran capacidad oxidante. En concentraciones normales, actúan como moléculas señalizadores que regulan el crecimiento celular, su diferenciación, apoptosis, y adhesión a otras células. Sin embargo, en altas concentraciones resultan perjudiciales para las células, porque oxidan proteínas, lípidos, y dañan el ADN. Es por esto que la producción prolongada de ROS juega un papel fundamental en la inflamación crónica. Las especies más conocidas son: el anión superóxido, el peróxido de hidrogeno, y el radical hidroxilo (Mittal et al., 2014, p. 1127).

3. CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1. Población y muestra

3.1.1. Población

La población corresponde a los mercados de frutos de mora (*Rubus glaucus B.*) del Ecuador, de la región de Ambato.

3.1.2. Muestra

Las muestras utilizadas corresponden a los extractos de frutos mora (*Rubus glaucus B.*) del Ecuador, de la región de Ambato.

3.2. Preparación de muestras

Las muestras se lavaron y trituraron con nitrógeno líquido, utilizando pistilo y mortero, y se liofilizaron hasta estar completamente secas. De este liofilizado se pesó 2 g de la muestra y se extrajo en una solución de metanol/agua (80:20), dejando en agitación por 2 horas. Posteriormente, se centrifugó y una vez obtenido el pellet, se lavó nuevamente en una solución de metanol/agua (80:20) y se colocó en el rotavapor a 45°C. Por último, se retiró el solvente restante en un concentrador al vacío a 37°C, por 1 hora aproximadamente.

3.3. Cultivo celular

Para el cultivo de células RAW 264.7 (ATCC) (Anexo 1) se utilizó 20 ml de medio "Dulbecó's Modified Eagle Medium" (DMEM) alto en glucosa y suplementado con glutamina, 5000 unidades/ml de Penicilina-Estreptomicina y 10% de Suero Bovino Fetal (FBS). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂. Los experimentos de estimulaciones de células se realizaron entre los pases 4 y 10 de los cultivos celulares (American Type Culture Collection [ATCC], 2018).

3.4. Estimulación con LPS y extractos de frutos

3.4.1. Sembrado celular

Al llegar a una confluencia de aproximadamente el 80%, las células se levantaron, se contaron en una placa Neubauer (Bastidas, 2008) y se sembraron en placas de 6 pocillos en una concentración de 0.3×10^6 células/pocillo, en un volumen final de 2 ml por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, por 24 horas, antes de las estimulaciones.

3.4.2. Tratamientos de estimulación con LPS y extractos de frutos

Se realizaron 6 diferentes tratamientos en cada experimento.

1. Control negativo (condición donde se agrega solo medio sin ninguna estimulación por 24 horas)
2. 0.1 ug/ml de LPS por 24 horas
3. 80 ug/ml de mora por 24 horas
4. 0.1 ug/ml de LPS y 80 ug/ml de mora simultáneamente, por 24 horas
5. 0.1 ug/ml de LPS por 24 horas, no se lavaron las células y se agregó 80 ug/ml de mora por 24 horas más.
6. 80 ug/ml de mora por 24 horas, no se lavaron las células y se agregó 0.1ug/ml de LPS por 24 horas más.

Para las estimulaciones se agregó 1ml adicional de medio suplementado para un total de 3ml por pocillo. Después de cada estimulación las células se incubaron bajo las mismas condiciones para el tiempo total de la estimulación.

3.5. Extracción de ARN

El ARN de las células RAW se extrajo por el método de TRIzol™ Reagent. Brevemente: el medio fue desechado y cada pocillo lavado dos veces con Phosphate Buffer Saline (PBS). Después se colocó 1 ml de TRIzol en cada pocillo y los lisados fueron transferidos a tubos para ser incubados por 5

minutos a temperatura ambiente. En los tubos se agregó 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol utilizado para la lisis seguido por vortex de cada tubo, y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 12000 x g a 4°C, para separar la muestra en 3 fases: superior o fase acuosa que contiene el ARN, interface o intermedia que contiene principalmente ADN e inferior u orgánica que contiene restos de ADN y proteínas. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos. A estos tubos se les agregó 0.5 ml de isopropanol por 1 ml de TRIzol utilizado en la lisis con el fin de precipitar el ácido nucleico. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó por 10 minutos a 1200 x g a 4°C. Con una micropipeta, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados, resuspendiendo el pellet en 1ml de etanol al 75% por 1ml de TRIzol utilizado en la lisis para purificar la muestra de sales. Se realizó vortex de cada tubo y se centrifugó por 5 minutos a 7500 x g a 4°C. Entre lavados se descartó el sobrenadante. Después del segundo lavado se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN a temperatura ambiente por 10 minutos. Los pellets se resuspendieron en 50µl de agua tratada con DEPC (Pirocarbonato de dietilo) (Invitrogen, 2016).

Las concentraciones finales de ARN se cuantificaron en el Nanodrop a una absorbancia de 260 nm y también se calculó la pureza de cada muestra.

3.6. Tratamiento con DNasa

Para la purificación del ARN del ADN genómico se utilizó el kit TURBO™ DNase de Ambion. Los volúmenes para la reacción se mezclaron en tubos de 0.5 ml, con 2 unidades/µl de enzima Turbo DNasa, para un volumen final de 50µl. Estos tubos se incubaron por 30 minutos a 37°C. Para inactivar las DNasas, se agregó EDTA a una concentración final de 15 mM y se incubó a 75°C por 10 minutos (Ambion, 2012, pp. 1-2).

Por último, las concentraciones finales de ARN se cuantificaron en el Nanodrop a una absorbancia de 260 nm, y se almacenaron las muestras a -80°C.

3.7. Expresión génica por RT-qPCR

La transcripción inversa y la PCR en tiempo real subsiguiente se realizaron con el kit SúperScript III Platinum SYBR Green One-Step RT-qPCR (Invitrogen, 2010), según el protocolo presentado en el Anexo 2. Se utilizaron *primers* de 8 diferentes genes asociados con respuestas, tanto pro-inflamatorias como antiinflamatorias (TNF- α , IL-1b, NF κ b), y otros genes asociados con el estrés oxidativo (OGG1, iNOS, SOD1, SOD2m, CAT); así como para el gen housekeeping (Act-b).

Las secuencias de los pares de *primers* utilizados para cada gen se presentan en el Anexo 3.

Adicionalmente se programó un análisis de la curva de melting de los productos de la qPCR para verificar la formación de productos específicos y evaluar la interferencia de dímeros de *primers* en nuestros resultados.

3.7.1. Análisis de la expresión génica relativa de los genes de interés

La expresión génica relativa de cada gen de interés se calculó mediante el método $\Delta\Delta$ Ct descrito por Livak (Livak y Schmittgen, 2001, pp. 403-406).

3.8. Evaluación estadística de los resultados

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando IBM SPSS Statistic para Windows versión 2.0. Se calculó el valor medio \pm desviación estándar (DE) para tres experimentos individuales. Los datos entre los diferentes grupos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey; $P < 0.05$ fue considerado significativo y $P < 0.01$ altamente significativo.

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la mora en la expresión del gen NF- κ B en macrófagos RAW 264.7

El factor de transcripción NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – factor nuclear potenciador de cadena ligera kappa de linfocitos B) es un complejo de proteínas que controla la transcripción del ADN para activar ciertas respuestas inmunes, principalmente inflamatorias. Puede ser activado por una amplia variedad de estímulos, aunque los inductores más potentes son lipopolisacáridos (LPS) (Reddy y Serasanambati, 2016, p. 373). Estos estimulan vías de señalización de macrófagos por dos adaptadores de TLR, MyD88 y TRIF. La vía MyD88 es esencial para la expresión de citocinas pro-inflamatorias y su señalización implica la activación de factor de transcripción clave de los macrófagos NF- κ B citoplasmático, para ser trasladado al núcleo e inducir la expresión de varios genes inflamatorios, incluidos TNF- α y IL-1 β (Liu, Zhang, Joo, y Sun, 2017, p. 4). Se conoce que las antocianinas tienen efectos antiinflamatorios por diferentes mecanismos, incluyendo la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B (Lee et al., 2014, p. 409). Los frutos rojos como fresas, arándanos y zarzamoras, constituyen una de las principales fuentes de polifenoles en la dieta, en especial por su alto contenido de antocianinas (Fuentes et al., 2016). Para estudiar si la mora de castilla tiene efecto sobre la inhibición de la expresión de genes pro-inflamatorios al mediar cambios en la translocación nuclear de NF- κ B, se analizaron los niveles de expresión de este gen en células RAW 264.7 sometidos a 5 tratamientos.

Los niveles de expresión de este gen en los macrófagos incrementaron notablemente al estimularlos con LPS en comparación con la estimulación solo con mora. De la misma manera, se observa un incremento en la estimulación simultánea y al estimular primero LPS y después con mora, Por otro lado, los niveles de expresión disminuyeron significativamente en el tratamiento con

mora y después LPS ($P < 0.05$) en relación al tratamiento solo con LPS (Anexo 4), similar a los resultados reportados por Lee et al, (2014, p. 409). Esto sugiere que la mora tiene un efecto preventivo, y que sus efectos antiinflamatorios se pueden atribuir, en parte, por la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B.

4.2. Efecto de la mora en la expresión de los genes pro-inflamatorios IL-1 β y TNF α en macrófagos RAW 264.7

Los macrófagos activados pueden diferenciarse en fenotipos distintos bajo distintas condiciones fisiopatológicas, macrófagos de tipo pro-inflamatorios (M1) y macrófagos de tipo pro-fibróticos (M2). Los macrófagos M1 producen citocinas pro-inflamatorias, como la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), así como quimiocinas, que actúan en procesos inflamatorios. Las señales de Toll-like Receptors (TLR), en especial el lipopolisacárido (LPS) de TLR4, promueven la diferenciación de los macrófagos al fenotipo M1, resultando en la secreción de estas citocinas (Liu et al., 2017, p.2). La inducción de expresión de las citocinas pro-inflamatorias se produce por la vía TLR dependiente de MyDD88, que involucra la activación de quinasas IRAK, las cuales estimula la actividad de la ligasa ubiquitina E3 de TRAF6, permitiendo que activen la quinasa dependiente de ubiquitina TAK1. TAK1 activa la quinasa IKK, la cual fosforila el inhibidor de NF- κ B, I κ B α , degradándolo y activando NF- κ B, y en consecuencia induciendo la transcripción de genes los pro-inflamatorios que codifican para las citocinas antes mencionadas (Liu et al., 2017, p. 2).

Los niveles de expresión de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β que se observan en el Anexo 5, aumentaron significativamente en los macrófagos estimulados con LPS con respecto al tratamiento solo con mora ($p < 0.01$). Por otro lado, los 3 tratamientos con LPS y mora presentan niveles elevados de IL-1 β sin cambios estadísticamente significativos con respecto a las células estimuladas solo con LPS, a diferencia de NF- κ B. Estos resultados discrepan de los reportados por Lee et al, (2014, p. 406), donde la mora disminuyó los niveles

de IL-1 β significativamente en células tratadas primero con mora y después con LPS. Sin embargo, Chen, Teng, Fang y Xiao (2016, p. 6) reporta que los niveles de IL-1 β en macrófagos tratados con otra fuente de polifenoles, y LPS, no disminuye significativamente, a diferencia del gen TNF α . El estudio realizado por Greten y otros (2007, p. 918), describe el rol inesperado de NF- κ B impulsado por IKKb, como regulador negativo de la secreción de IL-1 β revelado por inhibición genética de IKKb. Por lo que es aceptable inferir que algún componente de la mora pudo inhibir la quinasa IKKb.

La activación de NF- κ B por IKKb es importante para el control transcripcional, tanto de la inflamación aguda como de la crónica. Inesperadamente, la inhibición de esta vía aumenta la secreción de IL-1b, pero previenen la expresión, y a su vez, la secreción de TNF- α (Greten et al., 2007, p. 2). La expresión de la citocina pro-inflamatoria TNF- α (Anexo 5) muestra que la estimulación con LPS causó un aumento significativo en la expresión de TNF- α en comparación con el tratamiento solo con mora ($p < 0.01$). Además, existe una tendencia de disminución en la expresión de las células estimuladas primero con mora y después con LPS en comparación con las estimuladas solo con LPS. Posiblemente porque también existió una disminución de estas en la expresión de NF- κ B (Anexo 4), ya que este gen induce la síntesis de este tipo de citocinas pro-inflamatorias. Se puede inferir que los compuestos relacionados con las propiedades antiinflamatorias de la mora inhibieron este factor de transcripción, afectando a la expresión de TNF- α . Estos resultados se asemejan a los reportados previamente por Lee et al. (2014, p. 407), los cuales señalan que los niveles de TNF- α también disminuyeron significativamente en los macrófagos de ratón tratados primero con mora y después con LPS.

4.3. Efecto de la mora en la expresión del gen iNOS en macrófagos RAW 264.7

Una de las características de los macrófagos activados es la de producir óxido nítrico. La sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) libera NO, cuyos niveles, si son altos, pueden causar daño tisular durante una infección en la respuesta inflamatoria (Zhang, Hu, Jiang, Zhao y Zhu, 2018, p. 7138). La actividad de iNOS en macrófagos es regulada por los receptores de tipo Toll y CD14. CD14 también es receptor de LPS y es esencial para la respuesta pro-inflamatoria a través de la activación de la vía NF- κ B (Aktan, 2004, p. 644). Se conoce que la quercetina y el kaempferol son los inhibidores más potentes para la expresión de iNOS y la producción de NO (González-Gallego, García-Mediavilla, Sánchez-Campos y Tuñón, 2010, p. 18), y que son los flavonoides más comunes en los frutos de tipo baya (Kaume et al., 2012, p. 5718). Debido a que iNOS es crucial para la producción de NO, se analizaron los niveles de expresión del gen en las células *RAW 264.7* estimuladas con LPS y mora (Anexo 6).

Existió un aumento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de iNOS, en los macrófagos estimulados con LPS en relación al tratamiento solo con mora ($P < 0.05$). Además, las células estimuladas con mora y LPS exhibieron niveles de expresión del gen estadísticamente similares al tratamiento solo con LPS. Esto pudo ocurrir ya que iNOS también puede ser inducido por IFN- γ , a través de otra vía de señalización conocida como JAK-STAT (Aktan, 2004, p. 643). Se conoce que la producción de IFN- γ es controlada por citocinas secretadas por células presentadoras de antígeno, como lo son los macrófagos, especialmente la interleucina 12 (IL-12), cuya producción puede ser inducida por LPS a través del receptor TLR4 (Schroder, Hertzog, Ravasi y Hume, 2004, p. 164; Liu et al., 2005, p. 9). Por esta razón sería importante analizar la expresión génica de IL-12.

4.4. Efecto de la mora en la expresión de los genes SOD1 y SOD2m en macrófagos *RAW 264.7*

Una de las enzimas antioxidantes más importantes presente en los eucariotas es la superóxido dismutasa, la cual convierte el superóxido en peróxido de hidrogeno. Existen tres isoformas distintas encontradas en mamíferos: SOD1, SOD2 y SOD3. La SOD1 predomina en la mayoría de células y tejidos, y la SOD2 tiene actividad antioxidante mitocondrial (Fukui y Ting Zhu, 2010, p. 822). Los resultados de la expresión génica de SOD1 y SOD2m en los macrófagos estimulados se muestran en el Anexo 7.

SOD1 mostro tener niveles de expresión significativamente más altos para los macrófagos estimulados primero LPS y luego mora ($P < 0.05$) en comparación con los otros tratamientos, ya que el LPS tiene un efecto más prolongado en este tratamiento. Además se muestra que para el tratamiento de primero mora y luego LPS, los niveles de expresión disminuyen, incluso un poco más que en las células estimuladas solo con mora, similar a los resultados reportados por Hannon, Thompson, Khoo, Juturu y Vanden (2017, p. 155), donde se estudió al arándano en células THP-1. Sin embargo, estos no llegan a ser significativamente menores, ya que los niveles de expresión de las células estimuladas solo con LPS tampoco fueron muy elevados. Esto probablemente ocurre porque sitio de NF- κ B en el promotor SOD1 no es sensible a estímulos externos, como afirman Miao y St. Clair (2009, p. 350). Se espera que los polifenoles exhiban su actividad protectora a través de la activación de las vías de señalización relacionadas con la respuesta antioxidante y no directamente con las rutas relacionadas con la respuesta inflamatoria. Se ha propuesto que los polifenoles son capaces de ejercer su acción antioxidante in vivo regulando la activación de la vías de señalización y la expresión de las enzimas antioxidantes como SOD1 (Álvarez-Suarez et al., 2017, pp. 12-13).

Para SOD2m se observaron niveles significativamente más altos en las células estimuladas con LPS ($P < 0.05$) en relación con solo mora. Un estudio reporto resultados similares de los efectos inhibidores del arándano en la inflamación inducida por obesidad en adipocitos y macrófagos, donde existió regulación positiva de SOD2m (Kowalska, Olejnik, Zielińska-Wasielica, y Olkowicz, 2019, p. 376). Los niveles de expresión de los tratamientos con LPS y mora, no son

significativamente diferentes a las células tratadas solo con LPS, y se puede observar que se encuentran cercanos a los mismos valores. También, se muestra que los niveles de expresión de SOD2m son muy diferentes que los de SOD1, lo que se puede deber a que SOD1 no es fácilmente inducible a diferencia de otras superóxido dismutasas, ya que normalmente se expresa de manera constitutiva. Por otro lado, SOD2m tiene actividad mitocondrial, y se conoce que la fosforilación oxidativa mitocondrial es la fuente intracelular más grande de ROS (Benavides y Pinzón, 2008, p. 46). Además, se ha encontrado que la transcripción del gen SOD2m puede ser modulada por IFN- γ , y citocinas pro-inflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Miao y St Clair, 2009, p. 850), y no solo por la inducción de NF- κ B.

4.5. Efecto de la mora en la expresión del gen OGG1 en macrófagos RAW 264.7

La actividad de OGG1 para reparación de ADN, puede representar un marcador de daño del ADN. Se ha reportado que los frutos rojos como la frutilla, reducen la expresión de OGG1 (Gasparrini et al., 2017, p. 17). Los resultados obtenidos del análisis de la expresión génica relativa del gen OGG1, se muestran en el Anexo 8.

Los datos de la expresión del gen OGG1 no muestran diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, se puede observar una disminución notable de la expresión en los macrófagos estimulados primero con mora y luego con LPS, en relación a los estimulados solo con LPS o solo con mora. Estos resultados son similares a los reportados por Gasparrini y otros (2017, p. 18) obtenidos de estudios con fresas, a pesar de no ser estadísticamente significativos. Además, se observa una disminución menos notable del tratamiento simultaneo y en el de primero mora no lavo y luego LPS. Estas diferencias no significativas pueden deberse a la posible expresión de otro gen que codifica para una enzima con actividad similar a la de OGG1, como

MUTYH que codifica para MYH glicosilasa, una enzima que elimina la adenina pareada incorrectamente, opuesta a 8oxoG (Meira et al., 2008, p. 2517); así como por el valor de la desviación estándar entre repeticiones, que resultó ser alto.

4.6. Efecto de la mora en la expresión del gen CAT en macrófagos RAW 264.7

La *catalasa* es una enzima oxidorreductasa que descompone el radical libre peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno, por lo que está relacionada con el estrés oxidativo (Genetics Home Reference [GHR], 2019, p. 1). La expresión génica relativa del gen CAT, se muestran en el Anexo 9.

Los resultados para la expresión de CAT no fueron estadísticamente significativos, sin embargo se puede observar un aumento notable de la expresión para las células estimuladas primero con LPS y después con mora; así como una disminución para el tratamiento simultáneo en comparación con las células estimuladas solo con LPS. Como se observó en la expresión del gen iNOS, los niveles en los tratamientos fueron mayores al tratamiento solo con LPS, por lo que se puede inferir que existió la producción de radicales libres y por ende la actividad de la enzima catalasa (CAT). Por otro lado, el incremento en los niveles de expresión del gen en las células estimuladas primero con LPS y luego mora en comparación con el tratamiento solo con LPS por 24 horas, puede deberse a que el LPS ejerce su función por 48 horas.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Fue posible observar una disminución de la expresión génica relativa del gen NF- κ B, así como una tendencia en la disminución de otros genes, como TNF- α , SOD1, OGG1 y CAT, en las células estimuladas primero con mora por 24 horas y posteriormente con LPS por 24 horas más. Lo que sugiere que la mora tiene actividad antiinflamatoria preventiva en los macrófagos de ratón, y que esta propiedad se encuentra influenciada, en cierta medida, por la inhibición de la translocación de NF- κ B al núcleo.

Genes como IL-1 β , iNOS y SOD2m, exhibieron una tendencia de niveles de expresión iguales o mayores que las células estimuladas solo con LPS, probablemente porque siguen otras vías de señalización que conducen a su expresión. En este sentido, sería importante analizar la expresión de otros genes como la IL-12.

La expresión de la mayoría de los genes tendía a ser bastante alta en el tratamiento que consistía en estimular las células primero con LPS por 24 horas y posteriormente con mora por 24 horas más, por la acción prolongada del LPS en comparación a los demás tratamientos.

5.2 Recomendaciones

Realizar un tratamiento de estimulación de las células *RAW 264.7* con LPS por 48 horas, así como otro tratamiento con mora por 48 horas.

Estudiar los tratamientos utilizados para analizar la expresión génica en los macrófagos de ratón, a nivel proteico para corroborar resultados.

Investigar el compuesto específico que le confiere propiedades antiinflamatorias a la mora, y cuantificar/titular sus concentraciones óptimas en un estudio a futuro.

REFERENCIAS

- Aktan, F. (2004). *iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation*. *Life Sciences*, 75(6), 639–653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>
- Alarcón-Barrera, K. S., Armijos-Montesinos, D. S., García-Tenesaca, M., Iturralde, G., Jaramilo-Vivanco, T., Granda-Albuja, M. G., Giampieri, F., y Álvarez-Suarez, J. M. (2018). *Wild Andean blackberry (Rubus glaucus Benth) and Andean blueberry (Vaccinium floribundum Kunth) from the Highlands of Ecuador*. *Journal of Berry Research*, 8(3), 223–236. <https://doi.org/10.3233/JBR-180316>
- Álvarez-Suarez, J. M., Carrillo-Perdomo, E., Aller, A., Giampieri, F., Gasparrini, M., González-Pérez, L., Beltrán-Ayala, P., y Battino, M. (2017). *Anti-inflammatory effect of capuli cherry against LPS-induced cytotoxic damage in RAW 264.7 macrophages*. *Food and Chemical Toxicology*, 102, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.024>
- Ambion. (2012). *Turbo DNase*. Recuperado el 17 de mayo de 2019 de <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F4393900B.pdf&title=UEkgU2hlZXQ6IFRVUkJPIEROYXNI>
- American Type Culture Collection. (2018). LRRK2 parental RAW 264.7 (ATCC® SC-6003™). Recuperado el 5 de junio de 2019 de <https://www.atcc.org/products/all/SC-6003.aspx>
- Bastidas, O. (2008). *Neubauer chamber cell counting*. *Celeromics*. Recuperado el 17 de mayo de 2019 de www.celeromics.com
- Benavides, C., y Pinzón, A. (2008). *Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas*. *Rev. Col. Anest* (Vol. 36). Recuperado el 10 de junio de 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rca/v36n1/v36n1a07.pdf>
- Bravo, L. (2009). *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and*

nutritional significance. Nutrition Reviews, 56(11), 317–333.
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

Cancino, G. O., García, E. Q., y Villamizar, C. E. (2015). Propagación in vitro de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona , región nororiental de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 7–15.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262>

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., y Galán-Vidal, C. A. (2009). *Chemical studies of anthocyanins: a review. Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>

Chen, L., Teng, H., Fang, T., y Xiao, J. (2016). *Agrimolide from Agrimonia pilosa suppresses inflammatory responses through down-regulation of COX-2/iNOS and inactivation of NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Phytomedicine*, 23(8), 846–855.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.03.016>

Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr* (Vol. 42). Recuperado el 25 de mayo de 2019 de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>

Costa, A. G., García, D. F., Jimenez, P., y Silva, P. I. (2013). *Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. Journal of Functional Foods*, 5(2), 539–549.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.029>

Ellulu, M., Rahmat, A., Patimah, I., Khaza, H., y Abed, Y. (2015). *Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled trial. Drug Design, Development and Therapy*, 3405–3412.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S83144>

- Fuentes, L., Valdenegro, M., Gómez, M., Ayala-raso, A., Quiroga, E., Martínez, J., Vinet, R., Caballero, E., y Figueroa, C. R. (2016). *Characterization of fruit development and potential health benefits of arrayan (Luma apiculata), a native berry of South America*. *FOOD CHEMISTRY*, 196, 104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.003>
- Fukui, M., y Ting Zhu, B. (2010). *Mitochondrial superoxide dismutase SOD2, but not cytosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells*. *Free Radical Biol Med*, 48(6), 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.024>
- Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Giampieri, F., Afrin, S., Álvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., ... Battino, M. (2017). *Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages*. *Food and Chemical Toxicology*, 102, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.018>
- Genetics Home Reference. (2019). *CAT gene*. *Genetics Home Reference*. Recuperado el 10 de junio de 2019 de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CAT>
- Glorieux, C., y Calderon, P. B. (2017). *CAT gene*. *Biol. Chem*, 398(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>
- González-Gallego, J., García-Mediavilla, M., Sánchez-Campos, S., y Tuñón, M. J. (2010). *Fruit polyphenols, immunity and inflammation*. *British Journal of Nutrition*, 15–27. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003910>
- Greten, F. R., Arkan, M. C., Bollrath, J., Hsu, L.-C., Goode, J., Miething, C., ... Karin, M. (2007). *NF- κ B Is a Negative Regulator of IL-1 β Secretion as Revealed by Genetic and Pharmacological Inhibition of IKK β* . *Cell*, 918–931. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.009>
- Hannon, D. B., Thompson, J. T., Khoo, C., Juturu, V., y Vanden, J. P. (2017). *Effects of cranberry extracts on gene expression in THP-1 cells*. *Food Science and Nutrition*, 5(1), 148–159. <https://doi.org/10.1002/fsn3.374>

- Invitrogen. (2010). *SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit with ROX*. Recuperado el 11 de diciembre de 2018 de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/superscript_onestep_sybr_man.pdf
- Invitrogen. (2016). *TRIZOL Reagent User Guide*. Recuperado el 11 de diciembre de 2018 de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf
- Kaume, L., Howard, L. R., y Devareddy, L. (2012). *The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>
- Kolaczowska, E., y Kubes, P. (2013). *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Koleckar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L., y Opletal, L. (2008). *Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(5), 436–447. <https://doi.org/10.2174/138955708784223486>
- Kowalska, K., Olejnik, A., Zielińska-Wasielica, J., y Olkowicz, M. (2019). *Inhibitory effects of lingonberry (Vaccinium vitis-idaea L.) fruit extract on obesity-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages*. *Journal of Functional Foods*, 54, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.040>
- Lech, M., y Anders, H.-J. (2013). *Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 989–997. Recuperado el 5 de abril de 2019 de <https://pdf.sciencedirectassets.com/271023/1-s2.0-S0925443913X00055/1-s2.0-S0925443912002864/main.pdf?x-amz-security->

token=AgoJb3JpZ2luX2VjEFYacXVzLWVhc3QtMSJIMEYCIQD6hcKpZ3naeRA%2BVozEgRJJnGAL0drYR0jt3Uh9JicPQIhAlrL%2FTT5hNCF%2BOgGVCeilLuMOQ%2FjPQX9wu8W

- Lee, S. G., Kim, B., Yang, Y., Pham, T. X., Park, Y.-K., Manatou, J., Koo, S., Chun, O., y Lee, J.-Y. (2014). *Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B independent of NRF2-mediated mechanism. The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(4), 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.12.001>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., y Sun, S.-C. (2017). *NF- κ B signaling in inflammation. Nature Publishing Group*, 2, 1–9. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lizcano, S., Dávila, J., y Hernández, V. (2019). *Fruit agroindustrial wastes for preparing beverages for medicinal purposes by supercritical fluid extraction technology: andes berry (Rubus glaucus Benth) case. Elsevier*, 151–177.
- León, M., Alvarado, A., Armas, J. O., Alvarado, L. M., Varens, J., y Cuesta, J. Á. (2016). Respuesta inflamatoria aguda: consideraciones bioquímicas y celulares. *Finaly*, 5(1), 47–62. Recuperado el 2 de abril de 2019 de <http://scielo.sld.cu/pdf/rf/v5n1/rf06105.pdf>
- Marinovic, M. A. (2008). Inflamación, daño y reparación en enfermedades reumáticas. *Medwave*, 8(6). <https://doi.org/10.5867/medwave.2008.06.502>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*, (6), 271–278. Recuperado el 17 de mayo de 2019 de <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>
- Meira, L. B., Bugni, J. M., Green, S. L., Lee, C.-W., Pang, B., Borenshtein, D.,

- ... Samson, L. D. (2008). *DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice*. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 2516–2525. <https://doi.org/10.1172/JCI35073>
- Miao, L., y St Clair, D. K. (2009). *Regulation of superoxide dismutase genes: implications in diseases*. *Free Radical Biol Med*, 47(4), 344–356. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>
- Miguel, M. G. (2011). *Anthocyanins: antioxidant and/or anti-inflammatory activities*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 7–15. Recuperado el 20 de mayo de 2019 de http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/117_pdf.pdf
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., y Malik, A. B. (2014). *Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Moo-Huchin, V. M., González-Aguilar, G. A., Moo-Huchin, M., Ortiz-Vázquez, E., Cuevas-Glory, L., Sauri-Duch, E., y Betancur-Ancona, D. (2017). *Carotenoid composition and antioxidant activity of extracts from tropical fruits*. *Chiang Mai Journal of Science*, 44(2), 605–616. <http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/Contributed>
- Moresco, E. M., LaVine, D., y Beutler, B. (2011). *Toll-like receptors*. *Current Biology*, 21(13), 1–6.
- Moya, A. (2013). *La Amazonía: atlas alimentario de los pueblos indígenas y afrodescendientes del Ecuador*. Ministerio de Inclusión Económica y Social del Ecuador. Recuperado el 7 de abril de 2019 de <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/catalog/resGet.php?resId=56268>
- Murray, P. J., y Wynn, T. A. (2011). *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Nardi, G., Farias, A., Freire, C., Megiolaro, F., Schneider, K., Perazzoli, M.,

- Gon, A. C., Bolda, L., Wagner, G., Niero, R., y Locatelli, C. (2016). *Anti-inflammatory activity of berryFruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. Pharmacognosy Research*, 8.
- Newton, K., Dixit, V. M., Wrana, J. L., Alto, N. M., Orth, K., Sever, R., Glass, C., Kopan, R., Ward, P., Thompson, C., McCaffrey, L., Macara, I., Kennedy, M., Rhind, N., Russell, P., y Sassone-corsi, P. (2012). *Signaling in innate immunity and inflammation. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Ondarza, M., y Higuera, I. (2016). Importancia biotecnológica de frutillas de berries en la salud humana. *Virtual Pro*, (2), 2–12.
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., y Levine, M. (2003). *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35. Recuperado el 21 de abril de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569111>
- Pietta, P. G. (2000). *Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Ramirez, J. E., Zambrano, R., Sepúlveda, B., Kennelly, E. J., y Simirgiotis, M. J. (2015). *Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC–HR-ESI-ToF-MS. Food Chemistry*, 176, 106–114. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.12.039>
- Reddy, S., y Serasanambati, M. (2016). *Function of Nuclear Factor Kappa B (NF-kB) in human diseasesw. South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(4), 368–387. <https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443>

- Rojas, N. Y., y Correa, L. J. (2006). Obtención de un colorante natural alimentario de mora de Castilla (*Rubus glaucus benth*). *Ciencia En Desarrollo*, 2(2), 115–130.
- Rosando-Pérez, J., y Mendoza-Núñez, V. M. (2007). Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 32(2), 58–69. Recuperado el 5 de abril de 2019 de <https://www.redalyc.org/html/576/57632204/>
- Saini, R. K., Nile, S. H., y Park, S. W. (2015). *Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities*. *Food Research International*, 76, 735–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., y Hume, D. A. (2004). *IFN gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>.Journal
- Sies, H., Berndt, C., y Jones, D. P. (2017). *Oxidative stress*. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Takeuchi, O., y Akira, S. (2010). *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, (140), 805–820.
- Vázquez-Flores, A., Álvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J. A., Wall-Medrano, A., y de la Rosa, L. A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. Recuperado el 21 de abril de 2019 de http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v6n2/data/Taninos_hidrolizables_y_condensados_naturaleza_quimicaventajas_y_desventajas_de_su_consumo.pdf
- Wang, N., Liang, H., y Zen, K. (2014). *Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance*. *Frontiers in Immunology*, 5(11), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>

- Wang, R., Li, C., Qiao, P., Xue, Y., Zheng, X., Chen, H., ... Ba, X. (2018). *OGG1-initiated base excision repair exacerbates oxidative stress-induced parthanatos*. *Cell Death y Disease*, 9(6), 628. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0680-0>
- Wang, T., Li, Q., y Bi, K. (2018). *Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- World Health Organization. (2013). Fomento del consumo mundial de frutas y verduras. *WHO*. Recuperado el 7 de abril de 2019 de <https://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/>
- World Health Organization. (2016). Noncommunicable diseases country profiles 2016. Recuperado el 7 de abril de 2019 de https://www.who.int/nmh/countries/ecu_en.pdf?Ua=1
- World Health Organization. (2019). Aumentar el consumo de frutas y verduras para reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles. Recuperado el 7 de abril de 2019 de https://www.who.int/nmh/countries/ecu_en.pdf?Ua=1
- Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., y Waksmundzka-Hajnos, M. (2016). *The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's disease*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.024>
- Wu, Y., y Chen, S. (2014). *Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing*. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00001>
- Wynn, T. A., y Vannella, K. M. (2016). *Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis*. *Immunity*, 44(3), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
- Zhang, T., Hu, T., Jiang, J.G., Zhao, J.W., y Zhu, W. (2018). *Antioxidant and anti-inflammatory effects of polyphenols extracted from Ilex latifolia thunb.*

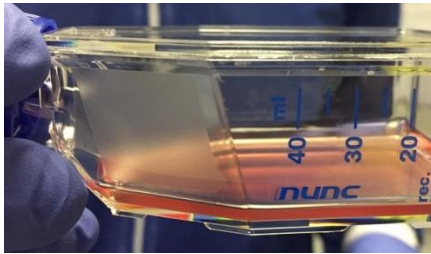
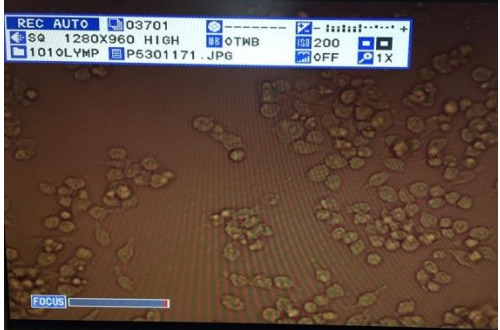
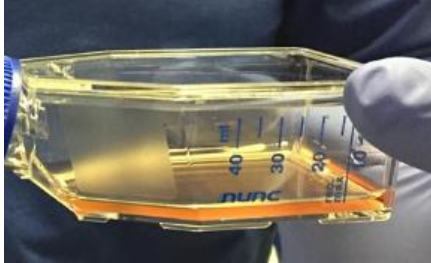
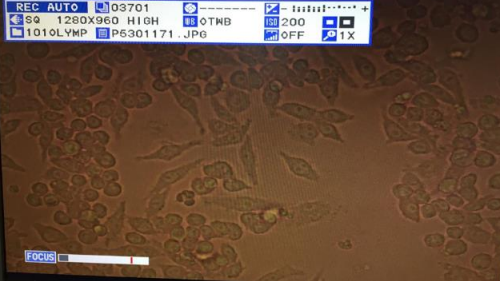
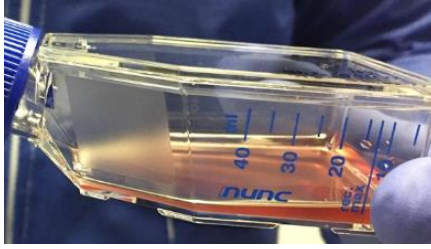
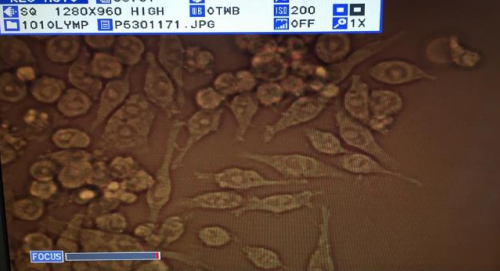
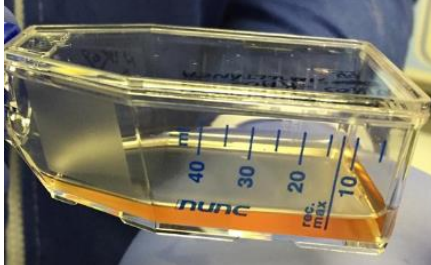
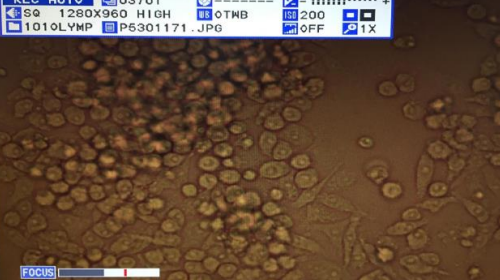
The Royal Society of Chemistry, 7134–7141.
<https://doi.org/10.1039/C7RA13569F>

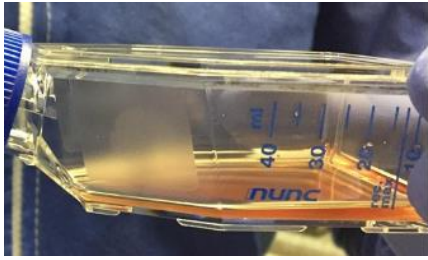
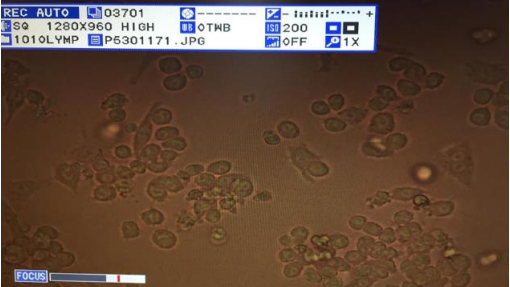
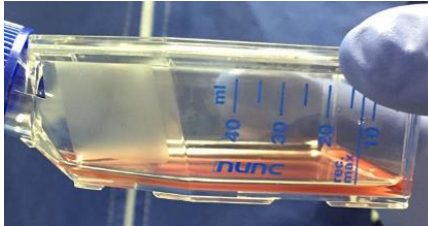

ANEXOS

ANEXO 1

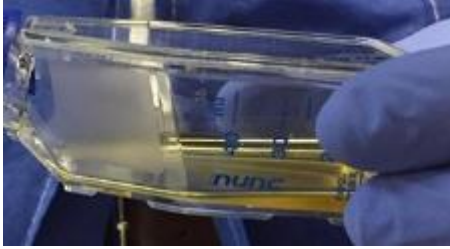
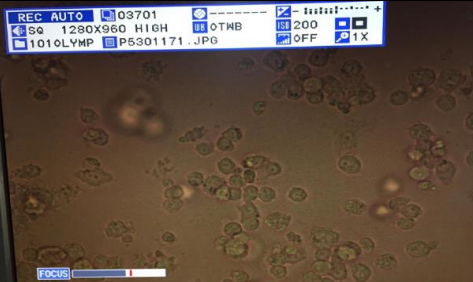
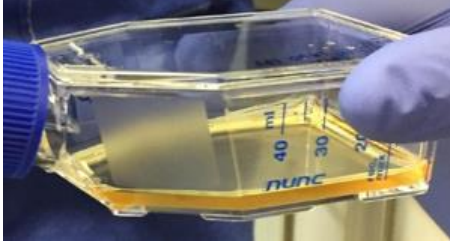
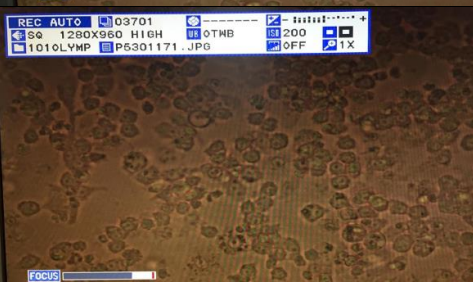
Fotografías de las células RAW 264.7 sometidas a cada uno de los tratamientos

- Capturadas a las 24 horas

Tratamiento	Cambio de color del medio	Células
Control Negativo		
LPS 24h		
Mora 24h		
LPS + MORA 24h SIMULTANEO		

LPS 24h no lavo + Mora 24h		
Mora 24h no lavo + LPS 24h		

- Capturadas a las 48 horas

Tratamiento	Cambio de color del medio	Células
LPS 24h no lavo + Mora 24h		
Mora 24h no lavo + LPS 24h		

ANEXO 2

Protocolo utilizado para el programa de qPCR

GGACATTCTACACAAAGGTGTTGAACGAGGAGGAGAGGAAACGCCTGTGTGAGAACATTGCCGGCCACCT
GAAGGACGCTCAGCTTTTCATTCAGAAGAAAGCGGTCAAGAATTTCACTGACGTCCACCCTGACTATGGG
GCCCCATCCAGGCTCTTCTGGACAAGTACAACGCTGAGAAGCCTAAGAACGCAATTCACACCTACACGC
AGGCCGGCTCTCACATGGCTGCGAAGGGAAAAGCTAACCTGTAA

✓ BLAST Verified

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	41	20	65.00	60.00	7.00	2.00	
ACCGCTGGGACCCA							ACTAT
RIGHT PRIMER	188	20	64.53	55.00	4.00	1.00	
TCTGGTGCCTGAAGCT							GTT

SEQUENCE SIZE: 534
INCLUDED REGION SIZE: 534

PRODUCT SIZE: 148, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

1 CTTCAGGGCCGCTTTTTGCCTACCCGGACACTCACCGCCACCGCCTGGGACCCA

61 CTGCAGATACCTGTGAACTGTCCCTACCGCGCTCGAGTGGCCA

121 CCCATGTGCATGCATGACAACCAGGGTGGTGCCCCCACTATTACCCCAACAGCTTCAGC

181 GCACCAGAGCAGCAGCGCTCAGCCCTGGAGCACAGCGTCCAGTGCCTGTAGATGTGAAA

241 CGCTTCAACAGTGCTAATGAAGACAATGTCACTCAGGTGCGGACATTCTACACAAAGGTG

301 TTGAACGAGGAGGAGAGGAAACGCCTGTGTGAGAACATTGCCGGCCACCTGAAGGACGCT

361 CAGCTTTTCATTCAGAAGAAAGCGGTCAAGAATTTCACTGACGTCCACCCTGACTATGGG

421 GCCCCATCCAGGCTCTTCTGGACAAGTACAACGCTGAGAAGCCTAAGAACGCAATTCAC

481 ACCTACACGCAGGCCGGCTCTCACATGGCTGCGAAGGGAAAAGCTAACCTGTAA

Tnf tumor necrosis factor [Mus musculus (house mouse)]

NM_001278601.1; NM_013693.3

T-COFFEE, Version_11.00.d625267 (2016-01-11 15:25:41 -
Revision d625267 - Build 507)

Cedric Notredame

SCORE=996

*

BAD AVG GOOD

*

NM_013693.3_168 : 99

NM_001278601.1_ : 99

cons : 99

NM_013693.3_168 ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGCGACGTGGAAGTGGCAGAAGAGG
CACTCCCCCAAAGATG

NM_001278601.1_ ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGCGACGTGGAAGTGGCAGAAGAGG
CACTCCCCCAAAGATG

cons *****

NM_013693.3_168 GGGGGCTTCCAGAACTCCAGGCGGTGCCTATGTCTCAGCCTCTTCT
CATTCCTGCTTGTGGCA

NM_001278601.1_ GGGGGCTTCCAGAACTCCAGGCGGTGCCTATGTCTCAGCCTCTTCT
CATTCCTGCTTGTGGCA

cons *****

NM_013693.3_168 GGGGCCACCACGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTC
CCCAAAGGGATGAGAAG

NM_001278601.1_ GGGGCCACCACGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTC
CCCAAAGGGATGAGAAG

cons *****

NM_013693.3_168 TTCCCAAATGGCCTCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCAGACCCTCA
CACTCAGATCATCTTCT

NM_001278601.1_ TTCCCAAATGGCCTCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCAGACCCTCA
CACTCA-----


cons *****

NM_013693.3_168 CAAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAGCCACGTCGTAGCAAACCACC

AAGTGGAGGAGCAGCTG

NM_001278601.1_ -----

CAAACCACCAAGTGGAGGAGCAGCTG

cons  *****

NM_013693.3_168 GAGTGGCTGAGCCAGCGCGCCAACGCCCTCCTGGCCAACGGCATGG

ATCTCAAAGACAACCAA

NM_001278601.1_ GAGTGGCTGAGCCAGCGCGCCAACGCCCTCCTGGCCAACGGCATGG

ATCTCAAAGACAACCAA

cons *****

NM_013693.3_168 CTAGTGGTGCCAGCCGATGGGTTGTACCTTGTCTACTCCCAGGTTC

TCTTCAAGGGACAAGGC

NM_001278601.1_ CTAGTGGTGCCAGCCGATGGGTTGTACCTTGTCTACTCCCAGGTTC

TCTTCAAGGGACAAGGC

cons *****

NM_013693.3_168 TGCCCCGACTACGTGCTCCTCACCCA **CACCGTCAGCCGATTTGCTA**

TCTCATAACCAGGAGAAA

NM_001278601.1_ TGCCCCGACTACGTGCTCCTCACCCA **CACCGTCAGCCGATTTGCTA**

TCTCATAACCAGGAGAAA

cons *****

NM_013693.3_168 GTCAACCTCCTCTCTGCCGTCAAGAGCCCCTGCCCAAGGACACCC

CTGAGGGGGCTGAGCTC

NM_001278601.1_ GTCAACCTCCTCTCTGCCGTCAAGAGCCCCTGCCCAAGGACACCC

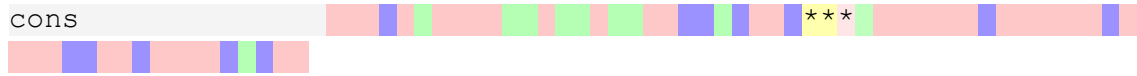
CTGAGGGGGCTGAGCTC

cons *****

NM_013693.3_168 AAACCCTGGTATGAGCCCATAT **ACCTGGGAGGAGTCTTCCAGCTGG**

AGAAGGGGGACCAACTC

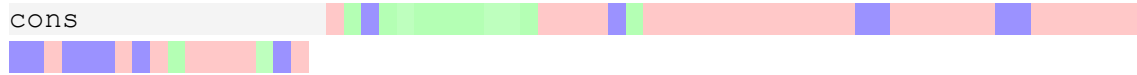
NM_010927.4_256 AAGGACATTAACAACAACGTGAAGAAAACCCCTTGTGCTGTTCTCA
GCCCAACAATAACAAGAT



NM_001313921.1_ -----

NM_001313922.1_ -----

NM_010927.4_256 GACCCTAAGAGTCACCAAAATGGCTCCCCGCAGCTCCTCACTGGGA
CAGCACAGAATGTTCCA



NM_001313921.1_ -----

NM_001313922.1_ -----

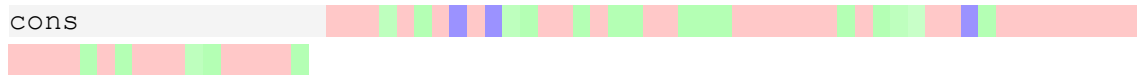
NM_010927.4_256 GAATCCCTGGACAAGCTGCATGTGACATCGACCCGTCCACAGTATG
TGAGGATCAAAAAGTGG



NM_001313921.1_ -----

NM_001313922.1_ -----

NM_010927.4_256 GGCAGTGGAGAGATTTTGCATGACACTCTTCACCACAAGGCCACAT
CGGATTTCACTTGCAAG



NM_001313921.1_ -----
CCAAGAGTTTGACCAGAGGACCCAGAGACAAG

NM_001313922.1_ -----
CCAAGAGTTTGACCAGAGGACCCAGAGACAAG

NM_010927.4_256 TCCAAGTCTTGCTTGGGGTCCATCATGAACCCCAAGAGTTTGACCA
GAGGACCCAGAGACAAG

cons *****

NM_001313921.1_ CCTACCCCTCTGGAGGAGCTCCTGCCTCATGCCATTGAGTTCATCA
ACCAGTATTATGGCTCC
NM_001313922.1_ CCTACCCCTCTGGAGGAGCTCCTGCCTCATGCCATTGAGTTCATCA
ACCAGTATTATGGCTCC
NM_010927.4_256 CCTACCCCTCTGGAGGAGCTCCTGCCTCATGCCATTGAGTTCATCA
ACCAGTATTATGGCTCC

cons *****

NM_001313921.1_ TTTAAAGAGGC AAAAATAGAGGAACATCTGGCCAGGCTGGAAGCTG
TAACAAAGGAAATAGAA
NM_001313922.1_ TTTAAAGAGGC AAAAATAGAGGAACATCTGGCCAGGCTGGAAGCTG
TAACAAAGGAAATAGAA
NM_010927.4_256 TTTAAAGAGGC AAAAATAGAGGAACATCTGGCCAGGCTGGAAGCTG
TAACAAAGGAAATAGAA

cons *****

NM_001313921.1_ ACAACAGGAACCTACCAGCTCACTCTGGATGAGCTCATCTTTGCCA
CCAAGATGGCCTGGAGG
NM_001313922.1_ ACAACAGGAACCTACCAGCTCACTCTGGATGAGCTCATCTTTGCCA
CCAAGATGGCCTGGAGG
NM_010927.4_256 ACAACAGGAACCTACCAGCTCACTCTGGATGAGCTCATCTTTGCCA
CCAAGATGGCCTGGAGG

cons *****

NM_001313921.1_ AATGCCCTCGCTGCATCGGCAGGATCCAGTGGTCCAACCTGCAGG
TCTTTGACGCTCGGAAC
NM_001313922.1_ AATGCCCTCGCTGCATCGGCAGGATCCAGTGGTCCAACCTGCAGG
TCTTTGACGCTCGGAAC
NM_010927.4_256 AATGCCCTCGCTGCATCGGCAGGATCCAGTGGTCCAACCTGCAGG
TCTTTGACGCTCGGAAC

cons *****

NM_001313921.1_ TGTAGCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCACATCTGCAGACACATAC
TTTATGCCACCAACAAT

NM_001313922.1_ TGTAGCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCACATCTGCAGACACATAC
TTTATGCCACCAACAAT

NM_010927.4_256 TGTAGCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCACATCTGCAGACACATAC
TTTATGCCACCAACAAT

cons *****

NM_001313921.1_ GGCAACATCAGGTCGGCCATCACTGTGTTCCCCAGCGGAGTGACG
GCAAACATGACTTCAGG

NM_001313922.1_ GGCAACATCAGGTCGGCCATCACTGTGTTCCCCAGCGGAGTGACG
GCAAACATGACTTCAGG

NM_010927.4_256 GGCAACATCAGGTCGGCCATCACTGTGTTCCCCAGCGGAGTGACG
GCAAACATGACTTCAGG

cons *****

NM_001313921.1_ CTCTGGAATTCACAGCTCATCCGGTACGCTGGCTACCAGATGCCCG
ATGGCACCATCAGAGGG

NM_001313922.1_ CTCTGGAATTCACAGCTCATCCGGTACGCTGGCTACCAGATGCCCG
ATGGCACCATCAGAGGG

NM_010927.4_256 CTCTGGAATTCACAGCTCATCCGGTACGCTGGCTACCAGATGCCCG
ATGGCACCATCAGAGGG

cons *****

NM_001313921.1_ GATGCTGCCACCTTGGAGTTCACCCAGTTGTGCATCGACCTAGGCT
GGAAGCCCCGCTATGGC

NM_001313922.1_ GATGCTGCCACCTTGGAGTTCACCCAGTTGTGCATCGACCTAGGCT
GGAAGCCCCGCTATGGC

NM_010927.4_256 GATGCTGCCACCTTGGAGTTCACCCAGTTGTGCATCGACCTAGGCT
GGAAGCCCCGCTATGGC

cons *****

NM_001313921.1_ CGCTTTGATGTGCTGCCTCTGGTCTTGCAAGCTGATGGTCAAGATC
CAGAGGTCTTTGAAATC

NM_001313922.1_ CGCTTTGATGTGCTGCCTCTGGTCTTGCAAGCTGATGGTCAAGATC
CAGAGGTCTTTGAAATC

NM_010927.4_256 CGCTTTGATGTGCTGCCTCTGGTCTTGCAAGCTGATGGTCAAGATC
CAGAGGTCTTTGAAATC

cons *****

NM_001313921.1_ CCTCCTGATCTTGTGTTGGAGGTGACCATGGAGCATCCCAAGTACG
AGTGGTTCCAGGAGCTC

NM_001313922.1_ CCTCCTGATCTTGTGTTGGAGGTGACCATGGAGCATCCCAAGTACG
AGTGGTTCCAGGAGCTC

NM_010927.4_256 CCTCCTGATCTTGTGTTGGAGGTGACCATGGAGCATCCCAAGTACG
AGTGGTTCCAGGAGCTC

cons *****

NM_001313921.1_ GGGTTGAAGTGGTATGCACTGCCTGCCGTGGCCAACATGCTACTGG
AGGTGGGTGGCCTCGAA

NM_001313922.1_ GGGTTGAAGTGGTATGCACTGCCTGCCGTGGCCAACATGCTACTGG
AGGTGGGTGGCCTCGAA

NM_010927.4_256 GGGTTGAAGTGGTATGCACTGCCTGCCGTGGCCAACATGCTACTGG
AGGTGGGTGGCCTCGAA

cons *****

NM_001313921.1_ TTCCAGCCTGCCCTTCAATGGTTGGTACATGGGCACCGAGATTG
GAGTTCGAGACTTCTGT

NM_001313922.1_ TTCCAGCCTGCCCTTCAATGGTTGGTACATGGGCACCGAGATTG
GAGTTCGAGACTTCTGT

NM_010927.4_256 TTCCAGCCTGCCCTTCAATGGTTGGTACATGGGCACCGAGATTG
GAGTTCGAGACTTCTGT

cons *****

NM_001313921.1_ GACACACAGCGCTACAACATCCTGGAGGAAGTGGGCCGAAGGATGG

GCCTGGAGACCCACACA
NM_001313922.1_ GACACACAGCGCTACAACATCCTGGAGGAAGTGGGCCGAAGGATGG
GCCTGGAGACCCACACA
NM_010927.4_256 GACACACAGCGCTACAACATCCTGGAGGAAGTGGGCCGAAGGATGG
GCCTGGAGACCCACACA

cons *****

NM_001313921.1_ CTGGCCTCCCTCTGGAAAGACCGGGCTGTCACGGAGATCAATGTGG
CTGTGCTCCATAGTTTC
NM_001313922.1_ CTGGCCTCCCTCTGGAAAGACCGGGCTGTCACGGAGATCAATGTGG
CTGTGCTCCATAGTTTC
NM_010927.4_256 CTGGCCTCCCTCTGGAAAGACCGGGCTGTCACGGAGATCAATGTGG
CTGTGCTCCATAGTTTC

cons *****

NM_001313921.1_ CAGAAGCAGAATGTGACCATCATGGACCACCACACAGCCTCAGAGT
CCTTCATGAAGCACATG
NM_001313922.1_ CAGAAGCAGAATGTGACCATCATGGACCACCACACAGCCTCAGAGT
CCTTCATGAAGCACATG
NM_010927.4_256 CAGAAGCAGAATGTGACCATCATGGACCACCACACAGCCTCAGAGT
CCTTCATGAAGCACATG

cons *****

NM_001313921.1_ CAGAATGAGTACCGGGCCCGTGGAGGCTGCCCGGCAGACTGGATTT
GGCTGGTCCCTCCAGTG
NM_001313922.1_ CAGAATGAGTACCGGGCCCGTGGAGGCTGCCCGGCAGACTGGATTT
GGCTGGTCCCTCCAGTG
NM_010927.4_256 CAGAATGAGTACCGGGCCCGTGGAGGCTGCCCGGCAGACTGGATTT
GGCTGGTCCCTCCAGTG

cons *****

NM_001313921.1_ TCTGGGAGCATCACCCCTGTGTTCCACCAGGAGATGTTGAACTATG
TCCTATCTCCATTCTAC
NM_001313922.1_ TCTGGGAGCATCACCCCTGTGTTCCACCAGGAGATGTTGAACTATG

TCCTATCTCCATTCTAC
NM_010927.4_256 TCTGGGAGCATCACCCCTGTGTTCCACCAGGAGATGTTGAACTATG
TCCTATCTCCATTCTAC

cons *****

NM_001313921.1_ TACTACCAGATCGAGCCCTGGAAGACCCACATCTGGCAGAATGAGA
AGCTGAGGCCCAGGAGG

NM_001313922.1_ TACTACCAGATCGAGCCCTGGAAGACCCACATCTGGCAGAATGAGA
AGCTGAGGCCCAGGAGG

NM_010927.4_256 TACTACCAGATCGAGCCCTGGAAGACCCACATCTGGCAGAATGAGA
AGCTGAGGCCCAGGAGG

cons *****

NM_001313921.1_ AGAGAGATCCGATTTAGAGTCTTGGTGAAAGTGGTGTCTTTGCTT
CCATGCTAATGCGAAAG

NM_001313922.1_ AGAGAGATCCGATTTAGAGTCTTGGTGAAAGTGGTGTCTTTGCTT
CCATGCTAATGCGAAAG

NM_010927.4_256 AGAGAGATCCGATTTAGAGTCTTGGTGAAAGTGGTGTCTTTGCTT
CCATGCTAATGCGAAAG

cons *****

NM_001313921.1_ GTCATGGCTTCACGGGTCAGAGCCACAGTCCTCTTTGCTACTGAGA
CAGGGAAGTCTGAAGCA

NM_001313922.1_ GTCATGGCTTCACGGGTCAGAGCCACAGTCCTCTTTGCTACTGAGA
CAGGGAAGTCTGAAGCA

NM_010927.4_256 GTCATGGCTTCACGGGTCAGAGCCACAGTCCTCTTTGCTACTGAGA
CAGGGAAGTCTGAAGCA

cons *****

NM_001313921.1_ CTAGCCAGGGACCTGGCCACCTTGTTTCAGCTACGCCTTCAACACCA
AGTTGTCTGCATGGAC

NM_001313922.1_ CTAGCCAGGGACCTGGCCACCTTGTTTCAGCTACGCCTTCAACACCA
AGTTGTCTGCATGGAC

NM_010927.4_256 CTAGCCAGGGACCTGGCCACCTTGTTTCAGCTACGCCTTCAACACCA

AGGTTGTCTGCATGGAC

cons *****

NM_001313921.1_ CAGTATAAGGCAAGCACCTTGAAGAGGAGCAACTACTGCTGGTGG
TGACAAGCACATTTGGG

NM_001313922.1_ CAGTATAAGGCAAGCACCTTGAAGAGGAGCAACTACTGCTGGTGG
TGACAAGCACATTTGGG

NM_010927.4_256 CAGTATAAGGCAAGCACCTTGAAGAGGAGCAACTACTGCTGGTGG
TGACAAGCACATTTGGG

cons *****

NM_001313921.1_ AATGGAGACTGTCCAGCAATGGGCAGACTCTGAAGAAATCTCTGT
TCATGCTTAGAGAACTC

NM_001313922.1_ AATGGAGACTGTCCAGCAATGGGCAGACTCTGAAGAAATCTCTGT
TCATGCTTAGAGAACTC

NM_010927.4_256 AATGGAGACTGTCCAGCAATGGGCAGACTCTGAAGAAATCTCTGT
TCATGCTTAGAGAACTC

cons *****

NM_001313921.1_ AACCACACCTTCAGGTATGCTGTGTTTGGCCTTGGCTCCAGCATGT
ACCCTCAGTTCTGCGCC

NM_001313922.1_ AACCACACCTTCAGGTATGCTGTGTTTGGCCTTGGCTCCAGCATGT
ACCCTCAGTTCTGCGCC

NM_010927.4_256 AACCACACCTTCAGGTATGCTGTGTTTGGCCTTGGCTCCAGCATGT
ACCCTCAGTTCTGCGCC

cons *****

NM_001313921.1_ TTTGCTCATGACATCGACCAGAAGCTGTCCCACCTGGGAGCCTCTC
AGCTTGCCCCAACAGGA

NM_001313922.1_ TTTGCTCATGACATCGACCAGAAGCTGTCCCACCTGGGAGCCTCTC
AGCTTGCCCCAACAGGA

NM_010927.4_256 TTTGCTCATGACATCGACCAGAAGCTGTCCCACCTGGGAGCCTCTC
AGCTTGCCCCAACAGGA

cons *****

NM_001313921.1_ GAAGGGGACGAACTCAGTGGGCAGGAGGATGCCTTCCGCAGCTGGG
CTGTACAAACCTTCCGG

NM_001313922.1_ GAAGGGGACGAACTCAGTGGGCAGGAGGATGCCTTCCGCAGCTGGG
CTGTACAAACCTTCCGG

NM_010927.4_256 GAAGGGGACGAACTCAGTGGGCAGGAGGATGCCTTCCGCAGCTGGG
CTGTACAAACCTTCCGG

cons *****

NM_001313921.1_ GCAGCCTGTGAGACCTTTGATGTCCGAAGCAAACATCACATTCAGA
TCCCGAAACGCTTCACT

NM_001313922.1_ GCAGCCTGTGAGACCTTTGATGTCCGAAGCAAACATCACATTCAGA
TCCCGAAACGCTTCACT

NM_010927.4_256 GCAGCCTGTGAGACCTTTGATGTCCGAAGCAAACATCACATTCAGA
TCCCGAAACGCTTCACT

cons *****

NM_001313921.1_ TCCAATGCAACATGGGAGCCACAGCAATATAGGCTCATCCAGAGCC
CGGAGCCTTTAGACCTC

NM_001313922.1_ TCCAATGCAACATGGGAGCCACAGCAATATAGGCTCATCCAGAGCC
CGGAGCCTTTAGACCTC

NM_010927.4_256 TCCAATGCAACATGGGAGCCACAGCAATATAGGCTCATCCAGAGCC
CGGAGCCTTTAGACCTC

cons *****

NM_001313921.1_ AACAGAGCCCTCAGCAGCATCCATGCAAAGAACGTGTTTACCATGA
GGCTGAAATCCCAGCAG

NM_001313922.1_ AACAGAGCCCTCAGCAGCATCCATGCAAAGAACGTGTTTACCATGA
GGCTGAAATCCCAGCAG

NM_010927.4_256 AACAGAGCCCTCAGCAGCATCCATGCAAAGAACGTGTTTACCATGA
GGCTGAAATCCCAGCAG

cons *****

NM_001313921.1_ AATCTGCAGAGTGAAAAGTCCAGCCGCACCACCCTCCTCGTTCAGC
TCACCTTCGAGGGCAGC

NM_001313922.1_ AATCTGCAGAGTGAAAAGTCCAGCCGCACCACCCTCCTCGTTCAGC
TCACCTTCGAGGGCAGC

NM_010927.4_256 AATCTGCAGAGTGAAAAGTCCAGCCGCACCACCCTCCTCGTTCAGC
TCACCTTCGAGGGCAGC

cons *****

NM_001313921.1_ CGAGGGCCCAGCTACCTGCCTGGGGAACACCTGGGGATCTTCCAG
GCAACCAGACCGCCCTG

NM_001313922.1_ CGAGGGCCCAGCTACCTGCCTGGGGAACACCTGGGGATCTTCCAG
GCAACCAGACCGCCCTG

NM_010927.4_256 CGAGGGCCCAGCTACCTGCCTGGGGAACACCTGGGGATCTTCCAG
GCAACCAGACCGCCCTG

cons *****

NM_001313921.1_ GTGCAGGGAATCTTGGAGCGAGTTGTGGATTGTCCTACACCACACC
AAACTGTGTGCCTGGAG

NM_001313922.1_ GTGCAGGGAATCTTGGAGCGAGTTGTGGATTGTCCTACACCACACC
AAACTGTGTGCCTGGAG

NM_010927.4_256 GTGCAGGGAATCTTGGAGCGAGTTGTGGATTGTCCTACACCACACC
AAACTGTGTGCCTGGAG

cons *****

NM_001313921.1_ GTTCTGGATGAGAGCGGCAGCTACTGGGTCAAAGACAAGAGGCTGC
CCCCCTGCTCACTCAGC

NM_001313922.1_ GTTCTGGATGAGAGCGGCAGCTACTGGGTCAAAGACAAGAGGCTGC
CCCCCTGCTCACTCAGC

NM_010927.4_256 GTTCTGGATGAGAGCGGCAGCTACTGGGTCAAAGACAAGAGGCTGC
CCCCCTGCTCACTCAGC

cons *****

NM_001313921.1_ CAAGCCCTCACCTACTTCCTGGACATTACGACCCCTCCCACCCAGC
TGCAGCTCCACAAGCTG

NM_001313922.1_ CAAGCCCTCACCTACTTCCTGGACATTACGACCCCTCCCACCCAGC
TGCAGCTCCACAAGCTG

NM_010927.4_256 CAAGCCCTCACCTACTTCCTGGACATTACGACCCCTCCCACCCAGC
TGCAGCTCCACAAGCTG

cons *****

NM_001313921.1_ GCTCGCTTTGCCACGGACGAGACGGATAGGCAGAGATTGGAGGCCT
TGTGTCAGCCCTCAGAG

NM_001313922.1_ GCTCGCTTTGCCACGGACGAGACGGATAGGCAGAGATTGGAGGCCT
TGTGTCAGCCCTCAGAG

NM_010927.4_256 GCTCGCTTTGCCACGGACGAGACGGATAGGCAGAGATTGGAGGCCT
TGTGTCAGCCCTCAGAG

cons *****

NM_001313921.1_ TACAATGACTGGAAGTTCAGCAACAACCCACGTTCCCTGGAGGTGC
TTGAAGAGTTCCTTCC

NM_001313922.1_ TACAATGACTGGAAGTTCAGCAACAACCCACGTTCCCTGGAGGTGC
TTGAAGAGTTCCTTCC

NM_010927.4_256 TACAATGACTGGAAGTTCAGCAACAACCCACGTTCCCTGGAGGTGC
TTGAAGAGTTCCTTCC

cons *****

NM_001313921.1_ TTGCATGTGCCCGCTGCCTTCCTGCTGTGCGCAGCTCCCTATCTTGA
AGCCCCGCTACTACTCC

NM_001313922.1_ TTGCATGTGCCCGCTGCCTTCCTGCTGTGCGCAGCTCCCTATCTTGA
AGCCCCGCTACTACTCC

NM_010927.4_256 TTGCATGTGCCCGCTGCCTTCCTGCTGTGCGCAGCTCCCTATCTTGA
AGCCCCGCTACTACTCC

cons *****

NM_001313921.1_ ATCAGCTCCTCCCAGGACCACACCCCTCGGAGGTTACCTCACTG
TGGCCGTGGTCACCTAC

NM_001313922.1_ ATCAGCTCCTCCCAGGACCACACCCCTCGGAGGTTACCTCACTG
TGGCCGTGGTCACCTAC

NM_010927.4_256 ATCAGCTCCTCCCAGGACCACACCCCTCGGAGGTTACCTCACTG
TGGCCGTGGTCACCTAC

cons *****

NM_001313921.1_ CGCACCCGAGATGGTCAGGGTCCCCTGCACCATGGTGTCTGCAGCA
CTTGGATCAGGAACCTG

NM_001313922.1_ CGCACCCGAGATGGTCAGGGTCCCCTGCACCATGGTGTCTGCAGCA
CTTGGATCAGGAACCTG

NM_010927.4_256 CGCACCCGAGATGGTCAGGGTCCCCTGCACCATGGTGTCTGCAGCA
CTTGGATCAGGAACCTG

cons *****

NM_001313921.1_ AAGCCCCAGGACCCAGTGCCCTGCTTTGTGCGAAGTGTCACTGGCT
TCCAGCTCCCTGAGGAC

NM_001313922.1_ AAGCCCCAGGACCCAGTGCCCTGCTTTGTGCGAAGTGTCACTGGCT
TCCAGCTCCCTGAGGAC

NM_010927.4_256 AAGCCCCAGGACCCAGTGCCCTGCTTTGTGCGAAGTGTCACTGGCT
TCCAGCTCCCTGAGGAC

cons *****

NM_001313921.1_ CCCTCCCAGCCTTGATCCTCATTGGGCCTGGTACGGGCATTGCTC
CCTTCCGAAGTTTCTGG

NM_001313922.1_ CCCTCCCAGCCTTGATCCTCATTGGGCCTGGTACGGGCATTGCTC
CCTTCCGAAGTTTCTGG

NM_010927.4_256 CCCTCCCAGCCTTGATCCTCATTGGGCCTGGTACGGGCATTGCTC
CCTTCCGAAGTTTCTGG

cons *****

NM_001313921.1_ CAGCAGCGGCTCCATGACTCCCAGCACAAAGGGCTCAAAGGAGGCC
GCATGAGCTTGGTGTTT

NM_001313922.1_ CAGCAGCGGCTCCATGACTCCCAGCACAAAGGGCTCAAAGGAGGCC
GCATGAGCTTGGTGTTT

NM_010927.4_256 CAGCAGCGGCTCCATGACTCCCAGCACAAAGGGCTCAAAGGAGGCC
GCATGAGCTTGGTGTTT

cons *****

NM_001313921.1_ GGGTGCCGGCACCCGGAGGAGGACCACCTCTATCAGGAAGAAATGC
AGGAGATGGTCCGCAAG

NM_001313922.1_ GGGTGCCGGCACCCGGAGGAGGACCACCTCTATCAGGAAGAAATGC
AGGAGATGGTCCGCAAG

NM_010927.4_256 GGGTGCCGGCACCCGGAGGAGGACCACCTCTATCAGGAAGAAATGC
AGGAGATGGTCCGCAAG

cons *****

NM_001313921.1_ AGAGTGCTGTTCCAGGTGCACACAGGCTACTCCCGGCTGCCCGGCA
AACCCAAGGTCTACGTT

NM_001313922.1_ AGAGTGCTGTTCCAGGTGCACACAGGCTACTCCCGGCTGCCCGGCA
AACCCAAGGTCTACGTT

NM_010927.4_256 AGAGTGCTGTTCCAGGTGCACACAGGCTACTCCCGGCTGCCCGGCA
AACCCAAGGTCTACGTT

cons *****

NM_001313921.1_ CAGGACATCCTGCAAAGCAGCTGGCCAATGAGGTACTCAGCGTGC
TCCACGGGGAGCAGGGC

NM_001313922.1_ CAGGACATCCTGCAAAGCAGCTGGCCAATGAGGTACTCAGCGTGC
TCCACGGGGAGCAGGGC

NM_010927.4_256 CAGGACATCCTGCAAAGCAGCTGGCCAATGAGGTACTCAGCGTGC
TCCACGGGGAGCAGGGC

cons *****

NM_001313921.1_ CACCTCTACATTTGCGGAGATGTGCGCATGGCTCGGGATGTGGCTA
CCACATTGAAGAAGCTG

NM_001313922.1_ CACCTCTACATTTGCGGAGATGTGCGCATGGCTCGGGATGTGGCTA
CCACATTGAAGAAGCTG

NM_010927.4_256 CACCTCTACATTTGCGGAGATGTGCGCATGGCTCGGGATGTGGCTA
CCACATTGAAGAAGCTG

cons *****

NM_001313921.1_ GTGGCCACCAAGCTGAACTTGAGCGAGGAGCAGGTGGAAGACTATT
TCTTCCAGCTCAAGAGC

NM_001313922.1_ GTGGCCACCAAGCTGAACTTGAGCGAGGAGCAGGTGGAAGACTATT
TCTTCCAGCTCAAGAGC

NM_010927.4_256 GTGGCCACCAAGCTGAACTTGAGCGAGGAGCAGGTGGAAGACTATT
TCTTCCAGCTCAAGAGC

cons *****

NM_001313921.1_ CAGAAACGTTATCATGAAGATATCTTCGGTGCAGTCTTTTCCTATG
GGCAA AAAAGGGCAGC

NM_001313922.1_ CAGAAACGTTATCATGAAGATATCTTCGGTGCAGTCTTTTCCTATG
GGCAA AAAAGGGCAGC

NM_010927.4_256 CAGAAACGTTATCATGAAGATATCTTCGGTGCAGTCTTTTCCTATG
GGCAA AAAAGGGCAGC

cons *****

NM_001313921.1_ GCCTTGGAGGAGCCCAAAGCCACGAGGCTCTGA

NM_001313922.1_ GCCTTGGAGGAGCCCAAAGCCACGAGGCTCTGA

NM_010927.4_256 GCCTTGGAGGAGCCCAAAGCCACGAGGCTCTGA

cons *****

GGGTGCCGGCACC CGGAGGAGACCCTCTATCAGGAAGAAATG CAGGAGATGGTCCGCAAGAGAGTGC
TGTTCCAGGTGCACACAGGCTACTCCCGGCTGCCCGGCAAACCCAAGGTCTACGTTTCAGGACATCCTGCA
AAAGCAGCTGGCCAATGAGGTA CTACGCTCCAGC GGGAGCAGGGCCACCTCTACATTTGCGGAGAT
GTGCGCATGGCTCGGGATGTGGCTACCACATTGAAGAAGCTG

✓ BLAST Verified

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	46	20	63.24	60.00	3.00	0.00	CAGGAGATGGTCCGCAAGAG

No se muestra el Anexo 5 antes de su publicación por confidencialidad

Los resultados se informan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos. *P<0.05, **P<0.01; diferencias significativas entre las células estimuladas con LPS.

ANEXO 6

Expresión génica relativa logarítmica de iNOS en células RAW 264.7, calculada mediante el método $\Delta\Delta$ Ct de Livak

No se muestra el Anexo 6 antes de su publicación por confidencialidad

Los resultados se informan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos. *P<0.05, **P<0.01; diferencias significativas entre las células estimuladas con LPS.

ANEXO 7

Expresión génica relativa logarítmica de SOD1 y SOD2m en células RAW 264.7, calculada mediante el método $\Delta\Delta$ Ct de Livak

No se muestra el Anexo 7 antes de su publicación por confidencialidad

Los resultados se informan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos. *P<0.05, **P<0.01; diferencias significativas entre las células estimuladas con LPS.

ANEXO 8

Expresión génica relativa logarítmica de OGG1 en células RAW 264.7, calculada mediante el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ de Livak

No se muestra el Anexo 8 antes de su publicación por confidencialidad

Los resultados se informan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; diferencias significativas entre las células estimuladas con LPS.

ANEXO 9

Expresión génica relativa logarítmica de CAT en células RAW 264.7, calculada mediante el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ de Livak

No se muestra el Anexo 9 antes de su publicación por confidencialidad

Los resultados se informan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; diferencias significativas entre las células estimuladas con LPS.

