



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS
ACUOSO Y ETANÓLICO DE MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* Kunth) EN
MACRÓFAGOS DE RATÓN



AUTORA

Jhoselyn Lisset García Culqui

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS
ACUOSO Y ETANÓLICO DE MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* Kunth) EN
MACRÓFAGOS DE RATÓN

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

Profesor guía

Msc. Andrea Paola Cordero Arroyo

Autora

Jhoselyn Lisset García Culqui

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, 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”

Andrea Paola Cordero Arroyo

Master en Células Madre y Medicina Regenerativa

C.C. 1714669825

DECLARACION DEL DIRECTOR CIENTIFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”

Patricio Rojas Silva

Doctor en Filosofía

C.C. 1714991062

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Alina Aguirre Quevedo

Doctora en Ciencias Biológicas

C.C. 1756594600

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.”

Jhoselyn Lisset Garcia Culqui

C.C. 2000069217

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por ser mi guía y mi fortaleza en cada paso de mi vida y haberme otorgado una familia maravillosa quienes han creído en mí, dándome un ejemplo de superación y sacrificio. A mis padres y mis hermanos por ser mi apoyo incondicional, por sus sacrificios que han hecho por mí y estar a mi lado en cada momento a pesar de la distancia. A mis compañeros que estuvieron pendiente de cada decisión que tomaba y A mis amigas Shary y Alejandra por su apoyo incondicional. Al Dr. Manuel Baldeón, Dr. Patricio Rojas Silva, M.Sc Andrea Cordero y Dra Alina Aguirre por su importante aporte, su disponibilidad y paciencia durante la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

Con todo el amor les dedico a mis Padres, Miguel García e Inés Culqui por ser mi pilar fundamental y por haber hecho de mí una persona responsable. A mi hijo Joaquín García que fue mi motivación más grande por concluir con éxito este proyecto.

Muchos de mis logros se los dedico a ustedes, mi familia y amigos.

RESUMEN

El sistema inmunitario requiere interacciones complejas y específicas de tal forma que una leve modificación de estos mecanismos los hace susceptibles de interrupciones o alteraciones que posteriormente dan lugar a disfunciones inmunitarias tales como procesos inflamatorios descontrolados. Los genes proinflamatorios *COX-2*, *iNOS* y *NLRP3* intervienen en la inflamación. La inflamación produce trastornos metabólicos por lo tanto la producción endógena de antiinflamatorios no es suficiente para la mayoría de las personas. Los polifenoles poseen actividad antiinflamatoria, además de una capacidad para captar radicales libres los cuales causan estrés oxidativo, es por ello que tienen efectos benéficos sobre la salud como reducir la incidencia de la inflamación. En este estudio se emplearon extractos etanólico a pH3, y acuoso a pH5 de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) obtenidos en experimentos previos. Los extractos fueron probados en macrófagos de ratón RAW264.7 y se analizó la expresión de los genes *COX-2*, *UCP2*, *iNOS* y *NLRP3* mediante RT-PCR. Así mismo, se determinó la actividad antiinflamatoria mediante la producción de óxido nítrico ya que si existe una producción descontrolada de óxido nítrico se producen alteraciones tales como la inflamación. Se determinó que el extracto acuoso a pH5 produce un mayor efecto antiinflamatorio por lo tanto *V. floribundum* presenta actividad antiinflamatoria.

ABSTRACT

The immune system requires complex and specific interactions in such a way that a slight modification of these mechanisms makes them susceptible of interruptions or alterations that later give rise to immune dysfunctions such as uncontrolled inflammatory processes. The proinflammatory genes *COX-2*, *iNOS* and *NLRP3* intervene in the inflammation. Inflammation causes metabolic disorders therefore endogenous production of anti-inflammatory drugs is not enough for most people. Polyphenols have anti-inflammatory activity, in addition to a capacity to capture free radicals which cause oxidative stress, which is why they have beneficial effects on health as reducing the incidence of inflammation. In this study, ethanolic extracts at pH3 and aqueous a pH5 of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) obtained in previous experiments were used. The extracts were tested on RAW264.7 cell line murine and the expression of the *COX-2*, *UCP2*, *iNOS* and *NLRP3* genes was analyzed by RT-PCR. Likewise, the anti-inflammatory activity was determined by the production of nitric oxide because if there is an uncontrolled production of nitric oxide, alterations such as inflammation occur. It was determined that the aqueous extract at pH5 produces a greater anti-inflammatory effect therefore *V. floribundum* shows anti-inflammatory activity.

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. Capítulo I. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 1 |
| 1.2 Formulación del Problema | 2 |
| 1.3 Objetivos..... | 3 |
| 1.3.1 Objetivo General..... | 3 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos | 4 |
| 1.4 Justificación | 4 |
| 2. Capítulo II. Marco teórico..... | 6 |
| 2.1 Generalidades de la especie en estudio..... | 6 |
| 2.1.1 Propiedades bioquímicas y usos | 7 |
| 2.2 Compuestos fenólicos | 7 |
| 2.2.1 Generalidades | 7 |
| 2.2.2 Los polifenoles en los alimentos y actividad antioxidante..... | 8 |
| 2.2.3 Compuestos fenólicos y su relación con el proceso inflamatorio.... | 9 |
| 2.2.4 Comportamiento de los fenoles con diferentes solventes..... | 11 |
| 2.2.5 Influencia del pH sobre los fenoles | 13 |
| 2.3 Proceso Inflamatorio | 14 |
| 2.3.1 Generalidades | 14 |
| 2.3.2 La inflamación y macrófagos | 15 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3.3 | Genes proinflamatorios: iNOS, COX-2, UCP2, NLRP3 | 16 |
| 2.3.4 | Sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y ciclooxigenasa (COX-2)..... | 16 |
| 2.3.5 | Proteína mitocondrial desacoplante 2 (<i>UCP2</i>)..... | 17 |
| 2.3.6 | Proteína de la familia NLR conteniendo dominio PYD 3 (<i>NLRP3</i>) | 18 |
| 3. | Capítulo III. Diseño del plan experimental..... | 19 |
| 4. | Capítulo IV. Procedimiento para la obtención de datos..... | 20 |
| 4.1 | Población y muestras | 21 |
| 4.2 | Materiales y métodos para la obtención de datos | 21 |
| 4.2.1 | Cultivo celular RAW 264.7..... | 21 |
| 4.2.2 | Ensayo de citotoxicidad | 22 |
| 4.3 | Extracción de ARN | 26 |
| 4.3.1 | Preparación de reactivos: LPS, DEXAMETASONA, QUERCETINA | 26 |
| 4.3.2 | Preparación de extracto etanólico a pH 2,extracto acuoso a pH 5 y extracto con solventes orgánicos para extracción de ARN..... | 26 |
| 4.3.3 | Extracción y purificación de ARN con PureLink ® | |

| | |
|---|-----------|
| RNA Mini Kit | 26 |
| 4.3.4 Reconstrucción y tratamiento de la Dnasa en columna PureLink y Purificación del ARN..... | 28 |
| 4.4 PCR en tiempo real..... | 30 |
| 4.5 Producción de Óxido nítrico | 32 |
| 4.6 Cuantificación de proteínas..... | 34 |
| 4.6.1 Lisis celular..... | 34 |
| 4.6.2 Cuantificación de proteínas | 34 |
| 4.7 Evaluación estadística de los resultados | 35 |
| 5. Capítulo V. Resultados y Discusión | 35 |
| 4.8 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos en macrófagos de ratón RAW 264.7 | 35 |
| 4.9 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de Vaccinium floribundum..... | 37 |
| 4.9.1 Inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW264.7 | 37 |
| 4.9.2 Expresión de los genes <i>iNOS</i> , <i>COX-2</i> <i>NLRP-3</i> Y <i>UCEP-2</i> | 39 |
| 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 46 |
| 6.1 Conclusiones..... | 46 |

| | |
|---------------------------|----|
| 6.2 Recomendaciones | 46 |
| REFERENCIAS | 47 |
| ANEXOS | 56 |

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

Los frutos conocidos como bayas o berries presentan una mayor capacidad antioxidante en relación con otras frutas y verduras. Los frutos, además de nutrientes esenciales y una serie de micronutrientes, contienen diversos metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, denominados polifenoles. Los polifenoles son considerados dentro de los productos naturales de origen vegetal de gran interés, debido a sus propiedades antioxidantes (González, 2010).

Los compuestos polifenólicos presentes en diferentes frutos han sido investigados intensamente y se conoce que actúan como mediadores de la respuesta inflamatoria entre otras acciones dentro del sistema inmune (Cobo, 2014).

Mediante diversos análisis como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) se ha comprobado que extractos de material vegetal de la especie *Vaccinium* posee un contenido de compuestos fenólicos que se encuentra estrechamente relacionado con las propiedades farmacológicas y medicinales adjudicadas a estas plantas (Vasco et al., 2009). La concentración de compuestos fenólicos esta relacionada con la actividad antioxidante, sobre la cual se fundamenta su uso medicinal y farmacológico (Gracia, 2007).

El sistema inmunitario requiere interacciones complejas y específicas entre muchos tipos de células y moléculas de tal forma que una leve modificación de estos mecanismos los hace susceptibles de interrupciones o alteraciones que posteriormente pueden dar lugar a disfunciones inmunitarias tales como enfermedades autoinmunes, procesos inflamatorios descontrolados, entre otros (Karp y Geer, 2005).

Los polifenoles se clasifican en función del número de anillos fenólicos y elementos estructurales. Un subgrupo son flavonoides y antocianinas. Se ha demostrado que estos polifenoles poseen actividad antiinflamatoria, además de una capacidad para captar radicales libres los cuales causan estrés oxidativo. Una dieta con alto contenido en polifenoles de origen vegetal puede traer efectos benéficos sobre la salud así como reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas, neurológicas e inflamaciones (Quiñones, Miguel, y Aleixandre, 2012).

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), es una especie vegetal que se destaca por su potencial medicinal y nutritivo, debido al alto contenido de vitamina C y, polifenoles que posee, así como por su capacidad antioxidante, lo cual le confiere una posible propiedad preventiva terapéutica contra enfermedades como diabetes, cáncer y la obesidad. Por otra parte, se ha observado que las antocianinas presentes en el mortiño son capaces de regular la expresión de citoquinas y enzimas proinflamatorias lo que disminuye la respuesta inflamatoria en macrófagos (Schreckinger, et al, 2010)

1.2 Formulación del Problema

A nivel mundial se conocen diferentes tipos de enfermedades que alteran el desarrollo y el metabolismo del ser humano, comenzando con una inflamación hasta convertirse en una enfermedad inflamatoria crónica. Muchas de las enfermedades causan trastornos, envejecimiento y muerte celular lo que puede ocasionar deterioro en la función de diferentes órganos y tejidos. En los últimos años se ha elevado el índice de enfermedades inflamatorias crónicas, siendo considerada enfermedades de estudio por su alto nivel de morbi-mortalidad, y además su investigación es importante para establecer tratamientos eficaces y confiables (Organización Panamericana de la Salud, 2008).

Las enfermedades crónicas están relacionadas con un estado inflamatorio crónico debido a alteraciones en la respuesta inflamatoria. Además, según Schreckinger, la inflamación crónica produce los trastornos metabólicos por lo

tanto, la producción endógena de antiinflamatorios no es suficiente para la mayoría de personas en condiciones de inflamación crónica (Schreckinger, et al, 2010).

De la misma forma en el paso de los años se ha utilizado diferentes tipos de tratamiento que combaten las distintas enfermedades inflamatorias crónicas, las cuales incluyen el uso de antiinflamatorios no esteroideos, corticoides o una combinación de estos; sin embargo, algunos de los tratamientos que se utilizan son costosos, no son eficaces y generan efectos secundarios (Podolsky, 2016). Debido a todo lo antes expuesto, se hace necesario investigar diferentes formas de prevención y tratamiento que logren ser accesibles y seguras para la población y esto podría ser el caso del uso de plantas como las del género *Vaccinium*.

Se han realizado varias investigaciones en el género *Vaccinium* en las cuales se han reportado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de sus frutos. Sin embargo, dichas propiedades requieren ser estudiadas más profundamente, ya que se les atribuye efectos benéficos en personas con enfermedades inflamatorias crónicas como la diabetes, cardiovasculares, cáncer y obesidad (Cobo, 2014) (Quiñones, Miguel, y Aleixandre, 2012).

En el Ecuador no se ha realizado ningún tipo de estudio sobre la actividad antiinflamatoria de este tipo de baya como en el caso del mortiño, por lo que se desea demostrar la actividad antiinflamatoria de un extracto acuoso y etanólico del mismo, que podría representar una opción terapéutica para las dolencias tipo inflamatorio.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antiinflamatoria de extractos etanólico y acuoso de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en la línea celular RAW 264.7

1.3.2 Objetivos Específicos

Evaluar la citotoxicidad de los extractos etanólico (pH=2) y acuoso (pH=5) obtenidos en estudios previos, en macrófagos murinos RAW 264.7.

Evaluar la actividad antiinflamatoria de extracto etanólico (pH=2) y acuoso (pH=5), en macrófagos murinos RAW264.7 mediante la producción de óxido nítrico.

Evaluar la actividad antiinflamatoria de extracto etanólico (pH=2) y acuoso (pH=5), mediante la expresión de genes proinflamatorios: iNOS, COX-2, NLRP3 y UCP2.

1.4 Justificación

Existen respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias fisiológicas, sin embargo cuando un estado inflamatorio se prolonga en el tiempo va a generar un efecto deletéreo en órganos y tejidos.

En la actualidad se ha incrementado el interés por el estudio de alimentos con alto contenido en antioxidantes naturales debido a que su consumo está asociado con la prevención de enfermedades metabólicas crónicas. Varios estudios han evaluado la actividad antiinflamatoria de extractos y metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales en diferentes modelos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*, para prevenir o reducir la incidencia de enfermedades crónicas.

Los alimentos con alto contenido de antioxidantes, poseen la capacidad de neutralizar los radicales libres. Esta capacidad se ha convertido en una alternativa para poder eliminar el estrés oxidativo, siendo un componente fundamental en muchas patologías.

El estrés oxidativo se asocia a diferentes estados patológicos como enfermedades reumáticas, cardiovasculares, envejecimiento celular, procesos inflamatorios crónicos, entre otras (Trujillo, 2009).

Estudios previos han demostrado la actividad antiinflamatoria de bayas del género *Vaccinium*; por tal motivo es importante realizar la presente investigación en la especie *V. floribundum* (mortiño), con el fin de obtener mayor información, y demostrar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de esta especie. El mortiño es una planta nativa del Ecuador y no necesita de cuidados especiales (crece normalmente en páramos del Ecuador), lo que la convierte en una especie de fácil acceso.

Se han descrito varios tipos de compuestos en el género *Vaccinium*, principalmente en el fruto, destacándose compuestos bioactivos como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, proantocianidinas, estilbenos y taninos. Estos compuestos han demostrado tener actividad antioxidante, antitumoral, antimutagénica, antimicrobiana antiinflamatoria y propiedades antineurodegenerativa in vitro e in vivo, es decir disminuyen el estrés oxidativo evitando muchos estados patológicos mencionados anteriormente (Hariram y Won, 2013, p.1).

Los compuestos polifenólicos han demostrado tener actividad antioxidante y antiinflamatoria, permitiendo que las células mantengan el equilibrio de los procesos de óxido-reducción. Por tal razón, es importante realizar esta investigación en *V. floribundum*, que permitirá la generación de datos relevantes para futuros proyectos. También, fomentará la producción y consumo regular de *V. floribundum* en los diferentes lugares del país (Chiluisa, 2015).

Finalmente al determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de un extracto acuoso y etanólico de *V. floribundum*, nos permitirá generar evidencia de la actividad antiinflamatoria de las bayas de esta especie y así poder demostrar

que un alimento puede tener un efecto preventivo de enfermedades inflamatorias crónicas que afectan al ser humano.

2. CAPITULO II. MARCO TEORICO

1.5 Generalidades de la especie en estudio

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es considerada como una fuente de materia prima para la elaboración de diferentes productos. Se lo encuentra habitualmente en el norte de América del Sur, entre Colombia y Ecuador, por tal motivo es conocido como arándano Andino. La especie es considerada nativa de los páramos ecuatorianos, ya que crece desde los 1400 hasta 4350 msnm. Además crece de forma silvestre y no existe ningún tipo de cultivo comercial de la especie (Chiluisa Utreras, 2015).

El género *Vaccinium* consta de 400 a 450 especies distribuidas en todos los continentes, exceptuando Australia y Antártida. De las 450 especies, 40 se encuentran alrededor de los Andes (Trujillo, 2009).

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) se lo puede encontrar en los páramos ecuatorianos como El Ángel o El Tambo. También se lo ha observado en los páramos alrededor de, Machachi y Pintag (Chiluisa, 2015).



Figura 1. Arbusto de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

Tomado de: Coba, M. 2012.

1.5.1 Propiedades bioquímicas y usos

Principalmente el uso que se da a este fruto es en la alimentación, por ejemplo, complemento de ensaladas, preparación de salsas, acompañamiento en distintos platos de tipo gourmet, entre otros (Tupuna, 2012).

En el Ecuador este fruto es muy conocido por ser uno de los ingredientes principales en la preparación de una bebida típica del país conocida como “Colada Morada”. Esta bebida se la prepara generalmente en el mes de noviembre, durante la conmemoración del Día de los Difuntos (Cobo, 2014).

Actualmente, el mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) está siendo introducido en el campo de la investigación. Se ha observado que contiene polifenoles, antocianinas, vitamina C y celulosa, en altas cantidades, las cuales confieren propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras (Tupuna, 2012).

1.6 Compuestos fenólicos

1.6.1 Generalidades

Se puede definir como compuesto fenólico a todas las sustancias que poseen uno o más anillos fenólicos (hidroxibenceno) unidos a una estructura alifática o aromática. En la naturaleza se puede encontrar varios compuestos que poseen en su estructura anillos fenólicos, los cuales se originan como producto del metabolismo secundario de las plantas. Los compuestos fenólicos cumplen varias funciones dentro la planta, son responsables de la pigmentación e incluso del aroma de flores y frutos. Además actúan como fitoalexinas para la planta, es decir que actúan como mecanismo de defensa contra hongos y bacterias (Gimeno, 2004) (Quiñones, Miguel y Aleixandre, 2012).

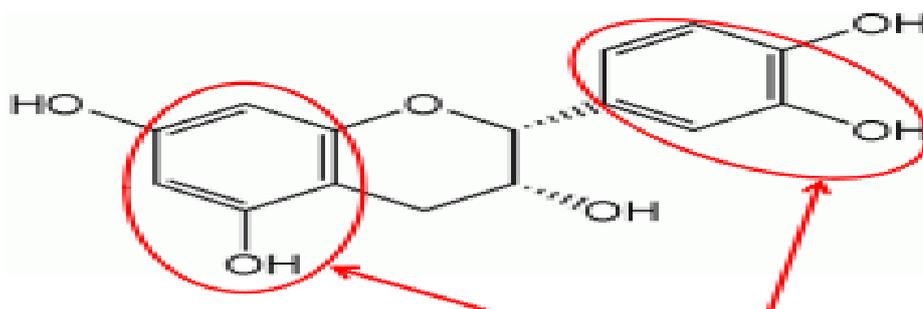


Figura 2. Estructura química del grupo fenólico. Se encuentra encerrada. Tomado de Dwyer y Erdman, 2015.

Se puede encontrar compuestos fenólicos en la mayoría de alimentos de origen vegetal, es por esta razón que la presencia de fenoles en el reino animal se debe principalmente a la ingesta de estos compuestos en la dieta. Dentro de los alimentos con alto contenido fenólico se puede mencionar al cacao, la mayoría de frutos tipo baya, las uvas, los cítricos, entre otros. Los compuestos fenólicos influyen en la calidad de estos alimentos, puesto que actúan como antioxidantes y les confieren características organolépticas como el sabor, olor y color de los mismos (Gimeno, 2004).

1.6.2 Los polifenoles en los alimentos y actividad antioxidante

Aproximadamente existen 8000 estructuras encontradas en plantas, sin embargo las plantas usadas en la alimentación solo tienen cien estructuras polifenólicas. Se clasifican de acuerdo al número de anillos de fenol, los flavonoides son el grupo más grande de los polifenoles. Entre las actividades biológicas poseen actividades biológicas se destaca su capacidad antioxidante, lo que le permite disminuir o prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas como: diabetes, cáncer e la inflamación (Silva, Seca, Barreto y Pinto.2015).

La actividad antioxidante está relacionada con el estrés oxidativo y de manera directa con las especies reactivas del oxígeno (ROS) y también con la inhibición de enzimas que producen ROS y la inhibición del factor de transcripción NF- κ B. (Echeverri y Mockus, 2008)

El factor de transcripción NF- κ B es clave en el proceso inflamatorio debido a que regula directamente la expresión de mediadores inflamatorios y su actividad se demuestra en enfermedades inflamatorias como la artritis y asma por su actividad inductora de citocinas proinflamatorias, enzimas promotoras de la inflamación, quimiocinas, moléculas de adhesión y inmunoreceptores, ya que algunos mediadores de la inflamación depende de este factor de transcripción. (Echeverri y Mockus, 2008)

El sistema inmunitario del cuerpo controla los niveles de ROS permitiendo un equilibrio en la producción y eliminación de ROS. El elevado nivel de producción de ROS o una inadecuada defensa provoca estrés oxidativo, el cual está implicado como un factor patológico en varias enfermedades crónicas (Silva, Seca, Barreto y Pinto. 2015).

Una de las principales fuentes para la ingesta de polifenoles son las verduras y frutas. Según Esteves, las moras, arándanos, cerezas, ciruelas e inclusive el vino tinto son ricos en flavonoides y antocianidinas (Esteves, 2016). Estudios demuestran que el consumo de esta dieta reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer las mismas que son producidas por inflamaciones crónicas ya que actúan como antioxidantes reduciendo el nivel del estrés oxidativo (Silva, Seca, Barreto y Pinto. 2015) (Torres, 2012)

1.6.3 Compuestos fenólicos y su relación con el proceso inflamatorio

La inflamación suministra un medio por que las células del sistema inmunitario (principalmente macrófagos y leucocitos polimorfonucleares), pueden llegar hasta el lugar donde se presenta la infección o lesión tisular e iniciar con la respuesta inmune. Sin embargo en estas células se originan radicales libres de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RONS). Tras el proceso inflamatorio existe una sobreproducción de dichos radicales libres, los cuales pueden provocar estrés oxidativo y daño a las células. Esta sobreproducción es inhibida por la activación de enzimas antioxidantes como la

catalasa o la superóxido dismutasa, las cuales eliminan o transforman a los radicales libres ya mencionados (Bravo y López, 1998).

La acumulación de las ROS, principalmente el anión oxígeno (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son capaces de producir la acumulación de estas moléculas es capaz de producir daños celulares a nivel de ADN así como estrés oxidativo y un desequilibrio entre mecanismos oxidantes y antioxidantes de los diferentes tejidos. Se ha evidenciado que pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas poseen niveles altos de radicales libres en la sangre y un deficiente sistema defensivo antioxidante. Algunos estudios reportan que los polifenoles tendrían un efecto antiinflamatorio considerable, el cual estaría justificado por las propiedades antioxidantes que caracterizan a estos compuestos. Por esta razón se ha indicado que el consumo de alimentos con alto contenido de compuestos tiene un efecto benéfico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Ver tabla 1) (Frontela, Canali y Virgili, 2010).

Tabla 1

Actividad antiinflamatoria ejercida por distintos compuestos fenólicos.

| COMPUESTO FENÓLICO | FUENTE ALIMENTARIA | ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA |
|---|---|---|
| Antocianos y flavonoles | Fresa | Regulación en la producción de citosinas |
| Resveratrol | - Vino Tinto - Uvas | Reducción de los niveles de citosinas e infiltración de neutrófilos |
| Antocianos | Baya del cornejo de Kousa (<i>Cornus Kousa</i>) | Inhibición de la enzima ciclooxigenasa |
| Aflavinas | Té negro | -Reducción en los niveles de ROS -Inhibición de la activación de NF-kb (Factor nuclear de transcripción) |
| -Rutina -Ácido clorogénico -Epicatequina | Zumo de manzana | -Disminución del daño oxidativo -Disminución de los niveles de ROS |

Tomado de: (Frontela, Canali, & Virgili, 2010)

1.6.4 Comportamiento de los fenoles con diferentes solventes

Los compuestos fenólicos y los alcoholes presentan algunas propiedades físicas químicas similares debido al grupo hidroxilo (OH⁻), sin embargo los

fenoles conforman una familia química totalmente diferente. Entre las propiedades están que se los puede encontrar en un estado de agregación líquido o sólido y tienen bajos puntos de fusión pero puntos de ebullición altos, gracias a su facilidad para formar enlaces de hidrógeno. De manera general son incoloros, a excepción de aquellos que contengan algún grupo que les confiera alguna coloración, como es el caso del grupo NO_2 , sin embargo, debido a que se oxidan con mucha facilidad, se los suele encontrar coloreados. En su mayoría los compuestos fenólicos son poco miscibles en agua, a pesar de estar formados por puentes de hidrógeno, la proporción entre carbonos y grupos hidroxilos (OH^-) es baja, lo cual dificulta la solubilidad en agua (Tabla 2).

Los monofenoles que poseen un solo grupo hidroxilo y varios carbonos son insolubles en agua, mientras que los polifenoles con más de un grupo hidroxilo poseen mayor solubilidad en agua. Por lo tanto se puede afirmar que los compuestos fenólicos tienen mayor miscibilidad en solventes polares como es el caso del etanol y el agua por excelencia (Serra, 2002).

Según Apolo, los compuesto polifenólicos son ligeramente soluble en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e incluso en agua. (Apolo, 2013).

Tabla 2

Solubilidad en agua de distintos compuestos fenólicos

| COMPUESTO | ESTRUCTURA | SOLUBILIDAD (% M/M A 25 °C) |
|----------------------|---|-----------------------------|
| Fenol |  | 6,6 |
| Catecol |  | 66,7 |
| 2-Clorofenol |  | <0,1 |
| 3-Clorofenol |  | 0,26 |
| 4-Clorofenol |  | 2,71 |
| Pentaclorofenol |  | 20-25 ppm |
| 4-Cloro-3-metilfenol |  | 0,4 |

Tomado de: Serra, 2002.

1.6.5 Influencia del pH sobre los fenoles

Los fenoles se caracterizan por ser compuestos con un pH ligeramente ácido, lo cual representa una de las principales diferencias con los alcoholes. En términos de acidez, los fenoles son compuestos ácidos más fuertes que el agua y los alcoholes, pero más débiles que los ácidos carboxílicos (Serra, 2002).

Esta característica permite a los fenoles reaccionar con el NaOH, mientras que los alcoholes no pueden. Esta diferencia se debe a que el ion fenóxido es mucho más estable con el anillo aromático que el ion alcóxido (Serra, 2002).

El pH tiene una relación directa con la solubilidad de los compuestos fenólicos, un medio con pH básico aumenta la solubilidad del fenol en agua, por otro lado en un medio ácido disminuye la afinidad del compuesto fenólico por el agua, siendo soluble en solventes orgánicos (Serra, 2002).

1.7 Proceso Inflamatorio

1.7.1 Generalidades

El organismo tiene mecanismos de respuesta ante procesos inflamatorios sean estos de carácter infeccioso, lesión tisular o estrés celular, inclusive puede presentarse como una alteración a los mecanismos de respuesta inflamatoria propios del sistema inmune (García, 2008).

Dentro del proceso inflamatorio existen algunos mediadores, de los cuales ciertos son investigados para descubrir nuevos agentes antiinflamatorios. Entre estos se encuentran las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α , que intervienen en la activación y amplificación de la vía de respuesta inflamatoria, óxido nítrico, mediador que es producido por la enzima óxido nítrico sintasa inducible, y PGE₂ (prostaglandina E2), que se presenta en las enfermedades crónicas, importante a la finalización de la inflamación. (Silva, Seca, Barreto y Pinto. 2015)

La inflamación se desarrolla para restaurar la homeostasis alterada, de esta manera puede elegirse según sea el factor desencadenante actuación como por ejemplo la defensa del organismo contra una infección, una respuesta de reparación tisular frente a una lesión del mismo tipo, adaptación al estrés y retorno al estado homeostático (García, 2008).

Las consecuencias fisiopatológicas derivadas de un proceso inflamatorio varían dependiendo del tipo de respuesta producido por el sistema inmunitario (Figura 3) (García, 2008).

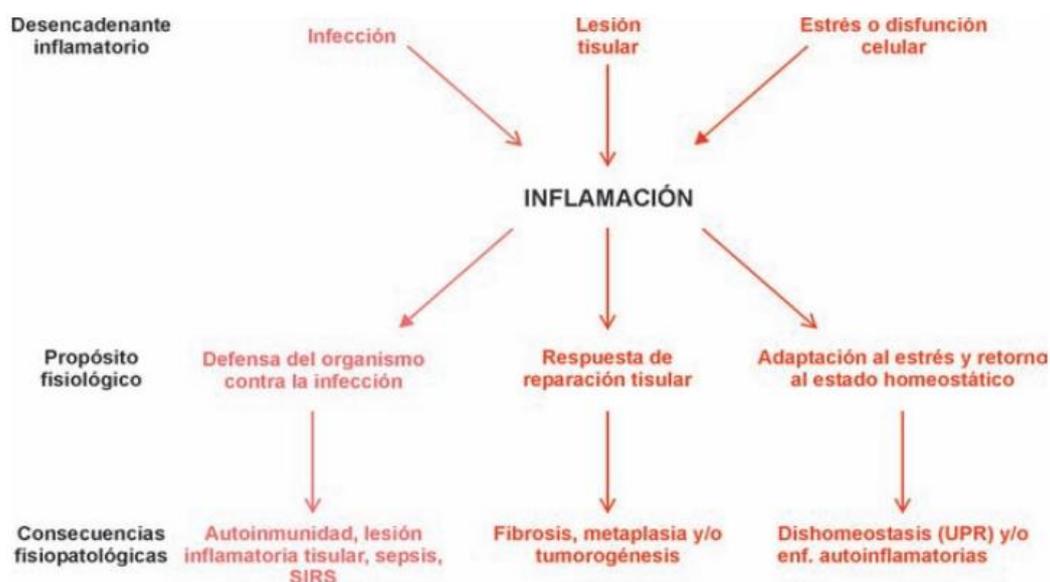


Figura 3. Consecuencias fisiopatológicas de un desencadenante inflamatorio. Tomado de: García Barreno, 2008.

El papel de los polifenoles es intervenir en la captación de radicales libres e inhibir las enzimas que intervienen en el proceso inflamatorio (hidrolasas, fosfolipasas, ciclooxigenasas produciendo prostaglandinas PGS, prostaciclina PC_s, tromboxanos TBX_s y lipooxigenasas) (Castell, 2005).

1.7.2 La inflamación y macrófagos

En la inflamación se produce la eliminación de agentes dañinos y patógenos para restaurar las funciones y estructuras celulares. Una reparación eficiente juega un papel importante debido a que si no existe una modulación adecuada de la inflamación, esta se puede perpetuar y volverse crónica.

Los macrófagos son considerados como células claves en la respuesta inflamatorias por que se pueden activar por distintas señales en donde intervienen algunos mediadores como: las citoquinas (IFN γ -interferón gamma, TNF-factor de necrosis tumoral o GM-CSF-factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos), LPS (lipopolisacárido bacteriano), complejos inmunes y proteínas de matriz extracelular. Estos mediadores juegan un papel crítico en

todo el proceso inflamatorio. Además intervienen en la presentación del antígeno, fagocitosis y la inmunomodulación gracias a la producción de citoquinas y factores de crecimiento (Ripoll, Hume y Fontanilla, 20015)

Dentro del proceso inflamatorio intervienen varias moléculas que activan a los macrófagos. Ciertas ocasiones los procesos inflamatorios se distorsionan en la resolución de infecciones lo que puede causar una inflamación prolongada generando alteraciones patológicas. Por esta razón los genes que intervienen en el proceso inflamatorio se expresan bajo una regulación exacta para evitar alteraciones en la respuesta inmune que pueden ser dañinas.

1.7.3 Genes proinflamatorios: iNOS, COX-2, UCP2, NLRP3

Los genes pro-inflamatorios se han determinado que intervienen en la actividad de eliminación de la apoptosis, proliferación, metástasis, invasión, inflamación. Entre los genes pro-inflamatorios tenemos los TNF y IL-1 alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-18 su superfamilia, quimiocinas como *MMP-9*, *VEGF*, *iNOS*, *COX-2*, *NLRP3*, *UCP2* y *5-LOX*. El factor de transcripción NF- κ B es el que regula estos genes y puede ser inducido por cualquier agente carcinógeno.

Los macrófagos activados producen factores principales mediante vías de señalización que permiten la inducción en su expresión. Entre estos están las citoquinas como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y IL-12, proteasas y enzimas que sintetizan mediadores inflamatorios como *iNOS* (sintetasa inducible de óxido nítrico) el cual es responsable de la producción de óxido nítrico y *COX-2* (ciclooxigenasa 2) y *PGE₂* microsomal 1 participan en la producción de prostaglandinas.

1.7.4 Sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y ciclooxigenasa (COX-2)

Las enzimas *iNOS* y *COX-2* son inducidas por citoquinas o LPS (lipopolisacárido), y están relacionadas a procesos inflamatorios agudos y crónicos. *iNOS* es responsable de la producción de NO y *COX-2* de

prostaglandinas pro-inflamatorias. En la mayoría de enfermedades inflamatorias ocurre una sobreexpresión de iNOS y COX-2. (Lim et al., 2009)

La enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) se encarga de sintetizar óxido nítrico, el cual interviene en las respuestas inflamatorias y se sintetiza a partir de varios mediadores como L-arginina, oxígeno molecular, NADPH y otros cofactores. La activación de NF- κ B está relacionado con el incremento de expresión de óxido nítrico sintetasa inducida (Fernández y Torres, p. 3-11).

La ciclooxigenasa cuenta con tres isoformas las cuales son COX-1, COX-2 y COX-3, se encargan de catalizar la misma reacción pero la regulación de la expresión es distinta frente a varios estímulos. La expresión de COX-2 se eleva en los macrófagos cuando se encuentran frente a citoquinas y LPS, estímulos proinflamatorios, esta enzima se regula a nivel transcripcional y post-transcripcional.

La COX-2 es precursor de los prostanoideos dentro de los procesos inflamatorios y enfermedades proliferativas y se activa por estímulos inflamatorios, factores de crecimiento y hormonas. Los prostanoideos son un grupo de compuestos incluidos dentro de los eicosanoides, por que se derivan de ácidos grasos insaturados de cadena larga (20-24 carbonos). Dentro de este grupo están tromboxanos (TXs) y las prostaglandinas (PGs) dichos compuestos son mediadores de procesos fisiopatológicos de la inflamación y el dolor.

El promotor de las secuencias de los genes *iNOS* y *COX-2* contienen un sitio de unión para el factor de transcripción universal, factor nuclear- κ B, el cual es activado por citoquinas, mediadores mitogénicos o endotoxinas (Lim et al., 2009).

1.7.5 Proteína mitocondrial desacoplante 2 (UCP2)

UCP2 fue descrita en 1997 y es una proteína integral de la membrana interna mitocondrial. El gen se encuentra dentro del cromosoma 11.

La proteína desacoplante 2 (UCP-2) se genera en varios tejidos, especialmente en el tejido graso y musculo esqueletico. Esta proteína tiene una acción fisiológica de controlar la producción de óxido nítrico e interviene en la actividad antiinflamatoria. Según Sanchez, esta proteína puede intervenir en la prevención de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a que desacopla la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP disminuyendo el gradiente de protones por lo tanto la producción de ROS y RNS reduciendo el estrés oxidativo. Así como ejerce un papel protector al daño celular debido a que tanto el O_2^- y los lípidos peroxidados activan la entrada de los protones, que son mediados por UCP2 (Figura 4). En la actualidad existe mas evidencia de que esta proteína puede intervenir como sistema de protección frente al estrés oxidativo y por ende con la inflamación. (Sanchez, 2008, p.27-34).



Figura 4. Modelo de funcionamiento de la UCPs

Tomado de: Sanchez, 2008.

1.7.6 Proteína de la familia NLR conteniendo dominio PYD 3 (NLRP3)

NLRP3 proviene de la familia de proteínas de NLR que son receptoras citosólicas cuya función es de regular la inflamación y la apoptosis mediante el inflamosoma es mediar la transducción de la señal o activación de las caspasas inflamatorias. Las caspasas pertenecen a la familia de las proteasas que intervienen en la apoptosis y en la activación de las citoquinas proinflamatorias. (Elinos, Maldonado y Meléndez, (2001), p. 493-495).

2. CAPÍTULO III. Diseño del plan experimental

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se realizaron 3 experimentos, se utilizó como variables los 3 extractos de interés de *Vaccinium floribundum* etanólico, acuoso y solvente orgánico, así mismo se denominó a un control positivo como vehículo compuesto por el solvente utilizado para las pruebas frente a RAW 264.7 para evaluar para las cuales el diseño experimental utilizado fue el siguiente:

En la prueba de citotoxicidad se seleccionó como control de crecimiento a células sin ningún tipo de tratamiento, control negativo a células tratadas con emetina 100 μ M. Los extractos de *Vaccinium floribundum* se probaron en 4 concentraciones 1, 10, 100, 1000 μ g/ml.

Para la prueba de producción de óxido nítrico y expresión de genes proinflamatorios, se seleccionó a las células sin tratamiento como control negativo, mientras que se usó 3 controles positivos: primero conformaban las células RAW 264,7 estimuladas con LPS y tratadas con los extractos de *V. floribundum*, el segundo estaba conformado con las células RAW 264,7 estimuladas con LPS + quercetina, el tercer control fue las células RAW264.7 estimuladas con LPS + dexametasona. La concentración de los extractos vegetales fue a 100 μ g/mL.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa programa de Microsoft Excel 2015 juntamente con el programa estadístico Graph Pad Prism v.6 en donde se realizó la prueba ANOVA con comparación de Tuckey al 95% de nivel de confianza.

3. CAPÍTULO IV. Procedimiento para la obtención de datos

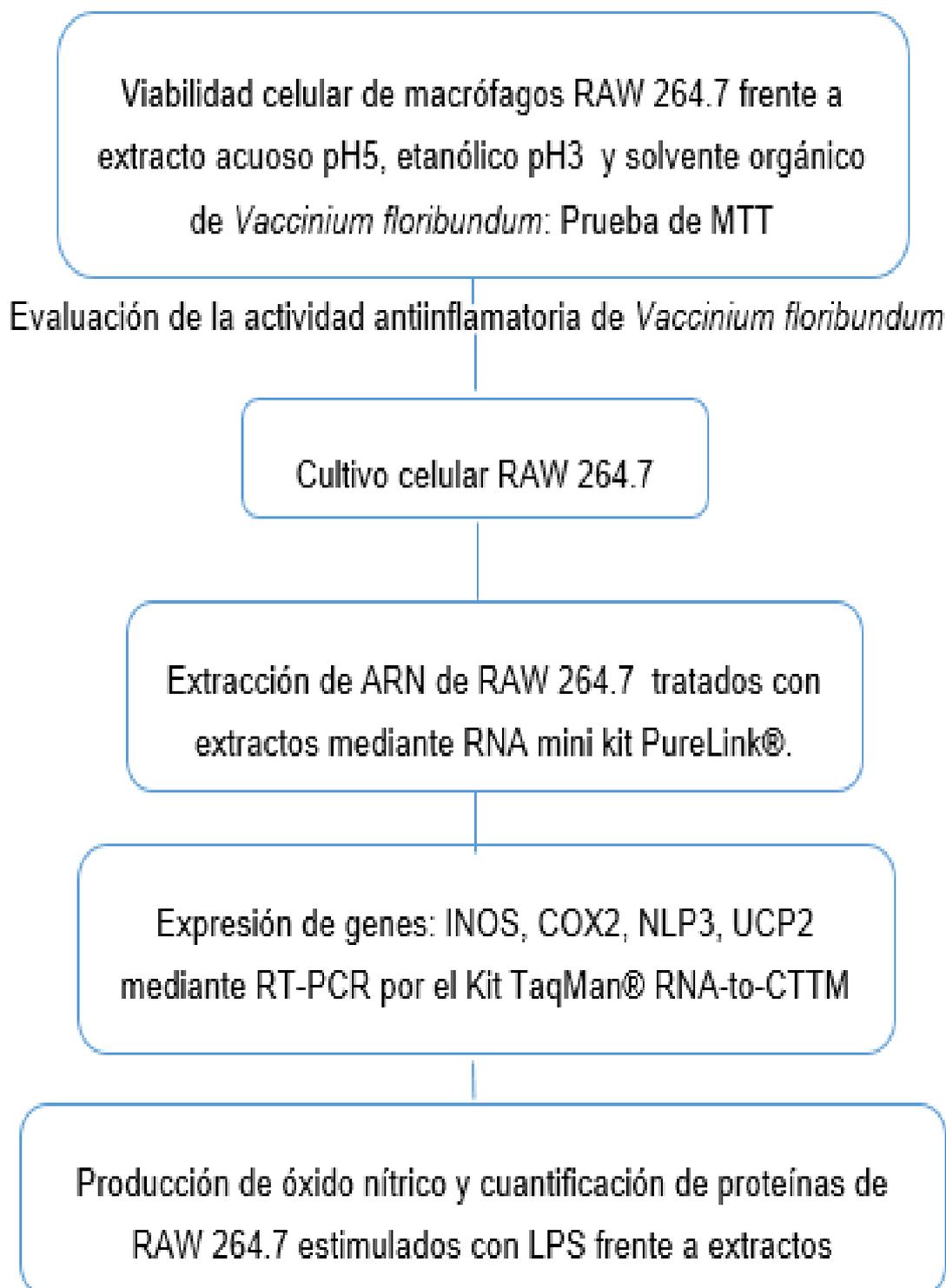


Figura 5. Diagrama de flujo del diseño experimental

3.1 Población y muestras

Los extractos de mortiño utilizados se adquirieron de un estudio previo realizado en el Centro de Investigación Traslacional de la Universidad de las Américas, en donde determinaron que el extracto acuoso pH 3 y etanólico pH 5, son los de mayor concentración de polifenoles.

Se empleó la línea celular de macrófagos RAW264.7 que fueron donados por el Dr. Ilya Raskin, Rutgers University. Se utilizó medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco™, EEUU) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y una solución penicilina-estreptomicina al 1%.

3.2 Materiales y métodos para la obtención de datos

3.2.1 Cultivo celular RAW 264.7

3.2.1.1 Condiciones del cultivo

La línea celular RAW264.7, se cultivó con una concentración inicial de 2×10^5 células por mL en medio DMEM, suplementado al 10 % con suero fetal bovino y 1% de penicilina. Las células fueron cultivadas a una concentración 1:10 y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ (Monroy *et al* 2005).

3.2.1.2 Descongelación celular

El criovial con las células RAW264.7 se colocó en baño maría a 37°C durante 5 minutos, con una micropipeta se colocaron las células en el medio de cultivo alto en glucosa DMEM a temperatura ambiente.

3.2.1.3 Cambios de medio

Las células fueron desprendidas con raspadores celulares Nunc™ (Termo Fisher scientific, EEUU). Con ayuda de una pipeta serológica se homogenizó lentamente, tratando de no generar burbujas y rápidamente se colocaron en un tubo falcon. Se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. Posteriormente se aspiró el sobrenadante quedando un residuo conocido, como sedimento de células. Se

realizó un lavado con 5 ml de PBS (tampón fosfato salino) hasta lograr homogenizar las células, se volvió a centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos. Se tomó 1 mL de células en 10 mL de medio DMEM fresco transcurridos 3 días se realizó un lavado y un cambio de medio.

3.2.1.4 Conteo celular

Se utilizó la cámara de Neubauer y las células fueron desprendidas con raspadores celulares NuncTM (Termo Fisher scientific, EEUU). Con ayuda de una pipeta serológica se homogenizó lentamente, se colocaron en un tubo falcon. Se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min. Posteriormente se aspiró el sobrenadante quedando un residuo conocido, como sedimento de células. Se realizó un lavado con 5 ml de PBS (tampón fosfato salino) hasta lograr homogenizar las células, se volvió a centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos. Se añadieron 10 μ L de Trypan Blue (Sigma-Aldrich, EE.UU, 93595), en 10 μ L de células. En cada zona de la cámara de Neubauer se colocaron 10 μ L de la mezcla preparada y se procedió al conteo celular.

3.2.2 Ensayo de citotoxicidad

3.2.2.1 Preparación del reactivo metiltiazoltetrazolio MTT

Se preparó el reactivo de metiltiazoltetrazolio (MTT) haciendo alícuotas de 5 mg en 1 mL de PBS. Para la esterilización se pasó la solución preparada por un filtro de jeringa de 30mm (FilterBio®, EEUU) en un microtubo estéril dentro de una cabina de flujo.

3.2.2.2 Preparación del reactivo Emetina 100 μ M

La solución madre de Emetina (Sigma-Aldrich, EE.UU) se preparó a una concentración de 5 mM para lo cual se pesaron 2,8 mg en 1 mL de agua estéril ultrapura.

3.2.2.3 Preparación de extracto etanólico pH 2, extracto acuoso pH 5 y extracto con acetato de etilo para la prueba de citotoxicidad

A partir de los extractos ya liofilizados de un estudio previo, se pesó 1 mg del extracto etanólico a pH2 y extracto acuoso a pH5 los cuales se disolvieron en 1 mL de EtOH 100%, de la misma manera se pesó 1 mg del extracto con acetato de etilo y se disolvió en DMSO (dimetilsulfóxido) dentro de microtubos.

Se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los extractos disueltos en EtOH 100% a las siguientes concentraciones: 50 µg/mL, 500 µg/mL, 5000 µg/mL, 50000 µg/mL.

3.2.2.4 Prueba MTT: Citotoxicidad

Para la prueba de citotoxicidad se sembraron las células a una densidad de 5×10^4 células/pocillo (5×10^5 células/mL) en un volumen final de 100 µL/ pocillo, en una placa de 96 pocillos. El medio que se utilizó fue DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de la solución penicilina-estreptomina.

Por cada tratamiento se realizaron 3 réplicas en tres días diferentes.

El diseño de la placa que se utilizó para la prueba de citotoxicidad se presenta en la figura 6 con las respectivas concentraciones por pocillo.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | Control negativo | Control negativo | Control negativo | E. Solvente Orgánico 1000µg/ml | E. Solvente Orgánico 1000µg/ml | E. Solvente Orgánico 1000µg/ml | E. EtOH 10µg/ml | E. EtOH 10µg/ml | E. EtOH 10µg/ml | | |
| C | | Vehículo EtOH 100% | Vehículo EtOH 100% | Vehículo EtOH 100% | E. H ₂ O 1µg/ml | E. H ₂ O 1µg/ml | E. H ₂ O 1µg/ml | E. EtOH 100 µg/ml | E. EtOH 100 µg/ml | E. EtOH 100 µg/ml | | |
| D | | Emetina 100 µM | Emetina 100 µM | Emetina 100 µM | E. H ₂ O 10µg/ml | E. H ₂ O 10µg/ml | E. H ₂ O 10µg/ml | E. EtOH 1000 µg/ml | E. EtOH 1000 µg/ml | E. EtOH 1000 µg/ml | | |
| E | | E. Solvente Orgánico 1µg/ml | E. Solvente Orgánico 1µg/ml | E. Solvente Orgánico 1µg/ml | E. H ₂ O 100µg/ml | E. H ₂ O 100µg/ml | E. H ₂ O 100µg/ml | | | | | |
| F | | E. Solvente Orgánico 10µg/ml | E. Solvente Orgánico 10µg/ml | E. Solvente Orgánico 10µg/ml | E. H ₂ O 1000µg/ml | E. H ₂ O 1000µg/ml | E. H ₂ O 1000µg/ml | | | | | |
| G | | E. Solvente Orgánico 100µg/ml | E. Solvente Orgánico 100µg/ml | E. Solvente Orgánico 100µg/ml | E. EtOH 1µg/ml | E. EtOH 1µg/ml | E. EtOH 1µg/ml | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Figura 6 Diseño de placa para prueba de citotoxicidad

Se añadieron los extractos de polifenoles a una concentración de 50000, 5000, 500 y 50 µg/ml.

El volumen que se utilizó en cada pocillo por cada tratamiento se encuentra descrito en la tabla 3.

Tabla 3

Dosis de tratamientos por pocillos para la prueba de citotoxicidad

| TRATAMIENTOS | DOSIS |
|---|---|
| Control negativo | 100µl de células. (Mix preparada) |
| Vehículo | 98µl células(Mix preparada) + 2µl EtOH 100% |
| Emetina 100µM | 98µl células(Mix preparada) + 2µl Emetina |
| E. Solvente Orgánico 50000, 5000, 500 y 50 µg/mL | 98µl células(Mix preparada) + 2µl Extracto |
| E. Agua 50000, 5000, 500 y 50 µg/mL | 98µl células(Mix preparada) + 2µl Extracto |
| E. EtOH 100% 50000, 5000, 500 y 50 µg/mL | 98µl células(Mix preparada) + 2µl Extracto |

Se incubaron las células en condiciones normales a 37°C y 5% CO₂ en un ambiente húmedo por 24 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, se añadieron 10 µL de la solución de MTT y se continuó con la incubación en condiciones normales durante 2 horas.

Transcurrido este intervalo de se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 100 µL de DMSO .Se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó por 10 min a 37°C.

Transcurridos los 10 minutos se hizo la lectura de la placa a 570 y 630 nm en un espectrofotómetro de marca BIOTEK.

3.3 Extracción de ARN

3.3.1 Preparación de reactivos: LPS, DEXAMETASONA, QUERCETINA

LPS: a partir de una solución madre de 1mg/ml de LPS ultrapura (INVIVOGEN, EEUU) se realizaron alícuotas de 1µg/ml con agua estéril ultrapura.

DEXAMETASONA 1 µM (Sigma-Aldrich, EEUU): Se tomaron 400 µL de la solución inicial que tenía una concentración de 100 µM y se añadieron 9600 µL de EtOH 100%.

QUERCETINA 100µM (Sigma-Aldrich, EEUU): Se pesaron 2 mg y se disolvieron en 1 mL de EtOH 100%.

3.3.2 Preparación de extracto etanólico a pH 2, extracto acuoso a pH 5 y extracto con solventes orgánicos para extracción de ARN

Para realizar las soluciones madres de los extractos, se pesaron 10 mg de los extractos liofilizados. En este caso para el extracto acuoso y etanólico se usó como solvente el EtOH 100% mientras que para el extracto con acetato de etilo se empleó DMSO.

Las muestras fueron sonicadas durante 40 minutos para favorecer la disolución completa.

3.4 Extracción y purificación de ARN con PureLink® RNA Mini Kit

3.5 Preparación para el levantamiento de las células con TRIzol.

La línea celular RAW 264.7 se cultivó a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en una placa de 24 pocillos con medio DMEM sin rojo fenol (Gibco™, EEUU).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| A | Control negativo | Control negativo | Control negativo | E. Solvente Orgánico 1µg/ml | E. Solvente Orgánico 1µg/ml | E. Solvente Orgánico 1µg/ml |
| B | LPS (1µg/mL) | LPS (1µg/mL) | LPS (1µg/mL) | E. Agua (1µg/ml) | E. Agua (1µg/ml) | E. Agua (1µg/ml) |
| C | LPS(1µg/mL)+ Quercetine (100µM) | LPS(1µg/mL)+ Quercetine (100µM) | LPS(1µg/mL)+ Quercetine (100µM) | E. EtOH100% (1µg/ml) | E. EtOH100% (1µg/ml) | E. EtOH100% (1µg/ml) |
| D | LPS(1µg/mL)+ Dexametazona (1µM) | LPS(1µg/mL)+ Dexametazona (1µM) | LPS(1µg/mL)+ Dexametazona (1µM) | Vehículo Etanol 100% (10µL) | Vehículo Etanol 100% (10µL) | Vehículo Etanol 100% (10µL) |

Figura 7. Diseño de placa para la extracción de ARN

Se cultivó en un volumen final de 100 µL por pocillo. Tras 24 horas de incubación se procedió a tratarlas por triplicado (Figura 7 y Tabla 4).

Tabla 4

Tratamientos con cada una de sus concentraciones y cantidad colocadas en cada pocillo

| TRATAMIENTOS | CONCENTRACION | CANTIDAD/POCILLO |
|--------------|---------------|------------------|
| LPS | 1µg/mL | 10 µL |
| Quercetina | 100µM | 15,11 µL |
| Dexametazona | 1µM | 10 µL |
| Extractos | 100µg/mL | 10 µL |
| EtOH 100% | 100µg/mL | 10 µL |

Transcurrido el tiempo de incubación se aspiró el medio de cultivo de la placa de 24 pocillos y se lavó con 1 mL de PBS (2 veces). Rápidamente se añadió 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y con movimientos en zigzag y circulares se levantaron las células y se pasaron a los microtubos de 1,5 µL libres de RNasa que se dejaron incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 200 μL de cloroformo a cada uno de los tubos, posteriormente se agitó de forma manual por 15 segundos y se incubó entre 2-3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, seguidamente después de la centrifugación se formaron 2 fases de las cuales se extrajo aproximadamente 400 μL de la primera y se colocó en microtubos libres de RNasa. Se añadieron 400 μL de EtOH 70%.

3.5.1.1 Unión del ARN en la columna y lavado

Se transfirieron 700 μL de la muestra a los cartuchos y se centrifugó a 12000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. Rápidamente se eliminó el residuo del tubo colector, y se añadieron los 100 μL de la muestra sobrante del microtubo en el mismo cartucho y tubo colector.

Nota: Previo a cada paso se homogenizó la suspensión celular por pipeteo.

3.5.2 Reconstrucción y tratamiento de la DNasa en columna PureLink y Purificación del ARN

3.5.2.1 Reconstrucción de DNasa PureLink.

Se reconstituyó la enzima DNasa liofilizada (Invitrogen, EEUU) con 550 μL de agua libre de RNasas y se mezcló con los demás componentes del kit *PureLink*[®] RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EEUU) realizando la relación correspondiente de acuerdo a la cantidad de muestra liofilizada (tabla 5).

Tabla 5

Componentes para la preparación de la DNasa para el tratamiento en la columna PureLink. Tomado de (*Thermo Fisher Scientific, 2007*)

| COMPONENTES | VOLUMEN PREDETERMINADO PARA UNA MUESTRA | VOLUMEN PARA EL ENSAYO |
|---|--|-----------------------------------|
| 10x Dnase I reaction Buffer | 8 μ L | 72 μ L |
| Dnasa reconstruida (~3U / μL) | 10 μ L | 90 μ L |
| Agua libre de Rnasas | 62 μ L | 558 μ L |
| Volumen final | 80 μ L | 720 μ L |

3.5.2.2 Tratamiento con la Dnasa en la columna y purificación

Para este tratamiento se siguió las instrucciones del kit *PureLink*[®] RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EEUU) como se describe a continuación:

Se añadieron 350 μ L de solución tampón de lavado 1 en el cartucho, seguidamente se centrifugó a 12000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el tubo colector con el residuo de la centrifugación y se colocó en un tubo colector nuevo.

De la enzima preparada anteriormente se colocaron 80 μ L directamente en la superficie de la membrana de cada cartucho y se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se volvió a añadir 350 μ L del buffer de lavado I en cartucho. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 segundos

a temperatura ambiente y se desechó el tubo colector con el residuo y se colocó un tubo colector nuevo.

Se añadió 500 μ L de la solución tampón de lavado 2 en el cartucho y se procedió a centrifugar a 12000 rpm por 15 segundos, se descartó el líquido del tubo colector y se reutilizó el mismo. Esto se hizo 2 veces.

Se centrifugó a 12000 rpm por un minuto para secar la membrana que contenía el ARN. Se intercambié el tubo colector con el residuo por un nuevo microtubo libre de RNasas de 1,5 mL. Para la extracción final del ARN se añadió 65 μ L de agua libre de RNasas en el centro de la membrana y se dejó incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 15000 rpm por 1 minuto. Después de la centrifugación se descartó el cartucho.

Se determinó la calidad y cantidad del ARN extraído leyendo la absorbancia a 260 nm de 2,3 μ L del ARN obtenido. El agua libre de RNasas se tomó como control para la lectura espectrofotométrica.

3.6 PCR en tiempo real

Se utilizó el kit comercial TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit, para medir la expresión de los genes β actina (como control endógeno), *iNOS*, *COX-2*, *NLRP3* y *UCEP2*:

Tabla 6

Componentes del kit comercial TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit, para la expresión de los genes iNOS, COX-2 NLRP3 y UCEP2.

| Componentes (Life Technologies Gene Expression Assays) | Volumen para una reacción | Volumen final para ensayo (20 muestras) |
|--|----------------------------------|---|
| TaqMan® RT-PCR Mix (2X) | 5 µL | 100 µL |
| TaqMan® Gene Expression Assay (20X) Sondas para βActina, Inos, NLP2, UCP3 | 0,5 µL | 10 µL |
| TaqMan® RT Enzyme Mix (40X) | 0,25 µL | 5 µL |
| RNA template (up to 1 µg) + RNase-free H2O | 4,25 µL | 85 µL |

Adaptado de: Thermo Fisher Scientific, 2007

Nota: Se preparó una mix por cada gen a analizar en microtubos libres de RNasas.

Se colocaron 4,25 µL del ARN extraído en tubos BIORAD cada uno por duplicado, rápidamente se añadieron 5,75 µL de la mix preparada con cada sonda (Tabla 6). Se centrifugó a 12000 rpm por 10 segundos y se colocó en el termociclador (BIORAD, EEUU).

Las condiciones para PCR en tiempo real se ajustaron según la tabla 7:

Tabla 7

Condiciones del perfil térmico de la RT-PCR. Tomado de (Thermo Fisher Scientific, 2007)

| RT-PCR | Temperatura | Tiempo |
|---|-------------|--------|
| Transcripción reversa | 48°C | 15 min |
| Activación de AMpliTaq Gold® DNA polimerasa(Ultrpure) | 95°C | 10 min |
| Desnaturalización | 95°C | 15 seg |
| Extensión | 60°C | 1 min |

Tomado de:Thermo Fisher Scientific, 2007

Para el análisis de los datos de RT- PCR, se utilizó el método comparativo de C_T . Los promedios de cada C_T se analizaron mediante una prueba de ANOVA con corrección de Tuckey.

3.7 Producción de Óxido nítrico

Se sembraron las células RAW264.7 a una densidad de 5×10^4 células/pocillo (5×10^5 células/mL) en un volumen final de 100 μ L/ pocillo en placa de 24 pocillos por 2 horas. El medio de cultivo empleado fue DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y 1% de la solución penicilina-estreptomomicina (Tabla 8).

Transcurrido el tiempo de fijación se procedió a trató a las células con los extractos que contenían polifenoles y los controles. Se realizó el análisis por duplicado y se incubaron las células con los extractos por 24 horas en condiciones normales (Figura 8).

Tabla 8:

Tratamientos con cada una de sus concentraciones y cantidad colocadas en cada pocillo.

| TRATAMIENTOS | CONCENTRACION | CANTIDAD/POCILLO |
|--------------|---------------|------------------|
| LPS | 1µg/mL | 10 µL |
| Quercetina | 100µM | 15,11 µL |
| Dexametasona | 1µM | 10 µL |
| Extractos | 100µg/mL | 10 µL |
| EtOH 1% | 100µg/mL | 10 µL |

| | 1 | 2 | | 4 | 5 | 6 |
|---|---------------------------------|---------------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|---|
| A | Control negativo | Control negativo | | E. Solvente Orgánico 1µg/ml | E. Solvente Orgánico 1µg/ml | |
| B | LPS (1µg/mL) | LPS (1µg/mL) | | E. Agua (1µg/ml) | E. Agua (1µg/ml) | |
| C | LPS(1µg/mL)+ Quercetine (100µM) | LPS(1µg/mL)+ Quercetine (100µM) | | E. EtOH100% (1µg/ml) | E. EtOH100% (1µg/ml) | |
| D | LPS(1µg/mL)+ Dexametazona (1µM) | LPS(1µg/mL)+ Dexametazona (1µM) | | Vehículo Etanol 100% (10µL) | Vehículo Etanol 100% (10µL) | |

Figura 8. Diseño de la placa de 24 pocillos para la producción de óxido nítrico.

Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pocillos y se conservó a -20°C en microtubos eppendorf. La placa de 24 pocillos con las células fijadas se guardó a -20°C para la posterior cuantificación de proteínas.

Para determinar la producción de óxido nítrico se utilizó el kit Griess Reagent System (Promega EEUU) como se describe a continuación.

Inicialmente se preparó 1 mL de la solución estándar de nitrito a una dilución (1: 1000) utilizando medio sin rojo fenol en un microtubo.

El experimento se realizó en una placa de 96 pocillos. Las 2 primeras columnas de la placa se destinaron para la curva estándar.

Para generar la curva estándar se colocaron 100 μL de la mix estándar en los 2 primeros pocillos y se añadieron 50 μL de la solución tampón en los pocillos restantes. Inmediatamente se realizaron diluciones seriadas en los pocillos con los duplicados para generar la curva estándar de nitrito con las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 μM .

Se colocaron 50 μL de las muestras del medio recolectado en el resto de pocillos. Con la ayuda de una pipeta multicanal se colocaron 50 μL de sulfanilamida del kit Griess Reagent System en todos los pocillos utilizados. Seguidamente, se incubó la placa por 10 min protegida de la luz a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se colocaron 50 μL solución NED solución diclorhidrato de sulfanilamida/N-1-naftiletilendiamina del kit Griess Reagent System en todos los pocillos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos protegidos de la luz. Se midió la absorbancia a 535 nm en el espectrofotómetro Biotek.

3.8 Cuantificación de proteínas

3.8.1 Lisis celular

Para la preparación de la solución tampón para lisis celular se utilizaron 80 mL de β mercaptoetanol y 8mL de la solución tampón del kit *PureLink*[®] RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Se colocaron 300 μL por pocillo de la solución preparada.

3.8.2 Cuantificación de proteínas

El kit utilizado para esta prueba fue Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination compuesto por solución A (Bicinchoninic Acid solution) y B (Copper (II) sulfate solution) (Sigma-aldrich, EEUU)

La solución de trabajo, se preparó con 50 mL de la solución A y 1 mL de solución B. Fue necesario hacer una curva de referencia con Albumina de suero bovino, (BSA), proteína estándar (Sigma-aldrich, EEUU). Las concentraciones fueron de 1000 μ M, 800 μ M, 600 μ M, 400 μ M, 200 μ M 150 μ M, 0 μ M cada una por duplicados.

Las dos primeras columnas de la placa se destinaron para la curva estándar con 100 μ L por pocillo para cada concentración. A continuación se añadieron 25 μ L de las muestras de lisis celular en cada pocillo por duplicado. Rápida mente se añadieron 200 μ L de solución de trabajo. Fue necesario cubrir la placa de la luz mientras se incubó durante 30 min a 37°C. Antes de la lectura de la absorbancia a 572 nm en el espectrofotómetro Biotek se dejó enfriar la placa.

3.9 Evaluación estadística de los resultados

Los resultados se analizaron en el programa de Microsoft Excel 2015 conjuntamente con el programa estadístico Graph Pad Prism v.6. Se realizó una prueba ANOVA con comparación de Tukey con un nivel de confianza al 95% para cada experimento realizado.

4. CAPÍTULO V. Resultados y Discusión

4.1 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos en macrófagos de ratón RAW 264.7

La evaluación de la citotoxicidad de los extractos de *Vaccinium floribundum*: etanólico, acuoso y preparados con solvente orgánico en macrófagos de ratón RAW264.7 se realizó con cuatro concentraciones 1, 10, 100, 1000 μ g/ml.

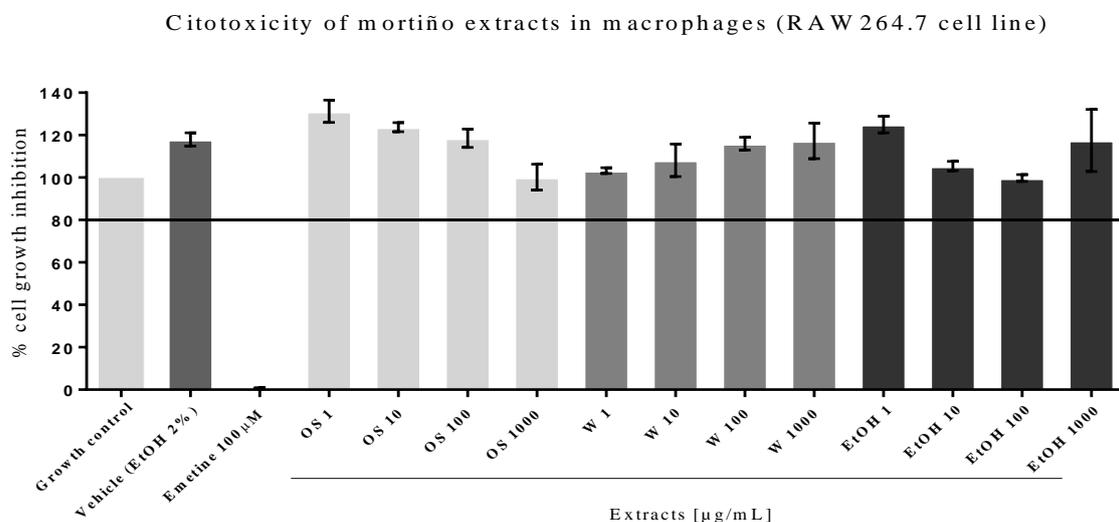


Figura 9. Viabilidad celular de la línea celular RAW 264.7 frente a los extractos de *Vaccinium floribundum*. SO: extracto con solvente orgánico. W: extracto acuoso pH5. Etanol: Extracto etanólico pH3

En la figura 9 se puede observar que los extractos etanólico, acuoso y con solvente orgánico presentaron una viabilidad celular superior al 80% para las concentraciones entre 1 y 1000 µg/ml tomando como referencia al control de crecimiento (células sin tratamiento). Según Ji y sus colaboradores en su investigación demuestran que la emetina tiene un efecto inductor de apoptosis debido a la inhibición de la síntesis de proteínas de células eucariotas (2015, p.12), es por ello que se empleó como control de muerte a la emetina a una concentración de 100 µg/ml confirmando la muerte celular en la línea celular RAW 264.7. Mediante el análisis ANOVA, se comparó la viabilidad celular frente a las diferentes concentraciones de los extractos, con el control de crecimiento y el control negativo y no se encontró ninguna diferencia significativa entre estos, por lo tanto los diferentes extractos no provocaron efecto negativo en los macrófagos.

Según los manifestado por Reyes y sus colaboradores (2015, p. 5), en su investigación para la expresión de genes de iNOS, TNF- *alfa* y 10 IL en los

macrófagos RAW264.7 determinaron que la dosis no tóxica de los extractos de *Aristolelia chilensis*, *Berberis microphylla* y *Vaccinium corymbosum* era de 100 µg/ml, esta dosis fue utilizada en el resto de sus experimentos. Tomando en cuenta estos resultados se seleccionó la concentración de 100 µg/ml como la dosis no citotóxica para los ensayos posteriores corroborando lo anteriormente mencionado, debido a que era la concentración con la que se conseguía más del 80% de viabilidad celular.

4.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de *Vaccinium floribundum*

Se han identificado varios genes pro-inflamatorios que tienen un papel crítico en el proceso inflamatorio, entre estos podemos mencionar: *iNOS*, *COX2*, *UCP2* y *NLP3*, los cuales se inducen en macrófagos activados por endotoxinas como el liposacárido bacteriano (LPS). (Yong-Chen, Wen-Chen , & Ohashi, 2008).

Para el ensayo de inhibición de la producción de *NO*, *iNOS*, *COX-2* y *NLRP3* se usó LPS como control positivo. Los resultados del experimento se presentan a continuación.

4.2.1 Inhibición de la producción de óxido nítrico (*NO*) en macrófagos RAW264.7

Para determinar la producción de *NO* se midió la concentración de los nitritos (NO^{-2}) en el medio de cultivo de la línea celular RAW 264.7 inducida con LPS, por medio de una reacción colorimétrica con sulfanilamida y dihidrocloruro de N-1-naftil-etilendiamina (NED). Se evaluó la producción de *NO* debido a su función principal durante la respuesta inflamatoria.

El óxido nítrico producido por los macrófagos destruye los microorganismos debido a que genera peroxinitrito por su reacción con radicales libres de oxígeno ejerciendo un efecto tóxico para las células. (Velásquez y Posada, 2013, p. 16-17)

Para esta prueba se empleó como control negativo a las células sin ningún tipo de tratamiento, mientras que los controles positivos fueron; solo LPS (1 μ g/mL) mediador de la inflamación que aumenta los niveles de NO, (LPS + Dexametasona (1 μ M) y LPS + Quercetina (100 μ M), antioxidante que inhibe la expresión de iNOS y por lo tanto reduce la producción de NO y ayuda a disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causantes del daño celular (Fernández y Torres, s.f, pp 3-12).

La producción de óxido nítrico se calculó estableciendo la producción de NO por μ g de proteínas. Se observó que el LPS aumentó la producción de NO, este efecto comparó con el ejercido por el extracto acuoso a pH5 de *Vaccinium floribundum* que presentó el mejor efecto inhibitor de la producción de NO, resultado de interés para el presente estudio, mientras que el extracto etanólico a pH 5 aumenta la producción de NO (Figura 10). Estos datos se pueden comparar con los obtenidos Reyes y colaboradores en la que se demuestra que el LPS aumentó la producción de NO, mientras que los extractos de *Aristotelia chilensis*, *Berberis microphylla* y *Vaccinium corymbosum* familia de la especie de interés en este estudio, inhibieron significativamente la producción de NO en macrófagos RAW264.7 (Reyes, et al., 2015, pp 5-7)

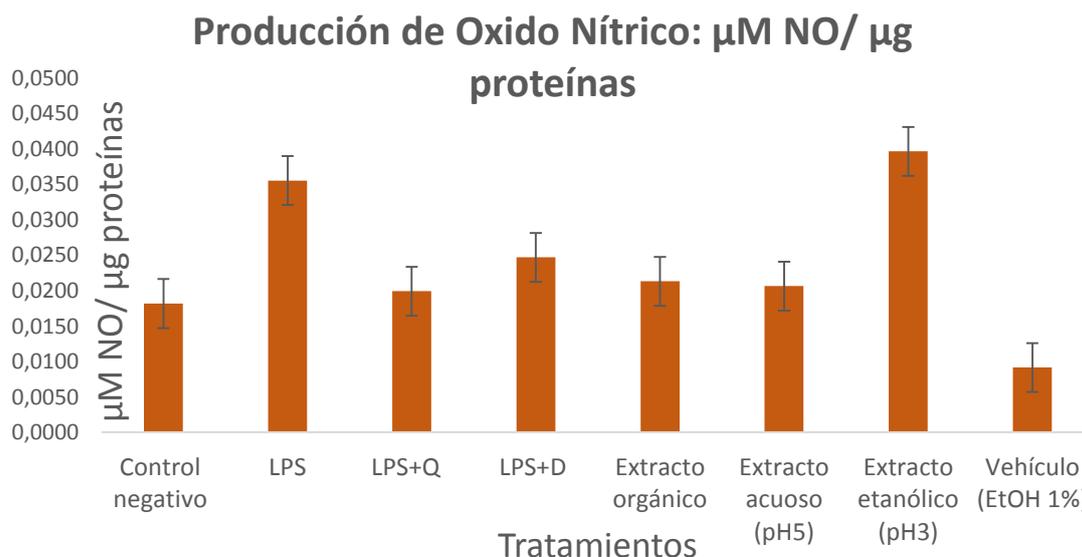


Figura 10 Inhibición de la producción de NO de los extractos de *Vaccinium floribundum*. Control negativo sin presencia de ningún extracto. Control positivo: LPS (liposacárido), LPS+Q (liposacárido + Quercetina) y LPS+D (liposacárido + Dexametasona).

4.2.2 Expresión de los genes *iNOS*, *COX-2*, *NLRP-3* Y *UCEP-2*

Se evaluó la expresión de los genes *iNOS*, *COX-2*, *NLRP3* y *UCEP2* a partir del RNA extraído a partir de macrófagos tratados con LPS y expuestos a los extractos: etanólico a pH3, acuoso a pH5 y con acetato de etilo. Se pudo determinar que los macrófagos RAW264.7 tienen una baja expresión de los genes *iNOS*, *COX-2*, *NLRP3* cuando no son estimulados con LPS. Se usó la β -actina como control endógeno ya que es uno de los controles comúnmente utilizados para células de ratón y sirve para normalizar la expresión relativa de cada gen (QIAGEN, 2015).

El ARN obtenido a partir de los macrófagos de ratón RAW264.7 tuvo un rango de pureza de 1,8 – 2,1 en los 3 ensayos realizados (Tabla 9). Estos valores se encuentran dentro del rango aceptable, que indica la calidad del ARN extraído. El valor para la relación A260/280 es de 2.0-2.2 y > 1.7 (Banco ADN, 2015). A partir de las relaciones calculadas se puede comprobar que el ARN extraído está libre de contaminación de fenoles o proteínas y es óptimo para la realización de la prueba RT PCR.

Tabla 9

Cuantificación de ARN obtenido a partir de las células RAW264.7 tratadas con los extractos de *Vaccinium floribundum*.

| MUESTRA | CONCENTRACION (ng/μl) | CALIDAD (A260/280) |
|--|----------------------------------|-------------------------------|
| Control negativo | 308,31 | 2,10 |
| Control positivo: LPS | 376,67 | 2,11 |
| Control positivo: LPS+ Quercetina | 212,87 | 2,10 |
| Control positivo: LPS+ Dexametazona | 145,96 | 2,08 |
| Extracto con solvente orgánico | 374,21 | 2,11 |
| Extracto acuoso | 276,03 | 2,09 |
| Extracto etanólico | 165,58 | 2,07 |
| Vehículo: EtOH 1% | 137,71 | 2,10 |

4.2.2.1 Efecto de los extractos en la expresión del gen *iNOS* en la línea celular RAW 264.7

En la figura 11 se observan los resultados del efecto de los extractos sobre la expresión del gen *iNOS* comparados con el control (macrófagos sin ningún tipo de tratamiento). La línea celular RAW294.7 responde a la estimulación con LPS mediante la activación del gen *iNOS*.

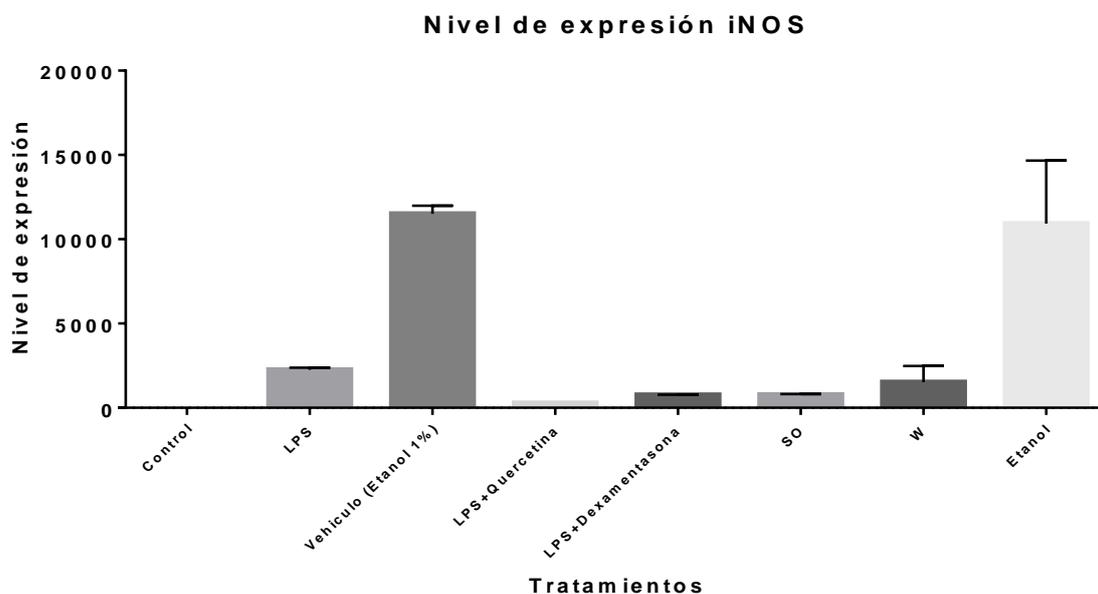


Figura 11. Inhibición de expresión de *iNOS* por los extractos *Vaccinium floribundum* en la línea celular de macrófagos RAW 264.7. SO: extracto con solvente orgánico. W: extracto acuoso pH5. Etanol: Extracto etanólico pH3)

Los resultados obtenidos indican que el extracto acuoso a pH5 y el extracto con acetato de etilo muestran el mejor efecto inhibitorio sobre la expresión del gen *iNOS*, si comparamos con el control de las células tratadas con LPS (Ver figura 11). En la investigación de Velásquez y Posada se menciona que el extracto acuoso de *Tabebuia chrysantha* no afecta la expresión de dicho gen mientras que el extracto con solvente orgánico disminuye la expresión de *iNOS* (Velásquez y Posada, 2013, p. 48)

Según Alfieri (2003, p. 3-5, 15), *iNOS* se expresa en los macrófagos activados expuestos a LPS e IFN- δ , su producto génico tiene la función de catalizar la reacción de conversión de arginina a citrulina en donde se libera NO, que es tóxico para ciertas células y procesos biológicos, siendo esta la reacción que se inhibe. Por lo tanto, el extracto acuoso a pH5 comparado con el control negativo y el control positivo con LPS promueve la inhibición de *iNOS* y así se genera una disminución de la producción de NO (Alfieri, 2013, pp 17).

El extracto etanólico a pH 3 de *Vaccinium floribundum* promueve la expresión del gen *iNOS*, por lo tanto genera grandes cantidades de NO provocando efectos negativos a nivel celular, desde una mayor vasodilatación hasta la muerte celular (Alfieri, 2013, pp15). Este resultado se comprobó mediante la prueba de ANOVA con la comparación de Tuckey que indicó que existen diferencias significativas cuando se compara este tratamiento con el control (Ver anexo 9).

4.2.2.2 Efecto de los extractos en la expresión del gen COX-2 en la línea celular RAW 264.7

Los mediadores químicos implicados en el proceso inflamatorio son sintetizados por la vía de la ciclooxigenasa, en donde COX-1 y COX-2 son las isoformas de esta enzima. COX-2 es una de las isoenzimas estimuladas por citoquinas y el lipopolisacárido bacteriano provocando la producción de mediadores de la inflamación como la prostaglandina PGE₂. COX ejerce su función sobre el ácido araquidónico promoviendo la formación de prostaglandinas, la cual estimula la inflamación generando dolor y fiebre. Existen inhibidores selectivos para COX-2 que reducen la inflamación (Chaverri, 2004, pp 8-14).

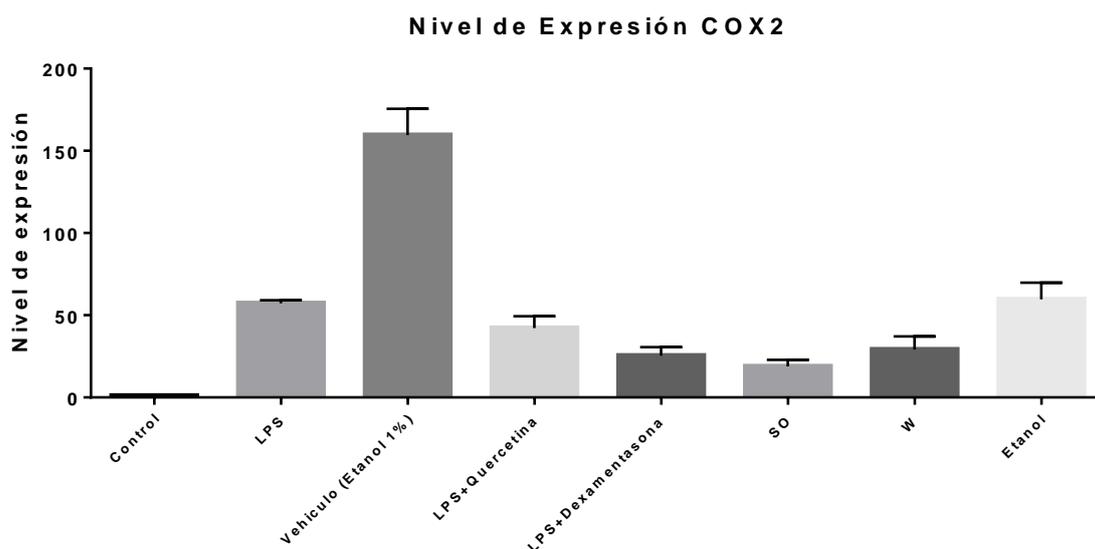


Figura 12 Inhibición de la expresión de COX-2 en la línea celular RAW264.7 tratada con los extractos de *Vaccinium floribundum*. Control: Control negativo. LPS: control positivo SO: extracto con solvente orgánico. W: extracto acuoso pH5. Etanol: Extracto etanólico pH3)

En figura 12 se pueden observar los niveles de expresión de COX-2. El tratamiento con los extractos de acetato de etilo y el extracto acuoso a pH5 provocaron la disminución de la expresión de dicho gen comparando con el control positivo (células tratadas con LPS). Estos resultados contradicen lo publicado por Velásquez y Posada que evaluaron la actividad anti-inflamatoria in vitro de extractos de *Tabebuia chrysantha* y determinaron que los extractos de acetato de etilo, butanol y agua comparados con el LPS inducen la expresión del gen COX-2 (Velásquez y Posada, 2013, p. 47- 48).

Por otro lado, se puede observar que el efecto del extracto etanólico a pH3 tiene relación con el vehículo (EtOH 1%) debido a que el tratamiento solo con el vehículo promueve la expresión del gen.

El extracto acuoso y el extracto con solvente orgánico tendrían un efecto anti-inflamatorio debido a la inhibición de la expresión de COX-2 (Ver anexo 10).

4.2.2.3 Efecto de los extractos en la expresión del gen *NLRP-3* en la línea celular RAW 264.7

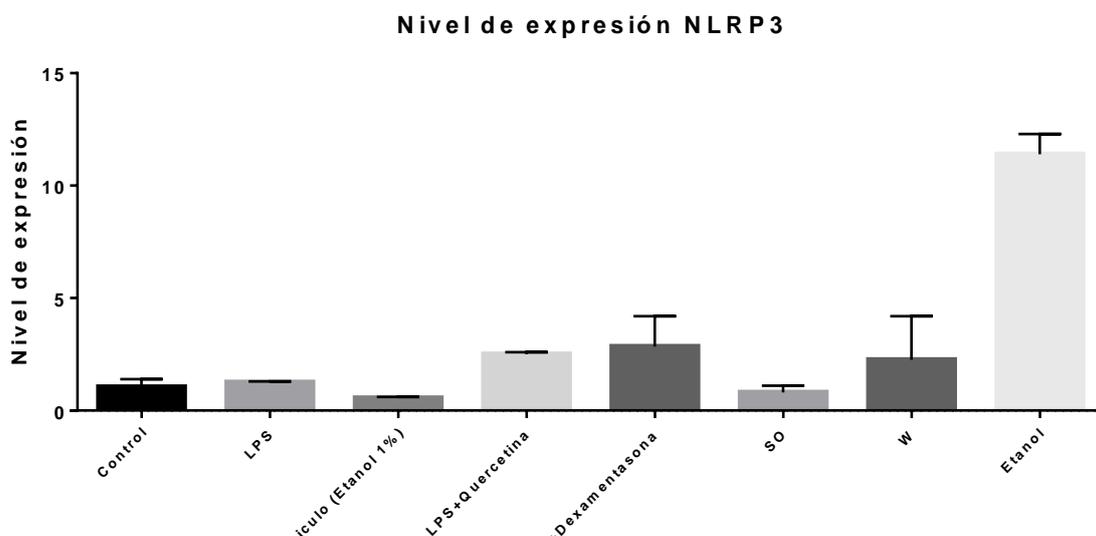


Figura 93 Inhibición de la expresión de *NLRP3* en la línea celular RAW264.7 tratada con los extractos de *Vaccinium floribundum*. Control: Control negativo. LPS: control positivo SO: extracto con solvente orgánico. W: extracto acuoso pH5. Etanol: Extracto etanólico pH3)

En la figura 13 se puede observar que tanto el extracto acuoso de *Vaccinium floribundum* como el extracto etanólico no inhiben la expresión del gen *NLRP3* comparando con las células tratadas con LPS, demostrando así una capacidad antiinflamatoria nula. El gen *NLRP3* es necesario para la defensa frente a los agentes nocivos y es por ello que alguna alteración de la expresión de este gen promueve una respuesta inflamatoria crónica y descontrolada (Ver anexo 11) (Ozaki, Campbell y Doyle , 2015, pp 13-15).

4.2.2.4 Efecto de los extractos en la expresión del gen *UCP2* en la línea celular RAW 264.7

Los macrófagos murinos RAW 264.7 tratados con los extractos de *Vaccinium floribundum* y estimulados con LPS no presentaron expresión del gen *UCP2* (Tabla 9), *UCP2* que codifica para una proteína de desacoplamiento mitocondrial tiene como función controlar las especies reactivas de oxígeno producidas durante el proceso inflamatorio.

Según Anneda (2009, p. 43) los macrófagos estimulados por LPS presentan niveles altos de expresión de *UCP2* lo que provoca un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno. Los extractos de *Vaccinium floribundum* no tiene efecto en la expresión de *UCP2*, por lo tanto, no ejercen ningún efecto sobre este mediador de la inflamación.

Tabla 9

Expresión del gen UCP2 en la línea celular RAW 264.7 tratada con los extractos

| MUESTRA | Cq | Cq |
|-----------------------------|------------|------------|
| Control | 17,09 | 16,6 |
| LPS | 16,65 | 16,24 |
| Vehículo (Etanol 1%) | 19,75 | 19,75 |
| LPS + Quercetina | 16,11 | 16,04 |
| LPS + Dexametasona | N/A | N/A |
| Solvente orgánico | N/A | N/A |
| Acuoso | N/A | N/A |
| Etanólico | N/A | N/A |
| NTC | 21,93 | |

Las células, especialmente los macrófagos, al ser inducidas con LPS producen mediadores de la inflamación como: *PGE2*, *TNF- α* , *NO*, *COX* (Velásquez y Posada, 2013, p. 48). Los experimentos mostrados anteriormente demuestran que los extractos acuoso a pH3 y con solvente orgánico de *Vaccinium floribundum* inhiben la expresión de los genes *iNOS*, *COX-2* y *NLRP3* y la

producción de NO en la línea de macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS, resultados que confirman el efecto antiinflamatorio de estos extractos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La viabilidad celular de la línea celular RAW 264.7 tratada con los extractos de *Vaccinium floribundum* es superior al 80% con respecto al control.

El extracto acuoso a pH5 de *Vaccinium floribundum* se destacó como el mejor inhibidor de la producción de óxido nítrico, y dicho efecto se relaciona con la disminución de la expresión de los genes *iNOS*, y *COX-2* en los macrófagos de ratón RAW264.7 lo que le atribuye efectos antiinflamatorios.

El extracto etanólico a pH3 promueve la producción de óxido nítrico y estimuló la sobreexpresión de los genes *iNOS*, *COX-2*, *NLRP3* por lo tanto se determinó que la capacidad antiinflamatoria de este extracto es nula.

Entre todos los extractos evaluados, el extracto acuoso de *Vaccinium floribundum* a pH5 ejerce un mayor efecto antiinflamatorio.

6.2 Recomendaciones

A partir de estos datos obtenidos se recomienda realizar más ensayos para confirmar dicho estudio y profundizar los conocimientos para la utilización de estos extractos de *Vaccinium floribundum*, como un tratamiento preventivo de enfermedades crónicas inflamatorias que afectan al ser humano.

REFERENCIAS

- Apolo, A. (2013). Efecto de la hidrólisis ácida en la extracción de antioxidantes y antiinflamatorios en subproductos de guayaba y mango. (Tesis pregrado). Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja. Recuperado el 12 de diciembre de 2016 de <http://www.dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/8116/1/Apolo%20Aguilas,%20Diana%20Maricela.pdf>
- Arencibia, D., Fernández, L., y Curveco, D. (2009). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea*, 13. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf
- Banco ADN. (2015). PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS. Salamanca, España: Universidad de Salamanca.6. Recuperado el 29 de noviembre de 2016 de <http://www.bancoadn.org>
- Bravo, M., y López, A. (1998). *Radicales libres e Inflamación*. Gaceta de ciencias veterinarias. Barquisimeto, Venezuela: Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. 31-40. Recuperado el 8 de diciembre de 2016 de <http://www.ucla.edu.ve/dveterin/departamentos/CienciasBasicas/gcv/2530int2530er2530no/articulos/documasp/~8dqq4rqj.pdf>
- Castell, V. (2005). *Bases Moleculares de la Inflamación*. Recuperado el 15 de diciembre de 2016 de <http://www.uv.es/jcastell/Inflamacion.pdf>
- Chaverri, J. (2004). *Antiinflamatorios No Esteroidales Ciclooxygenasa (COX) selectivos*. Centro Nacional de Información de medicamentos. Costa Rica: Universidad de Costa Rica. Recuperado el 3 de enero de 2016 de <http://www.sibdi.ucr.ac.cr/boletinespdf/cimed3.pdf>

- Chiluisa Utreras, V. P. (2015). *Vaccinium floribundum Kunth, reserva de antocianinas en los páramos*. (Tesis maestría en Biología de la Conservación). Quito, Ecuador: Universidad Católica del Ecuador. Recuperado el 10 de enero de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/9930>
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). *Estudio Etnobotánico del Mortiño (Vaccinium floribundum) como alimento ancestral y potencial alimento funcional*. Revista de Ciencias de la Vida. Cuenca, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana. 16(2).5-13. Recuperado el 2 de febrero de 2016 de <http://www.redalyc.org/pdf/4760/476047400002.pdf>
- Cobo, M. M. (2014). *Estudio de Diversidad Genética de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.) en tres Provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi*. (Tesis Pregrado). Quito, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito. Recuperado el 11 de noviembre de 2016 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3332>
- Dwyer, J. y Erdaman, J. (2015). *Sponsored by ILSI North America & American Society for Nutrition, (1-23)*. Estados Unidos. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de <https://asn-cdn-remembers.s3.amazonaws.com/f389088d94b90d94dce8a69512c9159c.pdf>
- Echeverri, R. y Mockus, S. (2008). *Factor nuclear kb (nf-kb): signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cancer*. Revista de la facultad de medicina. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 56(2), 133-146. Recuperado el 12 de noviembre de 2016 de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/15915>
- Elinos, C., Maldonado, V., y Meléndez, J. (2001). *Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis*. Mexico: Departamento de Biología Molecular y

Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 139(5), 492-499. Recuperado el 9 de noviembre de 2016 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2003/gm035h.pdf>

Esteves, A. (2016). *Efecto del consumo de un jugo de frutos rojos y uva rico en polifenoles procesado con ultrasonido en ratas Wistar con diabetes inducida*. (Tesis Maestría).Xalapa, Veracruz: Universidad Veracruzana. Instituto de Ciencias Básicas. Recuperado el 14 de noviembre de 2016 de <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/42617>

Frontela, C., Canali, R., y Virgili, F. (2010). *Empleo de compuestos fenólicos en la dieta para modular la respuesta inflamatoria intestinal*.Roma, Italia: Gastroenterología y Hepatología. Elsevier. 33(4), 307-312. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 dedoi: 10.1016/j.gastrohep.2009.09.006

García Barreno, P. (2008). *Inflamación*. Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 102(1), 91-159. Recuperado el 12 de enero de 2017 de <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>

Gimeno, E. (2004). *Compuestos Fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud*. Ámbito Farmacéutico. Nutrición. 23(6), 80-84. Recuperado el 11 de diciembre de 2016 de http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13063508&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v23n06a13063508pdf001.pdf&ty=134&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es

Gomez, H., González, K., y Medina, J. (2011). *Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Santiago, Chile: Universidad de Santiago de Chile. 10(3), 182-217. Recuperado el 23 de enero de 2017 de <http://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>

- González, F. (2010). *Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (Salvia hispanica L.) mediante electroforesis capilar*. (Tesis Magistral). México, México: Instituto Politécnico Nacional-Escuela de Ciencias Biológicas. Recuperado el 18 de diciembre de 2016 de <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9536/36.pdf?sequence=1>
- Gorocica, P., Chávez, R., Lascuarin, R., Espinosa, B. y Zenteno, E. (1999). *Óxido nítrico, una molécula multifuncional*. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria de Mexico, 12(4), 300-304. Recuperado el 7 de enero de 2016 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-1999/in994i.pdf>
- Gracia, M. (2007). *Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales*. Universidad autónoma de Querétaro. Recuperado el 4 de junio de 2016 de http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf
- Karp, G., & Geer, P. v. (2005). *BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR*. Colombia: McGraw-Hill. Recuperado el 7 de julio de 2016 de <https://oncouasd.files.wordpress.com/2015/06/biologia-celular-y-molecular.pdf>
- Kole, C. (2011). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Temperate Fruits*. En C. Kole, *Vaccinium*. (págs. 200-207). New York: Clemson University. Springer. doi:10.1007/978-3-642-16057-8. Recuperado el 18 de agosto de 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=kAJ_mUrdpWMC&printsec=frontcover&dq=Genomic+and+Breeding+Resources+Temperate+Fruits.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj-3-mwwrjSAhVF7iYKHUKRBLAQ6AEIHTAA#v=onepage&q=Genomic%20and%20Breeding%20Resources%20Temperate%20Fruits.&f=false

Lim, K. M., Lee, J. Y., Lee, S. M., Bae, O. N., Noh, J. Y., Kim, E. J., Chung, J. H. (2009). *Potent anti-inflammatory effects of two quinolinedione compounds, OQ1 and OQ21, mediated by dual inhibition of inducible NO synthase and cyclooxygenase-2*. *British Journal of Pharmacology*. 156(2), 328–337. Recuperado el 8 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00028.x>

Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Clasificación Estadística Internaional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud*. Washington: Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/6282/Volume1.pdf?sequence=1>

Ozaki, E., Campbell, M. y Doyle, S. (2015). *Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives*. *Journal of Inflammation Research*. 2015(8), 27. Recuperado el 12 de septiembre de 2016 de doi:10.2147/JIR.S51250

Patiño, V. (2002). *Historia y Dispersión de los Frutales Nativos del Neotrópico*. Santiago de Cali, Colombia: CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. Recuperado el 27 de julio de http://books.google.com.co/books?id=U12m7M2VMmsC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false

Pedreira, P. R., Garcia Prieto, E., Albaiceta, G. M., y Taboada, F. (2006). *Respuesta inflamatoria y apoptosis en la lesión pulmonar aguda*. España: Medicina Intensiva, Elsevier. 268-75. Recuperado el 2 de enero de 2017 de doi: S0210-56912006000600003

Podolsky, D. (2016). *Medwave*. Recuperado el 18 de septiembre de 2016 de Congresos: <http://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Congresos/607>

- QIAGEN. (2015). *El uso de genes endógenos de control en tiempo real de RT-PCR*. 1. Recuperado el 1 de septiembre de 2016 de <https://www.qiagen.com/dk/landing-pages/quantinova/?cmpid=QVen8GARRealTimePCR&kwid=%2Brt%20%2Bpcr>
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. Barcelona, España: Nutrición Hospitalaria. 27(1),76-89. Recuperado doi:10.3305/nh.2012.27.1.5418
- Rhoades, R. E. (2006). *Desarrollo con Identidad: Comunidad, cultura, y sustentabilidad en los Andes*. Cotacachi, Ecuador. Recuperado el 3 de octubre de 2016 de <https://repository.unm.edu/bitstream/handle/1928/10933/Desarrollo%20con%20identidad.%20Comunidad.pdf?sequence=1>
- Ripoll, V. M., Hume, D., y Fontanilla, M. R. (2015). *Expresión específica de los genes de la respuesta inflamatoria en subpoblaciones de macrófagos*. Biomédica. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 25(2), 261-270. Recuperado el 24 de de enero de 2017 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572005000200012
- Schreckinger, M., Wang, J., Yousef, G., Lila, M., y Gonzales de Mejia, E. (2010). *Antioxidant capacity and in vitro inhibition of adipogenesis and inflammation by phenolic extracts of Vaccinium floribundum and Aristotelia chilensis*. J. Agric. Food Chem. 58(16), 8966–8976. doi: 10.1021/jf100975m
- Serra, B. (2002). *Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos*. (Tesis Doctoral). Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de

Ciencias Químicas. Recuperado el 12 de noviembre de 2016 de <http://eprints.ucm.es/tesis/qui/ucm-t26000.pdf>

Sgiker. (2012). *ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL O Q-PCR. 4*. Universidad del País Vasco. Recuperado el 21 de octubre de 2016 de https://www.ehu.eus/documents/2458249/2715152/servicio_Q-PCR_expresion_genica_2012.pdf

Thermo Fisher Scientific. (2007). *Protocol: TaqMan® RNA-to-CT*. Estados Unidos. Recuperado el 13 de julio de 2016 de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4392938>

Trujillo, D. (2009). *Cultivo in vitro del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito. Recuperado el 8 de noviembre de 2016 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/794/1/91202.pdf>

Tupuna, D. S. (2012). *Obtención de jugo clarificado concentrado de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) mediante el uso de tecnología de membranas. (Tesis Pregrado)*. Quito, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional. Recuperado el 5 de enero de 2017 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4947>

Torres, G. (2012). *Determinación de la actividad antioxidante de los extractos clorofórmico, etanólico y acuoso del arrayán, calaguala, canayuyo, y tipo. (Tesis pregrado)*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador. Recuperado el 5 de julio de 2016 de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1999/1/56T00307.pdf>

Vargas, W. G. (2002). *Guía Ilustrada de las Plantas de las Montañas Quíndio y los Andes Centrales*. Manizales, Colombia: Universidad de Caldas. Recuperado el 22 de octubre de 2016 de

https://books.google.es/books?id=Omzm3LW0mZUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

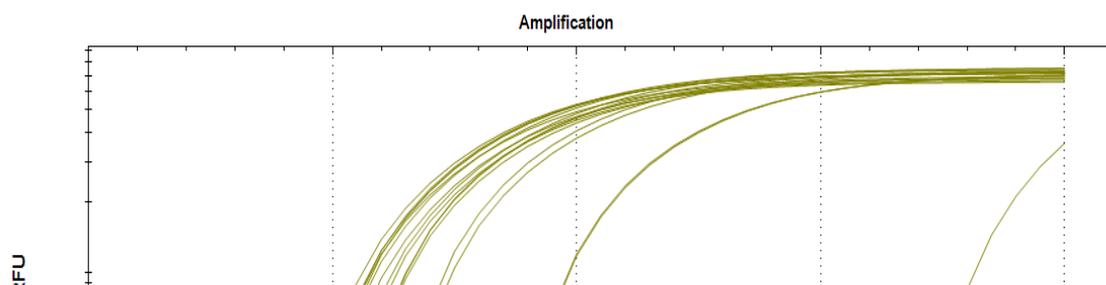
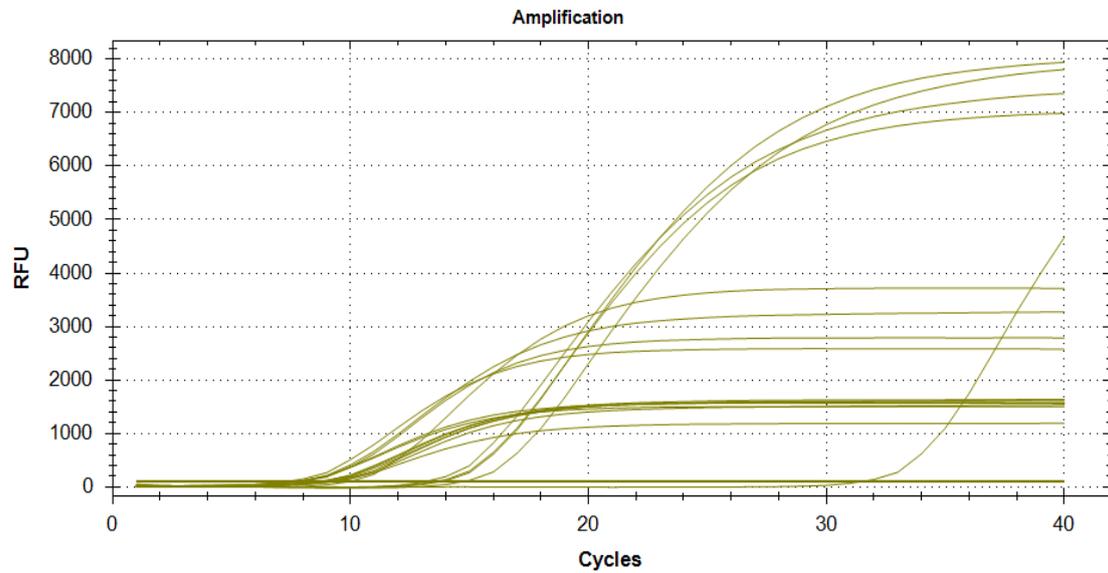
Vasco, C., Riihinens, K., Ruales, J. y Kamal, A. (2009). *Chemical composition and phenolic compound profile of Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. J. Agric. Food Chem., 8274–8281. Recuperado el 13 de diciembre de doi. 10.1021/jf9013586

Velazquez, S. y Posada, V. (2013). *Actividad anti-inflamatoria in vitro de los extractos y fracciones obtenidas de la corteza interna de Tabebuia chrysantha (JACQ.) G.NICHOLSON*. (Tesis pregrado). Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Recuperado el 8 de noviembre de 2016 de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3049/615321V434.pdf?sequence=1>

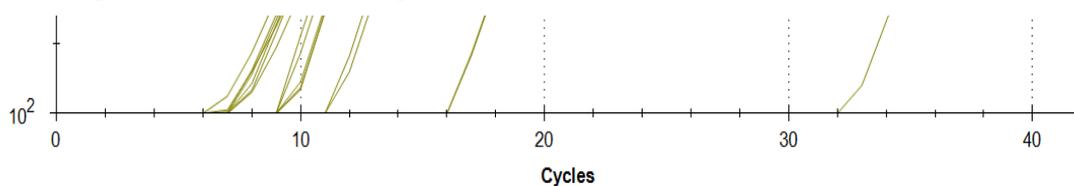
Yong-Chen, L., Wen-Chen, Y. y Ohashi, P. (2008). *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. ELSEVIER, 42(2), 145-151. Recuperado el 8 de diciembre de 2016 de DOI:10.1016/j.cyto.2008.01.006

ANEXOS

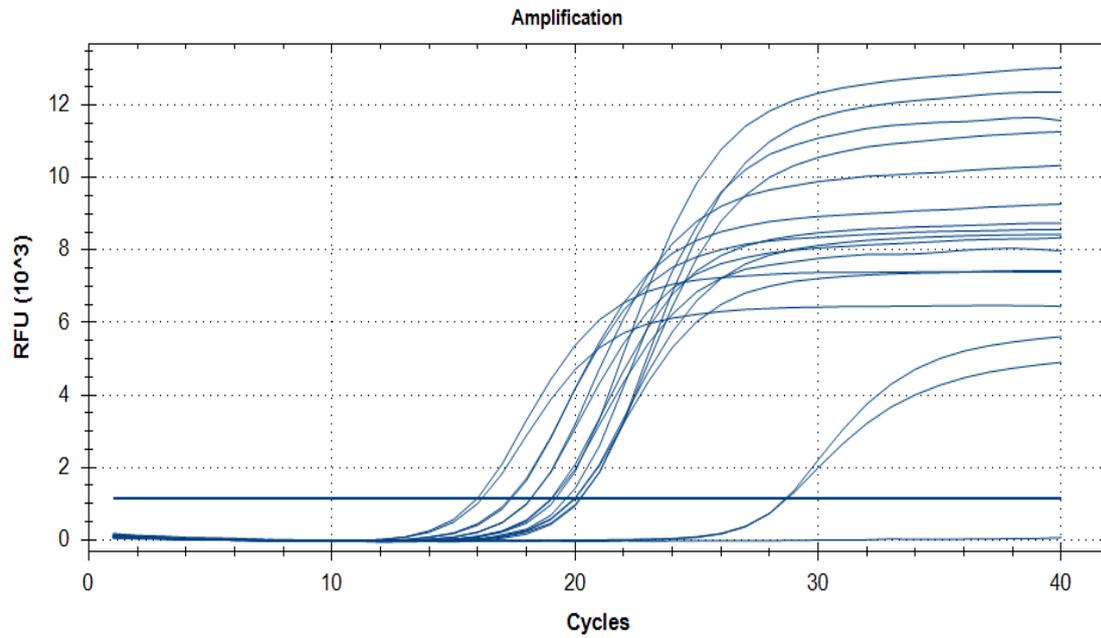
Anexo 1 Gráfica RT-PCR: Amplificación de β actina con fluoróforo VIC macrófagos RAW 264.7



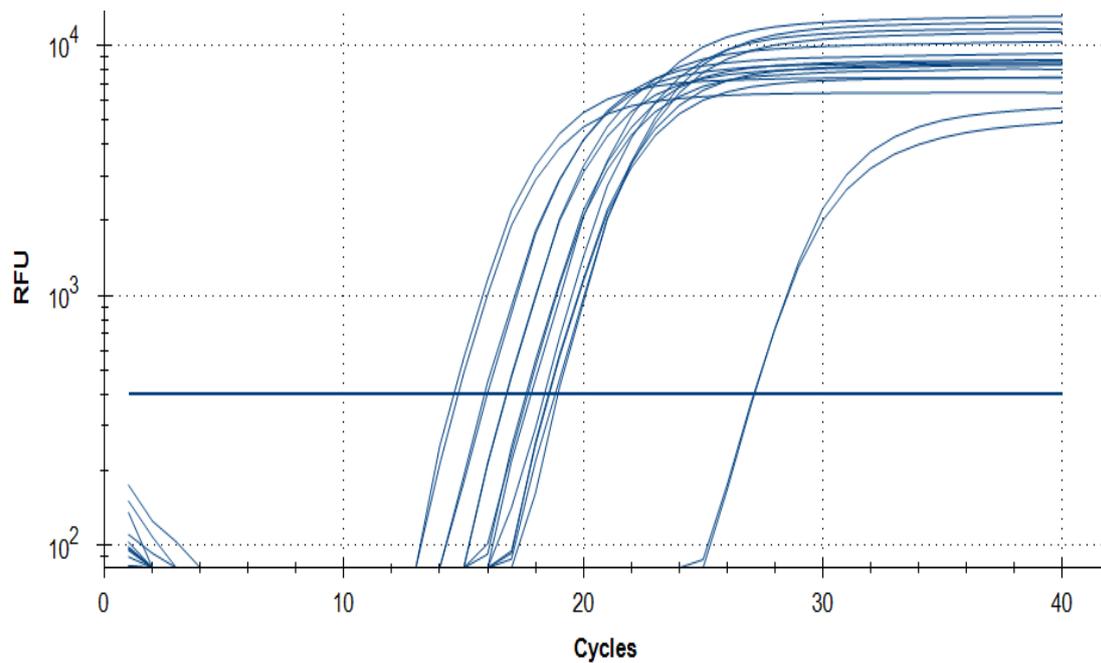
Anexo 2 Gráfica RT-PCR: Amplificación de β actina con fluoróforo VIC en escala logarítmica de macrófagos RAW 264.7



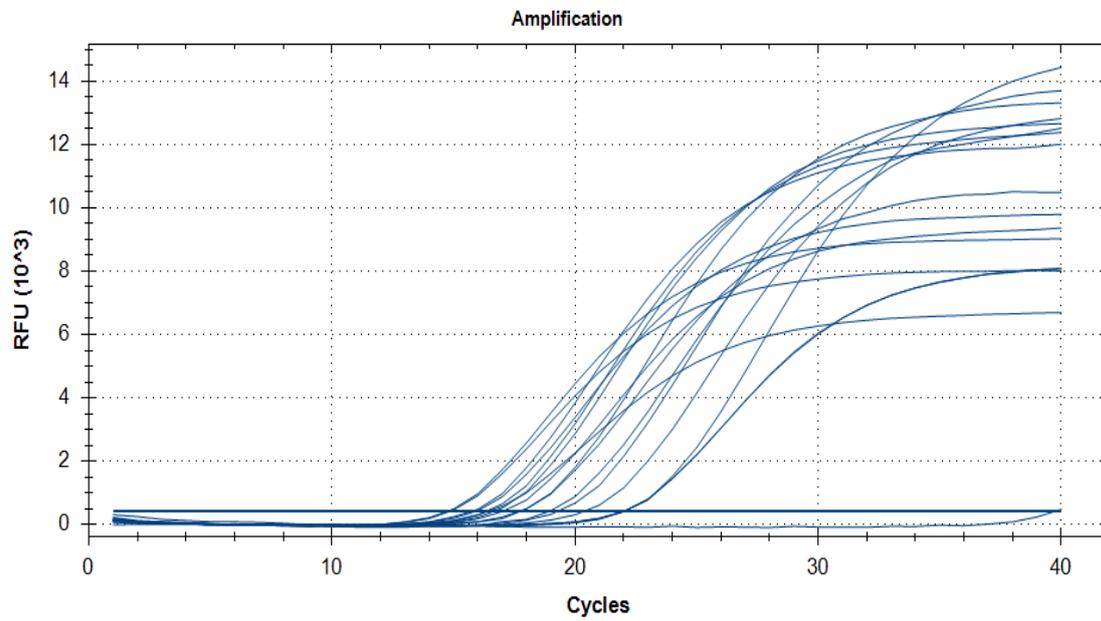
Anexo 1 Grafica RT-PCR. Amplificación de iNOS con fluoróforo FAM de macrófagos RAW 264.7



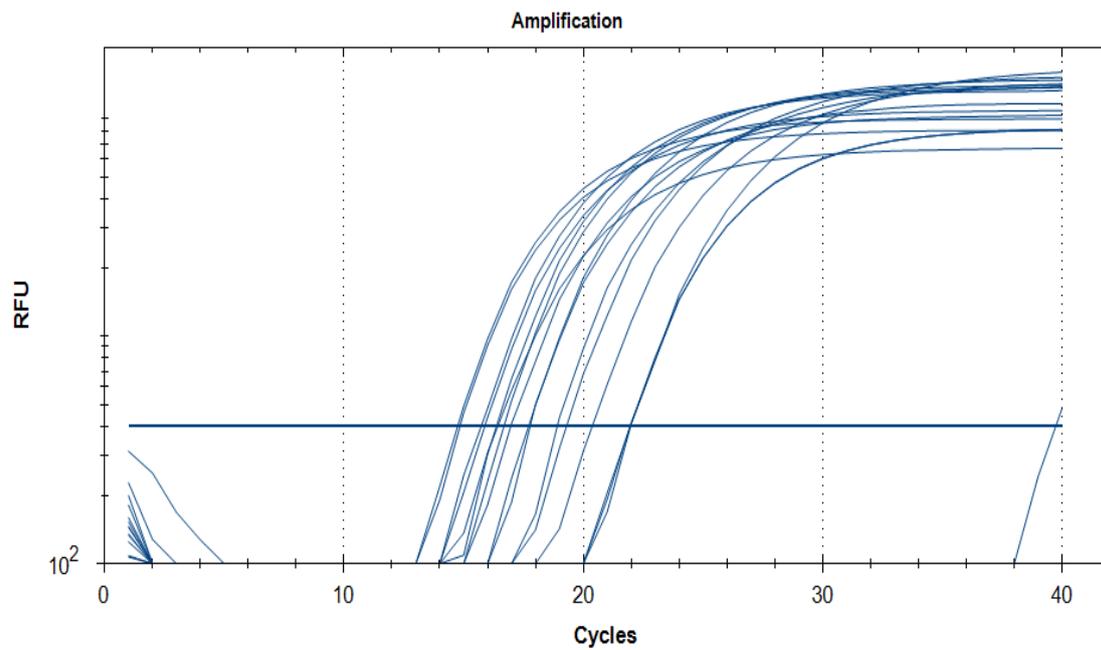
Anexo 2 Grafica RT-PCR. Amplificación de iNOS con fluoróforo FAM, escala logarítmica, de macrófagos RAW 264.7



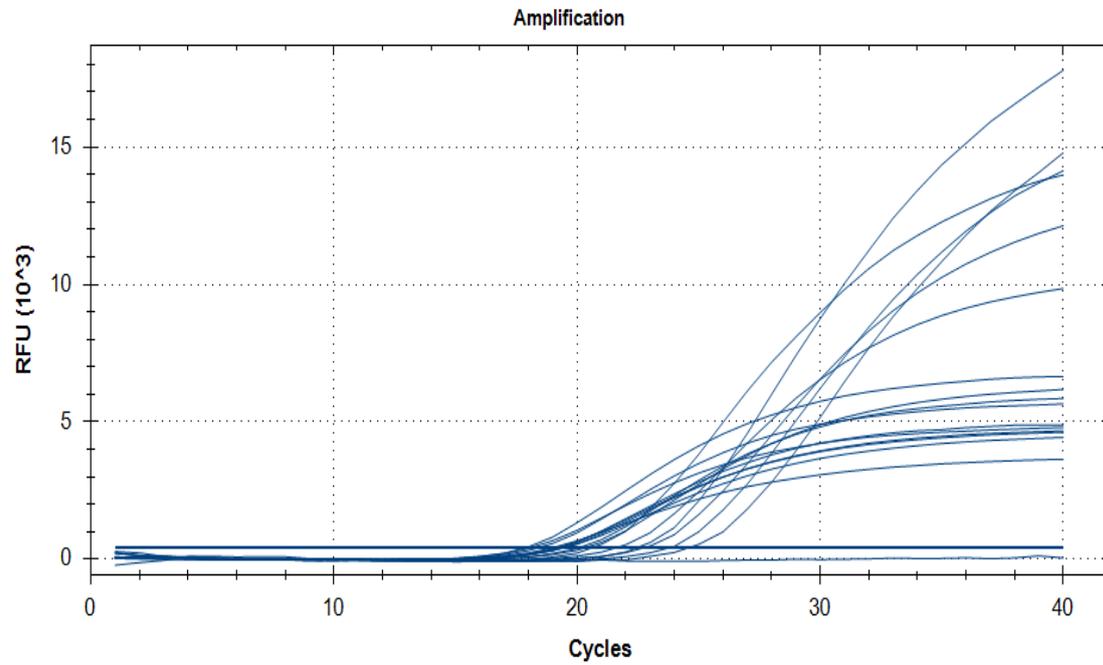
Anexo 3 Gráfica RT-PCR. Amplificación de COX-2 con fluoróforo FAM de macrófagos RAW 264.7



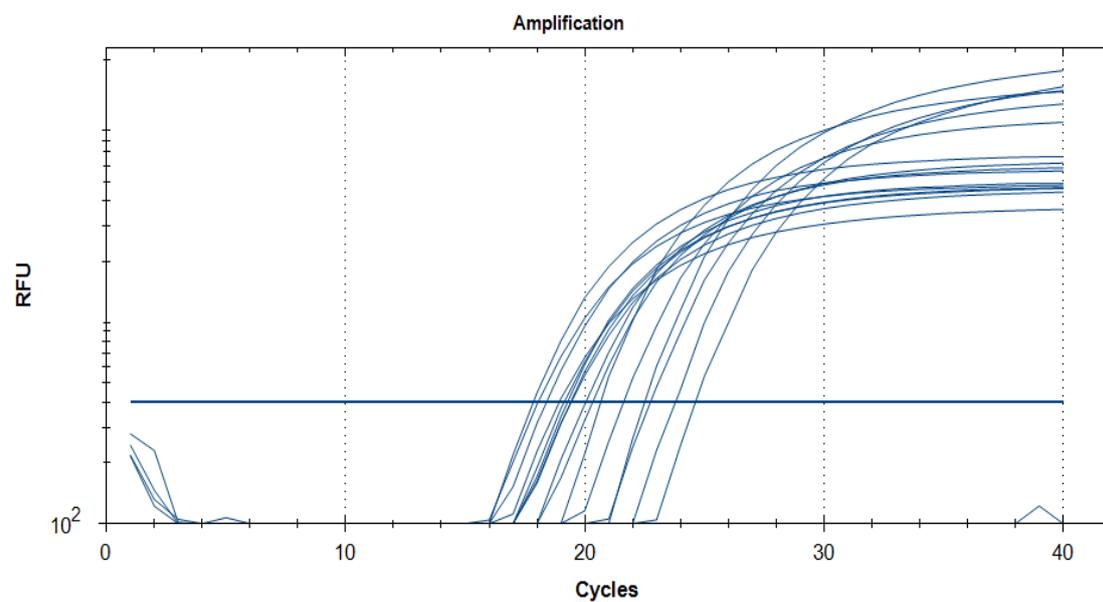
Anexo 4 Gráfica RT-PCR. Amplificación de COX-2 con fluoróforo FAM, escala logarítmica, de macrófagos RAW 264.7



Anexo 5 Gráfica RT-PCR. Amplificación de NLRP3 con fluoróforo FAM de macrófagos RAW 264.7 tratados con extracto de *Vaccinium floribundum*



Anexo 6 Gráfica RT-PCR. Amplificación de NLRP3 con fluoróforo FAM, escala logarítmica de macrófagos RAW 264.7



Anexo 7 Prueba de ANOVA con comparación de Tuckey: Expresión de iNOS

| | |
|----------------------------------|------|
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 28 |
| Alpha | 0,05 |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff | 95% CI of diff, | Significant | Adjusted P Value | |
|-----------------------------------|-----------|-----------------|-------------|------------------|-----|
| Vehículo (Etanol 1%) vs. LPS | 9262 | 1557 to 16968 | Yes | 0,0186 | C-B |
| LPS+ Quercetina vs. LPS | -1967 | -9672 to 5739 | No | 0,9598 | D-B |
| LPS+ Dexamentasona vs. LPS | -1493 | -9198 to 6213 | No | 0,9907 | E-B |
| SO vs. LPS | -1481 | -9187 to 6224 | No | 0,9911 | F-B |
| W vs. LPS | -725 | -8431 to 6980 | No | 0,9999 | G-B |
| Etanol vs. LPS | 8670 | 964 to 16375 | Yes | 0,0269 | H-B |

Anexo 8 Prueba de ANOVA con comparación de Tuckey: Expresión de COX-2

| | |
|----------------------------------|------|
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 28 |
| Alpha | 0,05 |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant | Adjusted P Value | |
|-----------------------------------|------------|-----------------|-------------|------------------|-----|
| Vehiculo (Etanol 1%) vs. LPS | 102 | 57 to 147 | Yes | 0,0003 | C-B |
| LPS+Quercetina vs. LPS | -15 | -60 to 30 | No | 0,8658 | D-B |
| LPS+Dexamentasona vs. | -32 | -77 to 13 | No | 0,22 | E-B |

| LPS | | | | | |
|----------------|-----|------------|----|----------|-----|
| SO vs. LPS | -38 | -84 to 6,7 | No | 0,1061 | F-B |
| W vs. LPS | -28 | -73 to 17 | No | 0,3258 | G-B |
| Etanol vs. LPS | 2,3 | -43 to 47 | No | > 0,9999 | H-B |

Anexo 9 Prueba de ANOVA con comparación de Tuckey: Expresión de NLRP3

| | |
|----------------------------------|------|
| Number of families | 1 |
| Number of comparisons per family | 28 |
| Alpha | 0,05 |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff | 95% CI of diff | Significant | Adjusted P Value | |
|-----------------------------------|-----------|----------------|-------------|------------------|-----|
| Vehículo (Etanol 1%) vs. LPS | -0,7 | -5,8 to 4,4 | No | 0,9988 | C-B |
| LPS+Quercetina vs. LPS | 1,3 | -3,9 to 6,4 | No | 0,9674 | D-B |
| LPS+Dexametasona vs. LPS | 1,6 | -3,5 to 6,7 | No | 0,8981 | E-B |
| SO vs. LPS | -0,45 | -5,6 to 4,7 | No | > 0,9999 | F-B |
| W vs. LPS | 1 | -4,1 to 6,1 | No | 0,9901 | G-B |
| Etanol vs. LPS | 10 | 5,0 to 15 | Yes | 0,0007 | H-B |

