



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

Efecto de un microencapsulado de granada roja (*Punica granatum*) en ratas Wistar macho inducidas a inflamación aguda con lipopolisacáridos de *E. coli*.

T E S I S

Que para obtener el título de

Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

P.L.N. Alejandra Josafat Teodoro

No. cuenta: 314414

Bajo la Dirección de:

Dr. David Cruz Robles

Investigador en Ciencias Médicas “D”.

Depto. de Biología Molecular, INCICH

Bajo la Co-dirección de:

Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Profesor-investigador. UAEH



Pachuca de Soto, Hidalgo, Abril 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. David Cruz Robles por permitirme entrar a su espacio laboral durante la realización de servicio social, por la asesoría y tiempo invertido para la realización de este proyecto.

Al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera por la proporción del microencapsulado de granada, la asesoría y tiempo invertido para la realización de este proyecto.

Al Mtro. José Santamaría Sosa por la capacitación y apoyo técnico durante la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Laura Gabriela Sánchez Lozada, al IBQ José Guillermo Gonzaga Sánchez, al estudiante de doctorado Enrique Fernando García Arroyo y al departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología por la capacitación para la manipulación de ratas.

Al Dr. Óscar A. Pérez Méndez y a la Dra. Elizabeth Carreón del Departamento de Biología Molecular, a la Dra. Natalia Pavón del laboratorio de Farmacología, al Dr. Fausto Sánchez Muñoz y al estudiante de doctorado Adrián Hernández Díaz Coude del Departamento de Inmunología, al Laboratorio Central del Instituto Nacional de Cardiología por el apoyo en el análisis bioquímico de las muestras tomadas en la etapa de experimentación de este proyecto.

Al estudiante de doctorado Gabriel Herrera Maya por el apoyo y asesoría brindada durante la elaboración de este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, Francisca y Epifanio, a mis hermanos Marisa, Leticia e Ivan, por siempre estar a mi lado incondicionalmente, por los valores que me han inculcado, por apoyarme en mis decisiones y proyectos, por impulsarme a lograr mis objetivos y ser cada día un mejor ser humano, agradezco a la vida y a Dios por ser mi familia, GRACIAS porque sin el apoyo e impulso de ustedes, no sería la persona que soy. Los **amo infinitamente**.

A mis amigos, Haima M. Cano Monroy, César Ruíz Ruíz, David Vázquez González, por tantos años de amistad incondicional, risas, momentos inolvidables, por brindarme su apoyo y no dejarme rendir cuando el camino no es sencillo.

A Victoriano Prisciliano García, por apoyarme e impulsarme para lograr mis objetivos.

A Marva I. Arellano González y Gabriel Herrera Maya por brindarme su amistad, por sus consejos, por tantas risas, momentos graciosos y agradables dentro y fuera del laboratorio, por hacer más ameno el servicio social así como la redacción de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Marco teórico.....	3
1.1.Sistema inmunológico	3
1.1.1. Inmunidad innata o inespecífica	4
1.1.1.1.Lipopolisacárido	4
1.1.1.1.1. Acción endotoxica del lipopolisacárido	6
1.1.2. Inmunidad adaptativa o adquirida	7
1.1.2.1.Citocinas	8
1.1.2.1.1. Citocinas pro-inflamatorias	9
1.1.2.1.1.1.Interleucina-1	9
1.1.2.1.1.2.Interleucina-6.....	10
1.1.2.1.1.3.Factor de Necrosis Tumoral alfa	10
1.2.Inflamación.....	11
1.2.1. Clasificación	11
1.2.2. Fisiopatología de la inflamación.....	12
1.2.2.1.Cambios vasculares	12
1.2.2.2.Cambios celulares.....	13
1.2.3. Cambios en lipoproteínas	16
1.3.Alimentos y su actividad anti-inflamatoria	16
1.3.1. Granada.....	17
1.3.1.1.Taninos	18
1.3.1.1.1. Taninos condensados o proantocianidinas	18
1.3.1.1.2. Taninos hidrolizables.....	19
2. Antecedentes.....	19
2.1.Microencapsulado de granada (<i>Punica granatum</i>).....	20
2.1.1. Microencapsulación.....	20
2.1.1.1.Secado por aspersion	21

3. Problema de investigación.....	21
4. Justificación	22
5. Objetivos.....	23
5.1.Objetivo general	23
5.2.Objetivos específicos	24
6. Hipótesis	24
7. Metodología.....	24
7.1.Tipo de estudio	24
7.2.Consideraciones éticas.....	24
7.3.Diagrama metodológico del proyecto.....	24
7.4.Definición de grupos de estudio	25
7.5.Criterio de inclusión	26
7.6.Criterio de exclusión.....	26
7.7.Criterio de eliminación	26
7.8.Tamaño de muestra.....	26
7.8.1. Calculo de muestra	26
7.9.Manejo general de los animales de experimentación	27
7.10. Alimentación de animales de experimentación	27
7.11. Modelo experimental	27
7.11.1. Tratamiento uno (Tx1).....	27
7.11.1.1. Administración del microencapsulado.....	28
7.11.2. Tratamiento dos (Tx2).....	28
7.11.2.1. Administración de lipopolisacáridos (LPS).....	28
7.12. Recolección de datos.....	28
7.12.1. Toma de muestra sanguínea	28
7.12.2. Sacrificio de animales de experimentación	29
7.12.3. Mediciones bioquímicas.....	29
7.12.3.1. Fórmula blanca.....	29
7.12.3.2. Perfil lipídico (Colesterol Total, HDL, TG)	29
7.12.3.3. Medición de la expresión de RNAm de citocinas (<i>IL-1β</i> , <i>IL-6</i> y <i>TNF-α</i>)	29

7.12.3.4. Citocinas séricas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α).....	30
7.13. Análisis estadístico.....	30
8. Resultados.....	30
8.1.Fórmula blanca	31
8.2.Perfil lipídico	34
8.3.Medición de la expresión de RNAm de citocinas	36
8.4.Citocinas séricas	38
9. Discusión	40
10. Conclusiones.....	44
11. Perspectivas	45
12. Referencias bibliográficas	46
13. Anexos.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información nutrimental de la granada por 100 g de porción	17
Tabla 2. Fórmula blanca en ratas Wistar macho	33
Tabla 3. Perfil lipídico en ratas Wistar macho	35
Tabla 4. Expresión relativa de RNAm en ratas Wistar macho.....	37
Tabla 5. Citocinas séricas en ratas Wistar macho	39
Tabla 6. Secuencias de los primers utilizados	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta celular de la inmunidad innata y adaptativa.....	3
Figura 2. Estructura general del LPS.....	5
Figura 3. Reconocimiento y vías de traducción del LPS.....	7
Figura 4. Fisiopatología de la inflamación aguda.....	15
Figura 5. Diagrama de flujo del proceso metodológico	25
Figura 6. Curva de concentración final de lípidos	55
Figura 7. Integridad del RNAm.....	56
Figura 8. Curva de concentración sérica para IL-1 β , IL-6 y TNF- α	59

ABREVIATURAS

AINE's	Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos	ME	Microencapsulado de Granada roja (<i>Punica granatum</i>)
Apo A-1	Apolipoproteína A-1	Mg²⁺	Magnesio
c-DNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	mL	Mililitros
CT	Colesterol total	MyD88	Proteína de diferenciación mieloide
dL	Decilitros		Factor Nuclear Potenciador de las cadenas ligeras de las células beta activadas
DNA	Ácido desoxirribonucleico	NFKB	
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genómico	NK	Células asesinas naturales
dNTPs	Desoxinucleósido trifosfatos	Nm	Nanómetro
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PGE2	Prostaglandina E2
FTC-β	Factor Transformador de Crecimiento beta	PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos
G	Gramos	ppm	Partes por millón
Gp-130	Glicoproteína 130	RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero-
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	RNA_t	Ácido ribonucleico de transferencia
HIF-α	Factor 1-alfa inducible por hipoxia	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimeraza en tiempo real
HPRT	Hipoxantina Fosforibosiltransferasa 1	SAA	Proteína amiloide A sérica
IFN-γ	Interferón gama	SAPK	Proteínas cinasas activadas por estrés
IL-1	Interleucina uno	T0	Tiempo cero, tiempo basal, primera toma sanguínea
IL-1AR	Antagonista del receptor de interleucina uno	T1	Tiempo 1, segunda toma sanguínea, 2 horas post-inducción con LPS
IL-1RI o IL1R1	Receptor tipo I de Interleucina uno	T2	Tiempo 2, tercera toma sanguínea, 4 horas post-inducción con LPS
IL-1RII o IL1R2	Receptor tipo II de Interleucina uno	TG	Triglicéridos
IL-1α	Interleucina 1 alfa	Th1	Citocinas pro-inflamatorias
IL-1β	Interleucina 1 beta	Th2	Citocinas anti-inflamatorias
IL-6	Interleucina 6	TIR	Receptores Tipo Toll de IL-1
INCICH	Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"	TLR4	Receptor Toll tipo 4
INF-κβ	Inhibidor del factor capa beta	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
KDa	Kilodaltones	TNFR1 o TNFR1	Receptor uno del Factor de Necrosis Tumoral
Kg	Kilogramos	TNFR2 o TNFR2	Receptor dos del Factor de Necrosis Tumoral
LCAT	Lecitina-Colesterol-Acil-Transferasa	TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad		
LOS	Lipooligosacáridos		
LPS	Lipopolisacáridos		
MD2	Antígeno linfocítico 96		

TRIF	Proteína adaptadora inductora de interferón	UI	Unidades Internacionales
Tx1	Tratamiento uno	VIP	Vía Intraperitoneal
Tx2	Tratamiento dos	µg	Microgramos
		µL	Microlitro

RESUMEN

El sistema inmunológico al detectar agentes extraños provoca inflamación. Esta respuesta, es tratada con fármacos que pueden causar efectos secundarios. Por ello, se buscan alternativas que ayuden a disminuir esta respuesta sin provocar efectos colaterales. Los taninos de la granada, han mostrado tener diversas propiedades benéficas en el organismo. Por ello, en el presente estudio, se evaluó el efecto anti-inflamatorio agudo de un microencapsulado de granada en ratas Wistar macho con inflamación inducida por lipopolisacárido de *E. coli*. Se emplearon 32 ratas asignadas aleatoriamente en 4 grupos (A-D) con 8 ratas cada uno, se administraron dos tratamientos: 1) vía oral= 0.5mg/mL/kg de microencapsulado de granada o agua de bebida durante 30 días; 2) vía intraperitoneal= 1mg/mL/kg de lipopolisacárido de *E. coli* o agua inyectable al día 31. Los grupos fueron tratados de la siguiente manera: grupo A o Control negativo= agua; grupo B o Acondicionado= microencapsulado de granada + agua; grupo C o Probando= microencapsulado de granada + lipopolisacárido de *E. coli*; grupo D o Control positivo= agua + lipopolisacárido de *E. coli*. Se realizó análisis de fórmula blanca, perfil lipídico, niveles de RNAm de citocinas pro-inflamatorias y su concentración en suero al día 30 después del tratamiento uno (T0= basal) y al día 31 más 2 (T1= Tiempo 1) y 4 (T2= Tiempo 2) horas posterior al tratamiento dos. Los animales del grupo C disminuyeron su concentración los Leucocitos (T0= 16.16±2.63%; T1= 4.96±1.91%; T2= 2.60±1.14%); Linfocitos (T0= 91.080±7.61%; T1= 66.91±23.68%; T2= 40.75±16.27%); Monocitos (T0= 0.53%; T1= 0.31±0.49%; T2= 0.47±0.55%); Colesterol total (T0= 68.50±13.09 mg/dL; T2= 62.81±17.90 mg/dL); HDL (T0= 32.00±5.66 mg/dL; T2= 22.71±4.83 mg/dL); *IL-6* (T0= 5.31±3.00; T1= 1.52±1.03) e *IL-6* (T0= 176.37±247.63 pg/mL; T1= 145.75±37.90 pg/mL; T2 125.37±52.97 pg/mL) comparados con los demás grupos estudiados, principalmente con el grupo D, quien tuvo parámetros más elevados comparados con los demás grupos, por lo tanto, se puede proponer que el microencapsulado de granada podría considerarse como un tratamiento preventivo contra la inflamación aguda para tratar de evitar daños colaterales provocados por los tratamientos farmacológicos.

Palabras clave: Microencapsulado de granada, inflamación aguda, lipopolisacárido de *E. coli*, interleucina 1 β , interleucina 6, Factor de Necrosis Tumoral- α , actividad anti-inflamatoria.

ABSTRACT

The immune system detecting foreign agents causes inflammation. This response is treated with drugs that can cause side effects. Therefore, alternatives are sought to help reduce this response without causing side effects. Pomegranate tannins have been shown to have various beneficial properties in health. Therefore, in the present study, the acute anti-inflammatory effect of a microencapsulated pomegranate in male Wistar rats with lipopolysaccharide-induced inflammation of *E. coli* was evaluated. 32 rats randomly assigned in 4 groups (A-D) with 8 rats each were used, two treatments were administered: 1) orally = 0.5mg / mL / kg of microencapsulated pomegranate or drinking water for 30 days; 2) Intraperitoneal route = 1mg / mL / kg of *E. coli* lipopolysaccharide or water for injection on day 31. The groups were treated as follows: group A or Negative control = water; group B or Conditioning = microencapsulated pomegranate + water; group C or Testing = microencapsulated pomegranate + *E. coli* lipopolysaccharide; Group D or Positive Control = water + *E. coli* lipopolysaccharide. Analysis of white formula, lipid profile, levels of pro-inflammatory cytokine mRNA and its serum concentration was performed at day 30 after treatment one (T0 = baseline) and at day 31 plus 2 (T1 = Time 1) and 4 (T2 = Time 2) hours after treatment two. Group C animals decreased their leukocyte concentration (T0 = 16.16 ± 2.63%; T1 = 4.96 ± 1.91%; T2 = 2.60 ± 1.14%); Lymphocytes (T0 = 91.080 ± 7.61%; T1 = 66.91 ± 23.68%; T2 = 40.75 ± 16.27%); Monocytes (T0 = 0.53%; T1 = 0.31 ± 0.49%; T2 = 0.47 ± 0.55%); Total cholesterol (T0 = 68.50 ± 13.09 mg / dL; T2 = 62.81 ± 17.90 mg / dL); HDL (T0 = 32.00 ± 5.66 mg / dL; T2 = 22.71 ± 4.83 mg / dL); IL-6 (T0 = 5.31 ± 3.00; T1 = 1.52 ± 1.03) and IL-6 (T0 = 176.37 ± 247.63 pg / mL; T1 = 145.75 ± 37.90 pg / ml; T2 125.37 ± 52.97 pg / mL) compared to the other groups studied, mainly with group D, who had more parameters compared to the other groups, therefore, it can be proposed that the grenade microencapsulation could affect as a preventive treatment against Acute inflammation to try to avoid collateral damage caused by pharmacological treatments.

Key words: *Punica granatum*, microencapsulated pomegranate, inflammation, lipopolysaccharides, interleukin 1 β , interleukin 6, Tumor Necrosis Factor- α , anti-inflammatory activity.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Sistema inmunológico

El sistema inmunológico es el conjunto de barreras físicos-químicas, de elementos celulares y sustancias solubles que sirven como mecanismos de defensa en contra de agentes extraños, sean: virus, bacterias, hongos, parásitos, células tumorales, células infectadas, entre otros. El sistema lo conforman varios órganos y diferentes tipos celulares, que le permiten al organismo distinguir lo propio y eliminar lo extraño en el cuerpo (Delves, *et al.*, 2014).

Este sistema se caracteriza por tener dos tipos de respuestas: 1) respuesta innata o inespecífica: es una respuesta inmediata a la agresión, independientemente del estímulo previo, siendo la primera línea de defensa del organismo, se adquiere antes del nacimiento y se madura en los primeros años de vida (Figura 1). 2) Respuesta adaptativa o adquirida: implica el reconocimiento de lo propio así como de lo extraño y utiliza una red de señalización entre diversos tipos celulares además de moléculas propias del sistema inmune como las citocinas. Posee mecanismos que permiten reconocer las sustancias extrañas, neutralizarlas y eliminarlas; los cuales, de primera instancia, tratan de impedir la entrada y el desarrollo de agentes patógenos en el organismo. Cuando esta acción no resulta efectiva, el agente extraño evade la respuesta inmune y produce la enfermedad (Collado, *et al.*, 2008; Delves, *et al.*, 2014; Júnior, *et al.*, 2010; Maddelaine y Boris, 2014).

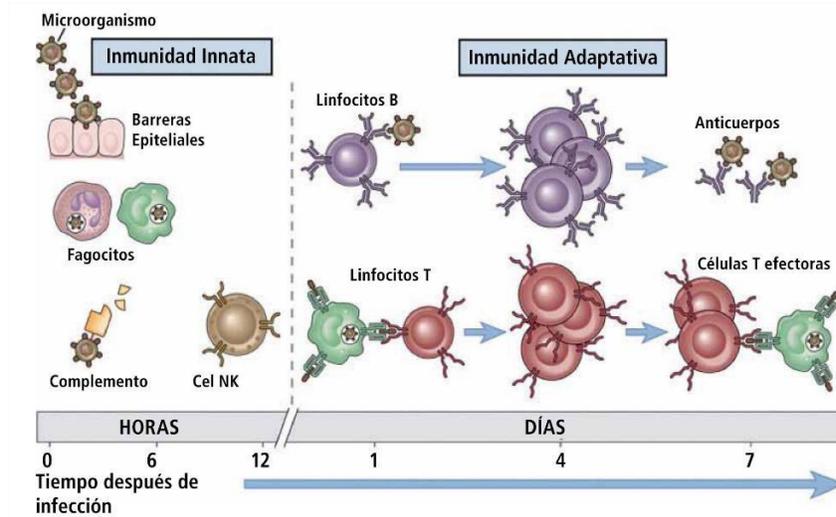


Figura 1. Respuesta celular de la inmunidad innata y adaptativa producida por un agente extraño al entrar al organismo (Toche, 2012). Inmunidad innata se activa en las primeras 12 horas posteriormente se activa la inmunidad adaptativa.

1.1.1. Inmunidad innata o inespecífica

Filogenéticamente este tipo de inmunidad es considerado el más antiguo dentro de la escala evolutiva. La inmunidad innata carece de memoria para agentes extraños y no es específica a antígenos, de tal modo que sus respuestas son constantes, sea cual sea el agente desencadenante y con el tiempo no aumenta su eficacia aun en repetidas exposiciones con el agente. No obstante, es capaz de diferenciar secuencias de ADN viral o bacteriano de modo que puede activar los diferentes mecanismos de defensa dependiendo del agente invasor (Collado, *et al.*, 2008; Maddelaine y Boris, 2014; Robledo^b, 2008; Zepeda, *et al.*, 2013).

La respuesta se da en dos mecanismos. a) Los externos que se hallan compuestos principalmente de barreras físicas (piel, uñas, pelo), barreras químicas (lagrimas, saliva) y flora autóctona del individuo y b) mecanismos internos que son activados en caso de que el agente extraño logre evadir los anteriores obstáculos, por lo que están constituidos por un grupo heterogéneo de células y factores solubles (Collado, *et al.*, 2008; Maddelaine y Boris, 2014).

Existen múltiples agentes patógenos que estimulan la activación del sistema inmunológico, uno de ellos es el lipopolisacárido (LPS), que es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas con 3.5×10^6 moléculas, ocupando aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes de la superficie de la bacteria (Aldapa-Vega, *et al.*, 2016; Hurtado e Iregui, 2010).

1.1.1.1. Lipopolisacárido

Entre los años 1930-1940, se identificó una molécula de bacterias Gram negativas con una porción lipídica y otra glicosídica, motivo por el cual recibió el nombre de lipopolisacárido (LPS), conocido también como endotoxina. Años más tarde se estableció que el LPS se encuentra en la membrana externa de las bacterias. La región lipídica y la glicosídica tienen funciones separadas y sinérgicas lo que hace de esta molécula uno de los factores de virulencia más complejos de estudiar (Aldapa-Vega, *et al.*, 2016; Hurtado e Iregui, 2010).

El LPS se compone de un glucolípido llamado lípido A, que se extiende hacia el exterior de la bacteria y un heteropolisacárido conocido como el núcleo o core unidos entre sí por el azúcar ácido 2-keto-3-deoxioctanato (KDO), como se muestra en la Figura 2. El lípido A, es la

fracción biológicamente activa de la molécula, que es la parte más receptiva por numerosos componentes celulares de la inmunidad innata, quien define el tipo de sustrato específico. El lípido A puede ser reconocido por el receptor TLR4/MD2 (receptor 4 tipo Toll/antígeno linfocítico 96), lo cual resulta en una ventana que permite que los patógenos puedan evadir la respuesta inmune innata y afecten a la inmunidad adaptativa (Aldapa-Vega, *et al.*, 2016; Hurtado e Iregui, 2010).

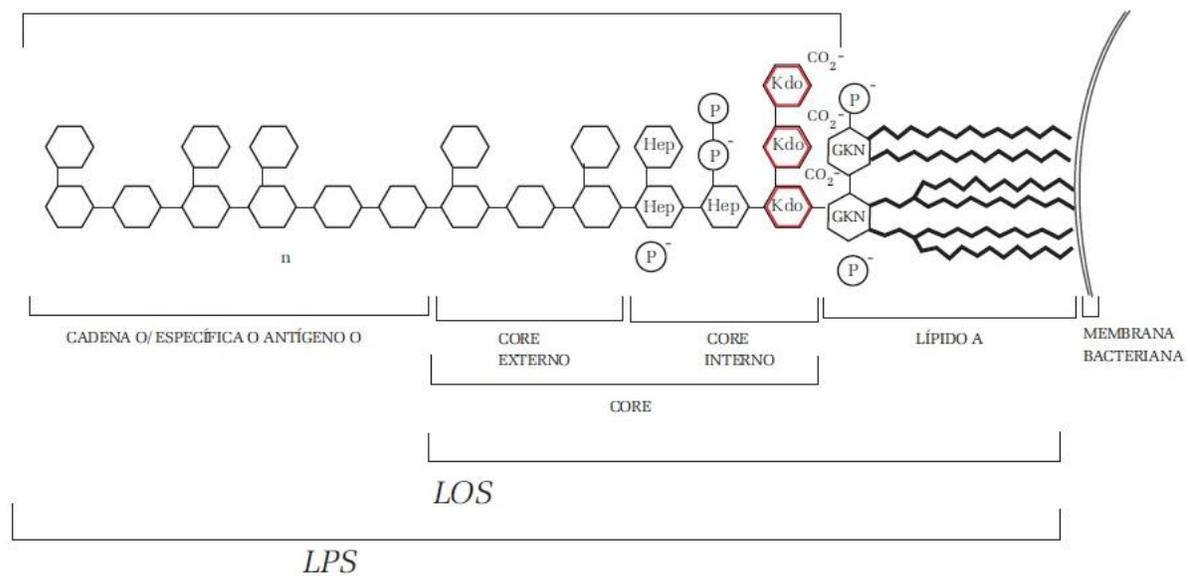


Figura 2. Estructura general del LPS. Se muestra el glucolípidio conocido como lípido A hasta el core o núcleo externo e interno y la unión que tienen ambos núcleos al lípido A mediante KDO, además de una glucosamida que es la fracción activa de la molécula y la unión que tiene con ácidos grasos saturados que son conocidos como antígeno O (Rietschel, *et al.*, 1991).

El heteropolisacárido se subdivide en núcleo externo (formado por hexosas) y en núcleo interno (formado por heptosas). En algunas bacterias el LPS presenta una región glicosídica adicional conocida como antígeno O, también llamada polisacárido O-específico; el cual es un polímero de unidades repetidas que consta de 1 a 8 residuos glicosídicos altamente variables entre especies bacterianas. La posibilidad de combinación y unión proporciona una probabilidad muy grande para la generación de esta estructura, por lo general diferente entre géneros y especies produciendo los llamados serotipos. Dada esta variabilidad se designa a un LPS cuando presenta las fracciones lipídicas, núcleo y antígeno O, y como lipooligosacárido (LOS) cuando presenta únicamente las fracciones lipídicas y núcleo, al LPS además se le

conoce con el nombre de LPS liso porque al sembrar en agar gel bacterias con este tipo de LPS sus colonias crecen con bordes lisos y al LOS con el nombre de LPS rugoso porque sus colonias crecen con bordes irregulares de apariencia rugosa (Figura 2) (Aldapa-Vega, *et al.*, 2016; Hurtado e Iregui, 2010).

1.1.1.1.1. Acción endotóxica del lipopolisacárido

Cuando el LPS es liberado de la membrana de la bacteria como consecuencia de la multiplicación o lisis, éste entra en contacto con varias proteínas del hospedero, dentro de las que destacan la proteína de unión al LPS (LBP) y los receptores CD14 (de sus siglas en inglés cluster of differentiation 14), TLR4 y MD2. La proteína LBP es la encargada de capturar al LPS y formar el complejo LPS-LBP facilitando, de esta manera, la asociación del LPS con el receptor CD14; el CD14 tiene como función principal transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR4/MD-2) (Figura 3) (Bäckhed, *et al.*, 2003; Lu, *et al.*, 2008; Rietschel, *et al.*, 1991).

Una vez formado el complejo LPS-TLR4/MD-2, el TLR4 sufre una oligomerización posteriormente se inicia una reacción que comienza con la interacción con proteínas celulares que poseen dominios TIR (Receptores tipo Toll de Interleucina 1), las cuales son las encargadas de mediar la relación entre el TLR4 y las proteínas celulares de transducción del LPS; Debido a la utilización de las proteínas con dominios TIR y sus productos finales (citocinas pro-inflamatorias o interferones tipo I), la señal de transducción del LPS a través del TLR4 ha sido dividida en dos rutas, la vía dependiente de la proteína MyD88 (proteína de diferenciación mieloide) y la vía dependiente de la proteína TRIF (proteína adaptadora inductora de interferón). Cada una genera reacciones diferentes que concuerdan en un punto donde activan a el factor de transcripción nuclear kapa beta ($\text{NF-}\kappa\beta$), el cual, en condiciones normales, se encuentra en forma inactiva en el citoplasma unido al inhibidor del factor kB (INB-kB), pero tras la señal enviada por las proteínas MyD88 o TRIF se activan cinasas del INF-kB que lo separan del NF-kB y lo activan, una vez activo se transloca al núcleo donde se une a la región promotora de los genes de respuesta inflamatoria generando como respuesta final la transcripción de interferones tipo I (α , β 1a y β 1b) si fue activado por la vía del TRIF y

de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α (factor de necrosis tumoral alfa)) si ocurrió por la vía de la proteína MyD88 (Figura 3) (Lu, *et al.*, 2008; Pinsky, *et al.*, 1993).

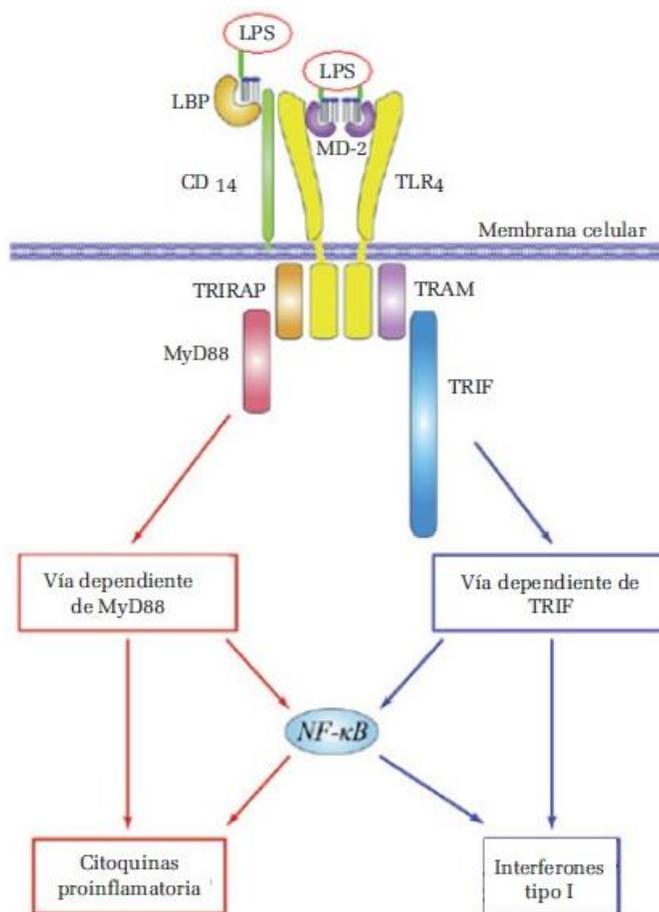


Figura 3. Reconocimiento y vías de transducción del LPS. La acción que realiza el LPS para entrar a las células provocando dos respuestas dependiendo la vía a la que se vaya, dependiente o independiente generando un grado de inflamación (Lu, *et al.*, 2008).

1.1.2. Inmunidad adaptativa o adquirida

Estos mecanismos se activan cuando la respuesta innata no es eficaz, consiste principalmente en eliminar al agente extraño. Estos mecanismos se dividen en: respuesta celular llevada a cabo por linfocitos y respuesta humoral mediada por anticuerpos (Collado, *et al.*, 2008; Maddelainne y Boris, 2014; Zepeda, *et al.*, 2013).

La inmunidad celular tiene como mediadores principales a los linfocitos, los mismos que se encargan básicamente de erradicar a los microorganismos intracelulares. Existen varios mecanismos de la respuesta inmunitaria celular, la mayoría de ellos se realiza

fundamentalmente por los linfocitos T, mismos que reconocen el antígeno presentado por las células de Langerhans, y desencadenan la fagocitosis por otro grupo de células como los linfocitos citotóxicos y macrófagos (Maddelainne y Boris, 2014).

La inmunidad humoral consiste principalmente en una serie de reacciones que median los anticuerpos producidos por linfocitos B y las proteínas del complemento, para eliminar al agente extraño. Cabe resaltar que la unión antígeno-anticuerpo no es suficiente para la eliminación del agente extraño, por lo que es indispensable la participación de otros elementos (sistema de complemento, células fagocitarias y células NK (Células asesinas naturales)) (Maddelainne y Boris, 2014).

1.1.2.1.Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas extracelulares, hidrosolubles, que pesan entre 8 y 30 kDa. Son producidas por diversos tipos de células en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico a través de la activación de proteín-cinasas que a su vez son activadas por mitógeno. Actúan como reguladores de las respuesta inmunitaria e inflamatoria. (Filella, *et al.*, 2002; Oliveira, *et al.*, 2011).

Las citocinas actúan especialmente por mecanismos parácrinos (en células vecinas) y autócrinos (en las propias células productoras) (Oliveira, *et al.*, 2011).

Diferentes tipos celulares pueden producir la misma citocina y éstas pueden tener diversos blancos celulares a su vez, esto se le conoce como pleiotropía. A menudo se forman en cascada, es decir, una citocina estimula a sus células blanco para que produzcan a su vez más citocinas. Esas sustancias están vinculadas a receptores específicos, activando mensajeros intracelulares que regulan la transcripción génica. Así, las citocinas influyen en la actividad, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula inmunológica, así como también regulan la producción y la actividad de otras citocinas, que pueden potenciar (proinflamatorias) o atenuar (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria (Oliveira, *et al.*, 2011).

Algunas citocinas pueden tener acciones pro (Th1) o antiinflamatorias (Th2), dependiendo del microambiente en que se encuentran. Entre las consideradas pro-inflamatorias se encuentran las interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 y TNF (factor de necrosis tumoral). Algunas anti-inflamatorias

son: IL-4, IL-10, IL-13 y $\text{FTC}\beta$ (factor transformador de crecimiento beta). Las citocinas son mediadores necesarios para conducir la respuesta inflamatoria hacia las regiones de infección y lesión, favoreciendo la cicatrización apropiada de la herida. Pero la producción exagerada de citocinas pro-inflamatorias a partir de la lesión puede manifestarse sistémicamente con una inestabilidad hemodinámica o con disturbios metabólicos. Después de las lesiones o de las infecciones graves, la respuesta exacerbada y persistente de citocinas Th1 puede contribuir con las lesiones en el órgano objetivo, conllevando al fracaso multiorgánico y por ende, a la muerte. Las citocinas Th2 pueden minimizar algunos de esos efectos indeseados. Ya que no se puede clasificar a las citocinas en cuanto a la célula de origen o en cuanto a la función biológica, se agruparon en interleucinas (IL, numerada secuencialmente de IL-1 a IL-35), factores de necrosis tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotácticas), interferones (IFN) y factores de crecimiento mesenquimal (Filella, *et al.*, 2002; Jun-Ming y Jianxiong, 2007; Oliveira, *et al.*, 2011).

1.1.2.1.1. Citocinas pro-inflamatorias

Las citocinas pro-inflamatorias son secretadas principalmente por la activación de macrófagos y son esenciales en su regulación de reacciones inflamatorias. Las citocinas pro-inflamatorias que muestran mayor alteración durante un proceso patológico son: interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) (Jun-Ming y Jianxiong, 2007).

1.1.2.1.1.1. Interleucina-1

La IL-1 es secretada principalmente por macrófagos y monocitos, aunque también por células no inmunológicas, tales como fibroblastos y células endoteliales activadas durante la lesión celular, la infección, la invasión y la inflamación. Es un polipéptido de unos 15-20 kDa del que existen dos formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β , con una homología del 26% y que derivan de una proteína precursora (pro-IL-1 α y pro-IL-1 β). Ambas citocinas actúan sobre los mismos receptores, IL-1RI e IL-1RII. El IL-1RI se le considera el receptor activo, mientras que el IL-1RII no posee una molécula de transducción y es funcionalmente inactivo, siendo el

antagonista y es una sustancia que impedirá la actuación de la IL-1 (Filella, et al., 2002; Oliveira, et al., 2011; Wolf, et al., 2008).

La IL-1 α actúa intracelularmente y no se encuentra en la circulación general excepto en casos de enfermedad grave. En cambio, la IL-1 β es la forma predominante en el espacio extracelular sintetizada como una proteína precursora (pro-IL-1 β), que no es segregada en la forma activa hasta ser metabolizada por la enzima caspasa-1. Los macrófagos activados son la principal fuente fisiológica de IL-1, citocina que destaca por su capacidad pro-inflamatoria (Filella, et al., 2002).

1.1.2.1.1.2. Interleucina-6

Es una glucoproteína de 22 a 27 kDa, secretada por muchos tipos celulares, como los macrófagos, monocitos, eosinófilos, hepatocitos y células de la glía, además de TNF- α e IL-1 que son potentes inductores. Interviene regulando la respuesta inmunológica, en la hematopoyesis y en las reacciones de fase aguda. Tiene, a la vez, efectos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. (Filella, et al., 2002; Jun-Ming y Jianxiong, 2007; Oliveira, et al., 2011; Wolf, et al., 2008).

Posteriormente a la lesión, las concentraciones plasmáticas de IL-6 se detectan en 60 minutos, con un pico entre 4 y 6 horas, pudiendo persistir durante 10 días (Filella, et al., 2002; Jun-Ming y Jianxiong, 2007; Oliveira, et al., 2011).

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que genera la madurez y la activación de los neutrófilos, la madurez de los macrófagos y la diferenciación/mantenimiento de los linfocitos -T citotóxicos y de las células asesinas naturales (NK). También ejerce propiedades anti-inflamatorias durante la lesión, por liberar receptores solubles de TNF e IL-1AR (Oliveira, et al., 2011; Raeburn, et al., 2002).

1.1.2.1.1.3. Factor de Necrosis Tumoral alfa

TNF- α , conocido también como caquectina, que es secretado fundamentalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos T; es otra citocina pro-inflamatoria que actúa a través de dos receptores de la superficie celular, TNFR1 y TNFR2, para regular las vías apoptóticas, la activación de la inflamación por NFKB y la activación de las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK). TNF- α ejerce un efecto antitumoral a través de un doble mecanismo que

incluye la inhibición de la angiogénesis, que produce la necrosis hemorrágica del tumor, y el aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral, acción en la que actúa sinérgicamente con el IFN- γ (Filella, *et al.*, 2002; Fragoso, *et al.*, 2013; Fragoso, *et al.*, 2014; Fuccelli, *et al.*, 2018; Jun-Ming y Jianxiong, 2007; Oliveira, *et al.*, 2011; Wolf, *et al.*, 2008).

1.2.Inflamación

El organismo humano posee mecanismos de defensa, ante cualquier daño. De esta forma, las agresiones endógenas o exógenas provocan una cascada defensiva, donde la inmunidad innata, a través del proceso inflamatorio logra aislar la lesión, destruye el agente patógeno y repara el tejido con el fin de restaurar su funcionalidad y la del órgano afectado (Granados, *et al.*, 2010; Herrera, 2014).

La inflamación, es una reacción o proceso defensivo natural del sistema inmunológico del organismo como respuesta al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por agentes lesivos como pueden ser microorganismos, traumatismos, necrosis, agentes químicos o físicos, o reacciones inmunitarias, entre otros (Herrera, 2014). También es una respuesta que promueve la reparación del tejido dañado. Este proceso de defensa natural lleva un mayor flujo de sangre al área afectada, lo que produce una acumulación de líquidos y a medida que el cuerpo acumula esta respuesta protectora, los síntomas de la inflamación se desarrollan, tales como el dolor, calor, rubor y edema, además de pérdida de funcionalidad (Herrera, 2014).

1.2.1. Clasificación

La clasificación de la inflamación se realiza tomando en cuenta el tiempo de duración, carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización. Este proceso puede presentarse en forma aguda con reacción inmediata al agente agresor, en la cual los fagocitos, al encontrarse con un agente lesivo intentan eliminarlo secretando sustancias mediadoras que actúan sobre las células endoteliales provocando cambios en la permeabilidad vascular, lo que provoca la migración de los leucocitos al foco inflamatorio para la fagocitosis de los agentes patógenos, retornando a la normalidad cuando se restaura la lesión. De igual manera la inflamación cursa con una evolución resultado de infecciones persistentes, autoinmunidad, o como continuación de una inflamación aguda por la persistencia del agente lesivo, dando lugar

a una inflamación crónica. En este nivel se presenta la infiltración de células mononucleares, destrucción tisular, e intentos de curación del tejido dañado por angiogénesis o fibrosis. El objetivo de la inflamación es librar al organismo de la causa inicial de agresión celular; sin embargo, cualquiera que fuera el cuadro inflamatorio, agudo o crónico, se deben tomar las medidas farmacológicas adecuadas para controlar las secuelas de la inflamación en el organismo, sin interferir con sus efectos benéficos (Granados, *et al.*, 2010; Herrera, 2014).

1.2.2. Fisiopatología de la inflamación

El proceso inflamatorio representa una reacción tisular imprevista ante un daño, que incluye: el inicio o cese de medidas basadas en la integración de secuencias moleculares incitadas por el daño tisular causado por la invasión de material extraño exógeno o endógeno; reclutamiento, instrucción y envío de células; eliminación de microorganismos, cuerpos extraños y de células infectadas y/o dañadas; creación de barreras para evitar la dispersión microbianas, y la reparación del tejido lesionado por el daño o por la respuesta del huésped. Si diferentes causas alteran o bloquean cualquiera de las etapas de este ordenado proceso, la inflamación puede derivar hacia soluciones no deseadas, como la infiltración tisular por agregados de linfocitos y leucocitos (granulomas) que, en ocasiones (en las articulaciones), son embebidos en una masa de fibroblastos sinoviales hiperproliferativos (pannus), o la distorsión tisular mediante la biosíntesis incontrolada de colágeno (fibrosis o cirrosis). La inflamación persistente puede provocar depósitos de proteínas amieloides, en principio protectoras pero que, a la larga, pueden inducir enfermedades crónicas degenerativas, y, también, lesiones oxidativas en el ADN que, con el tiempo, favorezcan transformaciones neoplásicas. La inflamación tiene diversos cambios fisiopatológicos, los más sobresalientes son vasculares y celulares que se producen simultáneamente (Figura 4) (Granados, *et al.*, 2010; González, *et al.*, 1994; Regal, *et al.*, 2016; Robledo^a, 2008).

1.2.2.1. Cambios vasculares

En el proceso inflamatorio los vasos sanguíneos sufren cambios importantes tanto en su flujo como en el calibre, por lo tanto posibilitan y maximizan la salida de proteínas así como de células plasmáticas desde la circulación hacia el foco inflamatorio. Uno de los primeros

cambios vasculares es la vasodilatación, inducida por la histamina, producida por las células cebadas y por el óxido nítrico, que actúan sobre el músculo liso vascular, dilatándolo, con el consiguiente aumento de la permeabilidad microvascular, resultado de la combinación del aumento de la presión hidrostática y la disminución de la presión osmótica, lo que lleva a la salida de líquidos del espacio intravascular al extravascular con la formación de edema (Granados, *et al.*, 2010; Regal, *et al.*, 2016). Estos cambios tienen como consecuencia la disminución de la velocidad sanguínea, que sumada a la pérdida de líquido intravascular, concentración de hematíes y aumento de la viscosidad de la sangre, da como resultado la estasis, la cual es responsable de la marginación de los leucocitos, los cuales en condiciones normales circulan por el centro de los vasos (Granados, *et al.*, 2010; Herrera, 2014).

1.2.2.2.Cambios celulares

Los leucocitos deben viajar desde la luz de los vasos sanguíneos al sitio de la lesión y ejecutar ahí sus funciones de defensa, como por ejemplo, fagocitar al agente patógeno. A este proceso se le denomina extravasación y consta de tres etapas:

1. Extravasación:

- i. **Marginación:** Aproximación de las células sanguíneas al endotelio. Significa el primer cambio que se produce en el capilar, positivo en las vénulas, por la acción del enlentecimiento de la circulación y la acción de las moléculas de adhesión celular.
- ii. **Rodadura:** Aproximación y unión laxa de linfocitos al endotelio. Se debe a la expresión de las moléculas de adhesión celular.
- iii. **Adhesión al endotelio:** Es un mecanismo de interacción celular esencial en el proceso inflamatorio. Las moléculas que se expresan en la membrana de las células endoteliales y en los leucocitos permiten la adherencia, “leucocito-endotelio” y extravasación. El ritmo de las células en abandonar el vaso depende de la expresión de cuatro grandes grupos de proteínas: Selectinas, Inmunoglobulinas, Integrinas y Cadherinas. Los neutrófilos responden rápidamente y son las primeras células en emigrar.

2. **Diapédesis:** Es el paso de elementos formes de la sangre (como leucocitos), a través de los capilares sanguíneos para dirigirse al foco de inflamación o infección sin que se produzca lesión capilar.
3. **Migración a los tejidos intersticiales:** Los leucocitos migran en los tejidos hasta alcanzar la zona de lesión, mediante un proceso que se denomina quimiotaxis, que se puede definir como la locomoción celular orientada por un gradiente químico, todos los granulocitos, monocitos y en menor grado, los linfocitos responden a los estímulos quimiotácticos con grados diferentes de velocidad, es decir, que “saben a dónde ir”.

Los leucocitos ya activados cumplirán su función principal, eliminar al agente agresor del foco inflamatorio mediante la fagocitosis, que se dará en tres etapas, 1) el reconocimiento y unión de partículas, 2) interiorización con formación de vacuola fagocítica, y 3) destrucción del material fagocitado.

Como ya se indicó este tipo de inflamación es una reacción rápida, por lo cual su cese también es rápido cuando el agente dañino es eliminado y los mecanismos anti-inflamatorios finalizan el proceso.

La inflamación puede restituirse al completo estado de normalidad solamente si se elimina el agente causal, se reabsorbe totalmente el exudado y se regeneran los tejidos destruidos. Este proceso dependerá del grado de respuesta de cada organismo a los mediadores químicos, y se podrán evidenciar tres posibles resultados del mismo:

- 1) Resolución completa.
- 2) Curación por reemplazo de tejido conectivo (fibrosis).
- 3) Progresión a una inflamación crónica.

El proceso inflamatorio descrito corresponde a una inflamación aguda, cuando progresa a una inflamación crónica las características más importantes son:

- a) Infiltrado celular compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
- b) Importante destrucción tisular.
- c) Formación de tejido fibroso y angiogénesis (proliferación de pequeños vasos sanguíneos) prevalece sobre exudado de líquidos (necrosis).

Los macrófagos son producto de la diferenciación de los monocitos del torrente sanguíneo, los cuales, al igual que los neutrófilos en la inflamación aguda, son inducidos a migrar a la luz de los vasos hasta el foco de la inflamación, por acción de los factores quimiotácticos. Estos macrófagos se activan gracias a citocinas producidas por las células T o por otros factores de origen no inmunitario. Este grupo celular representa la acumulación más persistente en la inflamación crónica (Granados, *et al.*, 2010; González, *et al.*, 1994; Herrera, 2014).

Otras células que interfieren en este cuadro inflamatorio son los linfocitos, eosinófilos y basófilos que se encuentran alterados cuando el organismo detecta un agente extraño. Las células cebadas están distribuidas por los tejidos conjuntivos y están presentes tanto en inflamación aguda como en la crónica (Herrera, 2014).

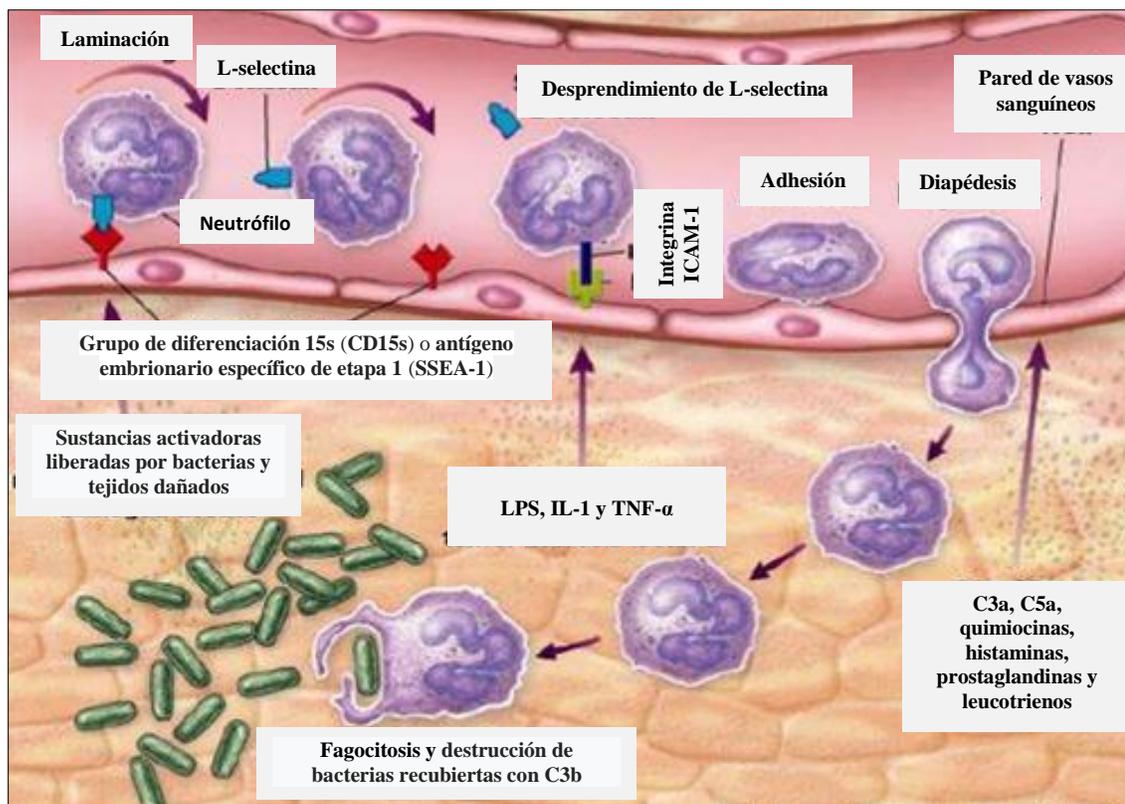


Figura 4. Fisiopatología de la inflamación aguda. Serie de procesos que suceden en el organismo para desarrollar un cuadro de inflamación aguda, tras la detección de un agente extraño el sistema inmunológico.

1.2.3. Cambios en lipoproteínas

Los niveles y la composición de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se ven afectados por la acción de algunas citocinas y moléculas liberadas durante los procesos inflamatorios. En este sentido, citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 disminuyen la expresión de apolipoproteína A-1 (ApoA-I) e inducen la expresión de la proteína amiloide A sérica (SAA), la cual cambia la composición de las HDL, afectando su capacidad anti-inflamatoria y antioxidante. Se ha reportado que durante esta fase hay un incremento en la actividad de proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) y una disminución en la actividad de lecitina-colesterol-acil-transferasa (LCAT), lo que lleva a una disminución de las HDL maduras; esto afecta en el transporte reverso del colesterol provocando una acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lo cual forma una estría de grasa, generando una enfermedad cardiovascular. Otras alteraciones que se han evidenciado en la composición de las HDL durante la respuesta inflamatoria son el incremento de los niveles de triglicéridos, colesterol libre, ceramidas y glucosilceramidas, así como la disminución en los niveles de ésteres de colesterol y fosfolípidos, lo que en consecuencia modifica sus funciones. Aunque durante la respuesta inflamatoria aguda se da un cambio en la composición de las HDL que disminuye su capacidad antiinflamatoria, se ha encontrado que algunos componentes inflamatorios pueden ser regulados por esta lipoproteína, como ocurre con los inflamasomas (Aguilar-Salinas y Melgarejo-Hernández, 2011; Marín-Palma, *et al.*, 2017).

1.3. Alimentos y su actividad anti-inflamatoria

Los alimentos forman parte importante en el mantenimiento de la salud no solo porque proveen nutrimentos necesarios y esenciales para las funciones del organismo también porque muchos de sus metabolitos secundarios tienen actividad pro y anti-inflamatoria los que podrían favorecer la homeostasis al mantener un balance entre la inflamación y la anti-inflamación, además de servir de complemento en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como las crónicas no transmisibles (Medina-Remón, *et al.*, 2017).

Los alimentos naturalmente son vehículos de una amplia variedad de compuestos, que reciben diversas denominaciones: fitoquímicos, fitonutrimentos, nutraceuticos, y otros referidos a las sustancias activas que tienen un papel en la modulación de la respuesta anti-inflamatoria. Los

que inducen estas funciones son entre otros, los compuestos fenólicos, alcaloides, terpenoides, flavonoides, isotiocianatos como el sulforafano, carotenoides, y los ácidos grasos poli-insaturados, que a su vez representan subgrupos con una amplia gama de metabolitos con reconocida actividad antiinflamatoria (Bellik, *et al.*, 2012; Hadad y Levy, 2012; Medina-Remón, *et al.*, 2017; Pinazo-Durana y Boscá-Gomarc, 2012; Salminen, *et al.*, 2012; Young-Joon, 2008). El fruto de granada, es uno de estos alimentos, a los que se les ha atribuido diversas propiedades tanto anti-inflamatorias, antioxidantes como antitumorígenas por su contenido de antocianinas y elagitaninos (Palu, *et al.*, 2008; Wagner, *et al.*, 2013).

1.3.1. Granada

El granado es un pequeño árbol frutal caducifolio de la familia *Punicaceae* que se cultiva en áreas templadas y subtropicales, dando como fruto la granada. Este árbol es probablemente originario de la región irano-turania, se ha naturalizado en la zona mediterránea e introducido en Sudamérica, México, Sudáfrica y Australia; cultivada en áreas templadas y subtropicales (Day y Wilkins, 2011; López-Mejía, *et al.*, 2010).

Tabla 1. Información nutricional de la granada por 100 g de porción

	Por 100 g de porción comestible	Por unidad (275 g)		Por 100 g de porción comestible	Por unidad (275 g)
Energía (Kcal)	34	33	Sodio (mg)	5	4,8
Proteínas (g)	0,7	0,7	Potasio (mg)	275	265
Lípidos totales (g)	0,1	0,1	Fósforo (mg)	15	14,4
Hidratos de carbono (g)	7,5	7,2	Selenio (µg)	0,6	0,6
Fibra (g)	0,2	0,2	Tiamina (mg)	0,02	0,02
Agua (g)	91,5	88,1	Riboflavina (mg)	0,02	0,02
Calcio (mg)	8	7,7	Equivalentes niacina (mg)	0,3	0,3
Hierro (mg)	0,6	0,6	Vitamina B6 (mg)	0,11	0,11
Magnesio (mg)	3	2,9	Vitamina C (mg)	5,7	5,5
Zinc (mg)	0,3	0,3	Vitamina A: Eq. Retinol (µg)	3,5	3,4

*Tabla de Composición nutricional de la granada en porciones comestibles recomendadas por la Fundación Española de Nutrición.

La granada ofrece varios beneficios para la salud cardiovascular y múltiples aportaciones al organismo como su actividad antioxidante por las propiedades nutrimentales que se muestran en la Tabla 1. Ha sido considerada superior a otros productos ricos en antioxidantes, como el vino o los mismos arándanos (López-Mejía, *et al.*, 2010). La granada tiene diversos componentes fitoquímicos que le dan las propiedades de medicina alterna antes mencionados como son los taninos que se pueden dividir en dos, taninos condensados o proantocianidinas y taninos hidrolizables.

1.3.1.1. Taninos

Los taninos, son compuestos fenólicos, no nitrogenados, solubles en agua pero no en solventes orgánicos. Son metabolitos secundarios de las plantas que pueden ser ésteres de ácido gálico o sus derivados unidos a una amplia variedad de poli oles, catequina o núcleos triterpenoides (galotaninos (GT), elagitaninos (ET) o taninos complejos), o bien oligómeros o polímeros de proantocianidinas que pueden poseer diferente acoplamiento inter-flavonil u otros patrones de sustitución (TC) (Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015). Abundan en las cortezas de los Robles y los Castaños, entre otros árboles. La fórmula $C_{14}H_{14}O_{11}$, considerada en algunos libros como la del tanino común, es sólo aproximada, ya que son polímeros complejos. La mayor parte se clasifican en base a su monómero base (ácido gálico, ácido elágico, flavan-3-oles y floroglucinol). Estos se ensamblan en estructuras poliméricas de alto peso molecular, con distinta capacidad de unión a proteínas u otras macromoléculas y susceptibilidad a la hidrólisis química o enzimática en condiciones *in vitro* lo que determina su clasificación en taninos condensados (TC, proantocianidinas) e hidrolizables (TH, galo y elagi-taninos) (López-Mejía, *et al.*, 2010; Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015) lo cuales tienen distintas propiedades con diferentes actividades biológicas.

1.3.1.1.1. Taninos condensados o proantocianidinas

Los taninos condensados muestran diversas propiedades fisicoquímicas con diversas actividades biológicas: propiedades antioxidantes, quimio-terapéuticas, anti-inflamatorias y antimicrobianas. Sin embargo, por su incapacidad para ser hidrolizados, se les ha involucrado en diversas actividades anti-nutricionales (secuestro de micronutrientes). Los TC son el

resultado de la polimerización de unidades de flavan-3-ol como la catequina, la epicatequina o la leucocianidina unidos mediante enlaces C-C y carentes de un núcleo glucídico. Los tres grupos representativos de TC son las procianidinas, proantocianidinas, prodelfinidinas y profisetinidinas (López-Mejía, *et al.*, 2010; Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015).

1.3.1.1.2. Taninos hidrolizables

Los TH por el contrario a los TC, poseen un núcleo glucídico (generalmente glucosa), son más susceptibles a hidrólisis en condición fisiológica, permiten la liberación gradual de sus componentes primarios. Diferentes TH aislados de plantas comestibles y no comestibles, han mostrado actividades biológicas como ser: anti-tumorales, anti-mutágenicos, anti-diabéticos y anti-microbianos (Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015). Sin embargo, su capacidad de hidrólisis puede acarrear un problema, debido a que sufre transformaciones cuando se le almacena. Los TH están compuestos de ésteres de ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico) o el ácido elágico (4', 5,5', 6,6'-ácido hexahidroxidifenico-2, 6,2',6'-dilactona) unidos a una unidad central de carbohidrato y su nombre hace referencia a su fácil capacidad para hidrolizarse en presencia de ácidos, bases o enzimas tanto *in vitro* como *in vivo* (Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015).

2. ANTECEDENTES

Las propiedades nutricionales y benéficas que tiene la granada ha generado interés para estudiar su efecto anti-inflamatorio principalmente *in vitro* y poco analizada *in vivo*. En 2010, Lee y *col.*, realizaron ensayos *in vitro* en células RAW 264.7 inducidas con LPS para inhibir el óxido nítrico y así identificar los taninos hidrolizables de la granada roja capaces de disminuir la inflamación; los taninos que tuvieron mayor capacidad inhibitoria de inflamación fueron punicalagina, punicalina, estricinina A y granatina B; la granatina B tuvo mayor efecto inhibitorio en niveles del óxido nítrico inducido en el gen *COX-2* y la óxido nítrico sintasa. Por su parte Sarker y *col.* en 2012, usaron ratones y ratas para evaluar la actividad antiinflamatoria y analgésica de un extracto orgánico de polvo de flor de granada. El potencial anti-inflamatorio agudo se evaluó mediante el método del edema de la pata trasera inducido por carragenina de Winer, *et al.*, 1962, donde concluyeron que la granada puede contrarrestar la inflamación aguda, probablemente por la inhibición de la enzima ciclooxigenasa y posterior

inhibición de síntesis de prostaglandinas. También BenSaady *col.*, en 2017, cultivaron células RAW264.7 en presencia y ausencia de LPS (1µg/ml); analizaron la producción de nitritos, interleucina-6 (IL-6), Prostaglandina E-2 (PGE-2) y ciclooxigenasa 2 (COX-2). Se extrajeron 4 fitatos, ácido elágico, ácido gálico y punicalagina A y B de la granada roja. Los resultados obtenidos mostraron que el ácido elágico (50 µg / ml) disminuyó la producción máxima de nitrito, el ácido elágico, el ácido gálico y la punicalagina A y B (50, 100, 150, 200 µg / ml) suprimieron la producción de PGE-2 e IL-6 pero no hubo expresión del gen COX-2 con ningún fitato extraído.

2.1. Microencapsulado de granada (*Punica granatum*)

A pesar de las múltiples propiedades de la granada, éste fruto no se incorpora en la dieta cotidiana, esto es porque las personas no tienen la disponibilidad de consumir este fruto debido a lo meticulosos que es el proceso de pelado, también la falta de consumo cotidiano se debe a que es un fruto de temporada. En el Laboratorio de Nutrigenómica del Dr. Betanzos, en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, se elaboró un microencapsulado de granada roja (Estrada-Luna, *et al.*, 2019). con el propósito de crear un producto estable que pudiera consumirse en cualquier época del año. El polvo se puede disolver en agua, y se convierte en una bebida de granada conservando las propiedades funcionales del fruto.

2.1.1. Microencapsulación

La encapsulación se puede definir como una técnica por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa dando así el término microencapsulación (Huertas, 2010). En la industria alimentaria, la técnica de microencapsulación ha permitido solucionar algunos problemas limitando las aplicaciones de ingredientes y aditivos alimenticios, puesto que puede controlar la eliminación de saborizantes, así como reducir volatilidad, higroscopicidad y reactividad incrementando la estabilidad de productos bajo condiciones ambientales adversas (Favaro-Trindade, *et al.*, 2010).

La microencapsulación, es una alternativa factible que permite la protección de compuestos biocativos y su liberación controlada aumentando la vida útil del producto. (Huertas, 2010)

2.1.1.1. Secado por aspersión

El secado por aspersión es un método de microencapsulación ampliamente utilizado en la industria que consiste en la dispersión de la sustancia a encapsular en el agente encapsulante seguido de una atomización de la muestra en una cámara a alta temperatura, el solvente se evapora instantáneamente y el material activo queda atrapado dentro de una película de material encapsulante (Figuroa, *et al.*, 2016).

Este método es el más utilizado en la industria alimentaria para la conservación de nutrimentos como ejemplo: vitaminas, ácido fólico, aromas, orégano, citronela, aceite de cardamomo, probióticos, lípidos, ácido linoléico, aceites vegetales; minerales como hierro; pigmentos de antocianina y leche entre otros más ((Favaro-Trindade, *et al.*, 2010; Wandrey, *et al.*, 2010).

La conveniencia del uso de esta técnica radica en los tiempos cortos de producción, la factibilidad económica y el uso de bajas temperaturas lo cual es un parámetro crucial para aquellos productos sensibles al calor, debido a que promueve una alta retención de sabor, color y nutrientes (Guevara, *et al.*, 2016).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La inflamación es un proceso del organismo producido por el sistema inmunológico, ante casos como traumatismos, necrosis, dañado por agentes químicos o físicos, entre otros. Esencialmente, es una respuesta protectora con el fin de aislar, contener la lesión, destruir al agente agresor y posteriormente reparar al tejido dañado para su correcto funcionamiento. Durante este proceso de defensa natural el flujo de sangre se incrementa en el área afectada produciendo una acumulación de líquidos como medida de protección, esto a su vez desarrolla síntomas normales y específicos de la inflamación como dolor, calor, rubor y edema, además de pérdida de funcionalidad del área afectada (Herrera, 2014). Esta respuesta fisiológica normal, puede comenzar cuando haya o no una agresión, e incluso cuando no se detiene cuando debería terminar, evolucionan a una inflamación crónica causando daños como, destrucción tisular, necrosis, cicatrización y angiogénesis, disminución de las HDL y el aumento de colesterol y de las LDL formando una estría grasa provocando aterosclerosis, entre otros daños (Aguilar-Salinas y Melgarejo-Hernández, 2011; Marín-Palma, *et al.*, 2017; Herrera, 2014). En el tratamiento de la inflamación, se emplean

medicamentos que suelen tener efectos secundarios o no todas las personas los pueden consumir, tal es el caso de niños o mujeres embarazadas o lactando. De tal manera, que es deseable buscar alternativas especialmente de origen natural, “nobles” para el organismo y que ayuden a disminuir o contrarrestar los efectos de la inflamación. Aunque existen pocos estudios que sugieren que componentes del fruto de granada tienen propiedades anti-inflamatorias, este hecho no está plenamente demostrado *in vivo* ya que la gran mayoría de los reportes, se han realizado *in vitro* (BenSaad, *et al.*, 2017; Lee, *et al.*, 2010; Sarker, *et al.*, 2012). En este trabajo se empleó un modelo experimental de inflamación aguda, lo que resulta en un reto interesante para poder establecer si la granada roja tiene propiedades anti-inflamatorias. Por lo que surge la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es el efecto de la administración de un microencapsulado de granada roja (*Punica granatum*), en ratas Wistar macho, en un modelo de inflamación aguda inducido por un lipopolisacáridos de *E. coli*?

4. JUSTIFICACIÓN

Las propiedades antitérmicas, analgésicas y especialmente anti-inflamatorias de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) hacen que su prescripción sea de las más frecuentes en los Sistemas de Salud. El gasto por el consumo de AINEs es muy elevado y si se suman los gastos producidos por la atención médica y manejo de los enfermos con efectos secundarios importantes principalmente gastrointestinales, el gasto monetario es de aproximadamente 325 millones de euros a nivel mundial (Gabaa, *et al.*, 2015), sin contabilizar a las personas que se auto-medican (Anexo 1) (Pérez, *et al.*, 2004). La administración de los AINEs debe ser cuidadosamente evaluada desde diferentes puntos de vista como el económico, legal y con mayor ímpetu el de la salud, ya que su uso desmedido, descontrolado y sin restricción o regulación hacia la población en general (Gabaa, *et al.*, 2015), puede causar problemas importantes por su administración sin supervisión o en periodos prolongados y dosis altas (Brechmann, *et al.*, 2019; Gabaa, *et al.*, 2015) debido a los efectos secundarios que pueden provocar en ciertos individuos como ulceraciones, desarrollo de estenosis, procesos inflamatorios variables como la colitis y la isquemia, que son los efectos colaterales más comunes, (Anexo 2) y que hay que tener presentes (Brechmann, *et al.*, 2019; Gabaa, *et al.*,

2015; Pérez, *et al.*, 2004). Debido a ello se buscan alternativas no farmacológicas que ayuden a contrarrestar la inflamación aguda sin tener efectos secundarios y no afectar al tratamiento que se esté llevando a cabo en el individuo y a su vez, que la inflamación no progrese a una inflamación crónica. Desde épocas milenarias se ha empleado la medicina tradicional para el tratamiento de una gran cantidad de enfermedades como diarrea, infecciones urinarias, tratamientos en colesterol y triglicéridos, asma, artritis, entre otras (Gallegos-Zurita, 2016). La granada es un fruto rico en nutrientes fitoquímicos bioactivos con propiedades médicas (Olapour y Najafzadeh, 2010; Shukla, *et al.*, 2008). Se ha reportado el potencial anti-inflamatorio de diferentes variedades de granada (Olapour y Najafzadeh, 2010; Shukla, *et al.*, 2008). Durante la última década, la fruta de la granada ha ganado una gran reputación como un suplemento dietético y un alimento funcional debido a la evidencia científica sobre efectos positivos a la salud (Basu y Penugonda, 2009; Johanningsmeier y Harris, 2011; Jurenka, 2008; Lansky y Newmana, 2007; Sreekumar, *et al.*, 2014). La granada contiene fitoquímicos, como flavonoides, flavonoles, flavonas, ácidos grasos conjugados, taninos hidrolizables y compuestos relacionados que se cree que son responsables de varias actividades biológicas y farmacológicas (Ismail, *et al.*, 2012; Lansky y Newmana, 2007; Rahimi, *et al.*, 2012). Existen reportes científicos sobre el efecto anti-inflamatorio *in vitro* del fruto, pero dicha actividad no se ha mostrado *in vivo* (BenSaad, *et al.*, 2017; Lee, *et al.*, 2010; Sarker, *et al.*, 2012), por lo tanto, se pretende evaluar el efecto anti-inflamatorio *in vivo* empleando un modelo animal tratado con LPS con la finalidad de contar con alternativas no farmacológicas para el tratamiento de la inflamación aguda.

5. OBJETIVOS

5.1.OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto anti-inflamatorio de un microencapsulado de granada roja (*Punica granatum*) en ratas Wistar macho con inflamación aguda inducida por lipopolisacárido de *E. coli*.

5.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Evaluar la respuesta inmune, en ratas Wistar macho acondicionadas o no con microencapsulado de granada roja y retadas o no con LPS a través del conteo de glóbulos blancos en sangre.
- 2) Evaluar el metabolismo de los lípidos en ratas Wistar macho alimentadas o no con microencapsulado de granada roja y retadas o no con LPS a través de la determinación de su perfil lipídico.
- 3) Determinar el estado inflamatorio en ratas Wistar macho, acondicionadas o no con microencapsulado de granada roja y retadas o no con LPS, mediante el análisis de las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α a nivel molecular (RNAm) y protéico.

6. HIPOTESIS

El microencapsulado de granada tiene propiedades anti-inflamatorias que reducen la inflamación aguda inducida con LPS de *E. coli* en ratas Wistar macho.

7. METODOLOGÍA

7.1.Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo experimental-longitudinal. Con un seguimiento de 31 días.

7.2.Consideraciones éticas

El protocolo experimental se sometió a aprobación por los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, obteniendo carta de aprobación de ambos comités (Comité de investigación y Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL)) con el número de registro PT-19-102. Se siguieron las recomendaciones estándar para el cuidado de los animales establecidos (NOM-062-ZOO, 1999).

7.3.Diagrama metodológico del proyecto

El proceso metodológico a seguir se describe esquemáticamente en la Figura 5.

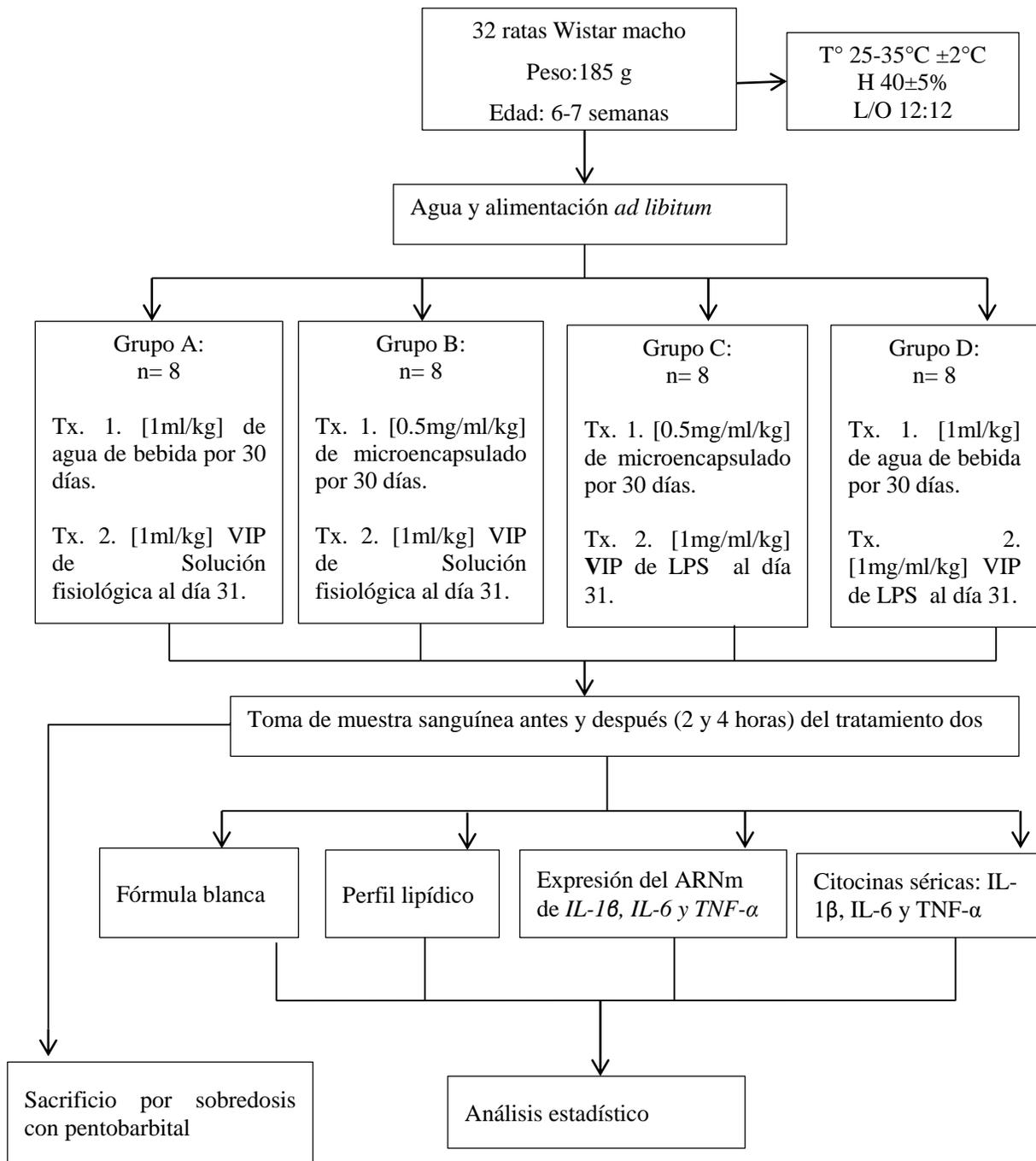


Figura 5. Diagrama de flujo metodológico.

7.4. Definición de grupos de estudio

- **Grupo A o Control negativo:** Ratas Wistar macho sanas alimentadas e hidratadas de forma convencional *ad libitum*.

- **Grupo B o Acondicionadas:** Alimentadas con el microencapsulado de granada roja (ME).
- **Grupo C o Probando:** Alimentadas con el microencapsulado de granada roja (ME) y retadas con LPS.
- **Grupo D o Control positivo:** Suministro de alimento convencional y reto con LPS.

7.5.Criterio de inclusión

Ratas Wistar macho sanos de 185 g de peso y de 6-7 semanas de edad.

7.6.Criterio de exclusión

Enfermedad que presentaran los animales fuera del contexto del estudio de investigación y afecten los resultados como enfermedades de vías respiratorias o parasitosis.

7.7.Criterio de eliminación

Aquellos animales que murieran durante el desarrollo de la investigación.

7.8.Tamaño de muestra

Se calculó el tamaño de muestra “n” mediante la fórmula para población finita de Aguilar-Barojas, 2005 (Anexo 3) tomando como referencia la “N” utilizada en Saeidienik, *et al.*, 2018 y de investigaciones realizadas en el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos del Departamento de Biología Molecular, INCICH por el Dr. Óscar A. Pérez Méndez (información personal).

7.8.1. Cálculo de la muestra

n: ?

N: 60

Z: 95%: 1.96

p: 50%= 0.5

q: 50%= 0.5

E: 4= 0.4

Sustitución:

$$n = \frac{1.96^2(0.5)(0.5)}{(0.4^2(60 - 1)) + (1.96^2(0.5)(0.5))} = 6.04$$

Se tomó en cuenta un 20% de pérdidas de muestra por alguna situación imprevista, por lo cual la “n” calculada fue de 8 ratas por grupo dando un total de 32 ratas.

7.9. Manejo general de los animales de experimentación

Para el desarrollo de este estudio, los animales de experimentación fueron mantenidos y trabajados en el Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH), distribuidas en 8 jaulas de 50 X 40 cm, cada una con 4 ratas, a una temperatura entre 25-35°C ±2°C, una humedad de 40±5% y ciclos de luz oscuridad de 12/12.

7.10. Alimentación de los animales de experimentación

El alimento y el agua de bebida fueron proporcionados *ad libitum*. El alimento fue tipo croqueta para roedores de laboratorio marca LABDIET® (Anexo 4) del Bioterio del mismo Instituto.

7.11. Modelo experimental

Se realizaron dos tratamientos durante la experimentación que se describen a continuación.

7.11.1. Tratamiento uno (Tx1)

Administración de una dosis diaria mediante cánula, del ME o placebo, durante 30 días en horario controlado y considerando el peso diario de cada rata.

- Grupo A (Control negativo): [1mL/kg] de placebo (Agua de bebida).
- Grupo B (Acondicionado): [0.5mg/mL/kg] de microencapsulado de granada roja.
- Grupo C (Probando): [0.5mg/mL/kg] de microencapsulado de granada roja.
- Grupo D (Control positivo): [1mL/kg] de placebo (Agua de bebida).

Nota: El microencapsulado se disolvió en agua destilada [1g/2mL].

7.11.1.1. Administración del microencapsulado

El microencapsulado de jugo de granada fue proporcionado por el Dr. Gabriel Betanzos Cabrera, profesor e investigador de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, el cual fue elaborado como se describe en Estrada-Luna, *et al.*, 2019.

Las ratas fueron suplementadas con el microencapsulado mediante el uso de una cánula metálica de 80 mm de largo, curvatura de 30° y punta roma, que ayuda a la mejor ingestión por la tráquea, directo al esófago, sin causar lesión al animal.

7.11.2. Tratamiento dos (Tx2)

Se indujo inflamación con una sola dosis de LPS (*E. coli*, cepa 055:B5) por vía intraperitoneal (V IP) al día 31 en el mismo horario en que se administraba el ME.

- Grupo A (Control negativo): [1mL/kg] de solución fisiológica
- Grupo B (Acondicionado): [1mL/kg] de solución fisiológica
- Grupo C (Probando): [1mg/1mL/kg] de LPS
- Grupo D (Control positivo): [1mg/1mL/kg] de LPS

Nota: el LPS se disolvió en Solución Fisiológica (0.9% de NaCl) (Moravcová, *et al.*, 2018).

7.11.2.1. Administración de lipopolisacáridos (LPS)

La administración de LPS fue sin anestesia previa, y según lo reporta BenSaad, *et al.*, 2017 y Lee, *et al.*, 2010. El efecto del LPS en la rata se mantiene de 6-8 horas.

7.12. Recolección de datos

7.12.1. Toma de muestra sanguínea

La primera muestra de sangre se tomó al día 30 después de ocho horas de la administración de ME (T0= tiempo basal o tiempo inicial), la segunda toma al día 31, 2 horas después de la inducción con LPS (T1= Tiempo 1). Ambas tomas fueron realizadas por punción de la vena cava lateral de la cola de la rata, sin emplear anestesia, utilizando una trampa para roedores que permite la fácil captura y liberación de las ratas sin dañarlas. El mecanismo de bloqueo es automático, por lo cual, el animal no puede escapar después de ser atrapado. La tercera muestra fue obtenida a las 4 horas del tratamiento 2 por la aorta abdominal (T2= Tiempo 2),

sedando a las ratas con 1mg/1mL/kg de pentobarbital sódico intraperitoneal.

7.12.2. Sacrificio de animales de experimentación

Después de coleccionar las muestras de sangre, los animales fueron sacrificados mediante una administración de 50 mg/kg de pentobarbital (Salamanca, 2005).

7.12.3. Mediciones bioquímicas

7.12.3.1. Fórmula blanca

Se obtuvo sangre total en tubos BD Microtainer de 500 µl con 1.0 mg de K₂EDTA. Las muestras se procesaron en el Laboratorio Central del INCICH, en donde se analizaron cualitativamente, usando un equipo automatizado para Biometrías Hemáticas de la marca Beckman coulter Act diff 2 (Coulter, 2000-2019).

7.12.3.2. Perfil lipídico (Colesterol Total, HDL, TG)

En el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos del Departamento de Biología Molecular, INCICH, se determinó el Colesterol Total (CT), Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y Triglicéridos (TG), mediante métodos enzimáticos colorimétricos (RANDOX, UK) partiendo de 5 ml de plasma-1 mg de heparina (Anexo 5).

7.12.3.3. Medición de la expresión de RNAm de citocinas (*IL-1β*, *IL-6* y *TNF-α*)

La determinación de la expresión del Ácido Ribonucleico mensajero (RNAm) de las citocinas mencionadas, se realizó por Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), en el Laboratorio de Inmunología del INCICH. Para ello, se extrajo RNA total empujando 400 µL de sangre total de cada rata mezclada con 700 µL de TriPure Isolation Reagent, (Roche, Mannheim, Germany) para más detalle ver Anexo 6. Una vez extraído el RNA total se realizó la síntesis de c-DNA de cada gen específico. Los iniciadores específicos (primers) para la cuantificación de la expresión de cada citocina se muestran en la Tabla 6. Como gen endógeno o de referencia se utilizó gen de la hipoxantina-guanina-fosforribosil-trasferasa (*HPRT*) La expresión relativa de cada gen se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Anexo 6).

7.12.3.4. Citocinas séricas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α)

La determinación de la concentración de citocinas en suero se realizó en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Farmacología del INCICH, mediante la técnica de ensayo inmunoenzimático ligado a inmunosorbente (ELISA) utilizando Kits comerciales de la marca Peprotech (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y 100 μ l de plasma de cada rata, con 0.1 mg de heparina (Anexo 7).

7.13. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a prueba de normalidad con el método estadístico de Kolmogórov-Smirnov. Los datos se expresaron para variables cuantitativas como la media \pm desviación estándar. Las comparaciones se hicieron empleando la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, teniendo como variables independientes al tiempo de toma de muestra y los grupos estudiados. Las diferencias entre las medias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 23 y Microsoft Excel versión 10.

8. RESULTADOS

Todos los animales de experimentación aumentaron de peso gradualmente de una manera similar hasta el término del Tx1 (día 30). Cabe resaltar que, los animales de experimentación se adaptaron paulatinamente a las maniobras de consumo en la primera semana del Tx1; en los grupos alimentados con ME fue más fácil la manipulación con cánula. Ningún grupo perdió el apetito hasta terminar el Tx1, a pesar del estrés sometido durante T0. A los pocos minutos de iniciar el Tx2 en los grupos C y D que fueron tratados con LPS, las ratas mostraron los siguientes signos: pelo erizado, debilidad, letardo, aumento de sueño, aumentó su frecuencia respiratoria y cardíaca a la manipulación, sin apetito ni sed, durante las 4 horas que duró el Tx 2, en cambio, los grupos A y B no mostraron signos que indicarán una alteración en el organismo. Durante la toma de muestra en el T1 todos los animales de experimentación no mostraron agresividad, solo inquietud al tratar de capturarlas en el cepo al igual que durante la aplicación de anestesia para iniciar el T2.

Cabe mencionar que hubo descenso de 4 ratas durante la etapa de experimentación; en la primera semana del Tx1, murieron dos ratas pertenecientes al grupo B, las cuales se descartaron para el análisis de los resultados y durante la toma de muestra en el T1 murieron dos ratas más, una del grupo A y otra del grupo B sin embargo, se consideró incluir los datos recolectados antes de su muerte para los análisis estadísticos.

8.1.Fórmula blanca

La tabla 2 muestra la cantidad de leucocitos que presentó cada grupo de ratas alimentadas o no con el ME. Se puede observar un aumento de leucocitos en los grupos A y B a partir de las 2 horas posteriores a la inoculación VIP de solución fisiológica (T0: 10.55 ± 2.46 y 11.62 ± 0.78 respectivamente; T1: 13.76 ± 3.83 y 13.30 ± 3.40 respectivamente) y una caída posterior respecto al T0 en el T2 (4.92 ± 1.14 y 4.50 ± 0.85 respectivamente); por el contrario, los grupos C y D presentaron una baja en el porcentaje de leucocitos en ambos tiempos, comparados con la cuenta basal (T0: 10.55 ± 2.46 y 11.62 ± 0.78 respectivamente; T1: 4.96 ± 1.91 y 6.92 ± 1.36 respectivamente y T2: 2.60 ± 1.14 y 4.90 ± 1.70 respectivamente) .

Al realizar un análisis de las cuentas de leucocitos entre todos los grupos de experimentación por cada tiempo muestreado, se observó que el grupo C presentó un menor número de leucocitos en todos los tiempos en comparación con los demás grupos (En el T1: A vs C $p=0.001$ y B vs C $p=0.008$; en el T2: B vs C $p=0.006$ y C vs D $p=0.016$) (Tabla 2).

En cuanto a los neutrófilos que presentó cada grupo experimental, se puede observar una disminución de más del doble de neutrófilos en los grupos Control negativo y Acondicionado, en el T1 (T0: 5.85 ± 3.68 y 4.35 ± 4.96 respectivamente; T1: 2.16 ± 0.57 y 1.36 ± 0.63 respectivamente) y una recuperación en el T2 (10.24 ± 14.9 y 51.95 ± 21.11 respectivamente); en cambio, los grupos Probando y Control positivo aumentaron el porcentaje de neutrófilos a las 2 y 4 horas posteriores a la inducción a inflamación con LPS, comparados con la cuenta basal (T0: 3.80 ± 3.15 y T0= 1.40 ± 0.17 respectivamente; T1: 11.68 ± 15.52 y 29.35 ± 18.62 respectivamente y T2: 51.95 ± 21.11 y 52.46 ± 44.65 respectivamente) .

Al comparar las cuentas de neutrófilos entre grupos en el mismo tiempo se observó que el grupo D presentó un mayor número de neutrófilos en todos los tiempos en comparación con

los demás grupos (En el T1: B vs D $p= 0.028$; en el T2: A vs D $p= 0.015$; B vs D $p= 0.020$ y C vs D $p= 0.046$) (Tabla 2).

Como se puede observar en la Tabla 2, hubo una disminución de linfocitos en los grupos A, C y D en el T1 y T2 comparados con la cuenta basal (T0: 88.72 ± 6.42 , 91.80 ± 7.61 y 83.90 ± 12.47 respectivamente; T1: 86.60 ± 15.80 , 66.91 ± 23.68 y 62.12 ± 5.00 respectivamente y T2: 65.72 ± 15.67 , 40.75 ± 16.27 y 22.56 ± 7.07 respectivamente); por el contrario, el grupo B presentó un aumento en el porcentaje de linfocitos en el T1, comparado con la cuenta basal (T0: 90.12 ± 4.37 y T1: 96.70 ± 0.52) y posteriormente disminuyó en el T2 (T2: 66.66 ± 26.63).

Al comparar las cuentas de linfocitos entre todos los grupos, se observó que el grupo C presentó un menor número de linfocitos en todos los tiempos en comparación con los demás sin embargo, el grupo D fue estadísticamente más significativo que los demás (En el T1: A vs D $p= 0.009$; B vs D $p= 0.003$; en el T2: A vs D $p= 0.001$; B vs D $p= 0.002$ y C vs D $p= 0.006$) (Tabla 2).

Se observó un aumento de monocitos en los grupos Control negativo a las 2 y 4 horas posteriores a la inducción a inflamación con LPS, comparados con la cuenta basal (T0: 0.47 ± 0.43 ; T1: 1.03 ± 1.44 y T2: 0.60 ± 0.51); por otro lado, el grupo Acondicionado aumento su porcentaje de monocitos en el T1 y posteriormente disminuyo en el T2 comparado con la cuenta basal (T0: 0.50 ± 0.21 ; T1: 0.53 ± 0.30 y 0.33 ± 0.25); por el contrario, el grupo Probando presento una disminución en el porcentaje de monocitos en el T1 y T2, comparado con la cuenta basal (T0: 0.90 ± 1.30 ; T1: 0.31 ± 0.49 y T2: 0.47 ± 0.55); por otro lado, el grupo Control positivo presento una disminución en el porcentaje de monocitos en el T1, comparado con la cuenta basal (T0: 0.43 ± 0.23 ; T1: 0.12 ± 0.05) y posteriormente un aumento en el T2 (T2: 0.70 ± 0.79 respectivamente) (Tabla 2).

Al comparar las cuentas de monocitos entre todos los grupos de experimentación en el mismo tiempo, se observó que el grupo C presento un menor número de monocitos siendo más evidente en el T1 (En el T1: C vs D $p= 0.024$) (Tabla 2).

Tabla 2. Fórmula blanca en ratas Wistar macho

	T0 (Basal)					T1 (2 horas post-inducción)					T2 (4 horas post-inducción)				
	A n=8	B n=6	C n=8	D n=8	<i>P</i>	A n=8	B n=6	C n=8	D n=8	<i>P</i>	A n=8	B n=6	C n=8	D n=8	<i>P</i>
Leucocitos %	10.55±2.4 6	11.62±0.7 8	16.16±2.63	14.00±2.04	NS	13.76±3.83	13.30±3.40	4.96±1.91	6.92±1.36	0.001 [^] 0.008 [°] 0.028 [*]	4.92±1.14	4.50±0.85	2.60±1.14	4.90±1.70	0.006 [°] 0.016 [*]
Neutrófilos %	5.85±3.68	4.35±4.96	3.80±3.15	1.40±0.17	NS	2.16±0.57	1.36±0.63	11.68±15.5 2	29.35±18.6 2	0.028 [*]	10.24±14.9	1.66±0.55	51.95±21.1 1	52.46±44.6 5	0.006 [*] 0.049 [^] 0.015 [*] 0.002 [°] 0.020 [*] 0.046 [*]
Linfocitos %	88.72±6.4 2	90.12±4.3 7	91.80±7.61	83.90±12.4 7	NS	86.60±15.8 0	96.70±0.52	66.91±23.6 8	62.12±5.00	0.009 [^] 0.003 [*]	65.72±15.6 7	66.66±26.6 3	40.75±16.2 7	22.56±7.07	0.011 [^] 0.001 [^] 0.014 [°] 0.002 [*] 0.006 [*]
Monocitos %	0.47±0.43	0.50±0.21	0.90±1.30	0.43±0.23	NS	1.03±1.44	0.53±0.30	0.31±0.49	0.12±0.05	0.024 [*]	0.60±0.51	0.33±0.25	0.47±0.55	0.70±0.79	NS
Eosinófilos %	0.50±0.35	0.92±1.07	0.43±0.05	0.16±0.11	NS	0.70±0.36	0.70±0.60	0.70±0.14	0.27±0.17	0.008 [^]	0.46±0.29	0.33±0.15	1.22±0.60	0.63±0.61	NS
Basófilos %	4.45±7.15	4.10±3.79	2.93±3.23	14.10±12.1 2	NS	9.50±15.93	0.70±0.87	21.01±28.1 4	8.12±15.91	NS	22.98±19.9 7	31.00±27.3 7	5.60±9.69	23.63±39.6 3	NS

A= Control negativo; B= Acondicionado; C= Probando; D= Control positivo. *A vs B, ^A vs C, ^A vs D, °B vs C, °B vs D, °C vs D

En cuanto a los eosinófilos, se puede observar una disminución de éstos en los grupos A y B en el T1 y T2, comparados con la cuenta basal (T0: 0.50 ± 0.35 y 0.92 ± 1.07 respectivamente; T1: 0.70 ± 0.36 y 0.70 ± 0.60 respectivamente y T2: 0.46 ± 0.29 y 0.33 ± 0.15 respectivamente); por el contrario, C y D presentaron un aumento en el porcentaje de eosinófilos en ambos tiempos (T1 y T2), comparado con la cuenta basal (T0: 0.43 ± 0.05 y 0.16 ± 0.11 respectivamente; T1: 0.70 ± 0.14 y 0.27 ± 0.17 respectivamente; T2: 1.22 ± 0.60 y 0.63 ± 0.61 respectivamente). Al analizar las cuentas de eosinófilos entre todos los grupos de experimentación en el mismo tiempo, se observó que el grupo C presentó un mayor número de eosinófilos en todos los tiempos en comparación con los demás grupos sin embargo, el grupo D fue estadísticamente más significativo que los demás en el T1 (En el T1: A vs D $p= 0.008$) (Tabla 2).

Por otro lado, se puede observar un aumento de basófilos en el grupo A en el T1 y T2 con respecto al tiempo basal (T0: 4.45 ± 7.15 ; T1: 9.50 ± 15.93 ; T2: 22.98 ± 19.97); por el contrario, los grupos Acondicionado y Control positivo presentaron una baja en el porcentaje de basófilos en el T1 comparado con la cuenta basal (T0: 4.10 ± 3.79 y 14.10 ± 12.12 respectivamente; T1: 0.70 ± 0.87 y 8.12 ± 15.91 respectivamente) y posteriormente un aumento en el T2 (T2: 31.00 ± 27.37 y 23.63 ± 39.63 respectivamente) comparado con el tiempo basal; sin embargo, el grupo C presentó un aumento en el T1 comparado con la cuenta basal (T0: 2.93 ± 3.23 ; T1: 21.01 ± 28.14) y posteriormente una disminución en el T2 (T2: 5.60 ± 9.69).

Al realizar un análisis de las cuentas de basófilos entre todos los grupos de experimentación por cada tiempo muestreado, se observó que el grupo B presentó un mayor número de basófilos en el T2 (Tabla 2).

8.2.Perfil Lipídico

En la Tabla 3 se describe la concentración en mg/dL de colesterol total (CT) que presentó cada grupo estudiado. Se observa una disminución en la concentración de CT en los grupos A, C y D 4 horas posteriores al tratamiento con solución fisiológica o con LPS, comparados con la cuenta basal (T0: 63.23 ± 6.51 , 68.50 ± 13.09 y 64.07 ± 6.79 respectivamente; T2: 53.27 ± 5.17 , 62.81 ± 17.90 y 59.31 ± 5.73 respectivamente). Si se comparan las cuentas de CT entre los dos grupos tratados con LPS en el mismo tiempo, se puede observar que el grupo que presentó un

menor número de colesterol total fue el grupo C, sin embargo, hubo una diferencia significativa entre el grupo A y el D en el T1 (En el T1: A vs D $p= 0.049$).

Tabla 3. Perfil lipídico en ratas Wistar macho

	T0 (Basal)				T2 (4 horas post-inducción)			
	A n=8	C n=8	D n=8	<i>p</i>	A n=7	C n=8	D n=8	<i>p</i>
Colesterol Total mg/dL	63.23±6.51	68.50±13.09	64.07±6.79	NS	53.27±5.17	62.81±17.90	59.31±5.73	0.049 ^α
HDL mg/dL	27.37±7.68	32.00±5.66	31.50±5.60	NS	23.78±5.17	22.71±4.83	25.61±5.43	NS
Triglicéridos mg/dL	89.76±50.92	116.84±54.17	74.35±22.25	NS	59.87±20.67	221.38±97.01	173.71±66.43	0.004 [^] 0.003 ^α

A= Control negativo; C= Probando; D= Control positivo. [^]A vs C, ^αA vs D, ^αC vs D.

Como se muestra en la Tabla 3, la concentración en mg/dL de lipoproteínas de alta densidad (HDL) que presentó cada grupo experimental disminuyó en los grupos A, C y D en el T2, comparados con la cuenta basal (T0: 27.37±7.68, 32.00±5.66 y 31.50±5.60 respectivamente; T2: 23.78±5.17, 22.71±4.83 y 25.61±5.43 respectivamente). Al realizar la comparación de la concentración de HDL entre todos los grupos de experimentación en el mismo tiempo, se observó que el grupo C fue quien presentó una menor concentración de HDL en todos los tiempos respecto con los demás grupos.

Se observa una disminución en la concentración (mg/dL) de TG en el grupo Control negativo en el T2, comparado con el T0 (T0: 89.76±50.92; T2: 59.87±20.67); en cambio, la concentración de TG en los grupos Probando y Control positivo aumentaron en el T2 comparado con el tiempo basal (T0: 116.84±54.17 y 74.35±22.25 respectivamente; T2: 221.38±97.01 y 173.71±66.43 respectivamente), aumentando en el grupo C 1.89 veces más y en el grupo D 2.33 veces más comparados con T0. Cuando se realizó la comparación de la concentración de TG entre todos los grupos de experimentación en el mismo tiempo, se observó que el grupo D presentó una concentración menor de TG en todos los tiempos comparado con los demás grupos (En el T2: A vs D $p= 0.003$) (Tabla 3).

8.3. Medición de la expresión de RNAm de citocinas

Se describen en la Tabla 4 los niveles de RNAm de *IL-1 β* que presentaron los grupos de experimentación, en donde se observa un aumento de la expresión de *IL-1 β* en los grupos B, C y D 2 horas posteriores al tratamiento con solución fisiológica o LPS, comparados con su expresión basal (T0: 25.41 \pm 14.37, 42.44 \pm 14.23 y 46.69 \pm 10.9 respectivamente; T1: 44.18 \pm 24.77, 249.30 \pm 61.85 y 277.14 \pm 131.16 respectivamente), aumentando 5.87 veces más el grupo C y 5.93 veces más el grupo D en el T1. Al comparar los valores de *IL-1 β* de entre todos los grupos de experimentación en el T1 se observó que el grupo D presentó un mayor nivel de *IL-1 β* en comparación con los demás grupos (En el T1: A vs D $p= 0.001$; B vs D $p= 0.002$).

Los niveles de *IL-6* aumentaron en los grupos A y B en el T1, comparados con el T0 (T0: 4.21 \pm 1.69 y 4.08 \pm 2.35 respectivamente; T1: 6.07 \pm 2.37 y 5.14 \pm 2.17 respectivamente); por el contrario, disminuyó la expresión de *IL-6* en los grupos C y D a las 2 horas posteriores a la inducción a inflamación con LPS, comparados con el tiempo basal (T0: 5.31 \pm 3.00 y 4.38 \pm 2.56 respectivamente; T1: 1.52 \pm 1.03 y 1.84 \pm 1.27 respectivamente). Cuando se compara el nivel de *IL-6* entre todos los grupos en el mismo tiempo, se observó que el grupo D presentó una menor expresión de *IL-6* en el T1 en comparación con los demás grupos (En el T1: A vs D $p= 0.002$ y B vs D $p= 0.005$) (Tabla 4).

La expresión de *TNF- α* que presentó cada grupo estudiado se muestra en la Tabla 4, en donde se puede observar un aumento en todos los grupos (A, B, C y D) en el T1, comparado con el T0 de cada grupo (T0: 0.42 \pm 0.15, 0.24 \pm 0.58, 0.40 \pm 0.12 y 0.54 \pm 0.09 respectivamente; T1: 0.61 \pm 0.29, 0.32 \pm 0.16, 2.19 \pm 0.88 y 2.14 \pm 1.09 respectivamente); el aumento fue mayor en los grupos tratados con LPS respecto con T0 (C= 5.47 y D= 3.96 veces más). Al comparar la expresión de *TNF- α* entre todos los grupos de experimentación en el T1, se observó que el grupo C presentó una mayor expresión de *TNF- α* comparado con los demás (En el T1: A vs C $p= 0.001$; B vs C $p= 0.002$; C vs D $p= 0.037$).

Tabla 4. Expresión relativa de RNAm en ratas Wistar macho.

	T0 (Basal)					T1 (2 horas post-inducción)				
	A n=8	B n=6	C n=8	D n=8	<i>P</i>	A n=7	B n=5	C n=8	D n=8	<i>P</i>
<i>IL-1β</i>	44.40±19.4 6	25.41±14.37	42.44±14.2 3	46.69±10.9 8	NS	45.12±21.3 0	44.18±24.7 7	249.30±61. 85	277.14±131. 16	0.001 [^] 0.002 [°] 0.003 [^]
<i>IL-6</i>	4.21±1.69	4.08±2.35	5.31±3.00	4.38±2.56	NS	6.07±2.37	5.14±2.17	1.52±1.03	1.84±1.27	0.002 [^] 0.005 [°] 0.028 [*]
<i>TNF-α</i>	0.42±0.15	0.24±0.58	0.40±0.12	0.54±0.09	NS	0.61±0.29	0.32±0.16	2.19±0.88	2.14±1.09	0.001 [^] 0.002 [°] 0.037 [°]

A= Control negativo; B= Acondicionado; C= Probando; D= Control positivo. *A vs B, ^A vs C, °A vs D, °B vs C, °B vs D, °C vs D

8.4. Citocinas séricas

Como se puede observar en la tabla 5, la concentración de la proteína IL-1 β en pg/mL en los grupos A, C y D, disminuyó en el T1 y en el T2 respecto a su T0 (T0: 146.42 \pm 67.11, 46.77 \pm 32.99 y 48.91 \pm 16.63 respectivamente; T1: 50.75 \pm 16.11, 39.25 \pm 14.54 y 38.72 \pm 20.91 respectivamente; T2: 40.85 \pm 5.49, 44.92 \pm 11.38 y 23.87 \pm 15.21); por el contrario, el grupo B presentó un aumento en la concentración de IL-1 β en ambos tiempos, comparados con la cuenta basal (T0: 33.83 \pm 18.76; T1: 49.83 \pm 13.19 y T2: 45.20 \pm 11.90).

Al realizar un análisis la concentración de la proteína IL-1 β entre todos los grupos de experimentación por cada tiempo muestreado, se observó que el grupo D presentó una menor concentración de IL-1 β en todos los tiempos en comparación con los demás grupos (En el T2: A vs D $p=0.015$; C vs D $p=0.013$) (Tabla 5).

La concentración de la proteína IL-6 en pg/mL se describe en la Tabla 5, en la cual se puede observar una baja de IL-6 en el grupo A en el T1 y T2 comparado con el T0 (T0: 80.00 \pm 46.33; T1: 77.50 \pm 41.02; T2: 67.71 \pm 21.54); por otro lado, el grupo B tuvo un aumento en la concentración de IL-6 en el T2 comparado con T0 (T0: 86.83 \pm 50.70; T2: 118.00 \pm 36.69); en cambio, el grupo C disminuyó la concentración de IL-6 a las 2 y 4 horas posteriores a la inducción a inflamación con LPS, comparado con la cuenta basal (T0: 176.37 \pm 247.63, T1: 145.75 \pm 37.90 y T2: 125.37 \pm 52.97); sin embargo, el grupo D aumentó su concentración de IL-6 en ambos tiempos, comparado con el T0 (T0: 150.00 \pm 56.09, T1: 172.25 \pm 45.46 y T2: 160.12 \pm 55.01). Así mismo, al realizar la comparación de la concentración de IL-6 entre grupos en el mismo tiempo se observó que el grupo C presentó una menor concentración de IL-6 en todos los tiempos conparado con los demás grupos, siendo estadísticamente significativo en el T2 (En el T2: C vs D $p=0.013$).

Tabla 5. Citocinas séricas en ratas Wistar macho.

	T0 (Basal)				<i>P</i>	T1 (2 horas post-inducción)				<i>P</i>	T2 (4 horas post-inducción)				<i>P</i>
	A n=8	B n=6	C n=8	D n=8		A n=7	B n=5	C n=8	D n=8		A n=7	B n=5	C n=8	D n=8	
IL-1 β pg/mL	146.42 \pm 67.11	33.83 \pm 1 8.76	46.77 \pm 32.9 9	48.91 \pm 1 6.63	NS	50.75 \pm 1 6.11	49.83 \pm 1 3.19	39.25 \pm 14. 54	38.72\pm 20.91	NS	40.85 \pm 5.49	45.20 \pm 11. 90	44.92 \pm 1 1.38	23.87\pm1 5.21	0.015 [*] 0.013 ^{**}
IL-6 pg/mL	80.00 \pm 46.33	86.83 \pm 5 0.70	176.3 7 \pm 247 .63	150.00 \pm 56.09	NS	77.50 \pm 4 1.02	85.00 \pm 2 6.19	145.75 \pm 37 .90	172.25 \pm45.46	0.007 [^] 0.003 [^]	67.71 \pm 21.54	118.00 \pm 36 .69	125.37\pm 52.97	160.12 \pm 55.01	0.018 [^] 0.003 [^]
TNF- α pg/mL	81.98 \pm 49.36	125.50 \pm 104.17	86.12 \pm 16.8 9	73.37 \pm 4 8.56	NS	98.00 \pm 2 9.52	126.16 \pm 110.94	86.75 \pm 20. 56	85.62 \pm 29.75	NS	85.85 \pm 32.64	63.80 \pm 19. 25	89.25\pm3 2.18	60.50 \pm 2 2.62	0.031 ^{**}

A= Control negativo; B= Acondicionado; C= Probando; D= Control positivo. *A vs B, ^A vs C, ^A vs D, ^B vs C, ^B vs D, ^C vs D.

En la Tabla 5 se muestra la concentración de TNF- α en pg/mL que presentó cada grupo de ratas con o sin ME. El grupo A, a pesar de que presenta un ligero aumento de su concentración en el T1 con respecto a la cuenta basal, se puede considerar sin cambios importantes a lo largo del experimento (T0: 81.98 \pm 49.36; T1: 98.00 \pm 29.52 y T2: 85.85 \pm 32.64); por el contrario, el grupo B disminuyó su concentración en el T2 casi a la mitad de su concentración basal (T0: 125.50 \pm 104.17 y T2: 63.80 \pm 19.25), el grupo C tuvo un ligero aumento en la concentración de TNF- α en el T1 y T2 comparado con T0 (T0: 86.12 \pm 16.89, T1: 86.75 \pm 20.56 y T2: 89.25 \pm 32.18); por el contrario, el grupo D tuvo un aumento en la concentración de TNF- α 2 horas posteriores a la inducción a inflamación con LPS, comparado con T0 (T0: 73.37 \pm 48.56 y T1: 85.62 \pm 29.75) y posteriormente una disminución en el T2 de su cuenta basal (T2: 60.50 \pm 22.62). Al comparar las cuentas de TNF- α entre todos los grupos en el mismo tiempo, se observó que el grupo B presentó una menor concentración de TNF- α en el T2 en comparación con los demás.

9. DISCUSIÓN

El sistema inmunológico utiliza a la inflamación como un mecanismo de defensa contra agentes extraños (Collado, et al., 2008; Delves, et al., 2014; Júnior, et al., 2010; Maddelaine y Boris, 2014) con la consigna de librar al organismo de la causa inicial de agresión celular, y evitar la evolución de una inflamación aguda a una crónica que pueda llegar a provocar necrosis tisular. Por otro lado, se sabe que la inflamación crónica puede generar daño tisular irreversible, por lo cual se pueden tomar medidas farmacológicas como tratamiento para menguar dicha inflamación (Granados, et al., 2010; Herrera, 2014); sin embargo, muchos de los tratamientos farmacológicos anti-inflamatorios, esteroideos o no (AINE's) pueden llegar a tener efectos secundarios, como problemas gastrointestinales (Medina-Remón, et al., 2017), formación de úlceras gástricas o intestinales a cualquier nivel del órgano o incluso problemas como la aterosclerosis en casos extremos.

Existen en el mercado suplementos alimenticios naturales que tratan de minimizar los efectos de los AINE's, pero la gran mayoría de éstos no cuentan con un respaldo científico que acredite y certifique sus beneficios para la Salud.

En el presente estudio se investigó el probable efecto anti-inflamatorio que puede provocar la toma de un microencapsulado de granada roja, lo cual se ensayó en modelos experimentales con ratas Wistar macho y se realizaron inferencias de acuerdo a diversas mediciones indirectas de inflamación.

Se observó que los niveles basales de leucocitos disminuyeron una vez induciendo el grado inflamatorio en el grupo Probando, así como en el grupo Control positivo. La disminución de leucocitos fue muy notoria para ambos grupos, debido a que fue más del doble de su nivel basal. Una posible explicación de esto podría contemplarse por la destrucción natural que ocurre de glóbulos blancos al presentarse una invasión de un agente infeccioso al sistema inmunológico (García-González, *et al.*, 2012); sin embargo, se observó que dicha caída de leucocitos fue mayor aún en el grupo C, al cual se le administró el ME, por lo tanto, podría indicar que éste complemento alimenticio pudo influir en ello (Tabla 2).

Por otro lado, se sabe que los neutrófilos son un grupo de células cuya función principal es atenuar las infecciones micóticas y bacterianas (García-González, *et al.*, 2012), lo cual se puede observar en el comportamiento que tuvieron en este estudio. En un inicio se pudo

observar que los neutrófilos se encontraban en un rango del 1.40 ± 0.17 al 5.85 ± 3.68 % en los cuatro grupos de ratas ensayados; sin embargo, la cuenta de éstos bajó a la mitad, en el grupo A en el T1, pero aumentó al doble ($10.24 \pm 14.9\%$) en el T2, lo cual podría deberse a que, independientemente de que el inóculo haya sido con Solución Fisiológica, el simple hecho de realizar una incisión en el peritoneo de los animales les provocó una ligera respuesta inmunológica celular; por otro lado, el comportamiento del grupo B, alimentado con ME, bajó su número de neutrófilos del 4.35 ± 4.96 al 1.36 ± 0.63 % en el T1 y 1.66 ± 0.55 en el T2, lo cual podría estar reflejando un equilibrio inducido por el ME. Al analizar los grupos que fueron tratados con el LPS, se observa aumento mucho mayor de neutrófilos en el D de hasta 20 y 37 veces sus niveles basales (T1 y T2 respectivamente), pero también se observa que el grupo C, aumenta 13 veces sus niveles basales a las 4 horas posteriores al tratamiento con LPS y solo 3 veces en el T1. Este comportamiento, junto con las cuentas de leucocitos podrían sumar motivos para pensar que el ME tiene un efecto regulador de la respuesta inmunológica hasta este momento (Husari, *et al.*, 2014; Somade, *et al.*, 2019).

Como se sabe, los linfocitos son células que se encargan de proteger al organismo contra agentes invasores y disminuyen ante un agente infeccioso (García-González, *et al.*, 2012) lo cual, se pudo observar en los grupos tratados con LPS (Probando y Control positivo) que disminuyeron su porcentaje basal en el T1 y en el T2 (Tabla 2). La disminución de linfocitos puede ser de manera aguda o crónica, causando síntomas característicos (Territo, 2016) pero, para conocer qué tipo de linfocitopenia pudo desencadenarse sería necesario realizar un hemograma completo.

Por otro lado, el comportamiento de los monocitos en todos los grupos experimentales de este estudio, fueron porcentajes bajos encontrándose dentro de los parámetros normales (Goñi, *et al.*, 2011); sin embargo, los grupos que disminuyeron más su porcentaje de monocitos, fueron los grupos alimentados con ME (grupos B y C) que los otros grupos estudiados (Tabla 2), aumentando la probabilidad que el ME tenga un efecto positivo en la respuesta inmunológica y de acuerdo a estudios similares (López-Mejía, *et al.*, 2010; Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015; Palu, *et al.*, 2008; Wagner, *et al.*, 2013), se le pueden atribuir a las propiedades de la granada como punicalagina o elagitaninos, taninos que disminuyen los niveles de inflamación (Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015).

Cabe mencionar, que el comportamiento del grupo Acondicionado bajó su porcentaje basal de eosinófilos a las 2 y 4 horas posteriores a la inoculación con solución fisiológica, lo cual, podría estar reflejando un equilibrio causado por el ME (López-Mejía, *et al.*, 2010; Olivas-Aguirre, *et al.*, 2015; Palu, *et al.*, 2008; Wagner, *et al.*, 2013); por el contrario, en los grupos inoculados con LPS (Probando y Control positivo) aumentaron el número de eosinófilos, sobretodo en el T2, justamente cuando el LPS está en su punto máximo causando mayor inflamación (Dzhalilova, *et al.*, 2019); sin embargo, al comparar ambos grupos (C vs D) se observó un incremento mayor en el número de eosinófilos en el grupo Control positivo (Tabla 2) por lo tanto, aumentan las probabilidades de atribuir el efecto protector en el sistema inmunológico ante una inflamación al ME (Zou, *et al.*, 2016).

Por otro lado, los cuatro grupos estudiados aumentaron su nivel basal de basófilos en el T2 pero no se reportan datos similares en otros estudios.

Cabe mencionar que, durante un periodo de inflamación la acción de algunas citocinas y moléculas liberadas durante este proceso provocan cambios en los niveles y composición lipoproteínas, en este estudio se pudo observar que los niveles de CT y HDL disminuyeron ligeramente en el T2 respecto a su concentración inicial en todos los grupos de experimentación (Tabla 3), sobresaliendo el grupo Probando, lo cual puede ser una consecuencia positiva por las propiedades antioxidantes de la granada como se observó en el estudio realizado *in vivo* por Estrada-Luna, *et al.*, 2019, estudio diferente pero en el cual, utilizó el mismo ME para conocer si este ME guarda las propiedades nutricionales y beneficiosas como el jugo fresco de granada.

Por otro lado, en el estudio realizado por Zou, *et al.*, 2014 se utilizó un extracto comercial a base de cáscara de granada con 40% de punicalagina; en ese estudio, se realizaron dos pruebas: *in vitro*, donde disminuyeron las concentraciones de HDL y TG e *in vivo*, donde se reflejó una alta en los niveles de HDL y TG, situación similar a lo sucedido en este estudio en los grupos C y D (Tabla 3), donde hubo un incremento de TG a las 4 horas posteriores de la inoculación con LPS comparado con su nivel basal, una posible explicación podría ser que, al entrar un agente tóxico de esa magnitud al organismo, conlleva a una insuficiencia de varios órganos, especialmente la disfunción de los hepatocitos como lo mencionan Li, *et al.*, 2018, Ni, *et al.*, 2016 y Zimmermann, *et al.*, 2012, pero para saber si la inflamación provocada

ocasionó daño hepático es necesario realizar estudios específicos como un perfil hepático; aunado a esto, Estrada-Luna, *et al.*, 2019 hace incapie que la insuficiencia hepática disminuye la absorción y el metabolismo de TG, aumentando así sus concentraciones en suero.

Cabe resaltar que, al realizar la inoculación VIP con LPS, se observó un aumento en la frecuencia respiratoria de las ratas; esto podría deberse a que la elevación de neutrófilos en circulación dificulta la respiración y puede provocar hipoxia (Husari, *et al.*, 2014; Saeideh, *et al.*, 2019; Somade, *et al.*, 2019), situación similar a lo que sucedió en el trabajo realizado por Dzhaililova *et al.*, 2019, donde hace incapie que la inoculación con LPS puede provocar el incremento del nivel de HIF- α , por lo tanto, en este estudio pudo haber un incremento en HIF- α pero, para saberlo a ciencia cierta, se tendrían que realizar estudios específicos; suponiendo que se tuvo una elevación en este factor más el aumento de neutrófilos (Tabla 2), posiblemente estimuló la producción de mediadores inflamatorios tipo Th1 (Chen, *et al.*, 2013; Dzhaililova *et al.*, 2019; Estrada-Luna, *et al.*, 2019; Husari, *et al.*, 2014; Saeideh, *et al.*, 2019; Somade, *et al.*, 2019) provocando una alta en los niveles de *IL-1 β* aunque, cabe resaltar que el grupo C, mantuvo niveles de *IL-1 β* por debajo del grupo D (Tabla 4).

Por el contrario, se sabe que, cuando no hay una adecuada maduración durante el proceso de traducción de RNAm a proteína hay una menor concentración de estas, lo que, posiblemente sucedió en este estudio, donde la concentración sérica de *IL-1 β* fue baja en los grupos Probando y Control positivo; sin embargo, considerando que el grupo C fue tratado con ME, se suman razones para determinar que la disminución en el nivel de *IL-1 β* y su concentración sérica, podría atribuirse a los efectos protectores de la granada (elagitaninos y punicalagina) como sucedió en los estudios realizados por Kim, *et al.*, 2016 y Zou, *et al.*, 2014 donde tuvieron resultados similares al suplementar jugo fresco de granada *in vivo* a ratas Wistar .

Por otro lado, el aumento del nivel de *IL-1 β* y su concentración sérica en el grupo Acondicionado (Tabla 4 y 5) podría deberse a la cantidad de fructosa del ME disminuyendo la absorción de éste en el hígado (Estrada-Luna, *et al.*, 2019; Riveros, *et al.*, 2014), estimulando una mayor liberación de citocinas pro-inflamatorias (Ellah, *et al.*, 2019; Hetta, *et al.*, 2017; Itariu y Stulnig, 2014).

Ahora, el aumento en los niveles de *IL-6* en el grupo B, como se menciono antes, pudo ser por la fructosa contenida en el ME. Como se sabe, la fructosa en grandes concentraciones, puede

provocar una disminución en el hígado estimulando una mayor liberación de citocinas pro-inflamatorias (Ellah, *et al.*, 2019; Hetta, *et al.*, 2017; Itariu y Stulnig, 2014), y a su vez, aumenta la concentración de TG, como sucedió en el estudio realizado por Husari, *et al.*, 2014, donde observó aumento en la concentración de *IL-6* aun con el tratamiento sometido de granada en polvo (POM Wonderful, Los Angeles), situación similar a lo que sucedió en este estudio.

Sin embargo, el grupo C tuvo menor concentración sérica de *IL-6* en el T1 y en el T2 comparado con sus concentraciones basales, aumentando la posibilidad de que el ME tenga efectos anti-inflamatorios (Kim, *et al.*, 2016; Zou, *et al.*, 2014).

Por el contrario, el incremento que tuvo *TNF- α* en la expresión de RNAm y niveles séricos en los grupos inoculados con LPS (grupo C y D) podría atribuirse al tipo de inflamación causada con LPS, provocando el aumento de neutrófilos (Chen, *et al.*, 2013; Dzhililova *et al.*, 2019; Estrada-Luna, *et al.*, 2019; Husari, *et al.*, 2014; Saeideh, *et al.*, 2019; Somade, *et al.*, 2019) y la disfunción de hepatocitos por consecuencia del LPS (Li, *et al.*, 2018; Ni, *et al.*, 2016; Zimmermann, *et al.*, 2012) estimulando la producción de citocinas pro-inflamatorias, especialmente *TNF- α* , que como se sabe, puede generar un daño hepático (An, *et al.*, 2012; Ni, *et al.*, 2016) propiciando una menor absorción de TG (Estrada-Luna, *et al.*, 2019; Li, *et al.*, 2018, Ni, *et al.*, 2016 y Zimmermann, *et al.*, 2012).

Por último, la expresión de RNAm de *TNF- α* en el grupo Probando, con ME, es menor que los demás grupos (Tabla 4) y en niveles séricos se mantiene en ambos tiempos, comparado con sus niveles basales (Tabla 5), sumando motivos que podrían indicar que éste complemento alimenticio tiene un efecto regulador en la respuesta inmunológica (Husari, *et al.*, 2014; Somade, *et al.*, 2019).

10. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- 1) La administración de microencapsulado en ratas sin inflamación, disminuyó el número de neutrófilos, monocitos, eosinófilos y la concentración sérica de *TNF- α* .

- 2) La administración de microencapsulado en ratas que fueron retadas con LPS, disminuyó el número de leucocitos, linfocitos, monocitos; la concentración de colesterol total, HDL y de IL-6, además de disminuir la expresión del RNAm de *IL-6*.
- 3) Los resultados en ratas tratadas únicamente con LPS, mostraron que hubo un mayor número de neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, concentración de HDL, IL-6, así como en la expresión del RNAm de *IL-1 β* y *TNF- α* comparado con los otros grupos probados.

De acuerdo con lo anterior, se establece que el microencapsulado de granada roja tiene propiedad anti-inflamatoria; aunque no podría usarse como un sustituto de fármacos anti-inflamatorios. No obstante, el microencapsulado podría utilizarse como una forma preventiva o simultánea con el tratamiento farmacológico.

11. PERSPECTIVAS

- Aumentar el tamaño de muestra, alimentar con diferentes cantidades de microencapsulado e inducir a inflamación aguda con distintas cantidades de lipopolisacárido de *E. coli* así como la modificación de horarios y tiempo de tratamientos para tener más información sobre el efecto del microencapsulado de granada.
- Usar un modelo de inflamación crónica y realizar análisis de perfil hepático como: albúmina, proteínas totales, bilirrubina, lactato deshidrogenasa, alanina transaminasa y gamma-glutamyl transpeptidasa para conocer si hay un daño a nivel hepático.
- Realizar más análisis histológicos y hematológicos como: histológicos de hígado o bazo, determinación de la velocidad de sedimentación globular para conocer más específicamente el grado de inflamación causada.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, M., Arnáiza, P., Barja, S., Bambs, C., Berríos, X., Guzmán, B., y otros. (2010). Proteína C reactiva y su relación con adiposidad, factores de riesgo cardiovascular y aterosclerosis subclínica en niños sanos. *Revista Española de Cardiología*, 60(10), 1051-1058.
- Aguilar-Barojas, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigación en Salud. *Salud en Tabasco*, 11(1-2), 333-338.
- Aguilar-Salinas, C., & Melgarejo-Hernández, M. A. (2011). Análisis de la composición y de la función de las HDL, ¿un estudio para el clínico del futuro? *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 19(3), 113-122.
- Aldapa-Vega, G., Pastelín-Palacios, R., Isibasi, A., Moreno-Eutimio, M. A., & López-Macías, C. (2016). Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides. *Revista Alergia México*, 63(3), 293-302.
- An, J., Harms, C., Lättig-Tünnemann, G., Sellge, G., Mandic, A. D., Malato, Y., y otros. (2012). TAT-Apoptosis Repressor With Caspase Recruitment Domain Protein Transduction Rescues Mice From Fulminant Liver Failure. *Hepatology*, 56(2), 715-726.
- Bäckhed, F., Normark, S., Schweda, E. K., Oscarson, S., & Richter-Dahlfors, A. (2003). Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes and Infection*, 5, 1057-1063.
- Barceló, B., Llompert, I., & Fuentespina, E. (2005). Comparación de tres métodos automatizados para la medida con gran detectabilidad de la proteína C reactiva. *Química Clínica*, 24(6), 468-473.
- Basu, A., & Penugonda, K. (2009). Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews*, 67(1), 49-56.
- Bellik, Y., Hammoudi, S. M., Abdellah, F., Iguer-Ouada, M., & Boukraâ, L. (2012). Phytochemicals to Prevent Inflammation and Allergy. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 6(2), 2-12.
- BenSaad, L., Kim, K., Quah, C., Kim, W., & Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from Punica granatum. *BMC Complement Alternative Medicine*, 17(1), 47.
- Brechmann, T., Günther, K., Neid, M., Schmiegel, W., & Tannapfel, A. (2019). Triggers of histologically suspected drug-induced colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 25(8), 967-979.
- Chen, B., Tuuli, M. G., Longtine, M. S., Shin, J. S., Lawrence, R., Inder, T., y otros. (2013). Pomegranate juice and punicalagin attenuate oxidative stress and apoptosis in human placenta and in human placental trophoblasts. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 302(9), 1142-1152.
- Collado, V. M., Porrás, R., Cutuli, M. T., & Gómez-Lucía, E. (2008). El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(1), 1-16.
- Coulter, B. (2000-2019). *Beckman Coulter*. Recuperado el 05 de 08 de 2019, de Beckman Coulter: <https://www.beckmancoulter.com/products/hematology/coulter-act-diff2#/documents>
- Day, K., & Wilkins, E. (2011). Commercial pomegranate (*Punica granatum* L.) production in California. *Acta Horticulturae*(890), 275-285.
- Delves, P., Martin, S., Burton, D., & Roitt, I. (2014). *Roitt - Inmunología Fundamentos* (12 ed.). México: Panamericana.
- Dutta, P., Tripathi, S., Mehrotra, G., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182.
- Dzhalilova, D. S., Kosyрева, A. M., Diatroptov, M. E., Zolotova, N. A., Tsvetkov, I. S., A.Mkhitarov, V., y otros. (2019). Morphological Characteristics of the Thymus and Spleen and the Subpopulation Composition of Lymphocytes in Peripheral Blood during Systemic Inflammatory Response in Male Rats with Different Resistance to Hypoxia. *International Journal of Inflammation*, 2019, 1-17.

- editores, A. (19 de Septiembre de 2016). *Alfa editores*. Recuperado el 08 de Abril de 2019, de Alfa editores: <http://www.alfa-editores.com.mx/microencapsulado-de-granada-desarrollo-mexicano/>
- Ellah, N. H., Ahmed, E. A., Abd-ellatief, R. B., Ali, M. F., Zahran, A. M., & Hetta, H. F. (2019). Metoclopramide nanoparticles modulate immune response in a diabetic rat model: association with regulatory T cells and proinflammatory cytokines. *International Journal of Nanomedicine*, 2019(14), 2383–2395.
- Estrada-Luna, D., Carreón-Torres, E., Bautista-Pérez, R., Betanzos-Cabrera, G., Dorantes-Morales, A., Luna-Luna, M., y otros. (2019). Microencapsulated Pomegranate Reverts High-Density Lipoprotein (HDL)-Induced Endothelial Dysfunction and Reduces Postprandial Triglyceridemia in Women with Acute Coronary Syndrome. *Nutriens*, 11(1710), 1-14.
- Favaro-Trindade, C., Santana, A., Monterrey-Quintero, E., Netto, M., & Trindade, F. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24(2010), 336–340.
- Figuerola, P. M., Ceballos, M. A., & Hurtado, A. M. (2016). Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (*Rubus glaucus*) extraído con CO₂ supercrítico. *Revista Colombiana de Química*, 45(2), 39-47.
- Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2), 63-71.
- Fragoso, J. M., Alarcón, G. V., Morales, S. J., Hernández, O. D., & Bello, J. R. (2014). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*, 2014(150), 334-344.
- Fragoso, J. M., Martínez, M. S., Alarcón, G. V., Rodas, A. B., & Bello, J. R. (2013). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*, 2013(149), 521-530.
- Fuccelli, R., Fabiani, R., & Rosignoli, P. (2018). Hydroxytyrosol Exerts Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activities in a Mouse Model of Systemic Inflammation. *Molecules*, 23(3212), 1-14.
- Gabaa, M., Gabaa, P., Uppala, D., Dhingrac, N., Bahiad, M. S., Silakarid, O., y otros. (2015). Benzimidazole derivatives: search for GI-friendly anti-inflammatory analgesic agents. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(4), 337–342.
- Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Facultad de medicina*, 77(4), 327-32.
- García-González, F. M., Heredia-Gutiérrez, Á., Neri-Torres, D. Y., Rivera-Cruz, J. M., & Dávila-Serapio, F. (2012). Utilidad de la biometría hemática en la práctica clínica. Leucocitos (Segunda parte). *Revista Sanidad Militar de México*, 66(1), 1-9.
- González, R. B., Beltrán, M. M., Olivares, E. G., & Barrilao, R. G. (1994). El proceso inflamatorio. *Revista de Enfermería*(4), 9-12.
- Goñi, A. C., Diuris, D. B., Peña, A., Ronda, M., Bárbara, B. G., Bada, M. E., y otros. (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11(12), 1-10.
- Granados, A. G., Venegas, G. G., & García, M. d. (2010). Efectos de lipopolisacárido y ácido lipoteicoico sobre la ciclooxigenasa-2 en células pulpares humanas. *Revista Odontológica Mexicana*, 12(4), 1-8.
- Guevara, J. J., Fuentes, J. M., González, O. J., & Guevara, L. L. (2016). Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersión. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(10), 1-11.
- Hadad, N., & Levy, R. (2012). The synergistic anti-inflammatory effect of fycopene, lutein, b-carotene, and carnosic acid combinations via redox-based inhibition of NF- κ B signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, 1381-1391.
- Herrera, W. E. (2014). Inflamación I. *Revista de Actualización Clínica*, 43, 2261-2265.

- Hetta, H. F., Elkady, A., & Meshaal, A. K. (2017). TH17/TH1 Role in Endocrine Disorders among Chronic HCV Infected Patients. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 2542-2551.
- Huertas, R. A. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Food Microencapsulation*, 63(2), 5669-5684.
- Huertas, R. A. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Food Microencapsulation*, 63(2), 5669-5684.
- Hurtado, S. R., & Iregui, C. A. (2010). El Lipopolisacárido. *Revista de Medicina Veterinaria*(19), 37-45.
- Husari, A., Khayat, A., Bitar, H., Hashem, Y., Rizkallah, A., Zaatari, G., y otros. (2014). Antioxidant activity of pomegranate juice reduces acute lung injury secondary to hyperoxia in an animal model. *BMC Research Notes*, 7(664), 1-10.
- Ismail, T., P. Sestili, P., & Akhtar, S. (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 397-405.
- Itariu, B. K., & Stulnig, T. M. (2014). Autoimmune Aspects of Type 2 Diabetes Mellitus – A Mini-Review. *Gerontology*, 2014(60), 189–196.
- Johanningsmeier, S. D., & Harris, G. K. (2011). Pomegranate as a Functional Food and Nutraceutical Source. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 181-201.
- Júnior, D. M., Araújo, J. A., Catela, T. T., Souza, A. W., Cruvinel, W. d., Andrade, L. E., y otros. (2010). Immune System – Part II Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Bras J Rheumatol*, 5(50), 552-580.
- Jun-Ming, Z., & Jianxiong, A. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27-37.
- Jurenka, J. (2008). Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Alternative Medicine*, 13(2), 128-144.
- Kim, H., Banerjee, N., Ivanov, I., Pfent, C. M., Prudhomme, K. R., Bisson, W. H., y otros. (2016). Comparison of anti-inflammatory mechanisms of mango (*Mangifera Indica* L.) and pomegranate (*Punica Granatum* L.) in a preclinical model of colitis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(9), 1912–1923.
- Lansky, E. P., & Newmana, R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2007), 177–206.
- Lee, C. J., Chen, L. G., Liang, W. L., & Wang, C. C. (2010). Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* Linne in vitro and in vivo. *Research output: Contribution to journal*, 118(2), 315-322.
- Li, J., Chen, B., Zhong, L., Gao, F., Zhu, H., & Wang, F. (2018). AMP-activated protein kinase agonist N6-(3-hydroxyphenyl) adenosine protects against fulminant hepatitis by suppressing inflammation and apoptosis. *Cell Death and Disease*, 9(37), 1-13.
- López-Mejía, O., López-Malo, A., & Palou, E. (2010). Granada (*Punica granatum* L.): una fuente de antioxidantes de interés actual. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 4(1), 64-73.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-151.
- Maddelaine, H. S., & Boris, R. M. (2014). Mecanismos de la inmunidad y antiinfección. *Revista de Actualización Clínica*, 44, 2330-2336.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S., & Madene, A. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21.
- Marín-Palma, D., Taborda, N. A., Urcuqui-Inchima, S., & Hernandez, J. C. (2017). Inflamación y respuesta inmune innata: participación de las lipoproteínas de alta densidad. *IATREIA*, 30(4), 424-436.
- Medina-Remón, A., Casas, R., Tresserra-Rimbau, A., Ros, E., Martínez-González, M. A., & Montserrat Fitó Dolores Corella2, 7. J.-S. (s.f.).

- Medina-Remón, A., Casas, R., Tresserra-Rimbau, A., Ros, E., Martínez-González, M. A., Fitó, M., y otros. (2017). Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial. *British Journal of Clinical Clinical*, 83, 114-128.
- Monza, R. (2013). Técnicas RANDOX. *RANOX*, 30-93.
- Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyclerová, H., Spišská, V., Novotný, J., y otros. (2018). The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *PLoS ONE*, 13(9), 1-16.
- Ni, H.-M., McGill, M. R., Chao, X., Woolbright, B. L., Jaeschke, H., & Ding, W.-X. (2016). Caspase Inhibition Prevents Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis and Promotes Necrotic Cell Death in Mouse Hepatocytes in Vivo and in Vitro. *The American Journal of Pathology*, 186(10), 2623-2636.
- NOM-062-ZOO, N. O. (1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Norma Oficial Mexicana*, 1-58.
- Olapour, S., & Najafzadeh, H. (2010). Evaluation Analgesic, Anti-Inflammatory and Antiepileptic Effect of Hydro Alcoholic Peel Extract of Punica granatum (pomegranate). *Asian Journal of medical Sciences*, 2(6), 266-270.
- Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., Rosa, L. A., y otros. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 55-66.
- Oliveira, C. M., Rioko Kimiko Sakata, T., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira Anestesiología*, 61(2), 137-142.
- Palu, A., Kim, A., West, B., Deng, S., Jensen, J., & White, L. (2008). The effects of Morinda citrifolia L. (noni) on the immune system: Its molecular mechanisms of action. *Journal Ethnopharmacol*, 115, 502-506.
- Peprtech. (2019). *Protocols - ELISA: Sandwich ABTS*. Recuperado el 06 de 08 de 2019, de Protocols - ELISA: Sandwich ABTS: <https://www.peprtech.com/es/protocols-elisa-sandwich-abts>
- Pérez, D. E., Buenadicha, A. L., & Manuel, E. C. (2004). Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. *Monografías de La Real Academia de Farmacia*, 237-286.
- Pérez, D. E., Buenadicha, A. L., & Manuel, E. C. (2004). Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. *Monografías de La Real Academia de Farmacia*, 237-286.
- Piedra, P. D., Fuentes, G. O., Gómez, R. H., Piedra, P. D., Fuentes, G. O., Gómez, R. H., y otros. (2012). Determinación de los intervalos de referencia de biometría hemática en población mexicana. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 59(4), 243-250.
- Pinazo-Durana, M., & Boscá-Gomarc, L. (2012). Propiedades antiinflamatorias de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3. Indicaciones en oftalmología. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 87(7), 203-205.
- Pinsky, M. R., Vincent, J.-L., Alegre, M., & Dupont, E. (1993). Serum Cytokine Levels in Human Septic Shock; Relation to Multiple-System Organ Failure and Mortality. *Chest*, 103(2), 565-575.
- PrepoTech. (2017). *Rat SCF Standard ABTS ELISA Development Kit*. Recuperado el 20 de junio de 2019, de <https://www.peprtech.com/en/rat-scf-standard-abts-elisa-development-kit>
- QIAGEN. (Septiembre de 2013-2019). (EN) *QuantiNova Probe PCR Handbook*. Recuperado el 05 de 08 de 2019, de (EN) *QuantiNova Probe PCR Handbook*: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5167d782-9fef-4202-bc79-95f358be7d8c&lang=en>
- QIAGEN. (Junio de 2015-2019). (EN) - *QuantiNova Reverse Transcription Kit Handbook*. Recuperado el 05 de 08 de 2019, de (EN) - *QuantiNova Reverse Transcription Kit Handbook*: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=97045b0c-fed8-41b4-9364-3f0351747cc5&lang=en>

- Raeburn, D., Sheppard, F., Barsness, K. A., Arya, J., & Harken, A. H. (2002). Cytokines for surgeons. *The American Journal of Surgery*, 2002, 268–273.
- Rahimi, H., Arastoo, M., & Ostad, S. (2012). A comprehensive review of Punica granatum (Pomegranate) properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. *Irania Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 385-400.
- Rai, M., Asthana, P., Singh, S., Jaiswal, V., & Jaiswal, U. (2009). The encapsulation technology in fruit plants--a review. *Biotechnol Advances*, 27(6), 671-679.
- Regal, M. L., Borges, A. A., Gardía, J. D., Alvarado, L. M., Cerdeño, J. V., & Sol, J. C. (2016). Respuesta inflamatoria aguda: Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay*, 5(1), 47-62.
- Rietschel, E., Seydel, U., Zähringer, U., Schade, U., Brade, L., Loppnow, H., y otros. (1991). Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. *The FASEB Journal*, 5(4), 753-779.
- Riveros, M. J., Parada, A., & Pettinelli, P. (2014). Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutrición hospitalaria*, 29(3), 491-499.
- Robledo, G. B. (2008). Inflamación. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 51(5), 220-223.
- Robledo, G. B. (2008). Inmunidad natural o innata. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 51(4), 171-172.
- Roche. (2018). *Discover which real-time PCR System is right for you*. Recuperado el 20 de junio de 2019, de https://lifescience.roche.com/en_mx/brands/realtime-pcr-overview.html
- Saeideh, S., Farimah, B., Vahid, R. A., Mahmoud, H., Nema, M. R., & Mohammad, H. B. (2019). Aminoguanidine affects systemic and lung inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. *Respiratory Research*, 20(96), 1-13.
- Saeidienik, F., Reza, M. S., Fanaei, H., & Badini, F. (2018). Research Paper: The Effects of Iron Oxide Nanoparticles Administration on Depression Symptoms Induced by LPS in Male Wistar Rats. *Basic and Clinical Neuroscience*, 9(3), 209-216.
- Salamanca, U. d. (2005). Eutanasia (rata, ratón, hámster, cobayo). *Univerddidad de Salamanca*, 1-4.
- Salminen, A., Kauppinenc, A., & Kaarniranta, K. (2012). Phytochemicals suppress nuclear factor-kB signaling: impact on health span and the aging process. *Curr Opin Clinic Nutrition Metabolic Care*, 15(1), 23-28.
- Sarker, M., Das, S. C., Saha, S. K., Mahmud, Z. A., & Bachar, S. C. (2012). Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Flower Extracts of Punica granatum Linn.(Punicaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(4), 133-136.
- Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K. A., & Haqqi, T. M. (2008). Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (Punica granatum L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE2 production in human chondrocytes in vitro. *Journal of Inflammation*, 5(9), 1-9.
- Somade, O. T., Ajayi, B. O., Safiriyu, O. A., & Oyabunmi, O. S. (2019). Renal and testicular up-regulation of pro-inflammatory chemokines (RANTES and CCL2) and cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) following acute edible camphor administration is through activation of NF-kB in rats. *Toxicology Reports*, 6(2019), 759–767.
- Sreekumar, S., Sithul, H., Muraleedharan, P., Azeez, J. M., & Sreeharshan, S. (2014). Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *BioMed Research International*, 2014, 1-12.
- Territo, M. (2016). *Manual MSD*. Recuperado el 29 de 08 de 2019, de Linfocitopenia: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/hogar/trastornos-de-la-sangre/trastornos-de-los-gl%C3%B3bulos-blancos-leucocitos/linfocitopenia>
- Toche, P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23, 446-457.
- Wagner, A. E., Terschluesen, A. M., & Rimbach, G. (2013). Health Promoting Effects of Brassica-Derived Phytochemicals: From Chemopreventive and Anti-Inflammatory Activities to Epigenetic Regulation. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 1-12.

- Wandrey, C., Bartkowiak, A., & Harding, S. E. (2010). Materials for Encapsulation. En N. J. Zuidam, V. A. Nedović, N. J. Zuidam, & V. A. Nedović (Edits.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (págs. 31-100). New York: Springer.
- Winer, C. A., Risle, E., & Nuss, G. (1962). Carrageenin-induced edema in hind. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *111*, 544-547.
- Wolf, G., Livshits, D., Beilin, B., Yirmiya, R., & Shavit, Y. (2008). Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: Genetic and pharmacological studies in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *22*(2008), 1072–1077.
- Young-Joon, S. (2008). NF-κB and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pac Journal Clinical Nutrition*, *17*(1), 269-272.
- Zepeda, G., Gvirtzman, C., Kreft, J., Inostroza, E., & Díaz, P. (2013). Streptococcus pneumoniae e inmunidad innata. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, *29*, 89-95.
- Zepeda, G., Gvirtzman, C., Kreft, J., Inostroza, E., & Díaz, P. (2013). Streptococcus pneumoniae e inmunidad innata. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, *29*, 89-95.
- Zimmermann, H. W., ChristianTrautwein, & FrankTacke. (2012). Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Frontiers in physiology*, *3*(56), 1-18.
- Zou, X., Yan, C., Shi, Y., Cao, K., Xu, J., Wang, X., y otros. (2014). Mitochondrial Dysfunction in Obesity-Associated Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Protective Effects of Pomegranate with Its Active Component Punicalagin. *Antioxidants & Redox signaling*, *21*(11), 1-14.

13. ANEXOS

Anexo 1. Efectos secundarios de los AINEs

Anorexia, náuseas, vómitos
Pirosis, distensión abdominal
Dolor abdominal
Ulceraciones en tracto digestivo
Hemorragia oculta o masiva
Perforación
Diarrea, esteatorrea
Antiagregación plaquetaria
Ictericia
Cefalea, mareos, vertigo, tinnitus
Obnubilación, confusión mental, angustia, ansiedad, depresión, insomnio
Alucinaciones, psicosis
Erupciones cutáneas
Neutropenia, trombopenia, anemia aplástica, anemia autoinmune
Inhibición de la excreción de litio
Retención de agua y sodio
Disminución de los efectos hipertensores de los β -bloqueadores y diuréticos
Hipertensión arterial

(Pérez, *et al.*, 2004).

Anexo 2. Efectos secundarios de los esteroides

Hiperglucemia
Incremento de la liberación de glucosa
Hiperinsulinemia
Resistencia de insulina
Aumento de síntesis hepática
Elevación de lipoproteínas VLDL, HDL, LDL y triglicéridos
Tendencia a la hipocalcemia
Disminución de acción de la hormona antidiurética
Retención de sodio
Aumento de potasio
Aumento de los efectos secundarios de los ANIEs

(Pérez, *et al.*, 2004).

Anexo 3. Fórmula para población finita

$$n = \frac{Z^2(p)(q)}{(E^2(N - 1)) + (Z^2(p)(q))}$$

en donde:

n: tamaño de muestra que se usará en el proyecto de investigación.

N: tamaño de población de referencia. Tomando como referencia la “N” utilizada en Saeidienik, *et al.*, 2018 y de investigaciones realizadas en el departamento de biología molecular, laboratorio de Metabolismo de Lípidos por el Dr. Óscar A. Pérez Méndez en el INCICH (información personal).

Z: nivel de confiabilidad, es la probabilidad de que el verdadero valor del parámetro estimado en la población se sitúe en el intervalo de confianza obtenido. El nivel de confianza se denota por $(1-\alpha)$, aunque habitualmente suele expresarse con un porcentaje $((1-\alpha) 100\%)$. Es habitual tomar como nivel de confianza un 95% o un 99%, que se corresponden con valores α de 0,05 y 0,01, respectivamente.

p: probabilidad a favor

q: probabilidad en contra

E: error de estimación, es una medida de precisión que corresponde con la amplitud del intervalo de confianza, en este caso el nivel de confiabilidad. Cuanta más precisión se desee en la estimación de un parámetro, más estrecho deberá ser el intervalo de confianza y, por tanto, menor el error, y más sujetos deberán incluirse en la muestra estudiada.

(Aguilar-Barojas, 2005).

Anexo 4. Composición química del alimento para roedores marca LABDIET®

Calorías por producto: Hidratos de carbono: 57.9%, Grasas: 13.496%, Proteínas: 28.507%

Nutrientes

Proteínas %	23.9	Lisina %	1.41	Ácido glutámico%	4.37
Arginina %	1.41	Metionina %	0.67	Alanina %	1.43
Citosina %	0.31	Fenilalanina %	1.04	Prolina %	1.49
Glicina %	1.21	Triptófano %	0.29	Taurina %	0.02
Histidina %	0.57	Valina %	1.17	Tirosina %	0.71
Isoleucina %	1.14	Serina %	1.19	Treonina %	0.91
Leucina %	1.83	Acido aspártico %	2.81		

Grasa (extracto de éter) %	5.0	Ácido araquidónico %	<0.01
Grasa (hidrolisis acida) %	5.7	Ácidos grasos omega 3 %	0.19
Colesterol, pmm	200	Ácidos grasos saturados totales%	1.56
Ácido linolenico %	1.22	Ácidos grasos monoinsaturados totales %	1.60
Ácido linoleico %	0.10		

Fibra cruda %	5.1	Fructosa %	0.30
Extracto libre de nitrógeno (por diferencia) %	48.7	Sacarosa %	3.70
Almidón %	31.9	Lactosa %	2.01
Glucosa %	0.22		

Minerales

Ceniza %	7.0	Sodio %	0.40	Cobre, ppm	13
Calcio %	0.95	Fluoruro, ppm	16	Cobalto, ppm	0.90
Fosforo %	0.66	Hierro, pmm	270	Yodo, ppm	1.0
Potasio %	1.18	Zinc, pmm	79	Cromo, ppm	1.2
Magnesio %	0.21	Manganeso, ppm	70	Selenio, pmm	0.30
Sulfuro %	0.36				

Vitaminas

Carotenos, ppm	2.3	Ácido fólico, ppm	7.1
Vitamina K, ppm	1.3	Piridoxina, ppm	6.0
Clorhidrato de tiamina, ppm	16	Biotina, ppm	0.30
Riboflavina, ppm	4.5	B12, µg/kg	50
Niacina, ppm	120	Vitamina A, UI/g	15
Ácido pantotenico, ppm	24	Vitamina D, UI/g	4.5
Cloruro de colina, ppm	2250	Vitamina E, UI/kg	42

Anexo 5. Método enzimático colorimétrico (RANDOX, UK) para la determinación de Lípidos

- En tubos de policarbonato se colocaron 200µL de plasma-heparina y se ajustó a una densidad de 1.063 g/mL con Bromuro de Potasio.
- Se ultra-centrifugaron (BECKMAN, rotor TLA-101) a 100,000 rpm durante 2.5 horas a 10°C.
- Se extrajo el sobrenadante y de la infranadante se depositó una alícuota de 10 µL en una placa de 96 pozos más 250 µL de reactivo de color específico para cada lípido.

- Se incubaron las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente y se hicieron lecturas de absorbancia en un lector de ELISA a una longitud de onda de 505nm. Para los cálculos, se utilizaron un estándar de 198 mg/dL para colesterol y 192 mg/dL para triglicéridos con una dilución de 1:2 (Monza, 2013).

Para determinar la concentración se extrapolo en la curva correspondiente (Figura 21) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$y = mx + b$$

dónde:

y : absorbancia

m : pendiente

b : ordenada al origen o intercección al eje

x : concentración

Nota: R^2 es la recta, siempre debe ser lo más cerca posible a 1 para tener un mejor resultado en la determinación.

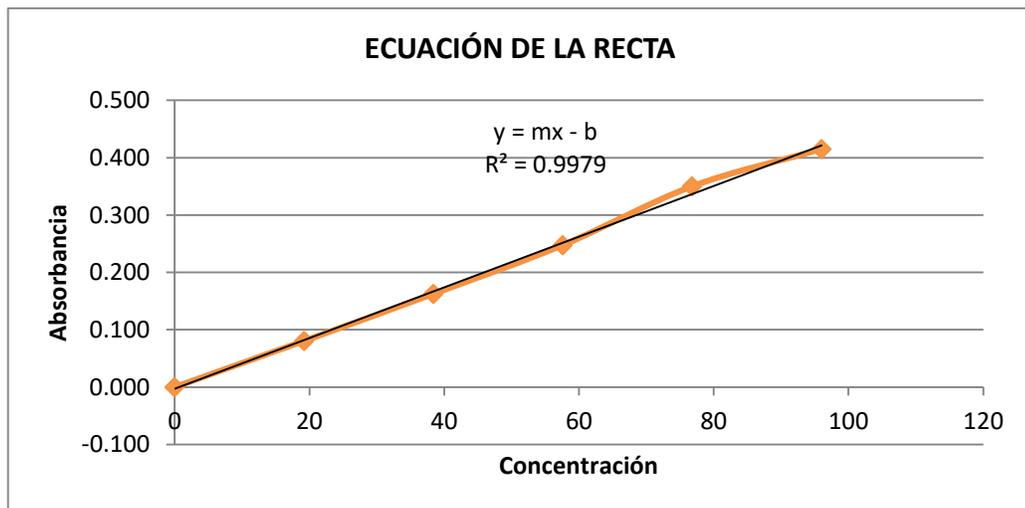


Figura 6. Curva de concentración final de lípidos.

Anexo 6. Técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real

I. Extracción de RNA total

- A cada muestra de sangre total más TriPure se le adicionó 200 μ L de cloroformo por cada 1 mL de TriPure utilizado y se homogeneizó vigorosamente.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos.
- Al sacar las muestras de la centrifuga, se observaron 3 fases en el tubo y se recolectó la primera fase de la muestra con una micropipeta y se colocó en otro tubo Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se agregaron 500 μ L de isopropanol a cada muestra, se homogenizó y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó la muestra a 13000 rpm durante 15 minutos y el pellet con ácidos nucleicos fue colectado.
- Se decantó el isopropanol y se agregó 1 mL de etanol al 75% a cada una de las muestras, re-suspendiendo el pellet formando y centrifugándose a 13000 rpm durante 15 minutos repitiendo este paso dos veces más.
- Se secaron las muestras evaporando el exceso de etanol en campana de flujo laminar.
- Se colocaron 25 μ L de H₂O grado Biología Molecular en el tubo que contenía el pellet y se re-suspendió con micropipeta.
- Se observó la integridad del RNA al observar las bandas de RNA ribosomal en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidilo (Figura 22).

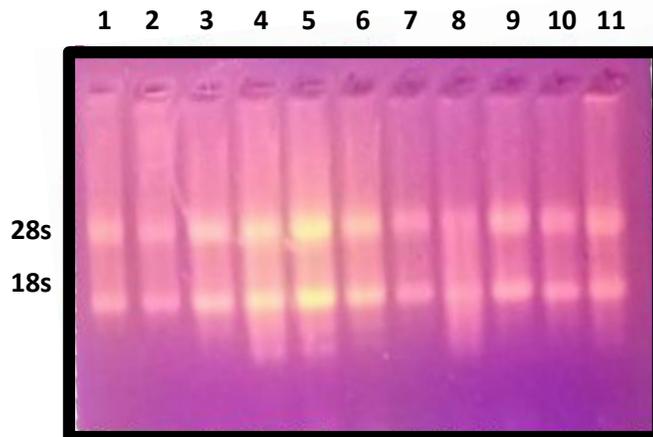


Figura 7. Integridad del RNAm. Se observan las bandas correspondientes al RNA Ribosomal 28s y 18s de diferentes muestras de ratas (Carriles 1-11). Agarosa al 2%, teñida con Bromuro de Etidilo.

Una vez extraído el RNA total de cada muestra sanguínea, se realizó una estrategia para eliminar DNA de cada muestra para purificar el RNA. Para ello se realizó lo siguiente::

- Se utilizó un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se añadieron los siguientes reactivos por muestra: DNAg Removal Mix 1 μ L, H₂O grado PCR 4.5 μ L y 500 ng de RNA obteniendo un volumen final de 7.5 μ L en cada reacción, posteriormente se colocaron en un termociclador para llevar a cabo la incubación a 45°C durante 2 minutos. Este paso elimina el DNA genómico.

II. Preparación de cDNA

Para la síntesis de DNA complementario (c-DNA), se añadieron los siguientes reactivos por muestra: Reverse Transcription Enzyme 0.5 μ L, Reverse Transcription Mix 2 μ L (el buffer optimizado para la transcripción inversa con la enzima de transcripción inversa Quantinova, la contiene una combinación optimizada de oligo-dT y primers aleatorios e incluye Mg²⁺ y dNTPs) y los 7.5 μ L de la reacción anterior (Eliminación del DNA genómico), obteniendo un volumen final de 10 μ L. Posterior a ello, las muestras se colocaron en el termociclador para llevar a cabo la síntesis de c-DNA. El termociclador se programó de la siguiente manera: 25°C durante 3 minutos (alineación de primers), 45°C durante 10 minutos (síntesis de c-DNA) y 85°C durante 5 minutos (inactivación de la enzima reversotranscriptasa).

III. Determinación de la Expresión del RNAm de las Citocinas *IL-1 β* , *IL-6* y *TNF- α*

- **Primers y sondas:** La secuencia de nucleótidos de los primers usados fueron tomadas de la Base de Nucleótidos para DNA y RNA del National Center for Biotechnology information U.S. National Library of Medicine (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) con los números de referencia que aparecen en la Tabla 6. Se utilizaron sondas específicas para cada gen a cuantificar, utilizando una concentración de 150 ng/ μ L (Universal Probe Library, ROCHE. Tabla 6) y como Control Endógeno se usaron Primers y sonda específica para el gen que codifica para la Hipoxantina Fosforibosiltransferasa 1 (*HPRT1*); un gene constitutivo expresado en linfocitos, hígado y casi cualquier tejido

de forma muy estable, lo cual permite realizar los cálculos de cuantificación relativa para cada gen por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 6. Secuencia de los primers utilizados

GEN	IDENTIFICADOR DEL GEN PARA DISEÑAR INDICADORES	ESPECIE	SENTIDO	PRIMER
<i>TNF-α</i>	NM_012675.3	<i>Rattus norvegicus</i>	Forward (5'-3')	tgaacttcggggtgatcg
			Reverse	gggcttgctactcgatgtt
<i>IL-6</i>	NM_012589.1	<i>Rattus norvegicus</i>	Forward (5'-3')	cccttcaggaacagctatgaa
			Reverse	acaacatcagtccaagaagg
<i>IL-1β</i>	NM_031512.2	<i>Rattus norvegicus</i>	Forward (5'-3')	tgtgatgaaagacggcacac
			Reverse	cttctctttgggtattgtttgg
<i>HPRT (gen de referencia)</i>	NM_012583.2	<i>Rattus norvegicus</i>	Forward (5'-3')	ggtcattcctatgactgtagattt
			Reverse	aacaatcaagacgttcttccag

- **Cuantificación de la Expresión de Citocinas:** Para analizar la expresión de RNAm de los genes en el momento que expresaron las ratas sometidas a los diferentes tratamientos y tiempos de experimentación, se amplificó el c-DNA por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. Para ello se mezclaron los siguientes reactivos para cada muestra de c-DNA de cada rata:

Reactivos	1X	Unidad
Master Mix 2X	5	μ L
Primer Forward [100 nm/ μ L]	0.32	μ L
Primer Reverse [100nm/ μ L]	0.32	μ L
Sonda [150 nm/ μ L]	0.12	μ L
c-DNA [40 ng/ μ L]	1.5	μ L
H ₂ O	2.74	μ L
Total	10	μ L

- La mezcla anterior se preparó para cada muestra de c-DNA de las diferentes ratas y tratamientos y se colocaron en una placa de reacción para después procesarlas en un Termociclador Light Cycler 480 II de Roche, bajo las siguientes condiciones de termociclado:

Pre-incubación	95°C, 5 minutos	} 45 Ciclos
Desnaturalización	95°C, 10 segundos	
Alineación	60°C, 40 segundos	
Extensión	72°C, 30 segundos	
Almacenamiento	4°C, indefinido	

- La captura de los datos de amplificación se llevó a cabo al término de la extensión en cada ciclo. Las curvas de amplificación fueron analizadas con el Software Data Collection de Thermo Scientific, Co.

(QIAGEN, 2013-2019; QUIAGEN, 2015-2019)

Anexo 7. Técnica de ensayo inmunoenzimático ligado a inmunosorbente (ELISA)

- En cada pozo se adiciono 0.01µL/mL a cero de diluyente más 100 µL de plasma-heparina realizando este paso por triplicado. Dejándose incubar a temperatura ambiente 2 horas.
- Se realizaron cuatro lavados con un buffer de lavado a una concentración de 0.5µL (500ng /mL).
- Se agregó 100 µL de solución de anticuerpo secundario ligado a una enzima que se une al complejo antígeno-anticuerpo primario y se incubo por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se realizaron cuatro lavados con buffer de lavado.
- Se añadieron 100 µL de solución de sustrato para la enzima ligada al anticuerpo secundario y se incubo a temperatura ambiente el desarrollo del color aproximadamente 30 minutos.
- Se añadió 50 µL de ácido sulfúrico (solución de paro) a 2.5N y se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 490 nm.
- La concentración de cada factor se calculó comparando las absorbancias obtenidas de las muestras contra la curva de calibración realizada con estándares de concentración conocida (Figura 23) (PrepoTech, 2017).

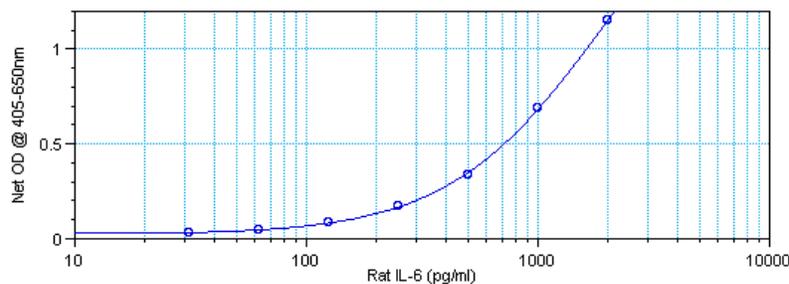


Figura 8. Curva de concentración sérica para IL-1β, IL-6 y TNF-α.