



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE TNF- α , IL-1 β Y COX-2 MEDIANTE
INMUNOFLUORESCENCIA EN PIEL DE RATA, EN MUESTRAS
PREVIAMENTE TRATADAS CON EL EXTRACTO ACUOSO DE LA HOJA
DE ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

AMEYALLI MIREYA ALMAGUER RIOJA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. Martha Leticia Jiménez Pardo
VOCAL: Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
SECRETARIO: Prof. Ruth Bustamante García
1° SUPLENTE: Prof. Vanessa Rebeca Maya Ampudia
2° SUPLENTE: Prof. Laura Carmona Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

***LABORATORIO DE PATOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACIÓN BIOMOLECULAR EN CARDIOLOGÍA DEL CM SXXI, IMSS.***

ASESOR: Dra. Ruth Bustamante García

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Teresa Neri Gómez

SUSTENTANTE: Ameyalli Mireya Almaguer Rioja

AGRADECIMIENTOS

Expreso a Dios primeramente mi gratitud, por haberme permitido culminar esta etapa de mi vida, y por concederme la oportunidad de que mi familia y amigos sean partícipes y testigos de este gran éxito personal y profesional, porque han sido los cimientos de lo que ahora soy.

Enseguida me permito agradecer entrañablemente:

A mi mamá porque siempre ha creído en mí.

A mi padre por su precisa estimulación en mi desarrollo.

A mi "Papi y Amí" por ser la base de mis logros y simiente en mi razón.

Al mejor hermano que la vida me dio, mi querido "Charles".

A mis mosqueteras incondicionales: "Eve y Zyan"

A mi tía Mary por su constante motivación en el rumbo de mi carrera.

Reconozco al Cielo, porque tiene a gigantescas estrellas expectantes de este maravilloso momento: a ti, mi amada tía Lety, porque fuiste y serás mi inspiración; a mi hermano Luis, porque atesoro enormes recuerdos de felicidad; a mis abuelitos "Cari y Ángel", y a mi tío "Isra", donde quiera que se encuentren; porque estoy segura de que están felices por este logro.

A mis "lobos": mi inseparable pequeña Erandi y su adorada familia, a mi Laus, mi Dann, Veriux, y el buen Vicc; por motivarme a continuar sin mirar atrás.

A Kate por las risas compartidas, a Coral y Clau por su compañerismo y amistad; y sin duda alguna, a mi Tole por siempre estar.

Correspondo a mi compañero de andar, por ir forjando pasos firmes a mi lado; a ti, Víctor Hugo, mi querido escritor.

A la Doctora Eli, por su amistad y apoyo para este logro.

A la Doctora Ruth y al Profesor Atonatiu, por sus críticas y paciencia para la culminación de este trabajo.

A la Dra. Tere y al Dr. Manjarrez, por el apoyo para realizar la parte experimental.

Finalmente, retribuyo a mi amada Universidad, por la oportunidad de conocimiento, de hermandad, por los valores adquiridos, por el orgullo que significa pertenecer a esta Facultad y por permitirme engrandecerla aún más.

"Por mi raza hablará el espíritu."

Ameyalli Mireya Almaguer Rioja

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS	10
1.- INTRODUCCIÓN	14
2.- ANTECEDENTES	15
2.1 Respuesta Inmune.....	15
2.2 Piel y anexos	17
2.2.1 Epidermis.....	18
2.2.2 Dermis.....	18
2.2.3 Hipodermis.....	18
2.3 Heridas	20
2.3.1 Cicatrización de las heridas	21
2.4 Respuesta inflamatoria.....	26
2.4.1 Inflamación aguda.....	28
2.4.2 Inflamación crónica	29
2.4.3 Mediadores químicos de la inflamación.....	29
2.5 Citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β	32
2.6 Sintetasa de prostaglandinas COX-2	38
2.6.1 Metabolitos del ácido araquidónico (AA)	38
2.6.2 Vía de la Ciclooxygenasa.....	39
2.6.3 Vía de la lipooxygenasa	41
2.7 Producto natural utilizado.....	42
2.7.1 Zarzamora o zarza (<i>Rubus fruticosus</i>)	42
2.7.2 Principios activos.....	43
2.7.3 Compuestos fenólicos	43
2.7.4 Propiedad antioxidante	45
2.7.5 Efecto antiinflamatorio	46

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
4.- OBJETIVOS	49
4.1 Objetivo General	49
4.2 Objetivos Particulares	49
5.- HIPÓTESIS	50
6.- METODOLOGÍA.....	51
6.1 Inmunofluorescencia.....	52
6.2 Análisis Microscópico.....	53
6.3 Análisis Estadístico	54
6.4 Diagrama de flujo.....	55
7.- RESULTADOS	56
8.- DISCUSIÓN	68
9.- CONCLUSIONES	72
10.- BIBLIOGRAFIA.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de los principales componentes de la piel y sus anexos.....	19
Figura 2.	Activación celular que se produce durante el proceso de cicatrización de una herida.....	24
Figura 3.	Fases de curación de las heridas, por primera y segunda intención.....	26
Figura 4.	Representación esquemática de las células intravasculares, componentes de la matriz de tejido conjuntivo y células del tejido conjuntivo, implicados en la respuesta inflamatoria..	28
Figura 5.	Efectos más importantes de la TNF- α e IL-1 β en la inflamación.....	36
Figura 6.	Biosíntesis de Eicosanoides.....	38
Figura 7.	Prostaglandina D2.....	40
Figura 8.	Hoja de zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>).....	43
Figura 9.	Estructura básica de los compuestos fenólicos.....	44
Figura 10.	Diagrama de flujo. Determinación de las proteínas TNF- α , IL-1 β y COX-2, por Inmunofluorescencia.....	55
Figura 11.	Presencia de la proteína TNF-alfa. Cada barra representa la media de la densidad óptica \pm E.E., P<0.05, respecto a los campos medidos de las muestras a diferentes tratamientos. (Control herida sin tratamiento, Cicatricure, Extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL).....	61

- Figura 12. Presencia de la proteína proinflamatoria IL-1 β . Cada barra representa la media de la densidad óptica \pm E.E., $P > 0.05$; con respecto a los campos medidos de las muestras a diferentes tratamientos. (Control herida sin tratamiento, Cicatricure, Extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL).....63
- Figura 13. Presencia de COX-2. Cada barra representa la media de la densidad óptica \pm E.E., $P > 0.05$; con respecto a los campos medidos de las muestras a diferentes tratamientos. (Control herida sin tratamiento, Cicatricure, Extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL).....67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Mediadores químicos en un proceso de cicatrización.....	22
Tabla 2.	Mediadores químicos inflamatorios.....	32
Tabla 3.	Determinación microscópica de TNF- α para los diferentes tratamientos evaluados.....	57
Tabla 4.	Determinación microscópica de IL-1 β para los diferentes tratamientos evaluados.....	61
Tabla 5.	Determinación microscópica de COX-2 para los diferentes tratamientos evaluados.....	65

ABREVIATURAS

%	Tanto por ciento
°C	Grados centígrados
AA	Ácido araquidónico
AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
BSA	Albumina sérica
C3a y C3b	Proteína del complemento 3a y 3b respectivamente
C5a	Proteína del complemento 5a
Ca ⁰	Calcio
cm	Centímetros
cNOS	Óxido nítrico sintasa constitutiva
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa tipo 1
COX-2	Ciclooxigenasa tipo 2
Cu ⁰	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGCG	epigallocatequina-3 galato
EGF	Factor de crecimiento epidérmico

eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
Fe ⁰	Hierro
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2
FRAP	Poder antioxidante para reducir el hierro
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
IA	Inmunidad adaptativa
IFN	Interferón
IGF	Factor de crecimiento insulínico
II	Inmunidad innata
IL-1ra	Interleucina primera
IL-1 β	Interleucina 1β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
KGF	Factor de crecimiento queratocítico

LDL	Lipoproteína de baja densidad
LOX-5	Lipooxigenasa tipo 5
LPS	Lipopolisacáridos
m	Metros
mm	Milímetros
NF-Kb	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Células natural killer
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
ON	Óxido nítrico
PAF	Factor activador de plaquetas
PBS	Buffer fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂

PL	Fosfolipasa
PLA ₂	Fosfolipasa A tipo 2
PLC	Fosfolipasa C
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
Snc	Suero normal de cabra
sTNF-I	Receptor soluble del factor de necrosis tumoral tipo I
sTNF-II	Receptor soluble del factor de necrosis tumoral tipo II
TCS	Tejido celular subcutáneo
TGF- α	Factor de crecimiento de transformación α
TGF- β	Factor de crecimiento de transformación β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TxB	Tromboxano
VEFG	Factor de crecimiento endotelial vascular
Zn ⁰	Zinc

1.- INTRODUCCIÓN

Hoy en día la fitoterapia se sustenta a través de métodos científicos; que profundizan el conocimiento de principios activos y mecanismos de acción involucrados en los fines terapéuticos. Un ejemplo es la hoja de la zarzamora (*Rubus fruticosus*) a la cual se le han atribuido efectos como: regenerante, cicatrizante, antiséptico, antiinflamatorio, entre otros. Tales efectos se relacionan con las propiedades de compuestos fenólicos, que la planta posee. En estudios previos se evaluó el efecto cicatrizante y regenerador que tiene el extracto acuoso de la hoja de zarzamora en rata Cepa Wistar (estómago y piel); debido a esto, es necesario plantear los posibles mecanismos por los cuáles está actuando. Para tal fin, en este trabajo se determinó la presencia de las proteínas involucradas en procesos inflamatorios, infecciosos y febriles como: el factor de necrosis tumoral(TNF- α), **la interleucina 1 β (IL-1 β)** y la ciclooxygenasa tipo 2(COX-2), con relación a la regeneración y/o cicatrización del tejido; por medio de inmunofluorescencia en muestras de piel de rata con previa lesión tratadas con extracto acuoso de la hoja de zarzamora. Los resultados muestran que existe una tendencia a disminuir la presencia de las proteínas proinflamatorias en las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora, en comparación con las muestras de la herida sin tratamiento (control) y las muestras tratadas con el producto comercial cicatricure[®] (control positivo). Lo cual permite deducir, que el uso del extracto acuoso de la hoja de zarzamora se ve implicado en la inhibición de mediadores de la inflamación.

2.- ANTECEDENTES

En México actualmente se han registrado alrededor de 4,500 a 5,000 especies de plantas medicinales, de estas especies sólo el 11% se ha estudiado químicamente, el 2.6% de forma biodirigida y sólo el 1.9% a nivel farmacológico y toxicológico. Actualmente la mayoría de los estudios fitoquímicos se enfocan en identificar compuestos específicos y característicos, presentes en las plantas, los cuales son los responsables de las propiedades terapéuticas que se le adjudiquen a la planta en estudio (Cruz M., 2013).

Debido a que se tiene conocimiento de que la hoja de la planta de zarzamora (*Rubus fruticosus*), posee diferentes propiedades terapéuticas; este trabajo realizó una investigación con relación a una de sus tantas propiedades, que es su efecto antiinflamatorio. El interés del trabajo, radica en conocer si el extracto de la hoja de zarzamora, tiene o no tiene un efecto sobre la expresión de las proteínas TNF- α , IL-1 β y COX-2, que son importantes mediadores de un proceso inflamatorio.

2.1 Respuesta Inmune

Cuando se tiene una herida en la piel, las bacterias bien pueden penetrar al organismo a través de la herida, a pesar de que las células locales mueren y desencadenan una respuesta automática llamada inflamación. La inflamación funciona como una alarma ante cualquier tipo de alteración o invasión, ya que una vez que se dispara, permite que muchas células defensoras lleguen al lugar de la lesión, lo que se observa por enrojecimiento e hinchazón en la zona. Esto sucede porque todos los seres vivos cuentan con el llamado sistema inmune. El sistema

inmune es el encargado de proteger al organismo cuando se ve atacado por microorganismos, partículas extrañas u otro tipo de sucesos que alteran su naturaleza funcional. El sistema inmune es muy complejo, su función se realiza mediante una gran diversidad de mecanismos de defensa, los cuales consisten en identificar lo extraño y destruirlo. Las sustancias segregadas por parte del organismo cuando se generan los mecanismos de defensa, se les denomina anticuerpos; y de forma general a las sustancias extrañas que desencadenan una serie de eventos celulares que provocan la activación de mecanismos de defensa, se les conoce como antígenos. A toda la actuación integrada de un gran número de mecanismos de defensa, por parte del sistema inmune, se le conoce como respuesta inmune (Stock S., 2007).

Existen dos tipos de respuestas inmunes, la innata y la adaptativa; si bien la primera actúa contra las alteraciones o infecciones en su fase inicial y la segunda protege contra una reinfección por algún microorganismo, además de eliminarlo. El sistema inmune está constituido por varios tipos de células y proteínas que cumplen como principal función, evitar una infección. Ambas respuestas defensivas, innata y adaptativa, dependen de las actividades de ciertas células llamadas leucocitos. La inmunidad innata está mediada por los granulocitos y macrófagos; la adaptativa, por la acción de células llamadas linfocitos. Cuando existe un proceso inflamatorio, una variedad de estas células, son responsables de secretar otras proteínas denominadas citocinas, que también intervienen activamente en la respuesta inmune cumpliendo diferentes funciones. Este trabajo tiene el interés de conocer la participación de importantes citocinas como lo son **TNF- α** , **IL-1 β** y la enzima COX-2, dentro de una respuesta inmune; ya

que son inducidas principalmente ante un proceso de inflamación, como sucede cuando hay una herida a nivel de piel (caso de estudio para este trabajo).

Para esta tesis se utilizaron muestras de piel de rata con previa herida, de la cepa Wistar; debido a que este roedor es utilizado como modelo experimental en una gran variedad de investigaciones científicas. Si bien su aspecto exterior es totalmente distinto al de los humanos, pero las similitudes genéticas son asombrosas; esto permite que la rata cepa Wistar no sea un modelo exacto, pero sí útil para comparar la función de diversos órganos del ser humano.

2.2 Piel y anexos

En los mamíferos y en la especie humana la piel está considerada como el órgano de mayor extensión y de mayor peso. La piel representa el 15% del peso total del cuerpo humano; proporcionando al organismo protección mecánica frente a los agentes externos, por la resistencia de su estrato córneo y por el conjunto de fibras colágenas y elásticas que la integran. También defiende al organismo de agentes físicos, químicos, radiaciones, bacterias, hongos y virus. La piel está encargada de regular la absorción de sustancias, interviene como barrera a nivel epidérmico, y regula el medio interno; manteniendo constante la temperatura y su composición fisicoquímica (Montalvo A., 2011).

En la piel se pueden distinguir dos capas principales. La capa externa se denomina epidermis, y la capa interna, que comprende dos partes: el corión (dermis) y el tejido subcutáneo de la piel (hipodermis).

2.2.1 Epidermis

La epidermis capa externa de la piel, forma un revestimiento celular ininterrumpido en la totalidad de la superficie externa del cuerpo. Desde la superficie externa hacia el interior, la epidermis está constituida por los siguientes estratos o capas: estrato córneo, estrato espinoso y el estrato germinativo (Muñoz M., 2013).

2.2.2 Dermis

La dermis, es la primera capa interna de la piel, conocida también como el tejido conectivo fibroso de la piel que se ubica bajo la epidermis, está constituido por una capa superficial o estrato papilar y otra profunda llamada capa o estrato reticular. El estrato papilar se prolonga en la epidermis y se encarga de nutrir a las células de la epidermis; también, se encuentran los órganos sensoriales de la piel que detectan calor, dolor, frío etc. El estrato reticular garantiza la flexibilidad, elasticidad y capacidad de modificación de la piel; en él se encuentran las células encargadas de la reacción defensiva del organismo (glóbulos blancos y células plasmáticas entre otras) contra aquellos cuerpos extraños que penetran la piel desde el exterior (Muñoz M., 2013; Alberts B. y col., 2015).

2.2.3 Hipodermis

La Hipodermis o tejido subcutáneo, es la segunda capa de la piel, constituye un depósito de grasa, que da protección a los vasos sanguíneos y linfáticos así como a los nervios que llegan a este lugar (Figura 1.) (Muñoz M., 2013).

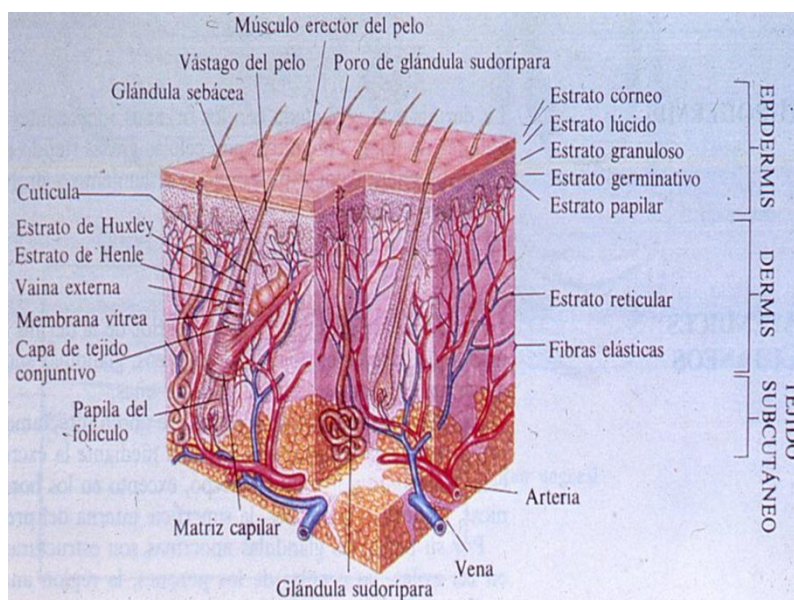


Figura 1. Esquema de los principales componentes de la piel y sus anexos; González I., 2011.

Los principales anexos de la piel, lo forman: el pelo, las uñas, la piel cabelluda, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas (Muñoz M., 2013; Alberts B. y col., 2015).

Como todo órgano, la piel también requiere de cuidados primordiales para el mantenimiento de sus funciones fisiológicas. Estas funciones se pueden ver alteradas cuando la piel sufre algún tipo de trastorno, como cuando se tiene una herida (Juárez, 2015).

2.3 Heridas

Una herida se define como toda interrupción de estructuras anatómicas y funcionales normales; sin embargo existen innumerables clasificaciones de heridas. La cuestión más importante es determinar si la herida es aguda o crónica basándonos en conceptos de orden y temporalidad (Fornes B., 2013).

- Agudas: En ellas la cicatrización sigue un proceso ordenado que tiene como resultados el establecimiento de una cicatriz estable con buenos resultados en cuanto a la integridad del tejido. Son de corta evolución y se caracterizan por una curación completa en un tiempo aproximado de seis semanas y están causadas por un agente externo traumático (Duce 2004 y Palomino 2001).
- Crónicas: El resultado funcional no es el más óptimo, es decir, en muchos casos no alcanza la funcionalidad inicial y se requiere de cirugía para eliminar aquellos elementos que entorpezcan la cicatrización (Duce 2004; Fernández 2013; Fornes B. 2013)

Cuando se lleva a cabo la curación de una herida, ocurre una secuencia de eventos biológicos, teniendo un orden establecido por el proceso de cicatrización y sus distintas fases.

2.3.1 Cicatrización de las heridas

La cicatrización es un proceso biológico con reacciones bioquímicas y mitóticas celulares (Andrades y col., 2004; Fernández y col., 2013). El proceso de cicatrización está encaminado a la curación correcta de las heridas, por medio de reacciones e interacciones celulares, cuya proliferación y diferenciación está mediada por proteínas llamadas citocinas, liberadas al medio extracelular, como parte de una respuesta inmune (Tabla 1.) (Fernández, Muñoz M., Fornes B., 2013).

Tabla 1. Mediadores químicos en un proceso de cicatrización. Fernández y col., 2013.

FACTOR	CÉLULA DE ORIGEN EN LA HERIDA	FUNCIÓN
Factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF	Plaquetas, macrófagos y endotelio.	-Proliferación fibroblástica. -Quimiotaxis. -Activación de neutrófilos y macrófagos.
Factor de crecimiento de transformación beta TGF-β	Plaquetas, neutrófilos, linfocitos, macrófagos.	-Proliferación fibroblástica. -Quimiotaxis. -Angiogénesis.
Factor de crecimiento de transformación alfa TGF-α	Macrófagos, plaquetas, queratinocitos.	-Proliferación fibroblástica y epitelial.
Factor de crecimiento epidérmico EGF	Plaquetas y plasma.	-Proliferación epitelial y fibroblástica. -Formación de tejido de granulación.
Interleucina IL-1β	Macrófagos y linfocitos.	-Proliferación fibroblástica. -Liberación de colagenasas. -Quimiotaxis.
Factor de necrosis tumoral TNF-α	Macrófagos, mastocitos, linfocitos T.	-Proliferación fibroblástica.
Factor de crecimiento fibroblástico FGF	Macrófagos.	-Contracción. -Angiogénesis. -Proliferación epitelial y fibroblástica.
Factor de crecimiento insulínico IGF	Células endoteliales Células musculares.	-Proliferación fibroblástica.
Interferón IFN	Linfocitos y fibroblastos.	-Inhibición de la síntesis del colágeno. -Proliferación fibroblastos

La cicatrización de heridas es un proceso complejo que clásicamente se divide en 3 fases: Fase inflamatoria y hemostasia, fase proliferativa, y fase de maduración. Algunos autores describen fases intermedias, pero de manera general se darán estas 3 fases que se solapan unas con otras (Christian Z. y col., 2000; Muñoz M., 2013).

A nivel nervioso, el traumatismo, va a desencadenar una serie de acontecimientos que darán comienzo a la cicatrización. A nivel de la piel, las células sensoriales del dolor transmitirán la señal a través de sus inervaciones a la medula espinal y al encéfalo, se estimulará el sistema nervioso central causando dos tipos de respuesta, una motora refleja, de alejamiento del foco de dolor, y una respuesta emotiva, que afectará al sistema límbico generando una mezcla de emociones. Simultáneamente se producirá una respuesta autónoma del sistema nervioso simpático, liberando noradrenalina que provocará una vasoconstricción en la zona afectada. El traumatismo implicará una destrucción celular, se liberará su contenido, el cual será detectado por las células de Langerhaans de la piel, que comenzarán a segregar sustancias quimioattractivas para los neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Con ello, comenzará activarse el sistema inmunológico que estará en un estado de alerta por posibles entradas de agentes infecciosos que compliquen la situación (Fornes B. y col., 2013).

De manera general se describe a la inflamación como la liberación de componentes de la sangre. Durante la fase proliferativa se dan dos procesos paralelos e independientes, uno es la formación de un nuevo tejido conectivo rico en fibroblastos, macrófagos y con una matriz extracelular de colágeno, fibronectina y ácido hialurónico; y el otro es la angiogénesis. Los queratinocitos de la periferia, proliferan hasta que entran en contacto unos con otros. Posteriormente, de uno a seis

meses, se iniciará la remodelación o maduración de ese tejido conectivo degradando el colágeno viejo por otro tipo I y sintetizando elastina y proteoglicanos. Durante este proceso de reparación, los macrófagos y las plaquetas, se convierten en células protagonistas en la segregación de factores de crecimiento como el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) entre otros, que estimularán la proliferación fibroblástica y la neovascularización de la herida por parte de las células endoteliales (Figura 2.)(Martínez M. y col., 2013).

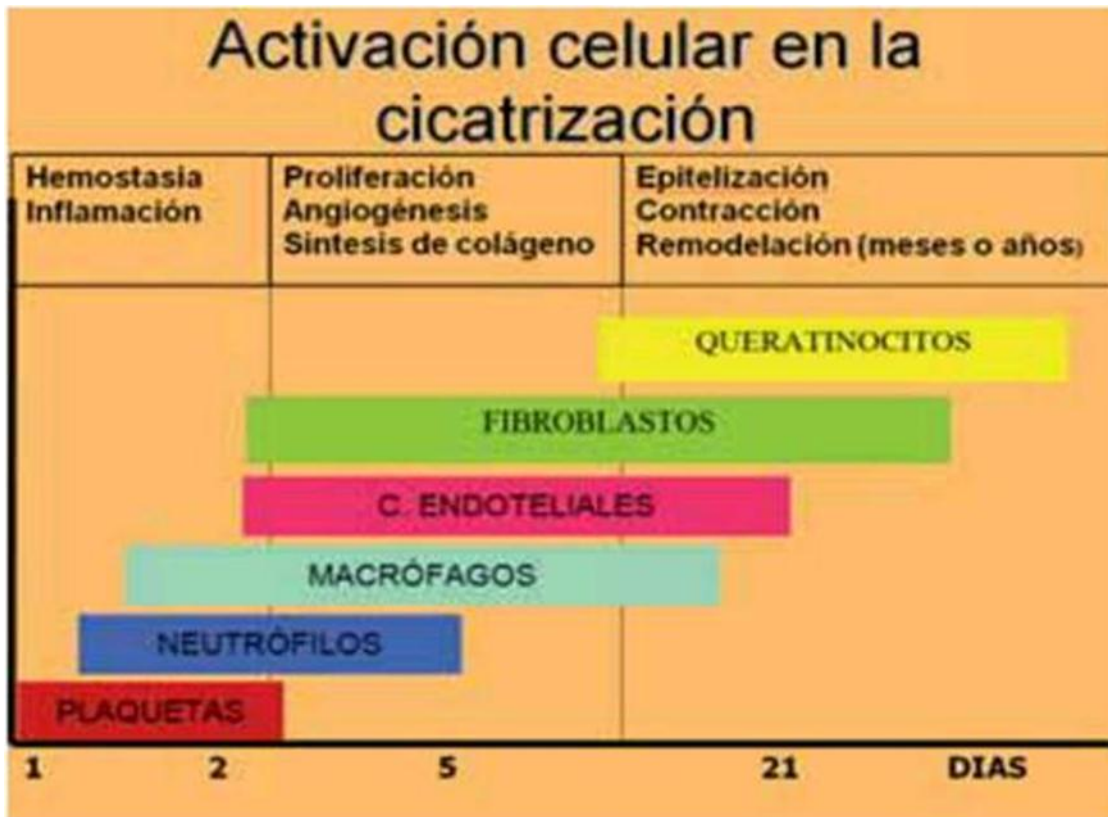


Figura 2. Activación celular que se produce durante el proceso de cicatrización de una herida. Fernández y col., 2013.

La cicatrización de las heridas se puede dar de 3 maneras, según el período y la forma en que ésta ocurra.

-Cicatrización primaria o por primera intención: Los tejidos cicatrizan por unión primaria; teniendo un mínimo edema, sin secreción local, en un tiempo breve, sin separación de los bordes de la herida y con mínima formación de cicatriz.

-Cicatrización secundaria o por segunda intención: Cuando la herida no se afronta por falta de una atención oportuna o por indicación médica, se lleva a cabo un proceso de cicatrización prolongado y complicado. La herida cierra por contracción y la cicatrización es lenta. Generalmente deja una cicatriz inestética.

-Cicatrización terciaria o por tercera intención (cierre primario diferido): Este es un método seguro de reparación en heridas muy contaminadas o en tejidos muy traumatizados. El cierre va desde el tercer al séptimo día de producida la herida, de acuerdo a la evolución local, asegurando así un cierre sin complicaciones (Figura 3.) (Christian Z. y col., 2000; Muñoz M., 2013).

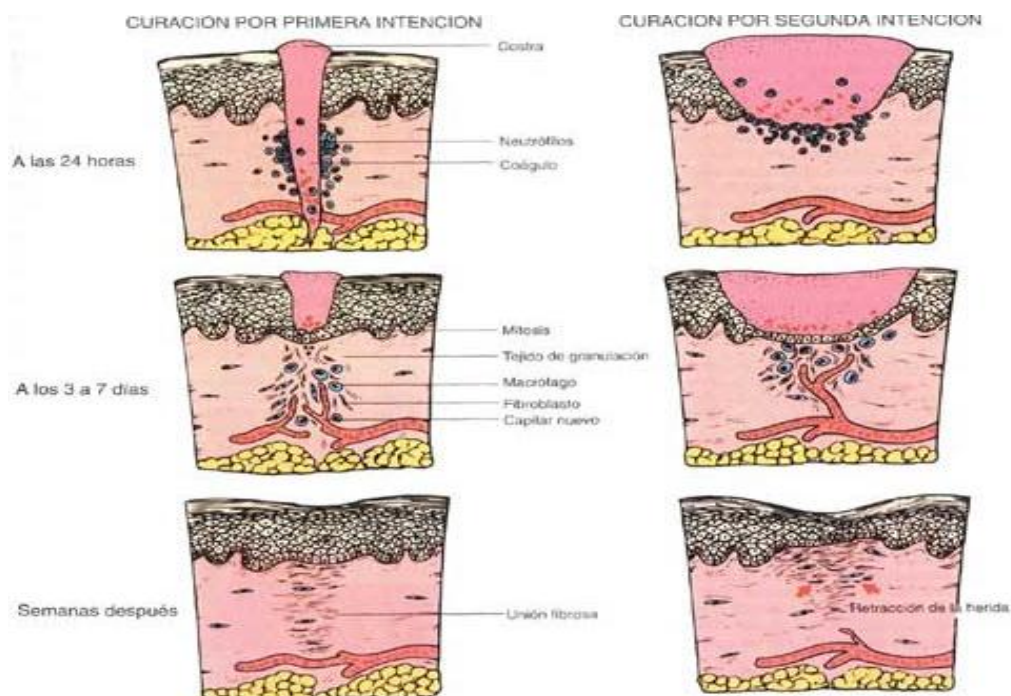


Figura 3. Fases de curación de las heridas, por primera y segunda intención. Anatomía patológica en línea.

La fase del proceso de cicatrización, relevante para la realización de esta tesis, es aquella donde se presenta la respuesta inflamatoria; haciendo hincapié en la expresión de las proteínas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y COX-2 , puesto que se ven involucradas en la regulación de esta fase.

2.4 Respuesta inflamatoria

Anteriormente se describió, que dentro de un proceso de cicatrización, se lleva a cabo una etapa denominada "Fase inflamatoria"; en la cual como su nombre lo dice, se tiene lugar a una respuesta inflamatoria por parte del organismo lesionado. Esta etapa resulta ser fundamental para este trabajo, debido a que es donde se encuentra relacionada la expresión de las proteínas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y COX-2 . La inflamación es un proceso protector del organismo, como la primera respuesta del sistema

inmune; cuyo objetivo es proteger contra daño tisular inducido por diferentes tipos de lesiones. La respuesta inflamatoria es muy útil para eliminar los agentes patógenos, induciendo así la cicatrización y reparación del tejido lesionado. El proceso de reparación de estos tejidos inicia en la fase inicial, pero no termina hasta que finaliza y se ha neutralizado el estímulo inductor de la respuesta inflamatoria (Almeida E., 2002; Álvarez G., 2013). El proceso inflamatorio tiene lugar en el tejido conectivo vascularizado e involucra mediadores plasmáticos, células circulantes, respuesta de vasos sanguíneos y de diferentes células del tejido conectivo. Las células circulantes son los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son células cebadas, fibroblastos, macrófagos y linfocitos residentes. La matriz extracelular se encuentra constituida por colágeno y elastina; así como glucoproteínas adhesivas. La inflamación se divide comúnmente en dos tipos: inflamación aguda e inflamación crónica (Figura 4.)(Ramzi S. y col., 2000; Álvarez G., 2013).

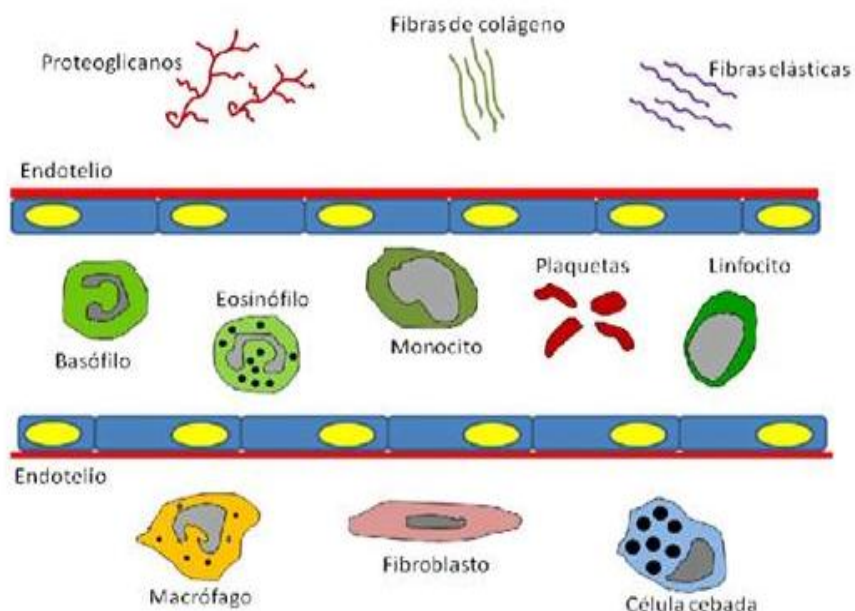


Figura 4. Representación esquemática de las células intravasculares, componentes de la matriz de tejido conjuntivo y células del tejido conjuntivo, implicados en la respuesta inflamatoria. Zaragoza A., 2012.

2.4.1 Inflamación aguda

Es la respuesta inmediata a la lesión, donde se ven implicados principalmente cambios hemodinámicos locales; como un aumento del flujo sanguíneo; induciendo manifestaciones clínicas: enrojecimiento, calor, ardor, y dolor en la zona afectada. Posteriormente, hay salida de leucocitos hacia el tejido lesionado e iniciar el proceso de degradación de los tejidos necróticos. Este tipo de inflamación tiene una duración que varía entre, minutos, horas y pocos días. La inflamación aguda presenta tres componentes principales: las modificaciones en el calibre de los vasos, las alteraciones en la microvasculatura que permiten la salida de proteínas plasmáticas y leucocitos al tejido (Justiniano M. y col., 2000; Álvarez G., 2013). Los mediadores químicos que se generan

durante la respuesta inflamatoria aguda son la IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ y ON (Ramzi S. y col., 2000; Ruibal L. y García, 2004; Álvarez G., 2013).

2.4.2 Inflamación crónica

Es una inflamación prolongada, en la cual se ve activada la lesión tisular y el proceso de reparación, sucediendo al mismo tiempo. La inflamación crónica es nociva para la salud y se constituye en el mecanismo patogénico básico de algunas enfermedades crónicas como el cáncer. La inflamación crónica implica la liberación de un número de mediadores que no son prominentes en la respuesta aguda; como los interferones, Interleucina 12, Interleucina 17 y factores de crecimiento derivados de las plaquetas. Este tipo de inflamación puede durar desde semanas, meses o años (Kumar V., Cotran R., 2003; Álvarez G., 2013).

Durante la inflamación aguda, el flujo de macrófagos al área afectada termina cuando se logra eliminar al agente causal de la respuesta inflamatoria. Por el contrario, durante la inflamación crónica, hay acumulación persistente de macrófagos en el sitio inflamatorio (Álvarez G., 2013).

2.4.3 Mediadores químicos de la inflamación

Los mediadores químicos producidos por células del sistema inmune son los responsables del desarrollo de la respuesta inflamatoria (Nash T., Florin T., 2005; Álvarez G., 2013). Los mediadores inflamatorios pueden ser secretados por células especializadas del sistema inmune y muchos de ellos son liberados a partir de gránulos intracelulares que liberan dichos mediadores en respuesta al estímulo inflamatorio. Como

respuesta al fenómeno inflamatorio, se liberan una serie de mediadores que funcionan de manera coordinada. Dichos mediadores se generan a partir de células o derivan de proteínas del plasma sanguíneo (Kumar V. y Cotran R., 2003; Álvarez G., 2013). Si se ha producido una herida, la lesión de los vasos sanguíneos desencadena inmediatamente dos cascadas enzimáticas protectoras. El sistema de cininas es una cascada enzimática de proteínas plasmáticas que se activa por la lesión tisular y produce diversos mediadores inflamatorios. Esto causa un aumento en la permeabilidad vascular que promueve el flujo de proteínas plasmáticas al sitio de la lesión tisular. El sistema de la coagulación es otra cascada enzimática de proteínas plasmáticas que se desencadena como consecuencia de la lesión en los vasos sanguíneos, llevando a cabo la formación del coágulo que impide la penetración de ciertos microorganismos al torrente sanguíneo (Langer H.F, 2009 y Zaragoza A., 2012).

A continuación se describen las generalidades de los mediadores químicos más importantes del proceso de inflamatorio:

-Histamina: amina básica almacenada en gránulos en los mastocitos y los basófilos que se secreta cuando los componentes C3a y C5a del complemento interactúan con receptores de membrana específicos generalmente.

-Eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos): A diferencia de la histamina, no se encuentran preformados en los tejidos, son generados a partir de fosfolípidos, se consideran los moduladores más importantes en la respuesta inflamatoria. La fuente principal de los eicosanoides es el ácido araquidónico que se encuentra esterificado en fosfolípidos de membrana (Rang H. y col., 2008).

-Prostanoides: Abarcan a las prostaglandinas (PG), que producen vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria, y tromboxanos (TxB), que producen una vasoconstricción y agregación plaquetaria. Son productos de la vía metabólica de la ciclooxygenasa (Rang H. y col., 2008 y Záragoza, 2012).

-Leucotrienos: Son productos de la vía metabólica de la lipooxygenasa: leucotrienos, lipoxinas y otros compuestos. Producen vasoconstricción y permeabilidad vascular (Rang H. y col., 2008 y Záragoza, 2012).

-Factor activador de plaquetas (PAF): El PAF, se libera indirectamente de muchas células inflamatorias activadas por la actividad de la fosfolipasa A₂ y actúa sobre receptores específicos en numerosos tipos celulares.

-**Bradicinina: Nonapéptido que se obtiene del cininógeno, una α -globulina plasmática, por acción de una enzima proteolítica calicreína.**

-Óxido nítrico (ON): El ON, ejerce acciones fundamentales proinflamatorias; es un potente vasodilatador, aumenta la permeabilidad muscular e incrementa la síntesis de prostaglandinas proinflamatorias.

-Neuropéptidos: Son moduladores liberados de las neuronas sensitivas y contribuyen a las reacciones inflamatorias, constituyendo el fenómeno **conocido como "inflamación neurógena"**.

-Citocinas: Son péptidos que en las reacciones inmunitarias e inflamatorias, se liberan desde las células inflamatorias y del sistema inmunitario, por lo que regulan su acción (Rang H. y col., 2008).

En la (Tabla 2.) se describe el efecto de algunos de los mediadores más pronunciados.

Tabla 2. Mediadores químicos inflamatorios, Bernadette F. y Rodak, 2005.

Mediador	Vasodilatación	Permeabilidad Vascular	Quimiotaxis
Histamina	++	↑↑↑	-
Serotonina	+/-	↑	-
Prostaglandinas	+++	↑	+++
Leucotrienos	-	↑↑↑	+++

Para el objetivo de esta tesis, se mencionan aspectos importantes de los mediadores inflamatorios, determinados por densitometría óptica en el trabajo experimental mediante la técnica de inmunofluorescencia; que corresponden a la COX-2 (sintetasa de prostaglandinas) y las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β .

2.5 Citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β .

Las citocinas son mediadores solubles de la respuesta inmunológica, de la inflamación, del crecimiento celular y del desarrollo embrionario. Son proteínas de bajo peso molecular producidas por diferentes tipos de células, macrófagos y linfocitos T activados, que actúan a través de su unión a receptores específico. La expresión de estos receptores está modulada en parte por sus propias citocinas. Algunas citocinas promueven la inflamación por lo que son denominadas citocinas proinflamatorias, mientras que otras suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias, y son llamadas citocinas antiinflamatorias.

Las citocinas ejercen sus acciones a través de tres mecanismos: sobre la misma célula (autocrino), sobre células inmediatas (paracrino) o lejos de la célula productora (endocrino). Las citocinas están implicadas en la respuesta inmunitaria celular y cumplen funciones adicionales que desempeñan un papel fundamental en la inflamación crónica y aguda. Las interleucinas representan una amplia familia de citocinas elaboradas por células hematopoyéticas y cuya principal acción se realiza sobre los leucocitos. Las quimiocinas son citocinas que tienen la capacidad de estimular el movimiento leucocitario (quimiotaxis) y el movimiento dirigido (quimiotaxis), siendo especialmente importantes en la respuesta inflamatoria. Los efectos de las citocinas suelen ser redundantes, e influyen en la acción o síntesis de otras citocinas, son multifuncionales porque una citocina puede dar lugar a acciones reguladoras positivas y negativas (Yong-guo Z. y col., 2010 y Álvarez G., 2013).

Se han identificado más de 100 citocinas y la superfamilia engloba: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral (Rang H. y col., 2008). Como se menciona con antelación, las citocinas reguladoras de la respuesta inflamatoria se dividen en dos:

-Citocinas proinflamatorias, siendo las principales **IL-1 β** y **TNF- α** , participando en las reacciones inflamatorias agudas y crónicas así como en procesos de reparación. Son liberadas principalmente por macrófagos, células natural killer (NK) y otras muchas células para causar así la activación de las cascadas proteicas plasmáticas: coagulación, complemento, fibrinólisis, sistema de cininas, mediadores lipídicos: eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos) y factor activador de plaquetas (PAF), liberación de radicales de oxígeno y óxido

nítrico. Pronto se comprobó que, de forma simultánea, en esta respuesta orgánica también se producían citocinas antiinflamatorias (Rang H. y col., 2008).

-Citocinas antiinflamatorias: Estas citocinas comprenden a las que inhiben aspectos de la reacción inflamatoria como TGF- β , IL-4, IL-10 (antagonista del receptor de la IL-1 y los receptores solubles de TNF- α e IL-13). Todas estas citocinas suprimen la expresión genética de las citocinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF- α (Moore P., 2008 y Durán G. y col., 2002)

Los antagonistas de TNF- α , son llamados **receptores solubles de TNF- α** (sTNF-I) y (sTNF-II), sobresaliendo sTNF-I que dispara la respuesta inmune inflamatoria mediada por TNF- α , **para así ser el principal receptor regulador** de las funciones de dicha proteína, y a un antagonista natural de IL-1 β , **que es el antagonista de su receptor el IL-1ra**. Los primeros, son fragmentos de dos receptores de TNF de membrana, que se liberan en la circulación y al unirse al TNF- α **inhiben** sus actividades biológicas. El segundo, es un miembro de la familia IL-1 que se libera en la circulación sanguínea e impide que la IL-1 β **se una a** sus receptores; tipo I (se encuentra en la mayoría de las células del cuerpo y son mediadores de las respuestas clásicas de la IL-1) y tipo II (localizados sobre linfocitos B, neutrófilos, monocitos y células de la médula ósea) (Fragoso L. y col., 2013).

La IL-1 β y TNF- α **son los principales mediadores de la respuesta inflamatoria aguda**, son producidos principalmente por macrófagos activados y comparten muchas propiedades biológicas (Almeida E., 2002 y Álvarez G., 2013).

Sus acciones más importantes en la inflamación son los efectos que producen sobre el endotelio, los leucocitos y los fibroblastos, así como la inducción de los reactantes de fase aguda. En el endotelio dan lugar a cambios que se denominan activación endotelial y que están regulados a través de la transcripción genética. También inducen la síntesis de moléculas de adhesión endotelial y de diversos mediadores químicos, entre ellos otras citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, eicosanoides, y óxido nítrico. El TNF- α , **también da lugar a la agregación** de los neutrófilos, causando respuestas aumentadas de estas células frente a otros mediadores, así como la liberación de enzimas proteolíticas por parte de células mesenquimales, contribuyendo así a una lesión tisular (Figura 5.) (Tracey D., 2008 y Álvarez G., 2013).

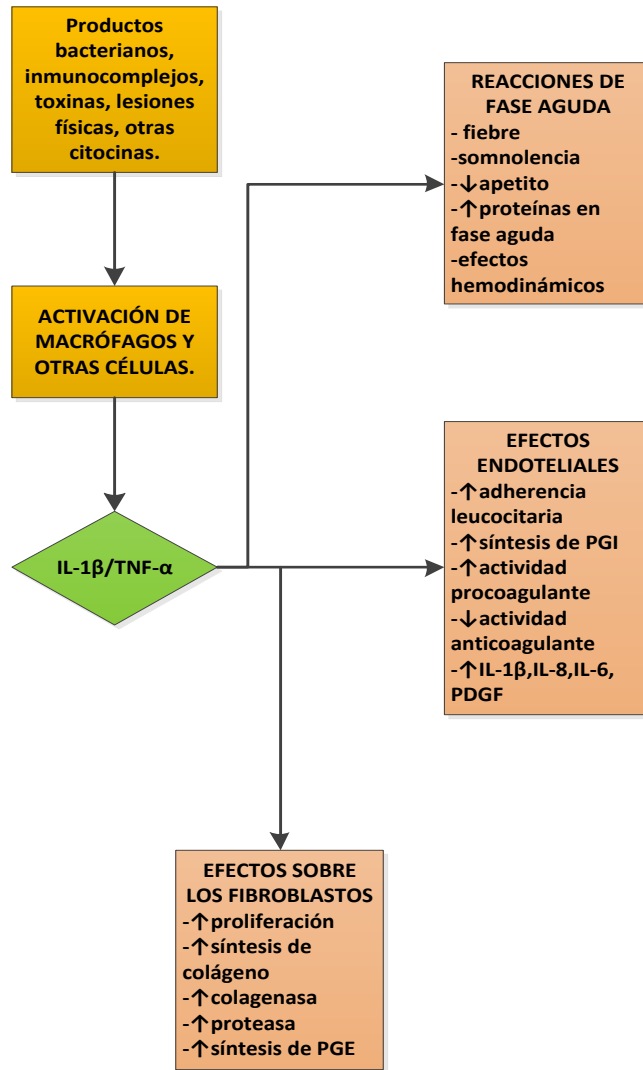


Figura 5. Efectos más importantes de TNF- α e IL-1 β en la inflamación. Zaragoza A., 2012.

La IL-1 β y el TNF- α , también inducen las respuestas de la fase aguda que acompañan a la infección o a los traumatismos, y que consisten en: fiebre, pérdida del apetito, sueño con ondas lentas, liberación de neutrófilos hacia la circulación, liberación de hormonas (adrenocorticotropina y corticoides), y efectos hemodinámicos del shock séptico, como hipotensión, disminución de la resistencia vascular,

aumento de la frecuencia cardíaca y disminución del pH de la sangre. Es importante señalar que el TNF- α es un potente mediador del sistema inmune, se sintetiza principalmente por monocitos y macrófagos tras la estimulación, por ejemplo con lipopolisacárido (LPS), y afecta a una gran cantidad de diferentes órganos y tejidos. Se ha considerado como una citocina de alarma, ya que inicia la respuesta de defensa a la lesión local. A bajas concentraciones en los tejidos, el TNF- α tiene efectos benéficos, tales como el aumento de los mecanismos de defensa del sistema inmune contra las infecciones. A altas concentraciones, el TNF- α puede generar lesión tisular e inducir shock séptico (Yong-guo Z. y col., 2010 y Álvarez G., 2013).

La presencia de elementos moleculares de signos contrarios: citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias se relaciona de la siguiente manera: la respuesta proinflamatoria intensa contribuye al inicio y al mantenimiento de una respuesta defensiva por parte del sistema inmune, pero también se produce una respuesta compensatoria antiinflamatoria que pretende restaurar la homeostasis. Cuando se produce una excesiva cantidad de mediadores proinflamatorios que apocan la respuesta antiinflamatoria el resultado sería una progresiva respuesta inflamatoria sistémica con fracaso multiorgánico. Por el contrario, una respuesta antiinflamatoria excesiva causaría inmunosupresión, que también sería considerada causa de fallo multiorgánico (Durán G., Aller R., Lorente R., Arias P., 2002).

2.6 Sintetasa de prostaglandinas COX-2

2.6.1 Metabolitos del ácido araquidónico (AA)

El AA es un ácido poliinsaturado de 20 átomos de carbono (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico), que procede directamente de la conversión del ácido graso esencial ácido linoleico. No está en forma libre en la célula, se encuentra esterificado en fosfolípidos de membrana. Durante la respuesta inflamatoria, el AA se genera a partir de los fosfolípidos de la membrana celular mediante la acción de la enzima fosfolipasa A₂. Los metabolitos del AA, también denominados eicosanoides, son sintetizados mediante dos clases principales de enzimas: ciclooxigenasas (generadora de prostaglandinas y tromboxanos) y lipoxigenasa (generadora de leucotrienos y lipoxinas); siendo considerados importantes mediadores de la inflamación (Bernadette F. y Rodak, 2005; Rang H. y col., 2008) (Figura 6.)

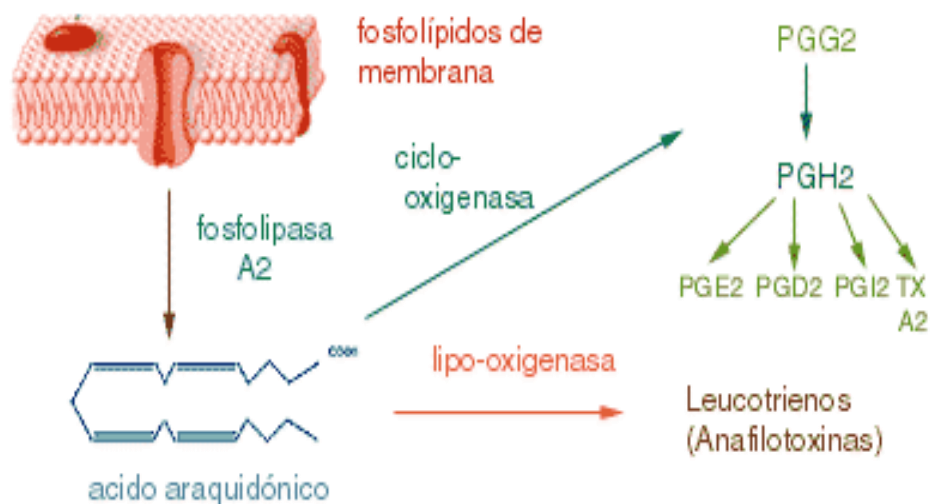


Figura 6. Biosíntesis de Eicosanoides. Díaz y col., 2009.

2.6.2 Vía de la Ciclooxygenasa

Dos isoenzimas de la ciclooxygenasa son capaces de convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas: La PGH Sintetasa 1 (llamada COX-1) y la PGH Sintetasa 2 (llamada COX-2). La primera se expresa de manera constitutiva en los tejidos mientras que la segunda es inducida. La COX-1 tiene principalmente funciones de mantenimiento (por ejemplo la protección gástrica), mientras que la COX-2 se produce tempranamente y de forma masiva por las células inflamatorias e inmunes; por tal razón, la segunda es la de interés para este trabajo (Koyama J., 2000 y Álvarez G., 2013). El conocimiento de estas isoenzimas es importante para el manejo farmacológico de la inflamación con antiinflamatorios no esteroideos, ya que estos medicamentos inhiben dichas enzimas. Los medicamentos que inhiben exclusivamente la COX-2 son útiles para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas, ya que no inhiben la COX-1 y por lo tanto, no se altera la protección de la mucosa gástrica y no se genera gastropatía. Las prostaglandinas se clasifican en diversas series según sus características estructurales y se codifican por una letra (PGD, PGE, PGF, PGG y PGH) y por un subíndice numérico, que indica el número de los dobles enlaces del compuesto. Una de las prostaglandinas más importantes en la inflamación es la PGE₂ ya que participa en la patogenia del dolor y la fiebre durante la respuesta inflamatoria (Bernadette F. y Rodak, 2005; Rang H. y col., 2008; Álvarez G., 2013). Son sustancias de carácter lipídico que juegan un papel de mediadores celulares en la respuesta inflamatoria. La presencia de prostaglandinas también se ve reflejada cuando la PGD₂ (Figura 7.) actúa sobre las células endoteliales de vasos sanguíneos, provocando vasodilatación y aumento de permeabilidad con una llegada de mayor

flujo de sangre a la zona dañada. Produce quimiotaxis de eosinófilos, basófilos y linfocitos T. También actúa sobre células musculares lisas estimulando su contracción (SIIC, 2002). Se destaca participación de la PGI₂, actuando como un poderoso vasodilatador e inhibiendo la agregación plaquetaria. (Díaz P. y col., 2009)

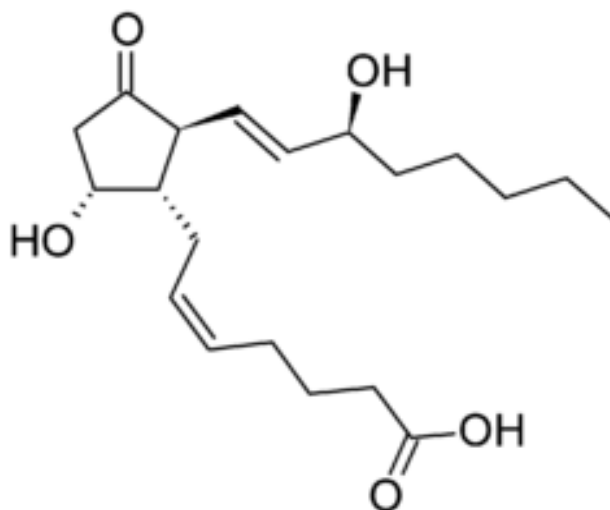


Figura 7. Prostaglandina PGD₂. Medicina molecular en línea.

Se describe de manera general a la COX como una enzima que limita la tasa de producción de prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TxB) a partir de ácido araquidónico libre (Díaz P. y col., 2009). La isoenzima COX-2 es inducida en células inflamatorias en respuesta a citocinas como: TNF- α , **factores de crecimiento, entre otras y produce mediadores** de la inflamación como: prostanoides (Antón A, 2009).

Recalamos la importancia de la COX-2 para este trabajo, debido a que es inducida en respuesta a citocinas proinflamatorias TNF- α . **La COX-2**, no suele estar presente en la mayoría de las células, pero una fuerte regulación le permite ser rápidamente expresada en respuesta a señales relacionadas con el crecimiento. Esté rápido incremento en la expresión

resulta en un aumento en la síntesis de prostaglandinas asociadas con la modulación de la inflamación (Bernadette F. y Rodak, 2005; Moore P., 2008; Antón A, 2009). Puesto que COX- 2 es una sintetasa de prostaglandinas, la consecuencia más obvia de la sobre expresión de COX-2 es el aumento en la producción de prostaglandinas, niveles altos de COX-2 pueden contribuir a la carcinogénesis modulando el metabolismo xenobiótico, apoptosis, vigilancia inmune y angiogénesis (Katzun y Bertram, 2007).

2.6.3 Vía de la lipooxigenasa

Describimos de manera general, que los productos iniciales por esta vía, son generados por tres lipooxigenasas diferentes; que están presentes sólo en algunos tipos celulares. El metabolismo del ácido araquidónico por vía de la 5-Lipooxigenasa da como resultado la producción de ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos los cuales rápidamente se convierten en Leucotrienos (Almeida E., 2002 y Álvarez G., 2013).

Para la reparación de una herida, hoy en día se utilizan alternativas para coadyuvar este proceso. Entre las diferentes opciones, encontramos el uso de medicamentos como son: antibióticos, antiinflamatorios, analgésicos, cicatrizantes, regeneradores tisulares o remedios herbolarios. El objetivo de la mayoría de estos tratamientos, se basa en la regulación de los diferentes moduladores químicos que participan en una respuesta inflamatoria. En este trabajo se utilizó un tratamiento fitoterapéutico, con base al uso del extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*); por sus propiedades ya conocidas.

2.7 Producto natural utilizado

La fitoterapia, es el nombre que recibe el estudio profundizado del uso de las plantas con fines terapéuticos. A través de la historia se sabe, que desde tiempos antiguos, el uso de plantas medicinales; ha sido exitosa. Sin embargo se requiere validar los beneficios y efectos de las propiedades medicinales de las plantas, a través de métodos científicos (Ancheta y Guzmán 2011).

2.7.1 Zarzamora o zarza (*Rubus fruticosus*)

El género *Rubus*, es uno de los géneros con mayor número de especies, aproximadamente 750; en México se han descrito 28 especies del género y algunas de ellas son endémicas (Espinosa, 2011); encontrándose localizadas en zonas boscosas del centro y sur del país (López, 2009). La planta de zarzamora (*Rubus fruticosus*); ha sido usada en la medicina tradicional griega, china, mexicana y en otras partes del mundo. Los extractos tanto de hojas como de frutos, de la planta de zarzamora se han utilizado para el tratamiento de varias enfermedades (Espinosa, 2011), como la diabetes mellitus, reumatismo, hemorroides; entre otras; gracias a su actividad terapéutica astringente, hipoglucémica, antiinflamatoria, y antioxidante; entre las más mencionadas en la literatura (Cai et al., 2012).

Ya que se sabe, que la hoja de esta planta, posee un efecto antiinflamatorio; la investigación consiste en indagar si existe un posible efecto al usar como tratamiento, el extracto acuoso de la hoja de zarzamora; sobre la expresión de proteínas involucradas en una respuesta inflamatoria como son: TNF- α , IL-1 β y COX-2 (Figura 8.)



Figura 8. Hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*). Vicentz F., 2007.

2.7.2 Principios activos

La caracterización fitoquímica reportada en la literatura, nos describe que la hoja de zarzamora contiene una diversidad de bioactivos, como son: terpenos, alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos. La investigación de esta tesis se enfoca en el último grupo; debido a que en una gran cantidad de reportes científicos han sido señalados como los principales responsables de los efectos terapéuticos de nuestro interés: antiinflamatorio y antioxidante. Estas dos propiedades terapéuticas nos describen la relación que existe entre los compuestos fenólicos presentes en la hoja de zarzamora y su efecto implicado en la expresión de proteínas características en una respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-1 β y COX-2)(Cruz M., 2013; Muhammad Z., 2014).

2.7.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles, constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos y ubicuos de las plantas. Así estos compuestos son considerados esenciales para su fisiología (Granado, 2010; Cruz M, 2013).

Estructuralmente, los compuestos fenólicos son derivados del benceno con uno o más grupos hidroxilo sustituyentes (Figura 9.), frecuentemente acompañados de sustituciones funcionales, como: ésteres, glicósidos y otros; lo que los hace ser solubles en agua; localizándose en las vacuolas (Wang y col., 2008; Cuevas R., 2011).

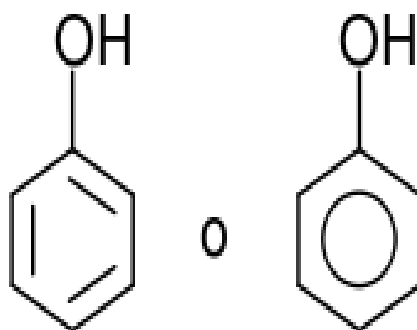


Figura 9. Estructura básica de los compuestos fenólicos. Cruz M., 2013.

Sobre la base de sus propiedades estructurales, generalmente los compuestos fenólicos se clasifican en: ácidos fenólicos, flavonoides (isoflavonas, flavanos, flavonoles, flavanoles y antocianidinas), cumarinas, estilbenos, diferuloilmetanos, ligninas y taninos (Paredes-López y col., 2010; Wu-Yang y Yi-Zhong, 2010). Se han descrito, más de 8,000 polifenoles distintos que pueden clasificarse en una gran variedad de grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos (Cuevas R., 2011 y Cruz M, 2013).

Las propiedades y efectos de importancia médica para esta investigación son: el efecto antiinflamatorio y antioxidante. Estas dos propiedades involucran los mecanismos necesarios para poder coadyuvar la regulación de una respuesta inflamatoria.

2.7.4 Propiedad antioxidante

La capacidad antioxidante de *Rubus fruticosus*, se debe principalmente a las propiedades óxido-reducción de sus compuestos fenólicos, por lo que pueden desempeñar un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres. La acción antioxidante de los compuestos fenólicos incluye la supresión de la enzima COX-2 y oligoelementos que participan en la producción de radicales libres. Los antioxidantes pueden reaccionar con los radicales, convirtiéndose en otro radical, pero estas moléculas son relativamente más estables en presencia de otro radical libre; a consecuencia, atrapan los radicales y detienen las reacciones en cadena, evitando daños a nivel celular y disminuyendo un estrés oxidativo. Es importante mencionar que al existir una situación de estrés oxidativo, se estimula y provoca una amplificación de la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL- 1β). Todo en conjunto puede ocasionar un desequilibrio redox en células del sistema inmunitario; induciendo una respuesta inflamatoria crónica (Cuevas R., 2011; Álvarez G., 2013). La relativa estabilidad de los antioxidantes que contienen radicales con electrones desapareados es generalmente el resultado de la presencia de enlaces conjugados y un electrón desapareado que pudiera estar deslocalizado. Los compuestos fenólicos, son antioxidantes muy efectivos por la deslocalización de sus electrones. La quercetina y catequina son los flavonoides que presentan una mayor actividad antioxidante; sus propiedades estructurales son responsables de una acción inhibitoria contra los radicales hidroxilo y superóxido, que son los principales inductores de la peroxidación de lípidos. A consecuencia de lo descrito anteriormente, resultan ser

eficaces en la inhibición de los procesos de peroxidación lipídica de los fosfolípidos de membrana (Díaz y col., 2010).

2.7.5 Efecto antiinflamatorio

Es muy conocida la relación existente entre el estrés oxidativo y las enfermedades inflamatorias (Herencia et al., 2001; Ballester E., 2006). La reacción inflamatoria se caracteriza por la hiperproducción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno; agentes oxidantes que pueden desencadenar por sí solos una respuesta inflamatoria. Los antioxidantes como los flavonoides que se encuentran en el extracto de la hoja de zarzamora, también presentan un efecto antiinflamatorio. Éste se relaciona en parte por su actuación sobre las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico: Ciclooxygenasa y lipooxygenasa. Se describe que el grupo fenólico de los curcuminoides, presentan un efecto antiinflamatorio, por el efecto inhibitor que ejercen sobre el metabolismo del ácido araquidónico así como tener la capacidad de inhibir la producción de mediadores de la inflamación como TNF- α (Meza M. y col. 2000; Shishu y col., 2008). Otro mecanismo por el cuál actúan los compuestos fenólicos, como agentes antiinflamatorios, se relaciona con la demostración de que los flavonoides polihidroxilados inhiben preferentemente la enzima 5-LOX y los menos hidroxilados inhiben la COX-2, destacando que existen estudios reportados, que apuntan a un efecto inhibitor preferentemente de la COX por parte de las flavonas (Kim et al., 2004; Ballester E., 2006). En la literatura se reportan estudios, donde se habla del papel inhibitorio de los compuestos fenólicos, en la síntesis de mediadores inflamatorios como los son específicamente el TNF- α y la IL-1 β ; **entre la variedad de mecanismos**, se conoce la capacidad que tienen los flavonoides en

inhibir la actividad de la fosfodiesterasa; la cual está relacionada con la inhibición de la producción de citocinas, debido a que la fosfodiesterasa modula la concentración del adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) en células inflamatorias, reduciendo la activación celular y la liberación de éstas (Goodman y Guilman, 2012).

Ambas propiedades terapéuticas, tanto la capacidad antiinflamatoria como la antioxidante principalmente de los flavonoides, también se ha correlacionado con la reducción de la activación del factor nuclear de transcripción (NF-κB), que desempeña un papel importante en la inflamación a través de la regulación de genes que codifican para citocinas proinflamatorias TNF-α e IL-1β, moléculas de adhesión, factores de crecimientos y enzimas inducibles como la COX-2 y la iNOS (Ballester E., 2006). De manera particular se ha descrito que el polifenol epigallocatequina-3 galato (EGCG), inhibe la expresión génica de las citocinas proinflamatorias ya mencionadas, debido a que ejerce una acción directa o indirecta sobre NF-κB, regulando así la inflamación. También se conoce que los polifenoles pueden inducir la producción de sirtuina 1, la cual es capaz de regular la función de NF-κB, lo que resulta beneficioso para reducir los efectos negativos de la inflamación. Entre los polifenoles activadores de la sirtuina-1 destaca el resveratrol (Suganuma M. y col., 2000; Díaz y col., 2010; Goodman y Guilman, 2012; Alcolea M. y Kaliman, 2015).

Así a través de una gran variedad de mecanismos de acción, los compuestos fenólicos interfieren en la expresión, producción y función de las citocinas TNF-α e IL-1β y la enzima COX-2; ejerciendo con esto una excelente actividad antiinflamatoria (Muhammad y col., 2014; Muñoz, 2014; Juárez, 2015; Aguilera y Reza, 2011; Cruz, 2013).

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inflamación es una respuesta protectora, cuyo principal objetivo es liberar al organismo del elemento causante del daño celular y de las consecuencias de ese daño. Sin la inflamación, las infecciones se diseminarían y las heridas nunca cicatrizarían. Por otro lado, la inflamación no curada adecuadamente es la base de las reacciones de hipersensibilidad y enfermedades inflamatorias crónicas. Durante una respuesta inflamatoria, existe la liberación de sustancias mediadoras de diferentes funciones, entre las principales están; las citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y la enzima COX-2. Estos mediadores contribuyen principalmente a la aparición de las manifestaciones indicativas de una respuesta inflamatoria.

La actividad antiinflamatoria en la actualidad, ha despertado un gran interés dentro del área de investigación fitoquímica; debido a la capacidad que han presentado ciertos compuestos bioactivos de origen vegetal, en bloquear la respuesta inflamatoria mediante diferentes mecanismos de acción. Por lo tanto este trabajo tiene el interés de determinar por densitometría óptica mediante la técnica de inmunofluorescencia, la presencia de proteínas moduladoras de una respuesta inflamatoria, como son: TNF- α , IL-1 β y COX-2; en muestras de piel lesionada de rata previamente tratadas fitoterapéuticamente con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*), debido a la propiedad antiinflamatoria que esta planta posee.

4.- OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Determinar la presencia de los marcadores TNF- α , IL-1 β y COX-2, relevantes en la inflamación, de un proceso cicatrizante.

4.2 Objetivos Particulares

- Determinar la presencia de las proteínas TNF- α , IL1- β y COX-2; en muestras con daño tisular, previamente tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*).

- Realizar un comparativo de la presencia de los marcadores TNF- α , IL-1 β y COX-2, entre las muestras previamente tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*), las muestras de la herida sin tratamiento (control) y las muestras tratadas con el producto comercial cicatricure[®] (control positivo).

5.- HIPÓTESIS

Dado que el extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*) ejerce un efecto antiinflamatorio, se espera por lo tanto una disminución de la expresión de los principales marcadores de la inflamación como son TNF- α , IL-1 β Y COX-2, en las muestras evaluadas.

6.- METODOLOGÍA

Los bloques de parafina con los tejidos de piel previamente tratados con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora y el producto comercial cicatricure® (control positivo), así como el control intacto; fueron proporcionadas por la Dra. Teresa Neri y la Dra. Ruth Bustamante. Las muestras correspondientes a tejido de piel, fueron obtenidas de un estudio anterior "Evaluación del efecto cicatrizante del extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*) en ratas cepa Wistar y realización de histopatología" (Juárez 2015). Estas muestras corresponden a tejido de piel de rata con inducción de herida, que fueron tratadas cada 24 horas por 8 días, después de haber lesionado la piel. Los tratamientos fueron con: producto comercial (cicatricure®) como control positivo y el extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*) a 10 y 100mg/mL; por vía tópica. Las muestras fueron facilitadas por la QFB. Laura Juárez.

6.1 Inmunofluorescencia

Se evaluó la expresión de las proteínas **TNF- α** , **IL-1 β** y **COX-2** mediante la medición de la densidad óptica para cada muestra, a través de la técnica de Inmunofluorescencia; con la finalidad de realizar un comparativo de los diferentes tratamientos realizados previamente en muestras de piel de rata de la cepa Wistar. De manera general se describe el procedimiento seguido para todas las muestras.

- Desparafinación-Hidratación de las muestras

En la primera fase experimental, se realizó la desparafinación de las muestras de los cortes tisulares, para poder trabajarlas adecuadamente.

- Recuperación Antigénica

La recuperación antigénica se realizó a través de la incubación con calor.

- Bloqueo de sustancias endógenas

Se realizó el bloqueo de sustancias endógenas que pudieran interferir en los resultados, agregando a las muestras, Solución de bloqueo de peroxidasas, albúmina sérica (BSA) y Suero Normal de Cabra (Snc).

- Aplicación de Anticuerpos

El anticuerpo primario puede estar en contacto con la muestra entre 1 y 72 horas, dependiendo del grosor de los cortes, el grado de hidratación, el anticuerpo empleado y la afinidad. Para la aplicación de los anticuerpos se recomiendan temperaturas bajas (4°C) para incubaciones largas (>12horas) y a temperatura ambiente o 37°C para incubaciones cortas. Los anticuerpos primarios, que se utilizaron, fueron comerciales y específicos para cada proteína: anti-(**TNF- α**), anti-(**IL-1 β**)

y anti-(COX-2); diluidos 1:200 en PBS. Al día siguiente de la incubación, se concluyó el procedimiento con la colocación del anticuerpo secundario (α -conejo), diluido 1:500 en PBS, marcado con el colorante fluorescente Alexa fluor con una emisión de 488nm.

- Dejar secar el sellado de laminillas y observar al microscopio.

6.2 Análisis Microscópico

El análisis se llevó a cabo en el microscopio de epifluorescencia marca Zeiss. Al observar las muestras se realizaron tomas fotográficas en aumentos de 40X, en el canal 1 (color verde) que permite observar el colorante fluorescente Alexa fluor con una emisión de 488nm, y en el canal 3 (colores, verde, azul y rojo) permitiendo observar además del color verde inducido por Alexa fluor; el color azul emitido por el colorante Hoechst con una longitud de onda de 461nm; que nos permite tener un contraste para la identificación de las proteínas.

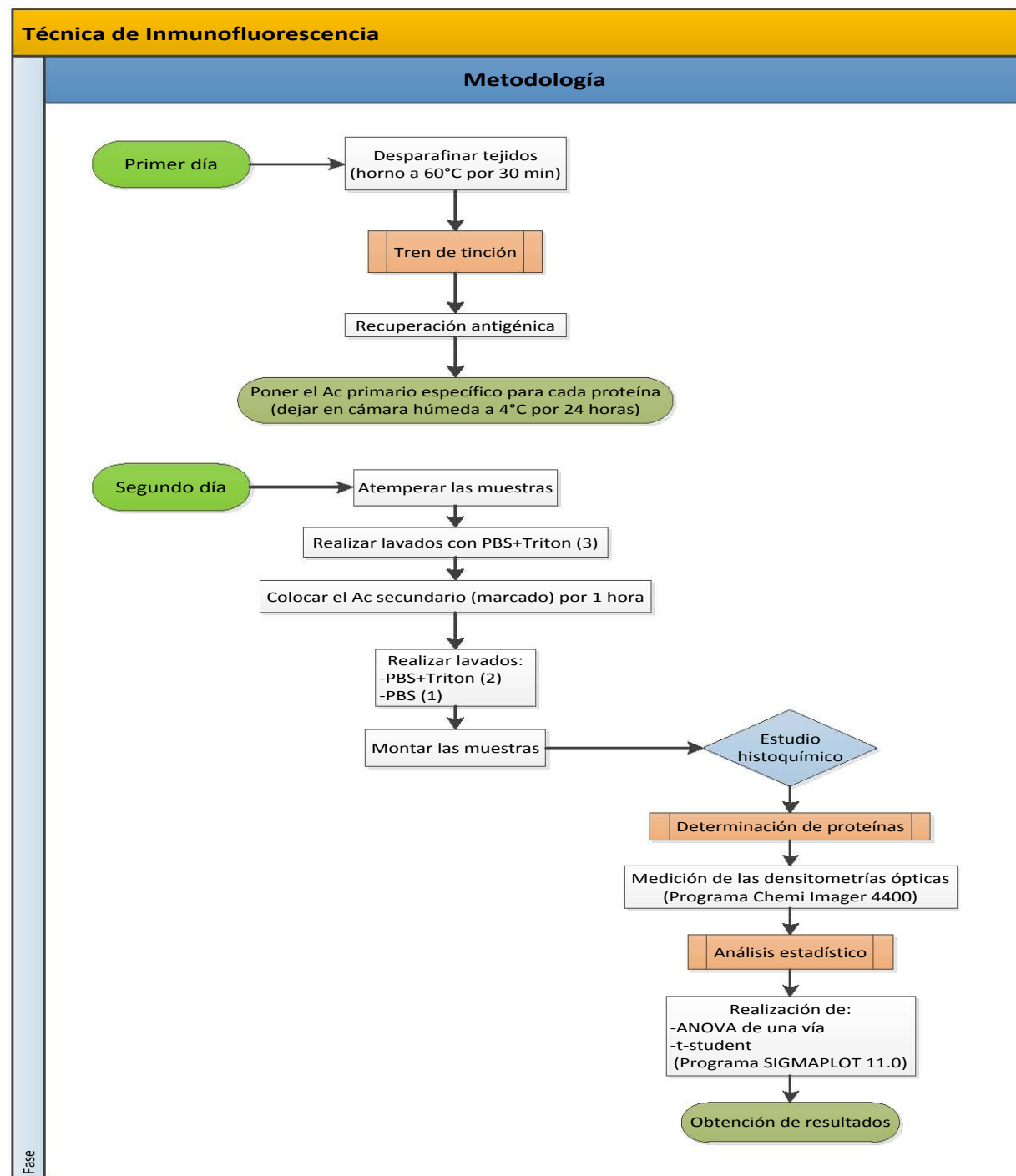
La densitometría óptica, es una técnica que permite medir la cantidad de luz que absorbe un material, para determinar cuantitativamente y objetivamente la presencia de determinadas proteínas. Se basa en medir la densidad óptica en cada región de una muestra observada al microscopio (López P., 2011). Una vez obtenidas las imágenes de cada muestra, se realiza la densitometría óptica de 3 campos por muestra, para cada una de las proteínas (TNF- α , IL-1 β y COX-2), mediante el programa Chemi Imager 4400.

6.3 Análisis Estadístico

Por el número de tratamientos evaluados se realizó la prueba estadística paramétrica, ANOVA de una vía para cada proteína, estableciendo diferencias significativas si $p < 0.05$. Para el caso donde no se encontraron diferencias significativas pero notables tendencias, se utilizó una prueba t-student para los diferentes tratamientos. Se grafican los resultados obtenidos de las densitometrías ópticas, para cada proteína (TNF- α , IL-1 β y COX-2), empleando el programa estadístico SIGMAPLOT versión 11.0.

6.4 Diagrama de flujo

Figura 10. Diagrama de flujo. Determinación de las proteínas TNF- α , IL-1 β y COX-2, por Inmunofluorescencia.

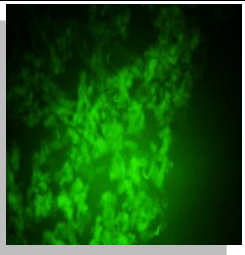
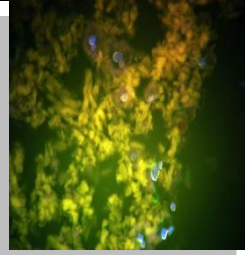
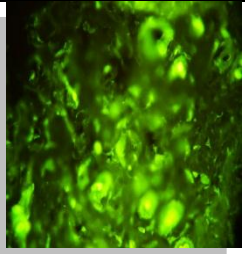
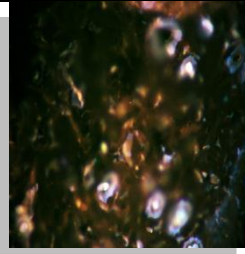
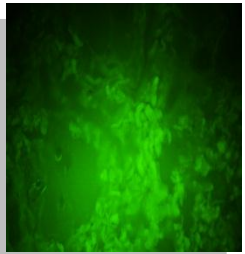

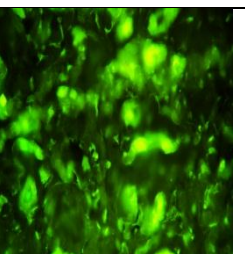
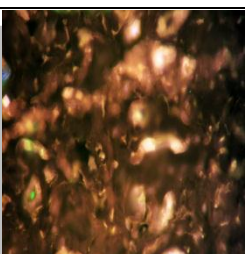


7-. RESULTADOS

En la Tabla 3, se observan las imágenes de las inmunofluorescencias, para cada uno de los diferentes tratamientos a 40 aumentos. Cada una de las imágenes nos permite observar la presencia de la proteína TNF- α , mediante la coloración verde fluorescente del anticuerpo secundario marcado con Alexa fluor. También se visualizan las mismas imágenes con un contraste de fluorescencia azul emitido por el colorante Hoechst, permitiendo ubicar los núcleos celulares y así poder observar la distribución de la proteína en cada una de las muestras.

La diferente fluorescencia que emiten los colorantes Alexa fluor (marcaje) y Hoechst (contraste), permite observar una mayor expresión de la proteína en las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 100mg/mL y las muestras del control del positivo, en comparación a la expresión de la proteína en la muestra control (herida sin tratamiento). Sin embargo para las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10mg/mL, se observa una disminución de la fluorescencia, con respecto a la fluorescencia emitida en las muestras control. Esta observación hace referencia a que existe una menor presencia de la proteína, en las muestras con el tratamiento de extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10mg/mL vs los otros tratamientos.

Tabla 3. Determinación microscópica de TNF- α para los diferentes tratamientos evaluados. EEAF=Espectro de emisión Alexa fluor, 488nm. EEH=Espectro de emisión Hoechst, 461nm. 40x=40 aumentos.

Tratamiento	TNF- α		Observaciones
	EEAF 40X	EEH 40X	
Control herida sin tratamiento			Se evidencia la presencia de TNF- α , con coloración fluorescente verdosa.
Cicatricure			El contraste nos permite observar una concentración mayor de la proteína con respecto al control.
Extracto acuoso de la hoja de zarzamora 10mg/mL			La presencia de la proteína implicada se encuentra en menor cantidad con respecto al control.
Extracto acuoso de la hoja de zarzamora 100mg/mL			Se observa que la expresión de TNF- α es mayor con respecto a los demás tratamientos.

En la Figura 11. Se muestran las densitometrías ópticas obtenidas, para determinar la presencia de la proteína TNF- α . **Para la evaluación de las densitometrías ópticas de cada uno de los tratamientos, se utilizó la prueba estadística ANOVA de una sola vía; resultando una $p < 0.05$, $p = 0.012$, lo cual constata diferencias significativas entre los tratamientos. Sabiendo que el promedio de la densidad óptica $\pm E.E.$, es proporcional a la presencia de la proteína TNF- α , en los diferentes tratamientos evaluados; se observa mayor presencia de TNF- α en las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 100mg/mL (EA100mg/mL), en comparación a la muestras control. También se observa una menor presencia de TNF- α , en las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10mg/mL (EA10mg/mL), con respecto al control positivo. Posteriormente se realizaron a través del método de Dunnett, las comparaciones múltiples de los distintos tratamientos vs la muestra control, no obstante no hubo diferencias significativas.**

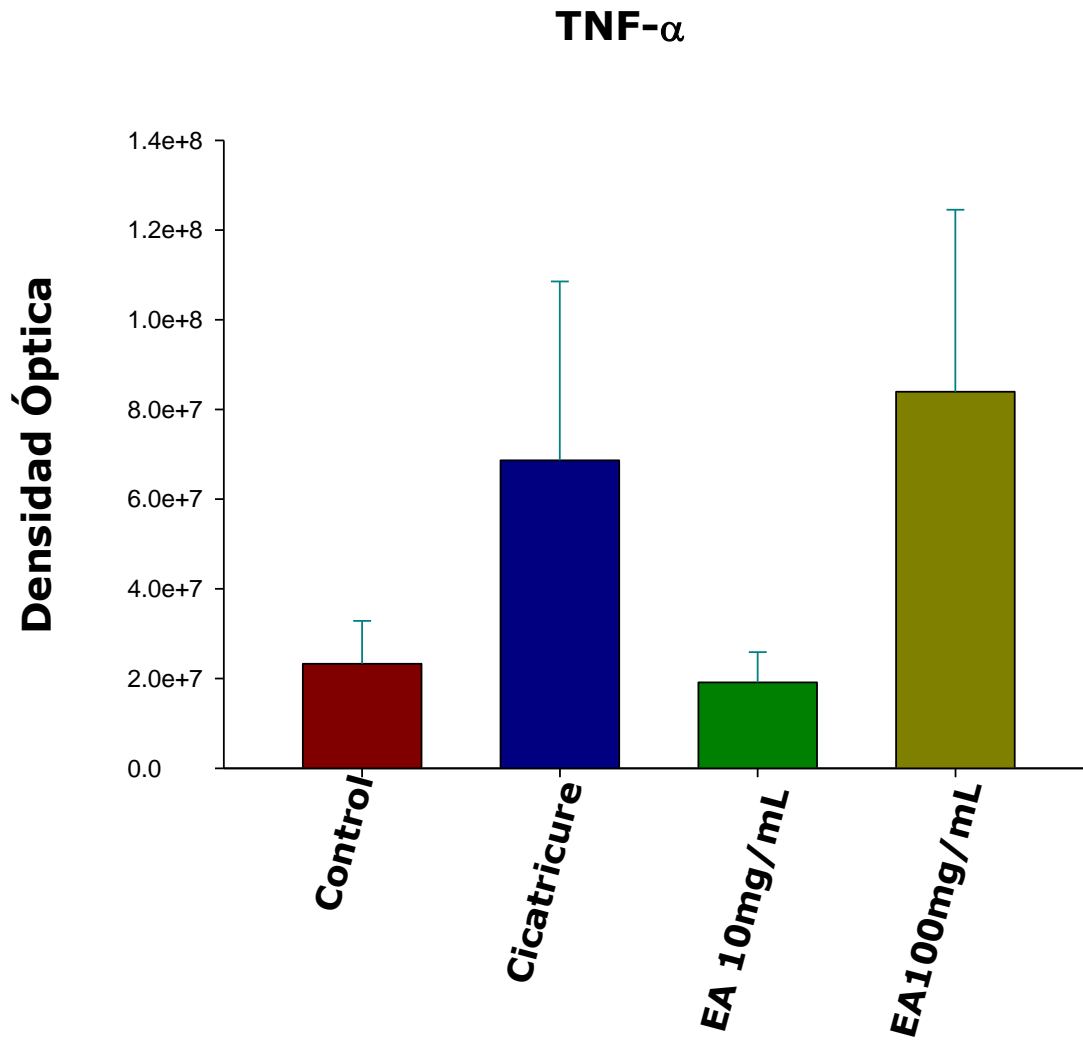
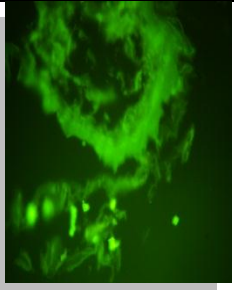
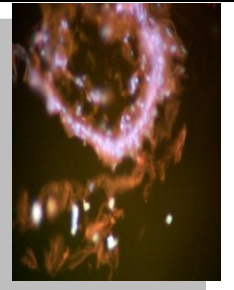
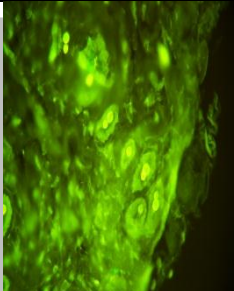
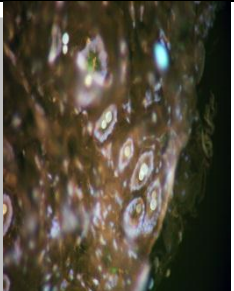
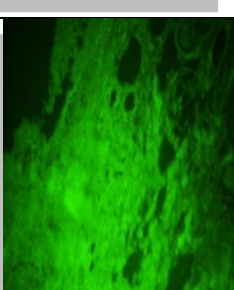
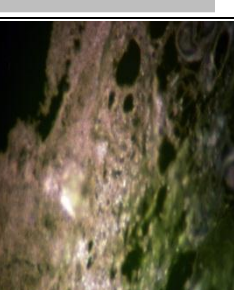
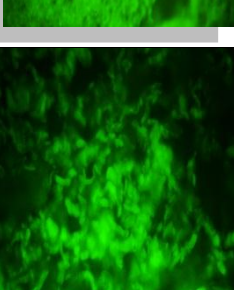
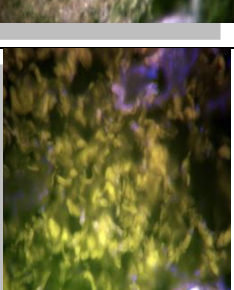


Figura 11. Presencia de la proteína TNF- α . Cada barra representa la media de la densidad óptica \pm E.E., $P < 0.05$, respecto a los campos medidos de las muestras a diferentes tratamientos. (Control de herida sin tratamiento, Cicatricure, Extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL).

En la Tabla 4, se muestran las fotografías de los cortes histológicos observados al microscopio a 40 aumentos. Las densitometrías ópticas de las imágenes, se analizaron en el programa Chemi Imager 4,400 para cada uno de los tratamientos con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora y los controles. En las imágenes se observa la presencia de la proteína IL-1 β , mediante la coloración fluorescente verdosa del anticuerpo secundario marcado con Alexa fluor; y el contraste de fluorescencia azul emitido por el colorante Hoechst, permitiendo tener una mejor visualización de la proteína en cada una de las muestras.

De manera global, en las fotografías microscópicas se puede presenciar una mayor expresión de la proteína IL-1 β , en las muestras del control positivo (cicatricure[®]); en comparación con las imágenes de los tratamientos restantes, incluidas las muestras del control (herida sin tratamiento). De manera que para los tratamientos con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL, se hace alusión de una menor presencia de proteína.

Tabla 4. Determinación microscópica de IL-1 β para los diferentes tratamientos evaluados. EEAF=Espectro de emisión Alexa fluor, 488nm. EEH=Espectro de emisión Hoechst, 461nm. 40x=40 aumentos.

Tratamiento	IL-1 β		Observaciones
	EEAF 40X	EEH 40X	
Control herida sin tratamiento			El contraste nos permite observar poca presencia de la proteína IL-1 β en el corte tisular.
Cicatricure			La fluorescencia verde indicativa de la expresión de la proteína, es mayor con respecto al control.
Extracto acuoso de la hoja de zarzamora 10mg/mL			Se evidencia menor presencia de la proteína IL-1 β
Extracto acuoso de la hoja de zarzamora 100mg/mL			Se manifiesta menor cantidad de proteína en la muestra, con respecto a la muestra de cicatricure [®]

En la Figura 12. Se observan las medias de la densidad óptica \pm E.E., de los diferentes tratamientos. Estadísticamente se evaluaron las densitometrías ópticas a través de la prueba ANOVA de una sola vía con $p > 0.05$, $p = 0.198$; lo cual afirma que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo el gráfico permite mostrar que existe tendencia de una menor presencia de la proteína proinflamatoria **IL-1 β** , en las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL, con respecto a las muestras del control positivo (cicatricure[®]). Por tal razón se consideró oportuno realizar en test estadístico t-student, entre ambos tratamientos descritos, obteniendo así una $t = 4.754$ y una $p < 0.05$, $p = 0.042$; indicando que sí existe una diferencia significativa entre los dos tratamientos evaluados.

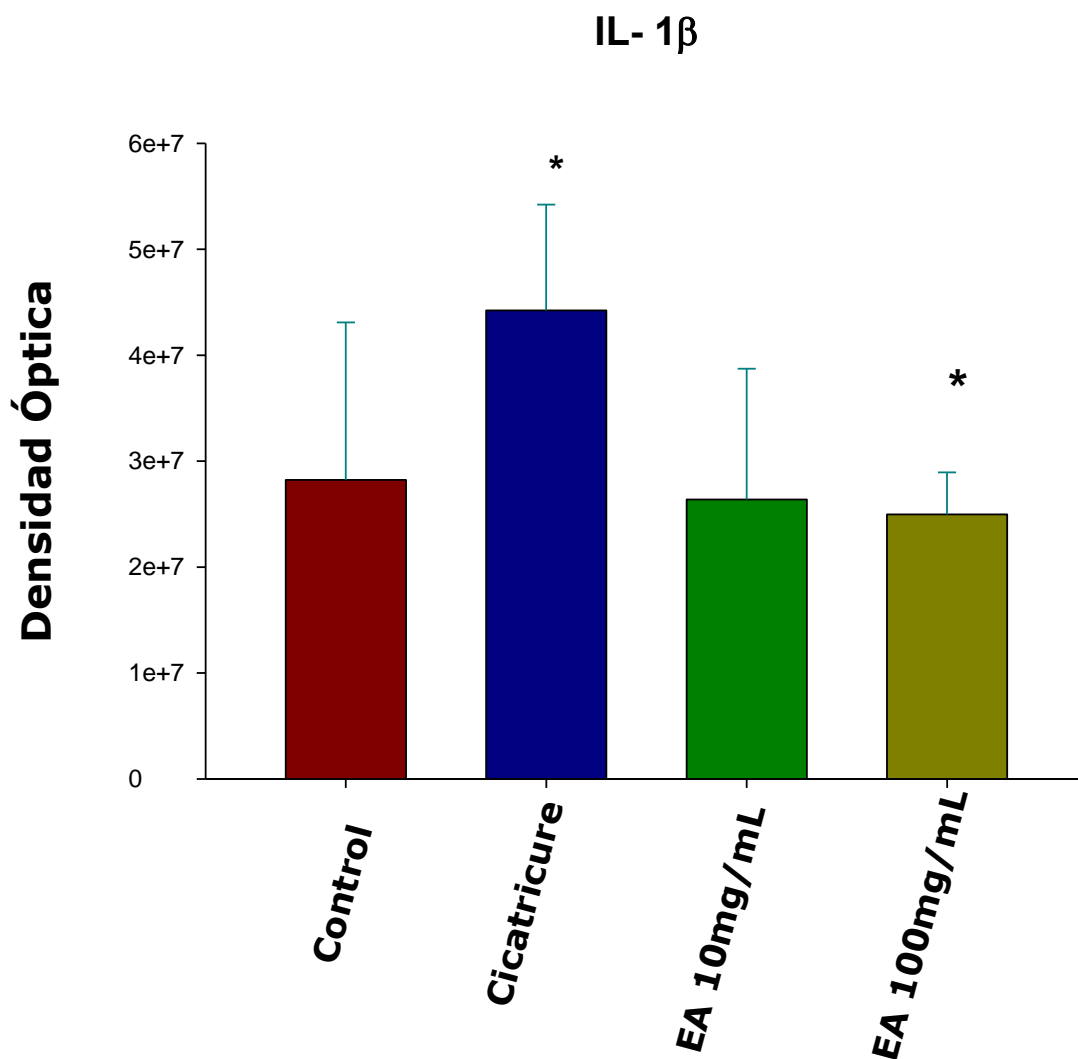


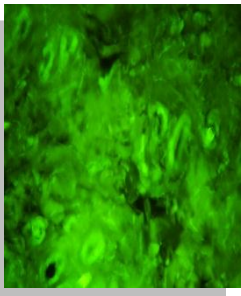
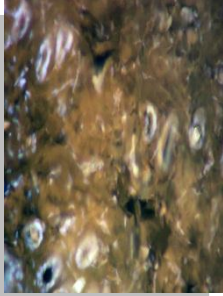
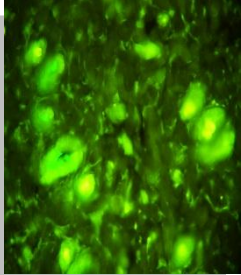
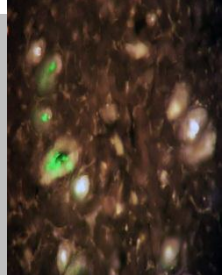
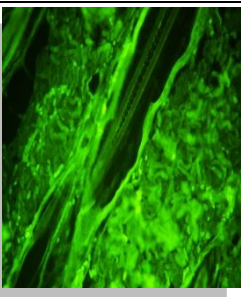
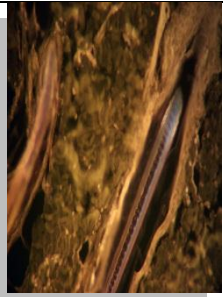
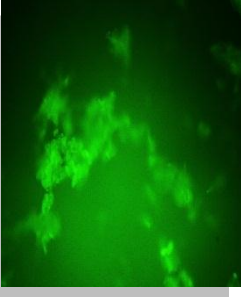

Figura 12. Presencia de la proteína proinflamatoria IL-1 β . Cada barra representa la media de la densidad óptica \pm E.E., $P > 0.05$; con respecto a los campos medidos de las muestras a diferentes tratamientos. (Control herida sin tratamiento, Cicatricure, Extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL).

*Se realizó test estadístico t-student, entre ambos tratamientos, obteniendo una $p < 0.05$; lo que confirma que existe una diferencia significativa.

En la Tabla 5. Se muestran las fotografías microscópicas a 40 aumentos de las inmunofluorescencias para la proteína COX-2, de cada uno de los tratamientos y controles. La fluorescencia que se puede observar en las imágenes, se debe al anticuerpo secundario marcado con Alexa fluor, así como la fluorescencia de contraste, que nos facilita la identificación de la proteína; esto gracias al colorante Hoechst que tiñe de azul los núcleos celulares, permitiendo evidenciar la distribución de COX-2 en cada muestra.

La fluorescencia emitida en la muestra control de herida sin tratamiento, es de mayor intensidad, en comparación a la fluorescencia emitida en las imágenes de los otros tratamientos evaluados y el control positivo (cicatricure®). Por lo cual se infiere, que en el control positivo y las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL, existe una menor presencia de la proteína COX-2; ya que la fluorescencia emitida, es directamente proporcional a la expresión de la proteína en la muestra.

Tabla 5. Determinación microscópica de COX-2 para los diferentes tratamientos evaluados. EEAF=Espectro de emisión Alexa fluor, 488nm. EEH=Espectro de emisión Hoechst, 461nm. 40x=40 aumentos.

Tratamiento	COX-2		Observaciones
	EEAF 40X	EEHD 40X	
Control herida sin tratamiento			La expresión de la COX-2 es altamente evidenciada en toda la muestra de color verde fluorescente.
Cicatricure			Es ampliamente notable la emisión verdosa indicativa de la presencia de la proteína, sin embargo es menor con respecto al control.
Extracto acuoso de la hoja de zarzamora 10mg/mL			La expresión de la COX-2, es menor con respecto al control.
Extracto acuoso de la hoja de zarzamora 100mg/mL			Se presencia una baja concentración de proteína en el tejido.

En la Figura 13. Se observa el gráfico de las densitometrías ópticas, para determinar la presencia de la proteína COX-2, en muestras con diferentes tratamientos. Las densitometrías ópticas se evaluaron, mediante la prueba estadística ANOVA de una sola vía, con una $p > 0.05$, $p = 0.156$; estimando que no existen diferencias significativas entre los tratamientos realizados. Sin embargo, se visualiza que existe tendencia a una menor presencia de la proteína COX-2, en los tratamientos con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL, vs el control (herida sin tratamiento).

COX-2

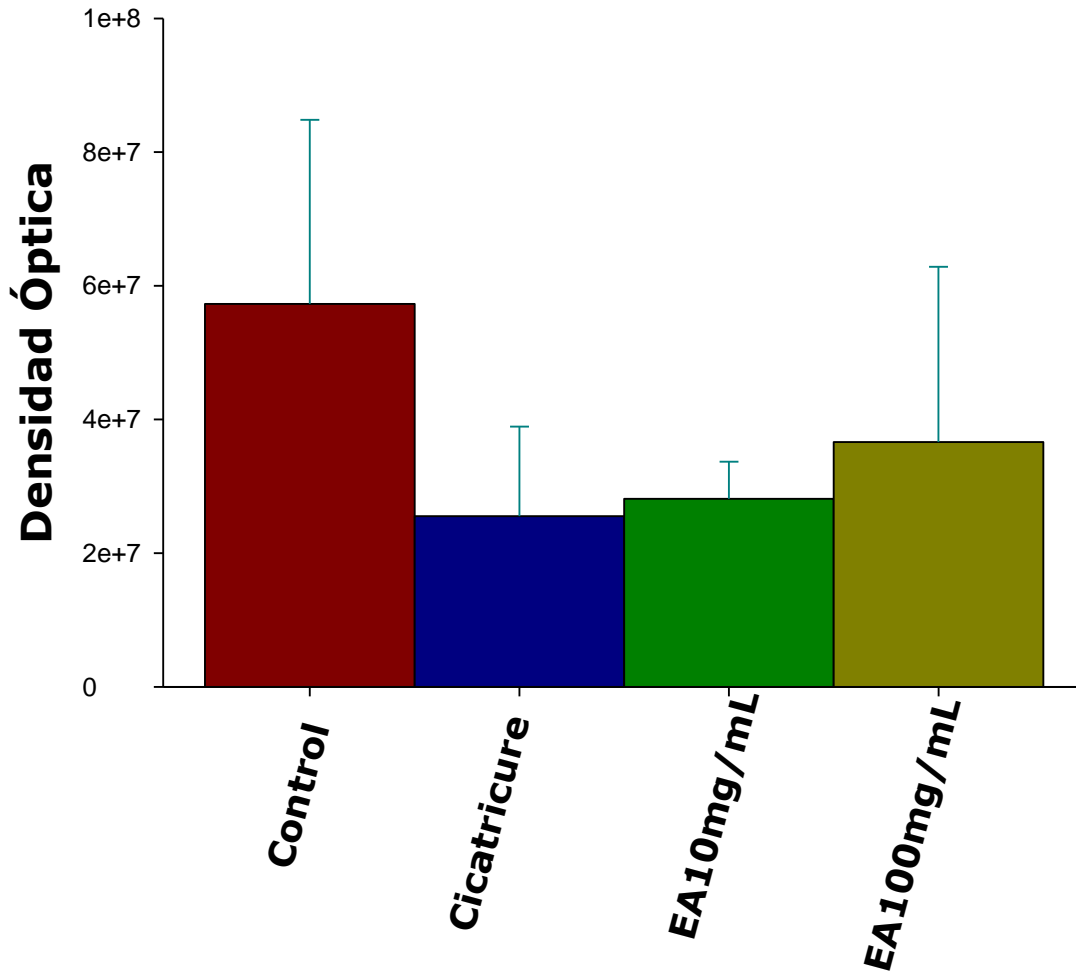


Figura 13. Presencia de COX-2. Cada barra representa la media de la densidad óptica \pm E.E., $P > 0.05$; con respecto a los campos medidos de las muestras a diferentes tratamientos. (Control herida sin tratamiento, Cicatricure, Extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL).

8.- DISCUSIÓN

En la piel, la reparación de los tejidos y la curación de heridas, son procesos complejos, en los que están implicados una gran variedad de fenómenos; entre los que destaca la inflamación, debido a que es la primera respuesta del sistema inmune ante cualquier daño. En respuesta al daño del tejido u órgano, se inicia la activación de cascadas de señales químicas en diferentes células, produciendo la expresión de proteínas como **TNF- α** , **IL-1 β** y **COX-2**. La presencia de estas proteínas es importante, puesto que una de sus principales funciones, es la de modular la respuesta inflamatoria del organismo; con el fin de proteger y aliviar la zona afectada (Hotamisligil, 2006).

Con respecto a la hoja de la planta de zarzamora (*Rubus fruticosus*), se tiene el conocimiento, que posee un conjunto de propiedades terapéuticas; las de interés para este trabajo son: su efecto antiinflamatorio y antioxidante. A través de múltiples investigaciones fitoquímicas se han podido identificar de manera adecuada, los componentes de la hoja de la planta de zarzamora; esto ha permitido comprender los mecanismos de acción probablemente involucrados en las actividades biológicas y farmacológicas que se le atribuyen (Muhammad Z., 2014). Los componentes bioactivos responsables de su efecto terapéutico antiinflamatorio y antioxidante, son sus compuestos fenólicos; dichos compuestos actúan por una gran variedad de mecanismos de acción (previamente mencionados en los antecedentes). Entre los mecanismos de acción más reportados en la literatura, se hace hincapié, en la capacidad de inhibir las citocinas proinflamatorias **TNF- α** e **IL-1 β** ; **así como el efecto inhibitor sobre el metabolismo del ácido araquidónico**, aunado por lo tanto a la inhibición de una importante

enzima sintetasa de prostaglandinas, llamada COX-2. Por lo descrito anteriormente se puede decir, que la acción de los compuestos fenólicos de la hoja de la planta de zarzamora, pudieran estar relacionados directamente en la regulación de una respuesta inflamatoria.

Esté trabajo se enfocó en la determinación de la presencia de importantes proteínas reguladoras de una respuesta inflamatoria, que son TNF- α , IL-1 β y la enzima COX-2; en muestras de piel de rata con inducción a herida, tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a diferentes concentraciones. De acuerdo a los resultados obtenidos en las inmunofluorescencias de las densitometrías ópticas de todas las muestras, que se analizaron con el test estadístico ANOVA de una vía, para cada proteína en los diferentes tratamientos evaluados; control (herida sin tratamiento), control positivo (cicatricure[®]) y extracto acuoso de la hoja de zarzamora a las concentraciones de 10 y 100mg/mL. Se determinó lo siguiente:

Con base a los resultados para la proteína proinflamatoria TNF- α ; **se** encontró que existen diferencias significativas entre los tratamientos del extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10mg/mL y el control positivo (cicatricure[®]). La presencia de la proteína TNF- α **fue menor en** las muestras con tratamiento de extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10mg/mL en comparación al control positivo. Por lo tanto el tratamiento con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10mg/mL, para esta proteína resulto eficaz. Entre los compuestos fenólicos que tiene la hoja de la planta de zarzamora, que se sabe, tienen la capacidad de inhibir directamente esta proteína, destacan los flavonoides y las cumarinas.

En cuanto a los resultados para la proteína proinflamatoria IL-1 β ; **hubo** diferencias significativas entre el tratamiento con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a la concentración de 100mg/mL, y el control positivo (cicatricure[®]). Sin embargo también se observó la tendencia de una disminución de IL-1 β , **entre el** tratamiento de extracto acuoso de la hoja de zarzamora a la concentración de 10mg/mL con respecto al control positivo. Siendo así podemos afirmar que los mejores tratamientos fueron los llevados a cabo con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora, debido a que la presencia de la proteína IL-1 β **fue** menor. En relación con los componentes bioactivos de la hoja de zarzamora, particularmente la epigallocatequina y las cumarinas, son inhibidores de la producción de IL-1 β (Ellis L. y col., 2011).

En el caso de los resultados obtenidos para la proteína COX-2; no hubo diferencias significativas entre los diversos tratamientos evaluados; sin embargo se observó la tendencia de una menor presencia de la proteína COX-2, en los tratamientos con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a las concentraciones de 10 y 100mg/mL con respecto al control (herida sin tratamiento). Esta tendencia, permite mostrar el efecto antiinflamatorio que el extracto acuoso de la hoja de zarzamora ejerce sobre el tipo de muestra (lesión en piel).

Teniendo en cuenta los resultados de forma individual para cada proteína, por consiguiente podemos hacer referencia; de que, el tratamiento con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a la concentración de 10mg/mL, resulta más eficaz en la disminución de la expresión de la proteína TNF- α , **en comparación con las** otras proteínas que son: IL-1 β y COX-2. Así como el tratamiento con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a la concentración de 100mg/mL, obtuvo un

mejor efecto sobre la expresión de la proteína **IL-1 β** , con respecto a las proteínas **TNF- α** y **COX-2**.

Cuando se produce una excesiva cantidad de mediadores proinflamatorios, que apocan la respuesta antiinflamatoria, el resultado sería una progresiva respuesta inflamatoria sistémica, con fracaso multiorgánico. Por el contrario, una respuesta antiinflamatoria excesiva causaría inmunosupresión, que también sería considerada causa de fallo multiorgánico (Durán G. y col., 2002). A medida de que exista una respuesta inflamatoria debidamente regulada, menos es la probabilidad de que se genere una falla orgánica en el organismo. Por lo tanto una menor presencia de las proteínas **TNF- α** , **IL-1 β** y **COX-2** en las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a diferentes concentraciones, en comparación con la presencia de las mismas proteínas en los controles manejados; es indicativo que se está ejerciendo un aporte benéfico sobre la regulación de la respuesta inflamatoria de la herida.

Debido a las determinaciones de la presencia de las proteínas **TNF- α** , **IL-1 β** y **COX-2** llevadas a cabo en este trabajo, al menos uno de los dos tratamientos evaluados con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora, presentó un buen efecto antiinflamatorio en comparación con los controles; y ya que se conoce que los compuestos fenólicos de la hoja de zarzamora, le confieren la capacidad de inhibir las proteínas **TNF- α** , **IL-1 β** y **COX-2** (reguladoras de una respuesta inflamatoria), por esta razón; el uso del extracto acuoso de la hoja de zarzamora, resulta ser efectivo para coadyuvar el tratamiento para la cicatrización de una herida.

9.- CONCLUSIONES

- Las lesiones bajo el tratamiento de extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10mg/mL, presentaron una mayor tendencia en disminuir la expresión de la proteína proinflamatoria **TNF- α** ; con respecto a las otras proteínas determinadas (**IL-1 β** y **COX-2**), en función de las densidades ópticas obtenidas.

- En función de las densidades ópticas obtenidas; las muestras con el tratamiento de extracto acuoso de la hoja de zarzamora a la concentración de 100mg/mL, presentaron mejor efecto antiinflamatorio al disminuir la expresión de **IL-1 β** ; con respecto al efecto que se obtuvo sobre **TNF- α** y **COX-2**.

- En la determinación de la presencia de COX-2 con base en las densidades ópticas, se obtuvo buen resultado en las muestras tratadas con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora a 10 y 100mg/mL, al tener una disminución en la presencia de la enzima COX-2 en comparación a los controles. Sin embargo los tratamientos con el extracto acuoso de la hoja de zarzamora, dieron un mejor resultado para las proteínas **TNF- α** e **IL-1 β** .

10.- BIBLIOGRAFIA

1. Advansta, Manual de laboratorio para el análisis de proteínas, Advansta Corporation, España, 2011.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Molecular biology of the cell, Garland Science (6ª edición), New York, 2015.
3. Alcole M., Fisiopatología de la inflamación y prevención a través de la nutrición., Tesis para obtener el grado de Maestro en Nutrición, Universidad Oberta de Catalunya, España, 2015.
4. Almeida E., Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review., Journal of Venomous Animals and Toxins, 2002, 191-212.
5. Almeida E., Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review, Journal of Venomous Animals and Toxins, 2002, 191-212.
6. Álvarez G., Actividad antiinflamatoria de los extractos polares y apolares de las flores de *Handroanthus chrysanthus* (Jacq.)S.O.Grose., Tesis para obtener el título de Químico Industrial., Facultad de Química., Universidad Tecnológica de Pereira., Pereira, 2013.
7. Andrades G., Un FGF-2 modificado acelera la cicatrización de las heridas., Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Málaga, España, consultado on line: www.encuentros.uma.es/encuentros72/fgf2.htm.
8. Andrades P., Sepúlveda, González, Curación avanzada de heridas., Revista chilena de cirugía. Vol.56 N°4, Universidad de Chile, Chile, 2004, 396-403.

9. Antiinflamatorios no esteroideos., Departamento de Ciencias Fisiológicas, Plataforma virtual, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Disponible: <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c37.htm>
10. Ballester E., Relación estructura-actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios intestinales., Tesis para obtener el grado de doctorado en Farmacología., Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, 2006.
11. Beca T., Hernández G., AINEs como tratamiento coadyuvante de la enfermedad periodontal. Avances en Periodoncia., 2007, 101-103.
12. Bello G., Ciencia Bromatológica: Principios generales de los alimentos, Díaz de Santos, 2000, 242-249
13. Bernadette F., Rodak, Hematología: fundamentos y aplicaciones., Médica Panamericana, 2005, 389-407.
14. Calderón P., Técnicas Inmunoquímicas., Instituto de Biotecnología, UNAM, 2007, Disponible: <http://www.ibt.unam.mx/computo/>
15. Calixto J., Otuki M., Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB)., Plantas Medicinales, 2003, 73-83.
16. Castellanos M., Guevara R., Robinson R., Vázquez R., Respuestas inmunes innata y adaptativa., Medisan, Instituto Superior de Ciencias Médicas, Cuba, 2000, 64-74.
17. Cruz M., Actividad biológica de los extractos etanólicos de dos especies de zarzamora en *Artemia franciscana* Kellogg 1906., Tesis para obtener el título de Biólogo., Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, 2013.
18. Cuevas R., Evaluación del potencial nutracéutico de zarzamoras silvestres y mejoradas., Tesis para obtener el grado de doctorado en

- Ciencias de los alimentos., Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, 2011
19. Delves, Martin, Burton, Roitt, Fundamentos de Inmunología, Medica Panamericana, 11° Edición, USA, 2006, 12-19.
 20. Díaz P., Gallego G., López-Cedrún., Ferreras G., Aparicio A., Cyclooxygenase-2(COX-2) and epidermal growth factor(EGF) in oral premalignant epithelial lesions., Rev.Esp.ClrOralMaxilofac., España, 2009.
 21. Durán G., Aller R., Lorente R., Arias P., Sepsis and septic shock: a turmoil of inflammatory mediators with a difficult therapeutic management., An.Med.Interna Vol 19, No. 1, Madrid, 2002, 35-43.
 22. Enciso E., Arroyo J., Antiinflammatory and antioxidant effects of *Jungia rugosa Less* (matico de puna) leaves flavonoids in rats., Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Rev. Médica, Perú, 2011, 231-238.
 23. Fernández V., Muñoz M., Fornes P., La cicatrización de las heridas., Departamento de Formación Dermatológica. Revista científica de Enfermería dermatológica N°3, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, España, 2008.
 24. Fitzpatrick, Dermatología en Medicina General/Dermatology in General Medicine, Médica Panamericana, 2010, 2342-2345.
 25. Forzza R., Florado de Brasil(listado de especies), Jardín Botánico, RíodeJaneiro, 2010, Disponible: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>.
 26. Fragoso L., Sierra M., Vargas A., Barrios R., Ramírez B., El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética., Gaceta Médica de México, 2013.

27. Gallardo V., Barbosa M., Efecto cicatrizante del gel elaborado del látex de *crotón lechleri* "Sangre de Drago"/ Healing effect of latex gel prepared with *crotón lechleri* " Sangre de Drago"., Universidad Alas Peruanas, 2015.
28. Goldman R., The growth factors and the chronic wound healing: the past, present, and future., *Skin wound care*, 2004, 24-35.
29. Gutiérrez M., Vino, polifenoles y protección a la salud., *Revista Cubana: Nutrición Alimentaria*, Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba, 2002.
30. Introducción a los autacoides., Departamento de Ciencias Fisiológicas, Plataforma virtual, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Disponible: <http://med.javeriana.edu.co/Ciencias%20Fisiologicas/fw/c32.htm>
31. Juárez, Evaluación del efecto cicatrizante del extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*) en ratas cepa Wistar y realización de histopatología., Tesis para obtener el título de Química farmacéutica bióloga., Facultad de Química. UNAM, 2015.
32. Jun Ma., Yong-guo Z., Yinglin X., Sun J., The inflammatory cytokine tumor necrosis factor modulates the expression of *Salmonella typhimurium* effector proteins., *Journal of Inflammation*, Japón, 2010.
33. Katzung, Farmacología básica y clínica., Mc- Graw Hill. 12ª edición, México, 2013.
34. Koyama J., Morita I., Tagahara K., Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*., *Phytochemistry Reviews*, Japón, 2000.
35. Ledezma N., Determinación del efecto miocontráctil o miorelajante de un neuropéptido obtenido del pulpo rojo mexicano en estudio in

- vitro (íleon de rata)., Tesis para obtener el título de Química farmacéutica bióloga., Facultad de Química. UNAM, 2015.
36. Limón, Díaz, Mendieta, Luna, Zenteno, Guevara, Los flavonoides: Mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos., Mensaje Bioquímico, Vol. XXXIV, Facultad de Ciencias Químicas., UNAM, México DF, 2010, 143-154.
37. López S., Contraste de hipótesis. Comparación de más de dos medias independientes mediante pruebas no paramétricas: Prueba de Kruskal-Wallis., Universidad de Córdoba, Rev. Enfermería del Trabajo, España, 2013, 166-171.
38. López-Poveda, Técnicas de análisis de imagen para aplicaciones en astronomía, teledetección y neurociencias, Universidad de Salamanca. Publicaciones, España, 2013, 12-22.
39. Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza, Moro, Portolés A., Velázquez, Farmacología: básica y clínica., Medica Panamericana. 18ª Edición, Madrid, 2009, 477-551.
40. Mesa M., Ramírez T., Aguilera C., Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa L.* y de los cucuminoides, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Rev. Pharmaceutica, España, 2000, 307-321.
41. Montalvo A., Microscopía, Portal de enseñanza. UNAM, 2010.
42. Muhammad Zia-Ul-Haq., Riaz M., Vincenzo, Hawa Z., Moga M., *Rubus fruticosus L.*: Constituents, biological activities and health related uses., Departament of Pharmacy. Shaheed Benazir University, journal molecules, Pakistan, 2014.
43. Muñoz L., Evaluación del efecto gastroprotector del extracto acuoso de la hoja de zarzamora (*Rubus fruticosus*) en rata cepa Wistar y determinación de la CI50 mediante el bioensayo con Artemia

- salina., Tesis para obtener el título de Química farmacéutica bióloga., Facultad de Química. UNAM, 2014.
44. Nash T., Florin J., Tumour necrosis factor inhibitors., *New Drugs, Old Drugs*, 2005, 183.
45. Olazo M., Efecto de la obesidad y la inducción de diabetes sobre los valores de glucosa, colesterol y triglicéridos en modelo de rata cepa Wistar., Tesis para obtener el título de Química farmacéutica bióloga., Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana., 2010.
46. Paniagua R., Nistal M., Sesma P., Álvarez-Uría M., Fraile B., Anadón R., Sáez F.S. *Citología e Histología vegetal y animal: Biología de las células y tejidos animales y vegetales*, McGraw-Hill Interamericana de España S.A. (4ª Edición), Madrid, 2007.
47. Pollard T.D., Earnshaw W.C., Lippincott-Schwartz J., *Cell biology*. Saunders, Elsevier (2ª Edición), Philadelphia, 2008.
48. Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A., The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease., *Artículo de Revisión: Nutrición Hospitalaria*, Vol.27, Instituto de Investigación en Ciencias de Alimentos, Universidad Complutense, Madrid, 2012.
49. Raghav SK., Gupta B., Agrawal C., Goswami K., Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells., *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 104-234.
50. Ramzi S., Cotran, Vinay K., Tucker C., *Patología Estructural y Funcional.*, McGRAW-HILL, 6º Edición, 2000.
51. Rang H., Dale M., Ritter J., Moore P., *Farmacología*, Elsevier. Quinta edición, España, 2004, 244-260.

52. Resino S., Propiedades Generales de las citocinas, Portal virtual. Epidemiología Moléculas de Enfermedades Infecciosas, Disponible: <http://epidemiologiamolecular.com/citocinas/>
53. Rojas- Espinosa, Inmunología de memoria, Médica Panamericana, 2006, 179-211.
54. Ross M.H., Kaye G.I., Pawlina W., Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular, Médica Panamericana (6ª Edición), Madrid, 2013.
55. Ruibal L., Machín, García, Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica., Revista Médica Cubana, Cuba, 2004.
56. Ruiz D., Barón L., Sánchez F., Parras G., Bioestadística: Métodos y Aplicaciones, Universidad de Málaga. Publicaciones, España, 2014, 282-295.
57. Salem Z., Pérez P., Henning L., Heridas: Conceptos generales., Revista científica Cuaderno de cirugía., Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile., vol.14 N°1, Chile(Valdivia), 2000, 90-99.
58. Suganuma M., Sueoka E., Sueoka N., Okabe S., Fujiki H., Mecanismos de Prevención del Cáncer de polifenoles del té basa en la inhibición de la expresión de TNF- α ., **Saitama Cancer Center Research Institute.**, Japón, 2000, 67-72.
59. Tracey D., Klareskog L., Sasso E., Salfeld J., Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review., *Pharmacol Ther*, 2008, 244-79.
60. Vargas S., El factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- α) en la patogénesis de la artritis reumatoide y el riesgo de tuberculosis con infliximab (un agente anti- TNF- α)., **Revisión bibliográfica, Revista**

médica de costa rica y centro américa, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, 2009.

61. Verma, Tushar G., Rakesh P., Chetan G., Rubus fruticosus (blackberry) use as an herbal medicine., Institute of Pharmacy. Vidhya Vihar., Pharmacogn Rev., Madhya Pradesh, India, 2014, 101-104.