

TRABAJO FIN DE MÁSTER
Máster de Investigación Biomédica
Curso 2021-2022



Instituto de Biología y Genética Molecular

**ESTUDIO DEL EFECTO DE UN EXTRACTO
FENÓLICO DE ALPERUJO SOBRE EL DAÑO
ISQUÉMICO**

Autora:

Ángela Zarco Cuadrillero

Tutoras:

María Luisa Nieto y Marita Hernández

Julio, 2022

Índice

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. CARDIOPATÍA ISQUÉMICA.....	2
2.2. HIPOXIA	2
2.2.1. <i>Agente mimético de Hipoxia: Cloruro de Cobalto (CoCl₂)</i>	4
2.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	4
2.4. APOPTOSIS.....	5
2.6. EFECTOS DE LA HIPOXIA EN CARDIOMIOCITOS	5
2.7. EXTRACTOS BIOACTIVOS.	6
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
3.1. HIPÓTESIS	7
3.2. OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. MATERIALES	8
4.1.1. <i>Anticuerpos</i>	8
4.1.2. <i>Reactivos</i>	8
4.1.3. <i>Estímulos</i>	8
4.1.4. <i>Compuestos Bioactivos</i>	9
4.1.5. <i>Cultivos celulares</i>	9
4.2. MÉTODOS	10
4.2.1. <i>Análisis de Proteína</i>	10
4.2.2. <i>Ensayo de Viabilidad</i>	12
4.2.3. <i>Estudio de Apoptosis</i>	13
4.2.4. <i>Estudio de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	13
4.2.5. <i>Análisis Estadístico</i>	14
5. RESULTADOS	15
5.1. NEUROINFLAMACIÓN: EFECTO DEL EXTRACTO PLE-A SOBRE CÉLULAS DE MICROGLÍA ACTIVADAS	15
5.1.1. <i>Ensayo de Viabilidad del PLE-A en microglía</i>	15
5.1.2. <i>Efecto de PLE-A sobre la inducción de proteínas proinflamatorias en células de microglía BV2</i>	15
5.2. HIPOXIA: EFECTO DEL EXTRACTO PLE-A SOBRE CARDIOMIOCITOS H9C2	17
5.2.1. <i>Ensayo de Viabilidad del PLE-A en cardiomiocitos</i>	17
5.2.2. <i>Efecto del CoCl₂ sobre cardiomiocitos H9c2</i>	18
5.2.3 <i>Efecto del extracto PLE-A sobre cardiomiocitos H9c2 hipóxicos</i>	21
6. DISCUSIÓN	24
7. CONCLUSIONES	26
8. BIBLIOGRAFÍA	27

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
APS	Persulfato amónico
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CAS-3	Caspasa-3
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
D.O.	Desviación Óptica
ECL	Quimioluminiscencia mejorada
FBS	Suero Bovino Fetal
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
h	Horas
HIF-1α	Factor 1 inducible por hipoxia
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno, agua oxigenada
HRP	Peroxidasa de Rábano Picante
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducible
min	Minutos
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazolio
NLRP3	Inflamasoma
ON	Durante la noche
PBS	Tampón Fosfato Salino
PVDF	Polivinilideno difluoruro
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TBS	Solución tamponada Tris-salino
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina
TTBS	TBS-Tween-20
u.a	Unidades arbitrarias
μM	MicroMolar
W-B	Western Blot

1. Resumen

Estudios clínicos y preclínicos relacionados con el infarto de miocardio han mostrado una fuerte correlación entre el daño cardíaco y la activación de la microglía cerebral. Este eje corazón-cerebro puede proporcionar la base para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas con utilidad en los pacientes con infarto agudo de miocardio. Teniendo en cuenta las importantes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que presentan determinados extractos provenientes de productos de desecho del aceite de oliva ricos en polifenoles y triterpenos, resulta de gran interés estudiar el posible efecto beneficioso que pueden tener sobre la salud. Por ello, a lo largo de este trabajo de investigación se llevó a cabo la caracterización funcional de un extracto proveniente del alperujo, el PLE-A (*Pressurized Liquid Extraction-Alperujo*) en el contexto del daño isquémico cardíaco.

En primer lugar, se caracterizó un modelo *in vitro* que simula la cardiopatía isquémica, empleando cardiomiocitos H9c2 tratados con un agente químico mimético de hipoxia, el cloruro de cobalto (II) (CoCl_2). Así observamos que el tratamiento de las células H9c2 con CoCl_2 induce acumulación del factor HIF-1 α , muerte celular programada y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), dando lugar a un estrés oxidativo. A continuación, se analizó el posible efecto del extracto de alperujo PLE-A en esta situación isquémica. Encontramos que a las dosis a las que no afectaban a la viabilidad celular, el extracto indujo una modulación de la situación hipóxica, mostrando su capacidad antioxidante, pero no era capaz de disminuir la apoptosis de las células.

A continuación, para el estudio del efecto del extracto sobre la neuroinflamación que se produce tras los procesos isquémicos cardíacos, se utilizó como modelo experimental la línea celular de microglía (BV2) estimulada con lipopolisacárido, LPS. Se observó que este extracto, PLE-A, disminuía el perfil proinflamatorio asociado a la microglía reactiva sin afectar a la viabilidad de las células.

2. Introducción

2.1. Cardiopatía Isquémica

La cardiopatía isquémica o enfermedad coronaria se produce cuando las arterias que suministran sangre al músculo del corazón se obstruyen, de manera parcial o completa, por lo que no le llega el flujo sanguíneo. La principal causa de esta patología es la arteriosclerosis, una inflamación crónica de las arterias que provoca un endurecimiento y acumulación de placas de colesterol (placas de ateroma) en sus paredes, lo que favorece la formación de trombos. Se distinguen 3 tipos de cardiopatía isquémica: Infarto agudo de miocardio, angina de pecho estable y angina de pecho inestable.¹

En Europa, se estima que la enfermedad cardiovascular es la causa de 4 millones de fallecimientos cada año, lo que supone el 47% de todas las muertes.¹

Este proceso empieza en las primeras décadas de la vida, pero no presenta síntomas hasta que el estrechamiento (estenosis) de las arterias coronarias se hace tan grave que causa un desequilibrio entre el aporte de oxígeno al miocardio y sus necesidades.²

Por lo que, en la isquemia, tanto el oxígeno como los nutrientes que generalmente lleva el suministro de sangre se vuelven limitados. Las patologías hipóxico-isquémicas ocurren a partir del déficit de oxígeno, provocando una deficiencia de energía.³

Tras un infarto de miocardio se producen un gran número de cambios en el miocardio a múltiples niveles: estructural, celular, extracelular, molecular, bioquímico y metabólico. Que finalmente resultan en dilatación, aumento de esfericidad y reducción de la función cardíaca. El remodelado cardíaco es un proceso por el que se ven alterados el tamaño, la forma y la función ventricular como consecuencia la lesión infringida al miocardio.

Es interesante mencionar las observaciones histológicas de diferentes estudios que apuntan a la existencia de un vínculo entre enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca, la isquemia/reperfusión cardíaca, entre otras, y la activación de la microglía.^{4 5} Estudios clínicos y preclínicos han mostrado como el infarto de miocardio (IM) conduce a una respuesta inflamatoria temprana, que además de estimular la remodelación adversa del ventrículo izquierdo, también desencadena el aumento de la microglía activada en diferentes partes del sistema nervioso.⁶ Esta activación de la microglía se ha relacionado tanto con la depresión subyacente al infarto de miocardio, como con las arritmias ventriculares post-infarto.⁷ Esto ha llevado a proponer que la microglía sirva además de como modulador neuroinmune como objetivo potencial para las enfermedades cardiovasculares.



Figura 1. Cardiopatía Isquémica.⁸

2.2. Hipoxia

La hipoxia es la situación que tiene lugar cuando la cantidad de oxígeno transportada a las células y tejidos del organismo es insuficiente, con compromiso en la función de los mismos, causando síntomas como dolor de cabeza, somnolencia, sudoración fría e incluso desmayos. Esta alteración puede ocurrir como consecuencia de enfermedades cardíacas, pulmonares y también puede surgir debido a anemia y a gran altitud.⁹

La HO-1, gracias a su actividad antioxidante puede contrarrestar el efecto nocivo de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen en diversas patologías, por ejemplo: durante la progresión del cáncer y en la obesidad, el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares.¹⁷

2.2.1. Agente mimético de Hipoxia: Cloruro de Cobalto (CoCl₂)

El cloruro de cobalto (II) es un sólido inorgánico formado por la unión del metal cobalto en su estado de oxidación +2 con el ion cloruro. Su color depende del grado de hidratación que presente.¹⁸

Algunos de sus usos son: tratamiento de casos especiales de anemia, catalizador en reacciones químicas, estándar en análisis químicos, mejora de las propiedades mecánicas de los polímeros, etc.¹⁸

En investigación, el CoCl₂ juega un papel de gran importancia ya que se trata de un compuesto metálico que actúa como agente mimético de hipoxia. Se emplea a diferentes concentraciones en función de la línea celular que se utilice. El CoCl₂ actúa como modulador enzimático al bloquear el sitio catalítico de las proli-hidroxilasas, enzimas encargadas de la regulación del HIF-1 α . La hipoxia química inducida por el cloruro de cobalto es uno de los modelos *in vitro* más utilizados, estabiliza los factores inducibles por hipoxia 1 α y 2 α en condiciones normóxicas. Aunque una disminución en la concentración de oxígeno es el modelo óptimo de hipoxia, el acceso a una cámara de hipoxia o a una cámara de CO₂ incubadora con niveles de oxígeno regulados no es posible en muchos laboratorios.¹⁹ El modelo de hipoxia química ofrece varios beneficios frente al modelo que emplea gas, ya que este último constituye un método más complejo y menos reproducible.^{20 21}

Estos modelos *in vitro* con agentes químicos, que utilizan como base los cultivos celulares, generan vías de señalización similares a las que se desencadenan cuando la concentración de oxígeno es baja en el medio intracelular. El principal objetivo de estos modelos es la búsqueda de mecanismos relacionados con los eventos patológicos y encontrar nuevas opciones de tratamiento y terapias que sean efectivas en diversos tipos de patologías. Actualmente, una gran cantidad de trabajos de investigación están enfocados en el contexto de la cardiopatía isquémica y la búsqueda de nuevas dianas y aproximaciones terapéuticas.^{22 23 24}

2.3. Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno, se forman como un subproducto natural del metabolismo normal del oxígeno y tienen funciones importantes en la señalización celular y la homeostasis.²⁵ En concentraciones moderadas están involucradas en varias vías de señalización, síntesis de estructuras celulares y defensa del huésped contra patógenos.²⁶

El estrés oxidativo se define ampliamente como un desequilibrio entre la producción de ROS y su eliminación por las defensas antioxidantes celulares²⁶. Estos antioxidantes son sustancias que neutralizan o eliminan los radicales libres donando un electrón. El efecto neutralizante de los antioxidantes ayuda a proteger los sistemas biológicos del estrés oxidativo.²⁶ No obstante, una producción excesiva o no controlada de especies reactivas de oxígeno puede causar daño celular, incluso una muerte celular programada, y está implicada en una variedad de condiciones patológicas.²⁵

2.4. Apoptosis

El proceso de muerte celular programada, o apoptosis, generalmente presenta características morfológicas y mecanismos bioquímicos dependientes de la energía. La apoptosis se considera un componente vital de varios procesos que incluyen la renovación celular normal, el desarrollo y funcionamiento adecuados del sistema inmunitario, etc. La apoptosis inapropiada es un factor fundamental en muchas condiciones humanas, incluidas las enfermedades neurodegenerativas, el daño isquémico, los trastornos autoinmunes y muchos tipos de cáncer. La capacidad de modular la vida o muerte de una célula es reconocida por su inmenso potencial terapéutico.²⁷

La apoptosis es una cascada proteolítica, presenta dos grandes vías para iniciarla:

- Vía extrínseca. Medida por los receptores de muerte. Al final de esta vía metabólica, la caspasa iniciadora, la caspasa-8 se activa, dando paso a la fase de ejecución de apoptosis.²⁸
- Vía intrínseca. Mediada por las mitocondrias. Esta vía es controlada por la familia de proteínas Bcl-2. Como resultado de esta vía se da la formación del complejo "apoptosoma" por la adhesión de dos factores pro-apoptóticos. Posteriormente, se activan una serie de caspasas, siendo la caspasa-9 la iniciadora de esta vía, causando la destrucción celular.²⁸

Las caspasas efectoras (como caspasa-3) son proteasas ejecutoras clave y comunes en ambas vías de inducción de apoptosis.²⁹

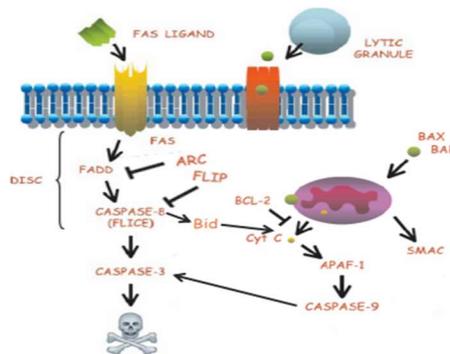


Figura 4. Vías de la Apoptosis celular.³⁰

2.6. Efectos de la Hipoxia en Cardiomiocitos

El corazón es un órgano altamente especializado para la contracción, cuya función es proporcionar un adecuado suministro de sangre al resto de los órganos y tejidos del organismo. La disminución de la disponibilidad de oxígeno (situación hipóxica) en el corazón puede deberse a diversas causas, entre las que se encuentran la disminución de la presión parcial de oxígeno en la sangre (hipoxemia) y la interrupción abrupta del flujo coronario al corazón (episodio isquémico).³¹

Como consecuencia de la hipoxia en el miocardio, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los cardiomiocitos, producen una alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, aumentando la entrada de calcio. Este incremento masivo de la concentración de calcio en la mitocondria inhibe la producción de ATP y dispara los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular.^{31 32 33} Múltiples factores están involucrados en esta vía de muerte celular programada, pero debido a que determina en gran medida la respuesta celular a la hipoxia, HIF-1 ha sido un candidato para regular también la apoptosis inducida por hipoxia.^{34 13}

El papel de ROS en el daño de órganos inducido por la lesión por isquemia miocárdica está bien establecido. Muchos estudios han demostrado que la inhibición de la producción de ROS ofrece protección contra las lesiones tisulares que se producen durante la isquemia/reperfusión, evitando por lo tanto el estrés oxidativo.³⁵ Otros estudios han tratado de inhibir las fuentes responsables de la producción de ROS.³⁶

2.7. Extractos bioactivos.

Los antioxidantes son compuestos que el cuerpo humano emplea para disminuir el estrés oxidativo generado por la presencia excesiva de ROS. En la naturaleza nos encontramos con multitud de compuestos con dichas propiedades, como es el caso de las vitaminas A, C y E, que se adquieren en la dieta o antioxidantes que genera el propio organismo como es el caso del glutatión.³⁷ También cabe destacar los polifenoles, los cuales son compuestos bioactivos presentes en las aceitunas, que ofrecen notables beneficios para la salud debido a sus reconocidas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, tales como la defensa ante los efectos oxidantes y dañinos de ROS; siendo además los responsables de la estabilidad del aceite y de las propiedades organolépticas.³⁸

El orujo graso húmedo o alperujo es el principal subproducto de la industria del aceite de oliva y es potencialmente peligroso para el medio ambiente. Sin embargo, contiene compuestos fenólicos para los que se ha descrito un amplio espectro de efectos beneficiosos, antioxidantes y antiinflamatorios, sobre diferentes tipos de células y órganos, ya sea en la salud o en la enfermedad. La valorización de estos residuos tiene gran utilidad en diversos campos, como en la farmacia, cosmética o la alimentación. Los compuestos bioactivos pueden ser obtenidos a partir de extracción con líquidos presurizados utilizando como disolventes etanol o agua en diferentes condiciones.³⁹

En el Grupo de Procesos a Alta Presión del Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid, se han obtenido diferentes extractos del alperujo, mediante técnicas convencionales y mediante extracción con líquidos presurizados, los cuales ya han sido evaluados en el contexto del daño ocular.⁴⁰

El gran potencial como antioxidantes de dichos extractos genera mucho interés para su estudio en un entorno en el que se generen altos niveles de ROS, como es el caso de la isquemia cardíaca. Considerando las recientes observaciones en pacientes y modelos animales de IM, que describen la presencia de neuroinflamación tras un infarto de miocardio, los enfoques de investigación científica que consideren el control tanto del daño que se produce en las células de miocardio como de la neuroinflamación (en el contexto del IM) serán de gran importancia para el manejo de estos pacientes.^{41 42}

Nos proponemos estudiar la caracterización funcional del extracto PLE-A (*Pressurized Liquid Extraction-Alperujo*) para comprobar si puede desempeñar un papel modulador sobre cardiomiocitos sometidos a hipoxia química, así como en células microgliales activadas.⁴¹

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

Dado que los procesos isquémicos-hipóxicos dan lugar a procesos inflamatorios y oxidativos y, como consecuencia, a un daño tanto en la microglía como en cardiomiocitos, el uso del extracto de alperujo PLE, con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, es capaz de atenuar la respuesta a la hipoxia en cardiopatía isquémica y reducir la inflamación en procesos neurodegenerativos.

3.2. Objetivos

Teniendo en cuenta esta hipótesis, el objetivo principal de este trabajo es estudiar el posible efecto protector del extracto PLE-A sobre la hipoxia química generada con CoCl_2 en una línea celular de cardiomiocitos (H9C2) y sobre la neuroinflamación empleando como modelo de microglía reactiva la línea microglial murina BV2 tratada con LPS.

Para lograr dicho objetivo, se propone el estudio del estrés oxidativo, apoptosis e inflamación en situaciones hipóxicas e inflamatorias en presencia y ausencia del extracto, una vez determinada su dosis óptima.

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Anticuerpos

Tabla 1. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo 1º	Referencia	Casa Comercial
HO-1	SPC-112D	StressMarq
Caspasa-3	9664S	Cell Signalling
HIF-1 α	610958	BD
β -Actina	A5441	Sigma
iNOS	610431	BD
NLRP3	MAB7578	R&D
COX-2	160126	Cayman

Tabla 2. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo 2º	Referencia	Casa Comercial
Anti Mouse	9410	cytiva
Anti Rabbit	9340	cytiva

4.1.2. Reactivos

Tabla 3. Reactivos comerciales.

Reactivos	Referencia	Casa Comercial	Técnica
H ₂ O ₂ (30% v/v)		Merk Milipore	Western Blot
MTS	G3582	Promega	Viabilidad celular
Anexina V- Isocianato de fluoresceína (FITC)	ANXVF-200T	Immunostep	Citometría de flujo (Apoptosis)
Binding Buffer 10X	BB10X-50ML	Immunostep	Citometría de flujo (Apoptosis)
DMEM 1X	10-013-CV	Corning	Cultivos celulares
Tripsina/EDTA 0.25% (1X)	25200-072	gibco	Cultivos celulares
FBS (Suero Bovino Fetal)			Cultivos celulares
BSA (Albúmina de Suero Bovino)	A3059-100G	Sigma-Aldrich	Western Blot (Bloqueo)
Marcador proteico BlueStar preservado	MWP03	Nippon Genetics Europe	Western Blot
DHE (Dihidroetidio)	D23107	Invitrogen	Microscopía de fluorescencia, Citometría de flujo
DCFHDA (Diacetato de 2'-7'diclorofluorescina)	D6882	Sigma-Aldrich	Microscopía de fluorescencia, Citometría de flujo

4.1.3. Estímulos

Tabla 4. Estímulos celulares.

Estímulos	Referencia	Casa Comercial	Dosis
CoCl ₂ ·6H ₂ O	C8661-25G	Sigma-Aldrich	En las H9c2: 600 μ g/mL
Lipopolisacárido (LPS) de E.coli	L 2630	Sigma-Aldrich	En las BV2: 1mg/mL

4.1.4. Compuestos Bioactivos

A lo largo de este trabajo, se ha utilizado un extracto de naturaleza fenólica enriquecido en hidroxitirosol, presente en el alperujo. La obtención del extracto, PLE-A, se produjo mediante extracción con líquido presurizado a partir del alperujo.³⁹

Este extracto fue cedido por la Dra. Soraya Rodríguez-Rojo del departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio, Escuela de Ingenierías Industriales, Universidad de Valladolid, en el contexto de un estudio en colaboración.^{39 40}

La caracterización química incluye la determinación de diferentes polifenoles y terpenos se realiza por el departamento/laboratorio responsable de la extracción, la cual está actualmente en curso.

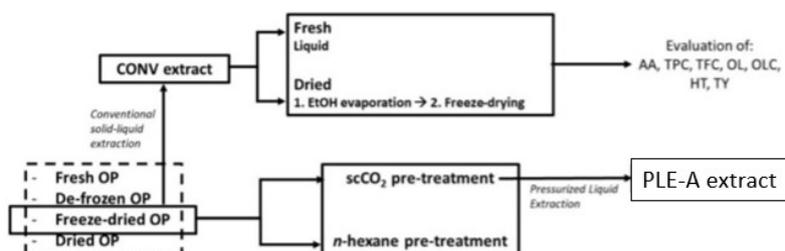


Figura 5. Extracción fenólica del alperujo pretratado de forma diferente y efecto del secado del extracto. Todos los extractos se evalúan en términos de actividad antioxidante (AA) y riqueza en contenido fenólico total (TPC), contenido total de flavonoides (TFC), oleuropeína(OL), oleaceína(OLC), hidroxitirosol(HT) y tirosol(TY).³⁹

4.1.5. Cultivos celulares

4.1.5.1. H9c2

Los cardiomiocitos de rata, H9c2, ofrecen una línea celular con un valioso modelo *in vitro* para estudiar la capacidad metabólica del corazón.⁴³ Dicha línea celular adherente (ATCC) proviene de células del ventrículo cardiaco de embrión de rata y presenta una característica conformación alargada.

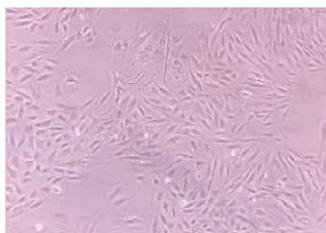


Figura 6. Línea celular H9c2

Estas células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con L-glutamina, glucosa 4.5 g/L, y piruvato sódico, al cual se adiciona 10% de Suero Bovino Fetal (FBS) y un 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) en un incubador a 37°C con un flujo de 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaban una confluencia del 80-90% se cambia el medio de cultivo, para ello se retira dicho medio, se adiciona Tripsina/EDTA 0.25%, se deja actuar hasta que se observa que las células han comenzado a desprenderse, posteriormente se toma la cantidad necesaria (0.6-0.8mL) para realizar cada pase. Los experimentos se realizan entre los pases 10 – 22. Alcanzada la confluencia, las células que serán estudiadas experimentalmente, se incuban en un

medio DMEM al 1% de FBS durante 4 h para inducir así una detección temporal del ciclo celular, es decir, la quiescencia y posteriormente se estimulan.

4.1.5.2. BV2

La línea de células microgliales murinas inmortalizadas BV-2 se ha utilizado con frecuencia como modelo sustituto de la microglía primaria.⁴⁴ Esta línea celular adherente procedente de ratón fueron cedidas por el Dr. J.R. Bethea (Escuela de Medicina de la Universidad de Miami, Florida, USA). Presentan una conformación redondeada.

Las BV2 pueden activarse para liberar citoquinas proinflamatorias por estrés oxidativo o factores inflamatorios. Tal estímulo posiblemente desencadene un trastorno neurodegenerativo, por lo que las BV2 se usan ampliamente como un sistema modelo alternativo para la microglía primaria y el modelo de enfermedad neurodegenerativa *in vitro*. El modelo generalmente es inducido por el tratamiento con lipopolisacáridos (LPS).⁴⁵ El LPS es reconocido por diferentes clases de células inmunes como una molécula peligrosa. El origen del LPS puede explicar muchos de los síntomas clínicos asociados con una respuesta inflamatoria, ya que se ha demostrado que es un componente importante de la pared celular bacteriana, eventualmente descrita como endotoxina.⁴⁶

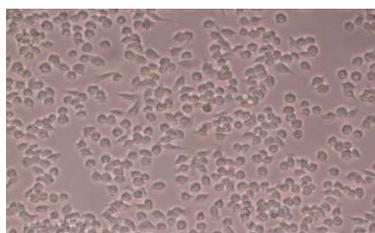


Figura 7. Línea celular BV2

Estas células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con L-glutamina, glucosa 4.5 g/L, y piruvato sódico, al cual se adiciona 5% de Suero Bovino fetal (FBS) y un 1% de antibióticos en un incubador a 37°C con un flujo de 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaban una confluencia del 80-90% se cambia el medio de cultivo, para ello se retira dicho medio, se adiciona GHCKS (0.006m/v, 0.0003m/v, 0.003m/v, 0.002m/v, 0.005m/v, pH:7.5) hasta que se produce la quelación del calcio y por lo tanto las células adheridas comienzan a desprenderse, posteriormente se diluyen en medio DMEM y se toma la cantidad necesaria (0.4-0.3mL) para realizar cada pase. Los experimentos se realizan entre los pases 10 – 22. Una vez alcanzada la confluencia necesaria, las células que serán estudiadas experimentalmente, se incuban en un medio DMEM sin FBS durante 24 h para inducir la quiescencia y posteriormente se estimulan, para luego ser analizadas según el protocolo que corresponda a la técnica que se va a emplear.

4.2. Métodos

4.2.1. Análisis de Proteína

4.2.1.1. Extracción de Proteína

La línea celular H9c2 se cultivó en placas P30, una vez alcanzada una confluencia del 80%, se incubaron en medio al 1% de suero durante 4 h. A continuación, se trataron durante 30 min con diferentes dosis del extracto PLE-A (8, 40 y 80 µg/mL), y a continuación se estimularon con CoCl₂ a las dosis indicadas y se incubaron durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con tampón PBS frío

y se añadió tampón de lisis, Buffer de Laemmli 3X (0.5 M Tris y pH 6.8, 35% (v/v) glicerol, 0.006% (p/v) azul de bromofenol, 6% (p/v) SDS y 1 M DTT). Por último, se hirvió el lisado celular durante 5 minutos, se utilizó una jeringuilla de insulina para romper el ADN y que no interfiriera en el procesamiento posterior. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

4.2.1.2. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot

Esta técnica también conocida como inmunoblot o electrotransferencia, se trata de un método analítico usado para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas. La técnica utiliza tres etapas para lograr dicho objetivo: separación por tamaño, transferencia a una membrana y, finalmente, visualización mediante el marcaje de proteínas con el uso de anticuerpos primarios y secundarios apropiados.⁴⁷

El gel encargado de separar las proteínas de los lisados celulares está dividido en dos secciones. La función del gel de empaquetamiento (*stacking gel*) es compactar el extracto proteico depositado en cada uno de los pocillos, de forma que el frente sea el mismo en todos los casos. El gel de resolución (*running gel*) se encarga de separar las proteínas desnaturalizadas y cargadas negativamente en función de su tamaño según migran hacia el ánodo.⁴⁷

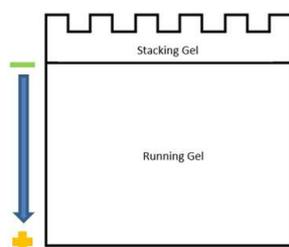


Figura 8. Gel de electroforesis.

La electroforesis se realizó depositando 25µL del lisado celular sobre cada uno de los pocillos de geles SDS-PAGE al 10-12% de una solución de acrilamida/bisacrilamida (30% p/v) en tampón de electroforesis (3% Tris (p/v) 25mM, 14.4% Glicina (p/v) 0.2M, 1% SDS (p/v)). Se dejó correr a 135V hasta que el frente de proteínas salió por la parte inferior del gel.

A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF), previamente activada con metanol 100% (1 min), durante 1 h a 350mA. Se tiñó la membrana de forma reversible con Ponceau S (0.2% Ponceau (p/v), 3% Ácido Tricloroacético) para visualizar que se ha realizado una correcta transferencia y carga de las proteínas. Luego se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente en una solución al 5% de leche desnatada en polvo o 3% de BSA (para proteínas fosforiladas) en TBS-Tween-20 al 0.1% (TTBS) (p/v) para evitar que se den interacciones inespecíficas. Posteriormente se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo primario durante 18 h en agitación a 4°C. A continuación, la membrana se lava 3 veces con TTBS durante 10 min, adicionando seguidamente el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en TTBS y se incubó durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente.

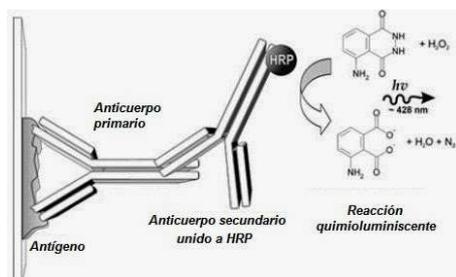


Figura 9. Anticuerpo secundario unido a la enzima peroxidasa de rábano picante, catalizando la reacción de quimioluminiscencia.⁴⁸

Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS de igual forma que en el caso anterior. La detección de la unión antígeno-anticuerpo se realizó por quimioluminiscencia ECL: 1 μ L de una solución de peróxido de hidrógeno en 1 mL de ECL (0.5% luminol + 0.22% ácido p-cumárico + 10% 1M Tris pH 8.5).

Para obtener la señal quimioluminiscente, se revelaron películas fotográficas Super RX-N (FujiFilm) con la máquina automática de revelado de sobremesa Curix 60 Agfa-Gevaert. Para cuantificar la proteína presente se utilizó el software *Image J*, a través de una densitometría cuantitativa de las bandas por análisis de imagen normalizando la densidad de la banda correspondiente a la proteína de interés con la de una proteína constitutiva de referencia, en este caso se empleó la β -Actina. Los datos de las gráficas se representan como la media \pm SEM.

4.2.2. Ensayo de Viabilidad

Para estudiar la viabilidad celular modulada por el extracto PLE-A en las líneas celulares BV2 y H9c2, se llevó a cabo una reacción de quimioluminiscencia empleando MTS, este se reduce a formazán por acción de las enzimas intramitocondriales, observándose un cambio de color de amarillo a violeta.⁴⁹ Esta variación colorimétrica es medible, la densidad óptica del producto medida a 490nm cuantifica el número de células metabólicamente activas, pudiéndose por lo tanto observar el efecto causado por el PLE-A.

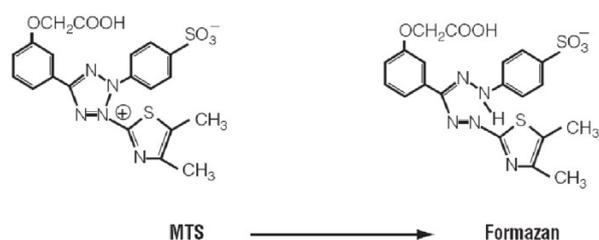


Figura 10. Reacción de reducción del MTS a Formazan.⁵⁰

Para llevar a cabo el procedimiento experimental de este ensayo se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (5.000 células/pocillo) en DMEM con 10% de FBS. Pasadas 18 h se cambió el medio de cultivo a DMEM con 1% de suero y sin rojo fenol durante 4 h. Una vez transcurrido dicho tiempo de incubación, se adicionaron diferentes dosis del extracto (0.8, 8, 40, 80 μ g/mL), y se incubaron durante 24 h. En el estudio se incluyeron células estimuladas con el vehículo, DMSO, y células sin tratar. Se realizaron 6 réplicas. El ensayo de viabilidad se realizó empleando el kit Promega, Cell Titer 96R *Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS), adicionando 10 μ L a cada pocillo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio. Tras

una incubación de 2 y 4 h, se midió en un lector de placas (Versamax) el producto violeta de la reacción colorimétrica, el formazán.

4.2.3. Estudio de Apoptosis

La anexina V es una molécula que tiene capacidad de unirse con gran afinidad a la fosfatidilserina exteriorizada en la membrana de las células apoptóticas. Recientemente se demostró que la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática es un evento temprano en la apoptosis, dándose como resultado la exposición de residuos de fosfatidilserina en la membrana externa de la membrana plasmática.⁵¹

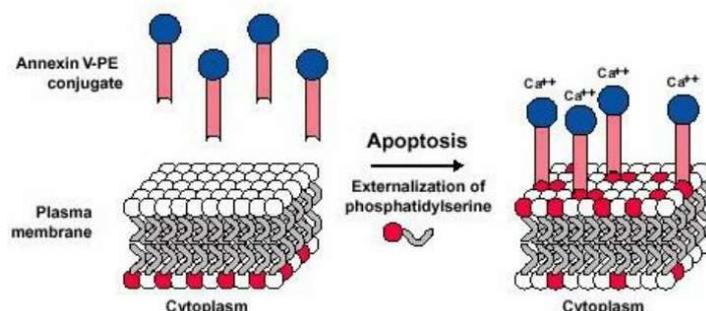


Figura 11. Representación esquemática del ensayo de Anexina V en apoptosis.⁵²

A lo largo del procedimiento experimental, las células se sembraron en frascos T-25 hasta obtener una confluencia del 80-90%, una vez alcanzada se dejaron 4 h en medio DMEM al 1% de FBS. A continuación, se añadieron las correspondientes dosis del extracto PLE-A (8, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$), pasados 30 min se estimularon con CoCl_2 ($600\mu\text{M}$) y se dejaron incubar a 37°C durante 24 h.

Una vez transcurrido este tiempo, se lavaron las células con PBS, se despegaron de los frascos de cultivo con Tripsina/EDTA 0.25%, se incubaron con $2\ \mu\text{L}$ de Anexina V-FITC en $100\ \mu\text{L}$ de un tampón rico en sales de unión a Anexina V, "Binding Buffer" (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4; 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) durante 10 minutos en agitación a oscuridad. Por último, se diluyeron con $400\ \mu\text{L}$ de "Binding Buffer" y con el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter) se estudiaron las células fluorescentes positivas a Anexina V en FL1 y ,por lo tanto, apoptóticas.

4.2.4. Estudio de especies reactivas de oxígeno (ROS)

4.2.4.1. Estudio de ROS con microscopia de fluorescencia

Para poder apreciar visualmente las especies reactivas de oxígeno (ROS) consecuentes de la hipoxia generada por el CoCl_2 ($400\mu\text{M}$) en las H9c2, se empleó un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i).

Para ello, se utilizaron cristales de polilisina, este homo-polipéptido de lisina pertenece al grupo de tensioactivos catiónicos. Se usa comúnmente para revestir utensilios de cultivo celular ya que mejora la adherencia de estas debido a las interacciones resultantes entre el polímero cargado positivamente y las cargas negativas presentes en las células.⁵³

Por lo que se colocaron sobre una placa de cultivo de 4 pocillos, 4 cristales de polilisina y 1100 células/pocillo en un volumen inicial de $100\ \mu\text{L}$, al cual se le adicionaron $400\ \mu\text{L}$ de DMEM al 10% de FBS pasadas 5 h. Transcurridas 18 h se cambia el medio por DMEM al 1% de FBS durante 4 h. Después de este tiempo de incubación, se estimularon

las células con CoCl_2 ($400\mu\text{M}$). Pasadas 18 h las células se marcan con la sonda fluorescente DHE (Dihidroetidio) en una concentración de $2\mu\text{M}$ durante 30 min a 37°C . Esta sonda fluorescente es empleada para la detección de la generación de ROS y es específico para superóxido y peróxido de hidrógeno, muestra una fluorescencia azul en el citosol hasta que se oxida, donde se intercala dentro del ADN de la célula y tiñe su núcleo de un rojo fluorescente brillante.⁵⁴

Tras lavados con PBS 1X, los cristales se montan, con la cara tratada hacia abajo en un portaobjetos, sobre la solución de Gelvatol. Finalmente, se dejan secar y se analizan por microscopía de fluorescencia.

4.2.4.2. Estudio de ROS con Citometría de flujo

En este caso, la sonda utilizada fue el diacetato de 2'-7'diclorofluorescina (DCFHDA), se trata de un colorante fluorogénico de permeabilidad celular que mide la actividad de ROS en la célula. Después de la captación celular, el DCFHDA es desacetilado por las esterasas celulares hasta convertirse en un compuesto no fluorescente, que posteriormente es oxidado por ROS a 2'-7'diclorofluoresceína (DCF). A continuación, el DCF puede detectarse por citometría de flujo.⁵⁵

Una vez las células han alcanzado la confluencia deseada, se cambió el medio a DMEM al 1% de FBS durante 4 h. Pasado este tiempo se añadió la sonda DCFHDA. Y las células se estimularon con 3 dosis del CoCl_2 (400 , 600 , $800\mu\text{M}$) durante 24 h. Mediante citometría de flujo se cuantificó la fluorescencia correspondiente a los ROS generados.

4.2.5. Análisis Estadístico

Los estudios celulares se realizaron en su mayoría por triplicado, se representaron como la media \pm SEM y se analizaron con el software *GraphPad Prism* versión 6 (La Jolla, CA, USA), mediante un análisis de varianza de una vía (*one-way ANOVA*) seguido del test de Tukey. Los P-valores inferiores a 0.05 indican una diferencia significativa.

5. Resultados

5.1. Neuroinflamación: Efecto del extracto PLE-A sobre células de microglía activadas

5.1.1. Ensayo de Viabilidad del PLE-A en microglía

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad en la línea celular de microglía inmortalizada BV2, con tres dosis del extracto PLE-A (8, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Este ensayo de viabilidad, como se mencionó en “Materiales y métodos”, se realizó a través de una reacción de quimioluminiscencia con el compuesto MTS. Como se puede apreciar en la **Figura 12**, el tratamiento con dicho extracto no produjo daño celular a ninguna de las dosis empleadas.

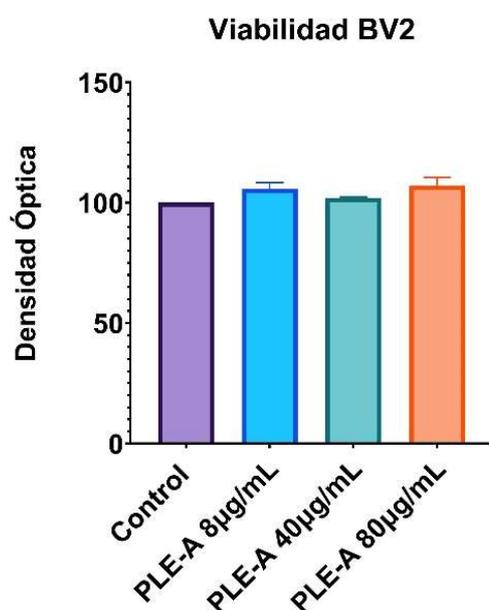


Figura 12. Estudio de la viabilidad del extracto PLE-A en células BV2. Las células BV2 se trataron con las dosis de los extractos durante 24 horas a 37°C. Los resultados se muestran como la media \pm SEM del experimento realizado por duplicado.

5.1.2. Efecto de PLE-A sobre la inducción de proteínas proinflamatorias en células de microglía BV2

Para estudiar el efecto del extracto sobre la respuesta inflamatoria en las células de microglía, las células BV2 fueron estimuladas con LPS 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h en presencia o en ausencia del extracto PLE-A (8, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados se muestran en la **Figura 13**.

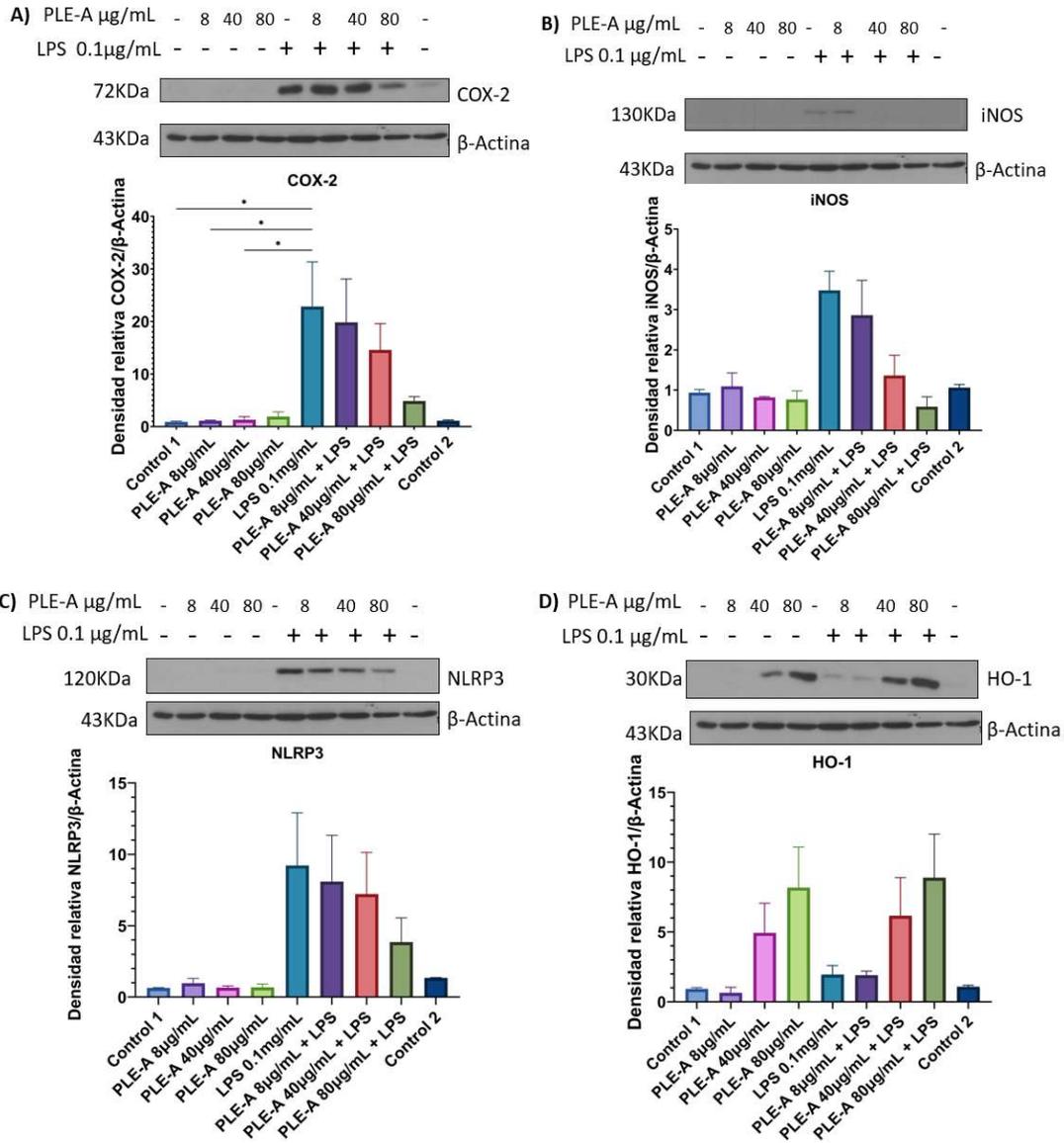


Figura 13. Efecto del extracto de alperujo PLE sobre la expresión de proteínas proinflamatorias inducida por LPS en células de microglía BV2. Las células BV2 se pretrataron con las dosis indicadas de los extractos durante 30 minutos, y se incubaron con el LPS durante 24 horas a 37°C; después se estudió por Western Blot la expresión de COX-2 (A), iNOS (B), NLRP3 (C) e HO-1 (D), mostrado en la parte superior de la figura. Los controles 1 y 2 son duplicados experimentales que no fueron estimulados ni tratados con el extracto. En la parte inferior se muestra una gráfica de la cuantificación de cada una de las proteínas, utilizando como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína la β -Actina. Los datos expresados se muestran como densidad relativa de la proteína proinflamatoria frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de tres experimentos, excepto para iNOS en el que se realizaron dos experimentos. (* $p < 0.05$).

Como podemos apreciar en las **Figuras 13 A, B y C**; el tratamiento con LPS indujo el aumento de la expresión característica de las proteínas asociadas a la respuesta inflamatoria como: Ciclooxygenasa 2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) e inflammasoma NLRP3. El pretratamiento con el extracto inhibió de forma dosis-dependiente este aumento. Observándose en los 3 casos una máxima disminución del perfil proinflamatorio cuando aplicamos la dosis más alta del extracto. Además, al estudiar la expresión inducida únicamente por los extractos, observamos que presenta valores muy similares a los de la expresión basal (en ausencia de extracto y LPS).

En el caso de la proteína hemo oxigenasa 1 (HO-1), una potente enzima antioxidante y desintoxicante que ejerce citoprotección en el cerebro, se puede apreciar un aumento dosis dependiente en las células pretratados con los extractos, tanto en ausencia como en presencia de LPS. Este resultado puede deberse a que el HO-1 esté generando una respuesta protectora antioxidante previa al estímulo o que dichos extractos estén provocando un estrés celular.

5.2. Hipoxia: Efecto del extracto PLE-A sobre cardiomiocitos H9c2

5.2.1. Ensayo de Viabilidad del PLE-A en cardiomiocitos

Se estudió la viabilidad de las células H9c2 tratadas con 4 dosis del extracto PLE-A (0.8, 8, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seleccionadas según los resultados observados en las células BV2.

Al igual que en el ensayo de viabilidad de las células BV2, se realizó una reacción de quimioluminiscencia con el compuesto MTS, permitiéndonos conocer la cantidad de células vivas. La cuantificación de esta reacción se produjo midiendo la densidad óptica a 490nm, mostrada en la **Figura 14**.

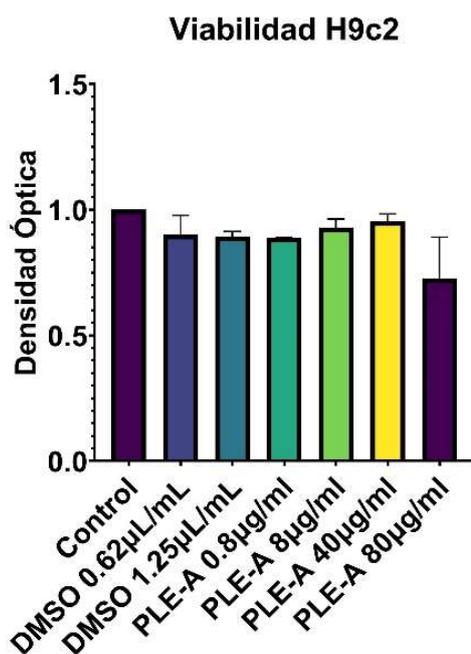


Figura 14. Estudio de la viabilidad del extracto PLE-A en células H9c2. Las células H9c2 se trataron con las dosis de los extractos durante 24 horas a 37°C. Los resultados se muestran como la media \pm SEM del experimento realizado por duplicado.

Como se puede observar, los valores obtenidos para las diferentes concentraciones de extracto son muy similares a los basales, permitiéndonos deducir que este extracto no induce un daño en los cardiomiocitos, aunque a la dosis más alta parece que disminuye la viabilidad, esta no es significativa; en cualquier caso, se precisarían más experimentos para obtener una conclusión estadísticamente sólida.

5.2.2. Efecto del CoCl_2 sobre cardiomiocitos H9c2

5.2.2.1. El CoCl_2 induce HIF-1 α y HO-1 en las células H9c2

El factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α) es el regulador clave de la respuesta a la hipoxia. La expresión de HIF-1 α se examinó en células H9c2 tratadas con diferentes dosis de CoCl_2 durante 24 h, para determinar si en nuestras condiciones experimentales CoCl_2 puede imitar condiciones hipóxicas en las células H9c2. Como se muestra en la **Figura 15A**, la expresión de HIF-1 α aumentó en las células tratadas con CoCl_2 (400, 600 y 800 μM). Por lo tanto, confirmamos que en nuestras condiciones experimentales el CoCl_2 se comporta como un agente mimético de hipoxia en los cardiomiocitos H9c2.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se estudió la inducción de proteínas dependientes de HIF-1 α como es el caso del HO-1, representado en la **Figura 15B**.

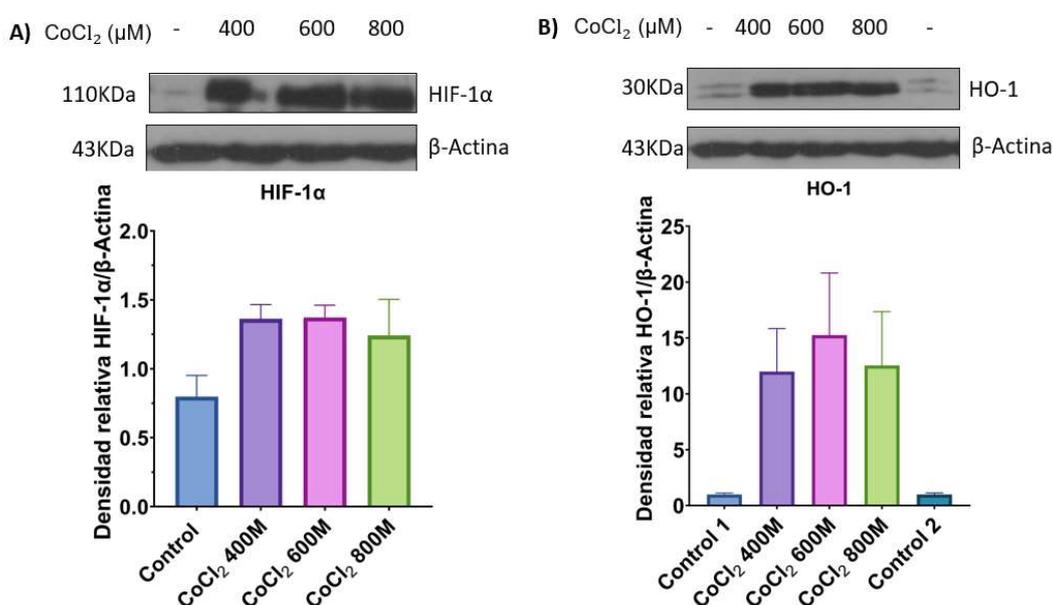


Figura 15. Expresión de proteínas hipóxicas en células H9c2 estimuladas con CoCl_2 . Las células H9c2 se estimularon durante 24 h a 37°C con las dosis indicadas del CoCl_2 , después se analizó por Western Blot la expresión de HIF-1 α (A) y HO-1 (B), mostrado en la parte superior de la figura. Los controles 1 y 2 duplicados son experimentales que no fueron estimulados. En la parte inferior se muestra una gráfica de la cuantificación de ambas proteínas, utilizando como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína la β -Actina. Los datos expresados se muestran como densidad relativa de las proteínas hipóxicas frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de experimentos realizados por triplicado.

Como se puede apreciar en la **Figura 15B**, el tratamiento con CoCl_2 durante 24 h induce el aumento de la expresión de HO-1.

5.2.2.2. El CoCl_2 desencadena procesos de Apoptosis en las células H9c2

Considerando que las situaciones de hipoxia pueden ser las responsables de desencadenar una muerte celular por apoptosis, a continuación, realizaremos un ensayo de Anexina V conjugada con FITC, para investigar el efecto del tratamiento con diferentes dosis de CoCl_2 sobre la muerte de las células H9c2.

Mediante citometría de flujo se cuantificó la fluorescencia de la Anexina V-FITC presente en las células H9c2, pudiendo por lo tanto conocer la cantidad de células apoptóticas inducidas por el CoCl_2 . Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 16**.

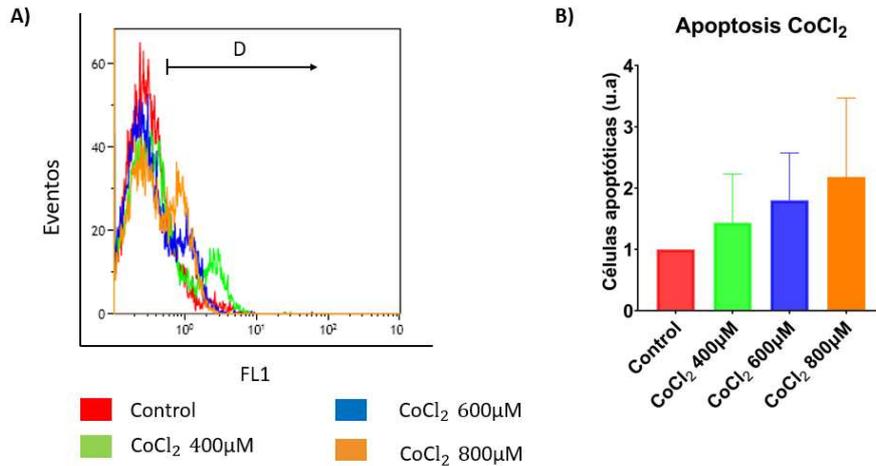


Figura 16. Detección de apoptosis en células H9c2 estimulada con CoCl_2 . Las células H9c2 se estimularon durante 24 h a 37°C con diferentes dosis de CoCl_2 . **A:** Las células H9c2 se tiñeron con FITC-Anexina V-PI y se analizaron mediante citometría de flujo. Histograma representativo. El área D indicada en la parte superior hace referencia a la población de células positivas a Anexina V. **B:** Análisis cuantitativo de la apoptosis inducida por el CoCl_2 en el área D: Representación de las medias de las células apoptóticas (u.a.). Los resultados se muestran como la media \pm SEM del experimento por triplicado.

Como se puede apreciar en la **Figura 16**, el tratamiento con CoCl_2 durante 24 h induce la apoptosis como consecuencia de la hipoxia generada en las células H9c2. Teniendo en cuenta estos resultados, se estudiaron proteínas implicadas en esta muerte celular programada, como es el caso de la caspasa efectora, Caspasa-3 activa.

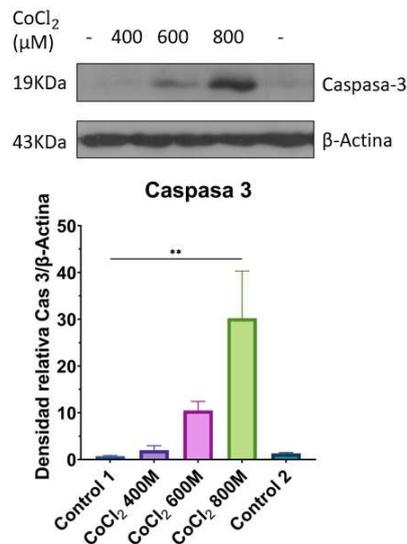


Figura 17. Expresión de Caspasa-3 activa en células H9c2 estimuladas con CoCl_2 . Las células H9c2 se estimularon durante 24 h a 37°C con las dosis indicadas del CoCl_2 , después se midió por Western Blot la expresión de la caspasa-3 activa, mostrado en la parte superior de la figura. Los controles 1 y 2 son duplicados experimentales que no fueron estimulados. En la parte inferior se muestra una gráfica de la cuantificación proteica, utilizando como control de carga y

para la cuantificación de la expresión de proteína la β -Actina. Los datos expresados se muestran como densidad relativa de la caspasa-3 frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de experimentos realizados por triplicado. (** $p < 0.01$).

Como se puede apreciar en la **Figura 17**, el tratamiento con CoCl_2 durante 24 h indujo expresión de Caspasa-3 activa de manera dosis dependiente, cuanto mayor es la concentración del cloruro, mayor es la expresión de la proteína pro-apoptótica.

5.2.2.3. El CoCl_2 produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células H9c2

También se estudió el efecto de la hipoxia química sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este caso, utilizamos la sonda diacetato de 2'-7'diclorofluorescina (DCFHDA), colorante fluorogénico que mide la actividad de ROS en la célula.

Las células H9c2 se trataron con 3 dosis del CoCl_2 (400, 600, 800 μM) durante 24 h y la fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 18**, la presencia del CoCl_2 indujo un aumento en la fluorescencia de manera dosis dependiente, mostrando un aumento significativo en la producción de ROS.

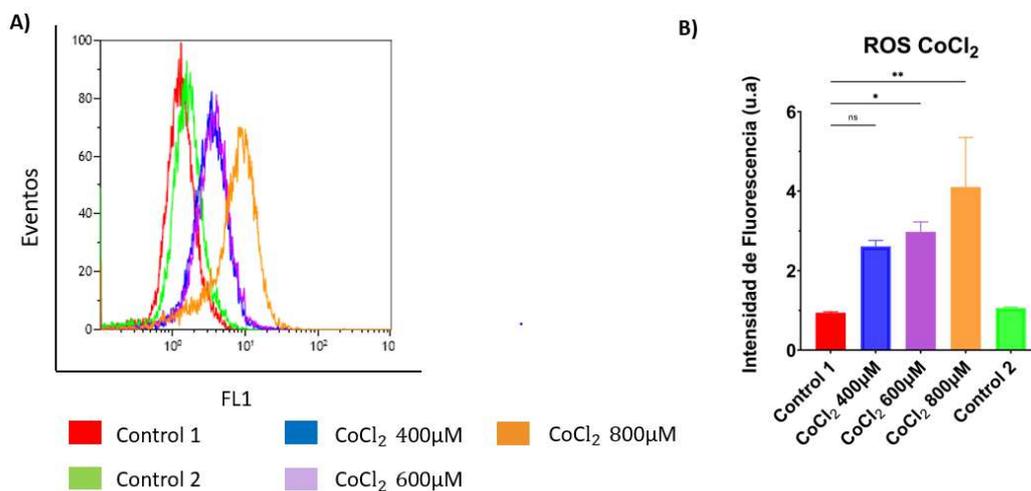


Figura 18. Detección de ROS en células H9c2 estimuladas con CoCl_2 . Las células H9c2 se estimularon durante 24 h a 37°C con diferentes dosis de CoCl_2 . Los controles 1 y 2 son duplicados experimentales que no fueron estimulados. **A:** Las células H9c2 se marcaron con DCFHDA y se analizaron mediante citometría de flujo. Histograma representativo. **B:** Análisis cuantitativo de los ROS inducidos por el CoCl_2 : Representación de las medias de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.). Los resultados se muestran como la media \pm SEM del experimento por triplicado. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

En la **Figura 18 B** se aprecian diferencias significativas entre las células control y las células estimuladas con las dosis de 600 y 800 μM de CoCl_2 .

La acumulación de ion superóxido en los cardiomiocitos de rata, también se evaluó mediante la sonda DHE, la cual es capaz de atravesar la membrana plasmática, reaccionar con ROS y, como consecuencia, migrar al núcleo donde se intercala con el ADN, tiñéndolo de un color rojo brillante observable bajo microscopía de fluorescencia.

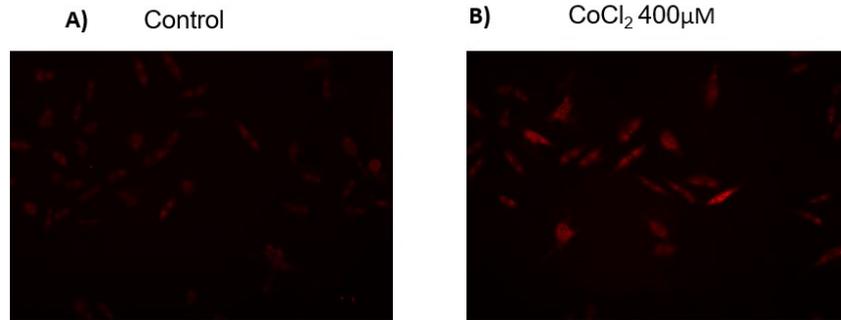


Figura 19. Imágenes representativas de fluorescencia a objetivo 10X de las H9c2 marcadas con DHE. A: Control celular H9c2. **B:** Células H9c2 estimuladas con dosis 400μM CoCl₂ durante 24 h a 37°C.

La intensidad de fluorescencia roja es directamente proporcional a la cantidad de especies reactivas de oxígeno generadas como consecuencia del CoCl₂. Como muestra la **Figura 19**, esta fluorescencia es mucho menor en las células control (**A**) que en las células estimuladas con CoCl₂ (**B**), lo que indica la presencia del ión superóxido en estas últimas. La hipoxia desencadena procesos de estrés oxidativo en las células H9c2.

5.2.3 Efecto del extracto PLE-A sobre cardiomiocitos H9c2 hipóxicos

5.2.3.1 Efecto del extracto PLE-A sobre la Hipoxia en las células H9c2

Para analizar la posible modulación del extracto PLE-A sobre los cardiomiocitos, se observó la expresión de determinadas proteínas relacionadas con la hipoxia mediante Western-Blot. Para ello, las células H9c2 fueron tratadas con las 3 dosis del extracto (8, 40, 80 μg/mL) y a continuación se estimularon con CoCl₂ 600μM. Obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 20**.

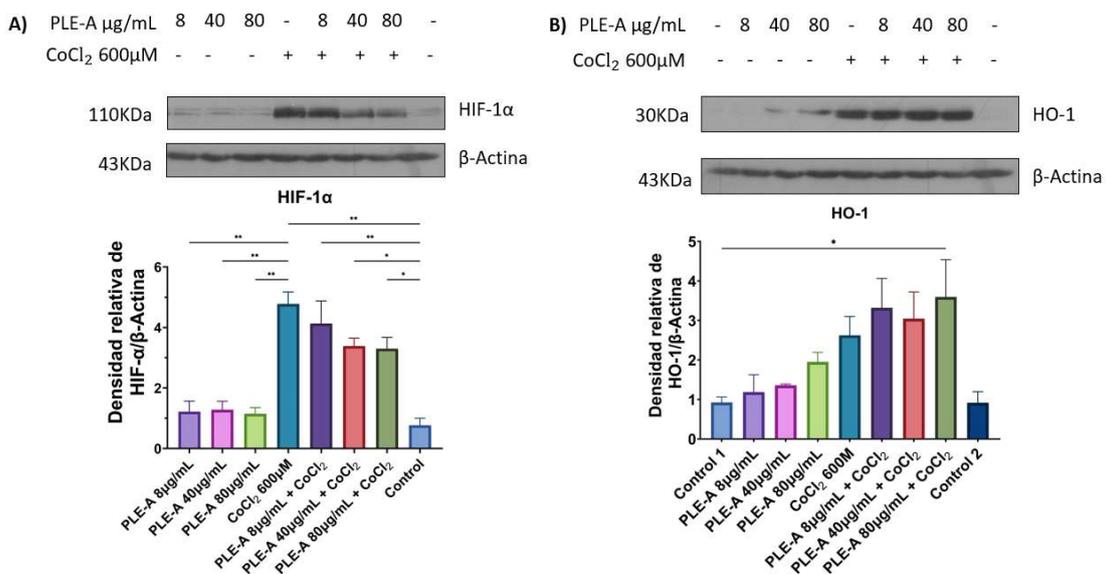


Figura 20. Efecto del extracto de alperujo PLE sobre la expresión de proteínas hipóxicas inducida por el CoCl₂ en células H9c2. Las células H9c2 se pretrataron con las dosis indicadas de los extractos durante 30 minutos, y se incubaron con CoCl₂ durante 24 horas a 37°C; después se midió por Western Blot la expresión de HIF-1α (**A**) y HO-1 (**B**), mostrado en la parte superior de la figura. Los controles 1 y 2 son duplicados experimentales que no fueron estimulados ni

tratados con el extracto. En la parte inferior se muestra una gráfica de la cuantificación de cada una de las proteínas, utilizando como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína la β -Actina. Los datos expresados se muestran como densidad relativa de la proteína hipóxica frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de dos experimentos. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Como ilustra la **Figura 20A**, la expresión de factor 1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α) disminuye según aumenta la concentración del extracto, lo que indica que el PLE-A inhibe el aumento de HIF-1 α por el CoCl₂.

En el caso de la hemo oxigenasa 1 (HO-1) (**Fig 20B**), su expresión aumenta de manera dosis dependiente es respuesta al tratamiento con el extracto en ausencia de CoCl₂ (normoxia), sin embargo el extracto no modula la respuesta inducida por el agente mimético de hipoxia.

5.2.3.2. Efecto del extracto PLE-A sobre la Apoptosis inducida por CoCl₂ en las células H9c2

Teniendo en cuenta que la hipoxia generada por el CoCl₂ desencadena una respuesta apoptótica en las células H9c2, como se comprobó en las **Figuras 16 y 17**. Se estudió la modulación de la expresión de la caspasa-3 activa en presencia del extracto de alperujo PLE.

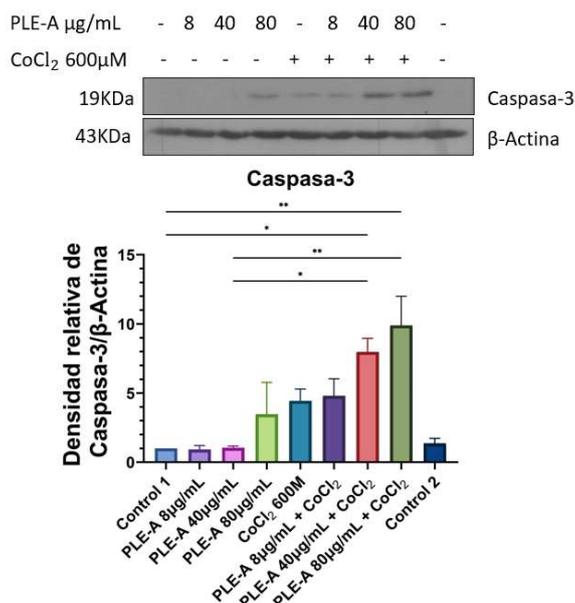


Figura 21. Efecto del tratamiento con el extracto PLE-A sobre la activación de la Caspasa-3 en células H9c2 tratadas con CoCl₂. Las células H9c2 se pretrataron con las dosis indicadas del extracto durante 30 min y se estimularon durante 24 h a 37°C con CoCl₂ 600 μ M, después se midió por Western Blot la expresión de caspasa-3 activa, mostrado en la parte superior de la figura. Los controles 1 y 2 son duplicados experimentales que no fueron estimulados ni tratados con los extractos. En la parte inferior se muestra una gráfica de la cuantificación proteica, utilizando como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína la β -Actina. Los datos expresados se muestran como densidad relativa de la caspasa-3 frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de experimentos realizados por duplicado. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

La **Figura 21** muestra que la expresión de la proteína pro-apoptótica caspasa-3 activa aumentó de manera dosis dependiente en presencia del extracto y del CoCl₂, mostrando

que dicho extracto no solo no inhibe la muerte programada en las H9c2, sino que, a ciertas dosis, parece que contribuye a aumentarla.

La isquemia también es responsable de la activación de otras proteínas relacionadas con la muerte celular programada, como es el caso de la proteína p38, se trata de una MAPK perteneciente al grupo de las SAPK o quinasas de respuesta a estrés.^{56 57 58} La presencia de esta proteína fosforilada (P-p38) es un indicador de su activación.

Teniendo en cuenta, los efectos generados por esta proteína, se estudió una posible modulación de P-p38 con el extracto de alperujo, mostrado en la **Figura 22**.

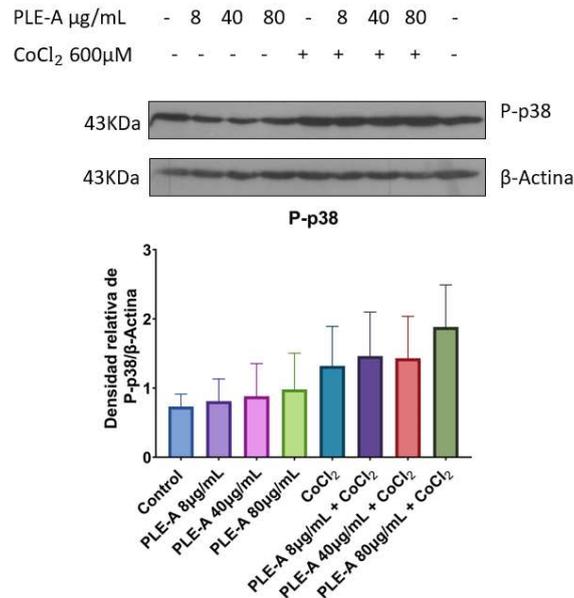


Figura 22. Efecto del extracto PLE-A en la fosforilación de la proteína p38 en células H9c2 tratadas con CoCl_2 . Las células H9c2 se pretrataron con las dosis indicadas del extracto durante 30 min y se estimularon durante 24 h a 37°C con CoCl_2 $600\mu\text{M}$, después se midió por Western Blot la fosforilación de la proteína p38, (P-p38) mediante anticuerpos fosfo-específicos. Los controles 1 y 2 son duplicados experimentales que no fueron estimulados ni tratados con los extractos. En la parte inferior se muestra una gráfica de la cuantificación proteica, utilizando como control de carga y para la cuantificación de la expresión de proteína la β -Actina. Los datos expresados se muestran como densidad relativa de P-p38 frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de experimentos realizados por duplicado.

Los resultados obtenidos en la **Figura 22** muestran un aumento en la fosforilación de la proteína p38 en respuesta al estímulo hipóxico, no obstante, no se da una significación estadística ni se modula como consecuencia del tratamiento con el extracto.

6. Discusión

Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la primera causa de mortalidad en el mundo. La cardiopatía isquémica (CI) es la patología más relevante incluida dentro de las enfermedades del sistema circulatorio.⁵⁹ En el caso del infarto de miocardio, ocurre como consecuencia de la obstrucción de una arteria coronaria por un trombo, provocando que el oxígeno se vuelva limitado y dando lugar a la muerte del territorio que irriga la arteria obstruida.² El estrés oxidativo juega también un papel importante en el síndrome isquemia/reperfusión, causa daño celular mediante la formación de especies reactivas derivadas del oxígeno.⁶⁰

Además del daño en el territorio que irriga la arteria obstruida, se han constatado recientes observaciones en las que pacientes y modelos animales de IM muestran la presencia de neuroinflamación tras un infarto de miocardio.² Esto ha llevado a proponer que además de las células del miocardio, la microglía activada puede ser una diana potencial a tener en cuenta en la investigación de tratamientos efectivos que atenúen la lesión del miocardio.^{4 5}

A lo largo de este trabajo analizamos el efecto de un extracto proveniente del alperujo en dos modelos celulares que reflejan el daño que puede ocurrir tras un evento isquémico: cardiomiocitos H9c2 hipóxicos, (generados mediante estimulación con CoCl_2), y células de microglía BV2 reactivas (generadas mediante estimulación con LPS).

En primer lugar, estudiamos el daño cardíaco resultante de la hipoxia química generada por el CoCl_2 en las H9c2. Para ello se realizaron ensayos de apoptosis, así como análisis de expresión de proteínas relacionadas con este proceso como es el caso de la Caspasa-3.¹⁹

Además, en esta misma situación de hipóxica, se analizó la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la expresión de proteínas encargadas de regular el proceso hipóxico, como es el caso de HIF-1 α y HO-1. Hay estudios que demuestran que la hipoxia induce la expresión de HO-1 en tejidos animales y cultivos celulares e implican a HIF-1 en esta respuesta.¹³

Esta situación induce a pensar que los compuestos naturales con propiedades antioxidantes, podrían modular el daño inducido en la situación de hipoxia. El extracto fenólico proveniente del alperujo del aceite de oliva, el PLE-A, tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias^{40 39}, que se han demostrado en células epiteliales corneales y conjuntivales humanas⁶¹. En nuestro modelo, tras estudiar su efecto sobre la viabilidad celular, encontramos respuestas protectoras a dosis mucho menores que las empleadas en otros estudios, entre 10 y 50 veces menos^{39 40}, lo cual puede ser debido a sensibilidad de los diferentes tipos celulares a los compuestos presentes en el extracto.

En la línea celular de cardiomiocitos H9c2, la preincubación con el extracto no tuvo efecto sobre la apoptosis inducida por la hipoxia química, pero sí fue capaz de inhibir el aumento de expresión del factor 1 α inducible por hipoxia, HIF-1 α . No obstante, el pretratamiento con el extracto aumentó la expresión de la proteína hemo oxigenasa 1 en las células H9c2 en reposo y esos niveles se mantuvieron en presencias de estímulo hipóxico, lo que puede deberse a que el HO-1 esté generando una respuesta protectora antioxidante, independiente al estímulo hipóxico, o que dichos extractos estén

provocando un estrés celular. Estas hipótesis deben ser evaluadas en detalle con estudios adicionales. Estos resultados respaldan los observados en la literatura, justificando la existencia de mecanismos dependientes e independientes de HIF para la activación del gen HO-1 por hipoxia y CoCl_2 .⁶²

En el caso de las células de microglía BV2, se estudió la modulación resultante de dicho extracto una vez las células han sido estimuladas con LPS. Este lipopolisacárido es un potente inductor de la inflamación debido a su endotoxicidad⁴⁶. El perfil inflamatorio de la microglía, caracterizado por expresión de Ciclooxigenasa 2 (COX-2), el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el complejo multiproteico inflammasoma (NLRP3) era modulado por el extracto. Con ello se confirma el perfil antiinflamatorio de este tipo de extractos.

63 40 64 65

También se examinaron los niveles de expresión de la proteína hemo oxigenasa 1 (HO-1). La HO-1 resulta ser una destacable diana terapéutica para moderar la progresión de las enfermedades que impliquen procesos inflamatorios y oxidativos.¹⁷ Varios estudios han demostrado que la HO-1 muestra una actividad citoprotectora o citotóxica, según el proceso fisiopatológico en el que participe, por lo que se ha descrito como una molécula "beneficiosa" o "perjudicial" según la situación.⁶⁶ En este caso, se dio un aumento de expresión de los extractos tanto en presencia como en ausencia del LPS, pudiendo justificarse que el HO-1 esté generando una respuesta protectora independiente al estímulo endotóxico o que el PLE-A esté produciendo un estrés celular. Se precisarían más estudios para dirimir este aspecto.

En cualquier caso, según nuestros resultados, el efecto del extracto PLE-A es amplio: Este extracto es efectivo controlando la respuesta inflamatoria en la microglía y aunque modula la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo en cardiomiocitos sometidos a hipoxia, no es capaz de prevenir la muerte por apoptosis que desencadena esta hipoxia.

Es importante tener en cuenta el pequeño número de repeticiones realizados en algunos de los experimentos, observándose a veces tendencias no significativas estadísticamente, por lo que se precisarían más experimentos para sacar conclusiones estadísticamente sólidas. De cualquier forma, con estos resultados preliminares, concluimos que este extracto de alperujo podría ser de gran utilidad para disminuir las consecuencias del daño isquémico a nivel de músculo cardíaco y neurológico.

7. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- Las dosis del extracto proveniente del alperujo, PLE-A, empleadas a lo largo de los experimentos, no afectan a la viabilidad de las líneas celulares H9c2 y BV2.
- El tratamiento con cloruro de cobalto (CoCl_2) en la línea celular de cardiomiocitos H9c2, ha resultado ser un modelo válido de hipoxia mimética.
- En los cardiomiocitos H9c2 estimulados con CoCl_2 , el tratamiento con el extracto PLE-A provoca una disminución del factor de respuesta a la hipoxia (HIF-1 α), aunque no inhibe el aumento de la apoptosis.
- En los cardiomiocitos H9c2 estimulados con CoCl_2 , el tratamiento con el extracto PLE-A provoca un aumento en los niveles de expresión de la proteína HO-1 tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia.
- En las células de microglía BV2 reactiva, generadas mediante estimulación con LPS, el tratamiento con el extracto PLE-A inhibe el aumento de la expresión de proteínas relevantes en la respuesta inflamatoria.
- En las células de microglía BV2 reactiva, generadas mediante estimulación con LPS, el tratamiento con el extracto PLE-A aumenta los niveles de expresión de la proteína HO-1.
- En base a estas evidencias, proponemos que el tratamiento con el extracto PLE-A podría ser de gran utilidad para disminuir las consecuencias del daño isquémico a nivel de músculo cardíaco y neurológico.

Estas conclusiones necesitarían, en algunos casos, la ejecución de más experimentos para poder obtener una afirmación estadística sólida.

8. Bibliografía

1. Cardiopatía Isquémica | Infarto | Angina de pecho | PortalCLÍNIC. *Clínic Barcelona* <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cardiopatia-isquemica>.
2. Administrator. Cardiopatía isquémica. *Fundación Española del Corazón* <https://fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/cardiopatia-isquemica.html>.
3. Torres, A. R., Naranjo, J. D., Salvador, C., Mora, M. & Papazian, O. FACTORES PREDOMINANTES DE ENCEFALOPATÍA NEONATAL: HIPOXIA E ISQUEMIA, UN PROBLEMA GLOBAL. 5 (2019).
4. Wang, M. *et al.* Microglia-Mediated Neuroinflammation: A Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *J Inflamm Res* **15**, 3083–3094 (2022).
5. Rana, I. *et al.* Microglia activation in the hypothalamic PVN following myocardial infarction. *Brain Research* **1326**, 96–104 (2010).
6. Zabala, J. A. Complicaciones neurológicas de la cirugía cardíaca. *Rev Esp Cardiol* **58**, 1003–1006 (2005).
7. Qi, L. *et al.* New insights into the central sympathetic hyperactivity post-myocardial infarction: Roles of METTL3-mediated m6 A methylation. *J Cell Mol Med* **26**, 1264–1280 (2022).
8. Familiar hypercholesterolemia - Symptoms and causes - Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/familial-hypercholesterolemia/symptoms-causes/syc-20353755>.
9. Hipoxia: síntomas, tipos y tratamiento. *Tua Saúde* <https://www.tuasaude.com/es/hipoxia/>.
10. Harrison, J. F., Greenlee, K. J. & Verberk, W. C. E. P. Functional Hypoxia in Insects: Definition, Assessment, and Consequences for Physiology, Ecology, and Evolution. *Annu Rev Entomol* **63**, 303–325 (2018).
11. Harrison, J. *et al.* Responses of terrestrial insects to hypoxia or hyperoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **154**, 4–17 (2006).
12. Semenza, G. L., Rue, E. A., Iyer, N. V., Pang, M. G. & Kearns, W. G. Assignment of the Hypoxia-Inducible Factor 1 α Gene to a Region of Conserved Synteny on Mouse Chromosome 12 and Human Chromosome 14q. *Genomics* **34**, 437–439 (1996).
13. Ke, Q. & Costa, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* **70**, 1469–1480 (2006).
14. Fraga, A., Ribeiro, R. & Medeiros, R. Hipoxia tumoral: Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urológicas Españolas* **33**, 941–951 (2009).
15. Nrf2 (proteína): función y efectos en el humano. *Salud y Belleza* <https://saludybelleza.net/nrf2-nfe2l2/> (2019).
16. Wang, Y. *et al.* HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress. *Aging (Albany NY)* **11**, 5535–5547 (2019).
17. Facchinetti, M. M. Heme-Oxygenase-1. *Antioxidants & Redox Signaling* **32**, 1239–1242 (2020).
18. Stea, M. Cloruro de cobalto (CoCl₂): estructura, nomenclatura, propiedades. *Lifeder* <https://www.lifeder.com/cloruro-de-cobalto/> (2019).
19. Muñoz-Sánchez, J. & Cháñez-Cárdenas, M. E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol* **39**, 556–570 (2019).

20. Marino, K. M., Silva, E. R. & Windelborn, J. A. A comparison between chemical and gas hypoxia as models of global ischemia in zebrafish (*Danio rerio*). *Animal Model Exp Med* **3**, 256–263 (2020).
21. Subirada, P. V. *et al.* Rapamycin and Resveratrol Modulate the Gliotic and Pro-Angiogenic Response in Müller Glial Cells Under Hypoxia. *Front Cell Dev Biol* **10**, 855178 (2022).
22. TL 90 – LA HIPOXIA QUÍMICA INDUCIDA POR COCL2 INDUCE SEÑALES PRO-INFLAMATORIAS Y PROFIBRÓTICAS Y LA ACTIVACIÓN INFLAMASOMA EN LAS CÉLULAS HEPÁTICAS. *Gastroenterología Latinoamericana* <https://gastrolat.org/tl-90-la-hipoxia-quimica-inducida-por-cocl2-induce-senales-pro-inflamatorias-y-profibroticas-y-la-activacion-inflamasoma-en-las-celulas-hepaticas/> (2016).
23. Palomar, L. S., Melana Colavita, J. P., Aguirre, M. V., Gay, C. C. & Rodríguez, J. P. Evaluación in vitro de la actividad proteolítica de células de carcinoma renal de células claras (Caki-1) en condiciones de hipoxia. (2019).
24. Piret, J.-P., Mottet, D., Raes, M. & Michiels, C. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* **973**, 443–447 (2002).
25. Ortiz, G. G. *et al.* Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. *Adv Protein Chem Struct Biol* **108**, 1–31 (2017).
26. AllScience. Estrés oxidativo, radicales libres y antioxidantes: ¿Qué son? ¿Cuáles son sus efectos? ¿Qué condiciones están relacionadas a ellos? *AllScience* <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/estres-oxidativo-radicales-libres-y-antioxidantes>.
27. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**, 495–516 (2007).
28. Apoptosis. *CancerQuest* <https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/apoptosis>.
29. Acar, V. *et al.* Immunohistochemical Evaluation of PARP and Caspase-3 as Prognostic Markers in Prostate Carcinomas. *Clin Med Res* **19**, 183–191 (2021).
30. Humeau, J. *et al.* Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium* **70**, 3–15 (2018).
31. Bautista Borrego, L. Hipoxia en cardiomiocitos; regulación de la expresión de la subunidad b1 del canal maxi-k y participación en el preconditionamiento cardíaco. (2009).
32. McClintock, D. S. *et al.* Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Mol Cell Biol* **22**, 94–104 (2002).
33. Brunelle, J. K. *et al.* c-Myc sensitization to oxygen deprivation-induced cell death is dependent on Bax/Bak, but is independent of p53 and hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* **279**, 4305–4312 (2004).
34. Carmeliet, P. *et al.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485–490 (1998).
35. Dai, D. *et al.* Knock-down of farnesyl pyrophosphate synthase protects heart-derived H9c2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury. *Cell Biol Int* **41**, 982–990 (2017).
36. Müller, M. J., Vollmar, B., Friedl, H. P. & Menger, M. D. Xanthine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of the liver. *Free Radic Biol Med* **21**, 189–197 (1996).
37. ¿Qué son y para qué sirven los antioxidantes? - Volumen XXV - Número 2 - Revista: La ciencia y el hombre - Universidad Veracruzana. <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num2/articulos/antioxidantes/>.

38. Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M. & Crea, R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem Toxicol* **44**, 903–915 (2006).
39. Katsinas, N., Enríquez-de-Salamanca, A., Bento da Silva, A., Bronze, M. R. & Rodríguez-Rojo, S. Olive Pomace Phenolic Compounds Stability and Safety Evaluation: From Raw Material to Future Ophthalmic Applications. *Molecules* **26**, 6002 (2021).
40. Katsinas, N., Rodríguez-Rojo, S. & Enríquez-de-Salamanca, A. Olive Pomace Phenolic Compounds and Extracts Can Inhibit Inflammatory- and Oxidative-Related Diseases of Human Ocular Surface Epithelium. *Antioxidants (Basel)* **10**, 1150 (2021).
41. Theoharides, T. C., Cholevas, C., Polyzoidis, K. & Politis, A. Long-COVID syndrome-associated brain fog and chemofog: Luteolin to the rescue. *Biofactors* **47**, 232–241 (2021).
42. Reboredo-Rodríguez, P. *et al.* State of the Art on Functional Virgin Olive Oils Enriched with Bioactive Compounds and Their Properties. *Int J Mol Sci* **18**, E668 (2017).
43. Zordoky, B. N. M. & El-Kadi, A. O. S. H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* **56**, 317–322 (2007).
44. Henn, A. *et al.* The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* **26**, 83–94 (2009).
45. Células microgliales BV-2 | AcceGen. <https://www.accegen.com/product/bv-2-abc-tc212s/>.
46. Nutrition, E. LPS: El más potente inductor de inflamación. *All About Feed ES - Puerta a la Industria Global de Alimentación* <https://es.allaboutfeed.net/lps-el-mas-potente-inductor-de-inflamacion/> (2020).
47. Taylor, S. C. & Posch, A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* **2014**, 361590 (2014).
48. Westernblot. *Academic dictionaries and encyclopedias* <https://de-academic.com/dic.nsf/dewiki/1503459>.
49. Ensayo del MTT. <http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>.
50. Figure 3.1 Structures of MTS tetrazolium salt and its formazan product... *ResearchGate* https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-MTS-tetrazolium-salt-and-its-formazan-product-from-CellTiter-96R-AQueous_fig6_322065602.
51. van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B. & Reutelingsperger, C. P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31**, 1–9 (1998).
52. Apoptosis assays detection and methods. <https://www.slideshare.net/Thirusangu/apoptosis-assays-detection-and-methods>.
53. e-polilisina - Producción, Estructura química y funciones | KripKit. <https://kripkit.com/e-polilisina/>.
54. Kit de ensayo de DHE (dihidroetidio) - Especies de oxígeno reactivo (ab236206) | Abcam. <https://www.abcam.com/dhe-dihydroethidium-assay-kit-reactive-oxygen-species-ab236206.html>.
55. KP06003 | DCFH-DA probe | Intracellular ROS assay. *BQC - Bioquochem* <https://bioquochem.com/dcfh-da-probe-intracellular-ros-assay/>.
56. QUINASA ACTIVADA POR ESTRÉS, p38 - Señalización y respuestas fisiológicas iniciadas en el antíg. <https://1library.co/article/quinasa-activada-estr%C3%A9s-se%C3%B1alizaci%C3%B3n-respuestas-fisiol%C3%B3gicas-iniciadas-ant%C3%ADg.z151d23y>.

57. Vlahopoulos, S. A. Aberrant control of NF- κ B in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode. *Cancer Biol Med* **14**, 254–270 (2017).
58. Sheikh, M. S. & Huang, Y. Death Receptor Activation Complexes: It Takes Two to Activate TNF Receptor 1. *Cell Cycle* **2**, 549–551 (2003).
59. Brotons, C., Cuende, J. I., Fernández Pardo, J., Plana, N. & Moral, I. [Ischaemic heart disease]. *Clin Investig Arterioscler* **25**, 203–210 (2013).
60. de Micheli, A. & Chávez, E. Consideraciones sobre el daño miocárdico por isquemia y reperfusión. *Archivos de cardiología de México* **73**, 284–290 (2003).
61. Mauro, M. D. D. *et al.* Polyphenolic Fraction from Olive Mill Wastewater: Scale-Up and in Vitro Studies for Ophthalmic Nutraceutical Applications. *Antioxidants (Basel)* **8**, E462 (2019).
62. Gong, P. *et al.* Cobalt induces heme oxygenase-1 expression by a hypoxia-inducible factor-independent mechanism in Chinese hamster ovary cells: regulation by Nrf2 and MafG transcription factors. *J Biol Chem* **276**, 27018–27025 (2001).
63. Yao, C. & Narumiya, S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. *Br J Pharmacol* **176**, 337–354 (2019).
64. Guzik, T. J., Korbout, R. & Adamek-Guzik, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* **54**, 469–487 (2003).
65. de Torre-Minguela, C., Mesa Del Castillo, P. & Pelegrín, P. The NLRP3 and Pyrin Inflammasomes: Implications in the Pathophysiology of Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol* **8**, 43 (2017).
66. Campbell, N. K., Fitzgerald, H. K. & Dunne, A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. *Nat Rev Immunol* **21**, 411–425 (2021).
67. Dogru, M., Kojima, T., Simsek, C. & Tsubota, K. Potential Role of Oxidative Stress in Ocular Surface Inflammation and Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **59**, DES163–DES168 (2018).
68. M, C. *et al.* Dry eye disease as an inflammatory disorder. *Ocular immunology and inflammation* **18**, (2010).