



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE  
DERIVADOS PROTEICOS DE *Salvia hispanica* L.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**IVAN HUMBERTO CHAN ZAPATA**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**

**2018**





**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-INFLAMATORIO  
DE DERIVADOS PROTEICOS DE *Salvia hispanica* L.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**IVAN HUMBERTO CHAN ZAPATA**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**

**2018**





**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

Mérida, Yuc., 17 de julio de 2018

Oficio Num.: PICQB/283/2018

**Asunto:** Autorización de digitalización

La tesis "Evaluación del efecto anti-inflamatorio de derivados proteicos de *Salvia hispanica* L." presentada por el Q.F.B. Ivan Humberto Chan Zapata, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la impresión de los ejemplares correspondientes.

**Directores de la tesis**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maira Rubi Segura Campos

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Víctor Ermo Arana Argáez

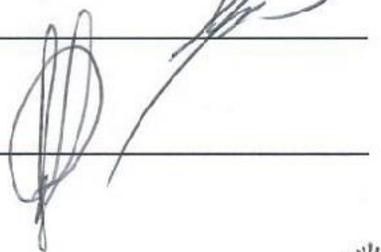
**Sinodales:**

Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocóm

Dra. Yelda Leal Herrera

Dr. Julio Cesar Lara Riegos

**Firmas**

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**  
**"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"**

  
**DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS**  
**COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL**  
**EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**



POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS QUÍMICAS  
Y BIOQUÍMICAS

c.c. Archivo  
MRSC

Página Web: <http://www.picqb.uady.mx>  
E-mail: [picqb@correo.uady.mx](mailto:picqb@correo.uady.mx)



## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Maira Rubí Segura Campos**, por aceptarme en su grupo de trabajo y permitirme conocer otras metodologías y un ambiente de trabajo distinto e interesante, así como brindarme todo su apoyo, consejos y conocimientos para sacar adelante este proyecto y otros productos muy valiosos; siempre estaré muy agradecido.

Al **Dr. Víctor Ermilo Arana Argáez**, por darme una nueva oportunidad para seguir colaborando en su grupo de trabajo y sobre todo, por seguirme apoyando a lo largo de toda mi formación con su valioso tiempo, su vasta experiencia y su invaluable amistad; también estoy muy agradecido y fue, es y siempre será un gusto trabajar a su lado, esperando de todo corazón no sea la última vez.

A los miembros del honorable sínodo y suplentes, **Dra. Leydi Maribel Carrillo Cocom**, **Dra. Yelda Aurora Leal Herrera**, **Dr. Julio César Lara Riegos** y **Dr. Guillermo Valencia Pacheco**, por prestar parte de su invaluable tiempo y sus valiosos conocimientos en las revisiones de este trabajo, sin su ayuda este logro no hubiese sido posible.

Al **Dr. Julio César Torres Romero**, por todos sus acertados consejos en la elaboración de los artículos, tanto de contenido científico como en los aspectos del idioma inglés.

A la **M. en I.S. Karla Guadalupe Fernández Martín**, por apoyarme con sus conocimientos desde la tesis de licenciatura, compartir muchos logros académicos y otorgarme toda su valiosa y sincera amistad.

A la **M. en I.S. Tahali Mendoza Oliveros**, por darme la oportunidad de ser su amigo y compartir muchos buenos momentos en el laboratorio, al igual que todo su apoyo y experiencia en algunos aspectos de la última parte de esta tesis.

Al **Q.F.B. Antonio Euán Canto**, por darme toda su amistad a lo largo de muchos años y estar siempre para apoyarme con todo lo académico y las cosas cotidianas de la vida.

Al **M. en C. Ulil Us Medina**, **M. en I.A. Roberto Laviada Castillo** y **Dra. Mayday Salazar Vega**, por apoyarme con toda su experiencia en la primera parte de esta tesis, sin su ayuda este trabajo no hubiese iniciado, por lo que estoy muy agradecido.

A los demás compañeros, **Amalia Avila, Emanuel Ceballos, Jorge Xool, Alejandra Domínguez, Stephanie Vázquez, Loremy Cauich, Lilibeth Manzanilla, Juan Quintal, Jonatan Uuh, Suleidy Torres, Mario Briceño, Andrea Bellavista, Iván Sosa, José Mendoza, Imelda Rosales y Gemma Gutiérrez**, por brindarme su valiosa amistad e incomparable apoyo en los momentos necesarios.

A mi **madre, padre y hermana**, por confiar en mí siempre y apoyarme en cada uno de los momentos buenos, malos y peores.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ciencias de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química y en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de la Dra. Maira Rubí Segura Campos y el Dr. Víctor Ermilo Arana Argáez y formó parte del Proyecto “Proyecto i-LINK0923” financiado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España, con el apoyo de una beca concedida por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



## RESUMEN

Los padecimientos inflamatorios han constituido un problema de salud pública, por lo que una amplia gama de fármacos han sido utilizados para su tratamiento; sin embargo, éstos presentan efectos secundarios y elevado costo. Diversos grupos de investigación han buscado en las plantas, moléculas con potencial actividad anti-inflamatoria que pudieran presentar ventajas clínicas y económicas a los fármacos existentes. Entre estas plantas se encuentra *Salvia hispanica* L. (chía), un alimento funcional cuyas semillas han demostrado ser fuente de proteínas y péptidos. Entonces, se estableció como objetivo de este estudio evaluar el efecto anti-inflamatorio del hidrolizado proteico y fracciones peptídicas aisladas de las semillas de *S. hispanica* L. Las semillas fueron procesadas para la elaboración del aislado proteico. Se realizó la obtención del hidrolizado proteico (dos lotes) y se determinó el grado de hidrólisis. Las fracciones peptídicas fueron obtenidas por ultrafiltración y las concentraciones de proteínas de los derivados proteicos se determinaron siguiendo el método de Bradford. El efecto citotóxico de los derivados de un lote fue evaluado por el ensayo con MTT en macrófagos aislados de ratones BALB/c, mientras que la actividad *in vitro* fue determinada mediante la cuantificación de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ . Se seleccionó la fracción de 1-3 kDa para su evaluación *in vivo* en modelos de edema plantar inducido por carragenina, edema auricular inducido por TPA e hipersensibilidad retardada inducida por DNFB. El aislado presentó un 90.29% de proteínas en base seca. Los lotes 1 y 2 del hidrolizado exhibieron un grado de hidrólisis de 38.31 y 39.83%, respectivamente. El contenido proteico de los derivados de ambos lotes no mostró diferencias significativas. Los derivados no mostraron efectos tóxicos significativos en la viabilidad celular, pero ocasionaron una disminución en los niveles de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , así como un aumento en la producción de IL-10. Asimismo, la fracción de 1-3 kDa demostró efectos inhibitorios significativos en el edema auricular y el edema del ensayo de hipersensibilidad retardada. En conclusión, los derivados proteicos de *S. hispanica* L. presentaron efectos anti-inflamatorios, aportando información sobre el papel de esta planta en los mecanismos del proceso inflamatorio.



## ABSTRACT

The inflammatory diseases have been a public health problem and a wide range of drugs have been used for their treatment. However, these drugs have demonstrate side effects and high cost. Research groups have searched the plants for molecules with potential anti-inflammatory activity that could present clinical and economic advantages to existing drugs. *Salvia hispanica* L. (chia) is one of these plants, which are a functional food whose seeds have been shown to contain a high amount of proteins and peptides. Then, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of protein hydrolysate and peptide fractions isolated from *S. hispanica* L. seeds. The seeds were processed for the preparation of a protein isolate. Later, the protein hydrolysate was obtained (two batches) and the degree of hydrolysis was determined. An ultrafiltration step was carried out to obtain the peptide fractions and the protein concentrations of protein derivatives were determined by the Bradford method. The cytotoxic effect of protein derivatives from one batch was evaluated by the MTT method on macrophages isolated from BALB/c mice. Likewise, the *in vitro* anti-inflammatory activity was determined by quantifying the NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  levels. The 1-3 kDa fraction was choose for evaluation on *in vivo* models of carrageenan-induced paw edema, TPA-induced ear edema and DNFB-induced delayed hypersensitivity. The protein isolate presented 90.29% of proteins in dry basis. The batches from protein hydrolysate exhibited a hydrolysis degree of 38.31 (batch 1) and 39.83% (batch 2). The protein concentrations of the batches from the protein derivatives did not show significant differences. The protein derivatives did not show significant toxic effects on cell viability, but they caused a decrease in the NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  production, while an increase in the release of IL-10 was observed. The 1-3 kDa fraction showed significant inhibitory effects on ear edema and induced edema of delayed hypersensitivity test. In conclusion, the protein derivatives isolated from *S. hispanica* L. presented anti-inflammatory effects, providing information on the role of this plant in the mechanisms of the inflammatory process.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
Enfermedades inflamatorias.....	3
Manifestaciones clínicas.....	4
Respuesta inmune innata en el proceso inflamatorio .....	5
Respuesta inmune adaptativa en el proceso inflamatorio.....	10
Resolución del proceso inflamatorio.....	11
Tratamientos para enfermedades inflamatorias.....	13
Alimentos funcionales .....	14
Péptidos con actividad anti-inflamatoria .....	15
<i>Salvia hispanica</i> L. ....	16
Composición química de <i>Salvia hispanica</i> L.....	17
Usos de <i>Salvia hispanica</i> L. ....	18
Actividad biológica de <i>Salvia hispanica</i> L. ....	19
Efecto anti-inflamatorio de <i>Salvia hispanica</i> L. ....	20
JUSTIFICACIÓN .....	23
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES .....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares.....	25
HIPÓTESIS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
Diagrama metodológico .....	29
Material vegetal.....	30
Obtención de la harina desgomada y desgrasada.....	30
Obtención del aislado proteico .....	31
Determinación de humedad .....	31
Determinación de proteínas .....	32
Obtención del hidrolizado proteico .....	33
Determinación del grado de hidrólisis.....	33
Obtención de las fracciones peptídicas .....	34
Cuantificación de proteínas .....	35
Animales de experimentación .....	35
Ensayos <i>in vitro</i> .....	36
<i>Obtención de macrófagos peritoneales murinos</i> .....	36
<i>Conteo celular</i> .....	36
<i>Cultivo, tratamiento y activación de macrófagos</i> .....	37
<i>Viabilidad celular</i> .....	38
<i>Producción de óxido nítrico</i> .....	39
<i>Producción de peróxido de hidrógeno</i> .....	40

<i>Producción de citocinas</i> .....	41
<i>Screening de las muestras evaluadas</i> .....	42
Ensayos <i>in vivo</i> .....	42
<i>Inducción de edema plantar</i> .....	42
<i>Inducción de edema auricular</i> .....	43
<i>Hipersensibilidad retardada</i> .....	44
Análisis estadístico.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
Rendimiento en la obtención del aislado proteico.....	47
Contenido de humedad y proteínas del aislado proteico .....	47
Grado de hidrólisis .....	48
Cuantificación de proteínas de los derivados proteicos .....	50
Efecto de los derivados proteicos sobre la viabilidad celular .....	51
Efecto de los derivados proteicos sobre la producción de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno .....	52
Efecto de los derivados proteicos sobre la producción de citocinas .....	57
Efecto de la fracción de 1-3 kDa sobre el edema plantar.....	64
Efecto de la fracción de 1-3 kDa sobre el edema auricular.....	66
Efecto de la fracción de 1-3 kDa sobre la prueba de hipersensibilidad retardada.....	68
CONCLUSIONES .....	71
REFERENCIAS.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Inicio del proceso inflamatorio .....	6
<b>Figura 2.</b> Migración leucocitaria .....	8
<b>Figura 3.</b> Generación de ERO y ERN .....	10
<b>Figura 4.</b> Diferenciación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	11
<b>Figura 5.</b> Principales citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias .....	12
<b>Figura 6.</b> Diagrama experimental del protocolo realizado en la evaluación de las propiedades anti-inflamatorias de los derivados proteicos de <i>Salvia hispanica</i> L. ....	29
<b>Figura 7.</b> Semillas de <i>S. hispanica</i> L.....	30
<b>Figura 8.</b> Reacciones en la determinación del contenido de proteínas .....	32
<b>Figura 9.</b> Reacción en la determinación de grupos aminos libres .....	34
<b>Figura 10.</b> Reacción en la formación de cristales de formazán.....	38
<b>Figura 11.</b> Reacción en la determinación de NO .....	39
<b>Figura 12.</b> Reacción en la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
<b>Figura 13.</b> Complejo formado en el ELISA sándwich .....	41
<b>Figura 14.</b> Efecto de los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. sobre la viabilidad de macrófagos .....	51
<b>Figura 15.</b> Efecto de los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. sobre la producción de NO por macrófagos.....	53
<b>Figura 16.</b> Efecto de los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. sobre la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por macrófagos .....	55
<b>Figura 17.</b> Efecto de los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. sobre la producción de IL-1 $\beta$ por macrófagos .....	57
<b>Figura 18.</b> Efecto de los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. sobre la producción de IL-6 por macrófagos .....	59
<b>Figura 19.</b> Efecto de los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. sobre la producción de TNF- $\alpha$ por macrófagos .....	60
<b>Figura 20.</b> Efecto de los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. sobre la producción de IL-10 por macrófagos .....	62
<b>Figura 21.</b> Efecto de la fracción de 1-3 kDa de <i>S. hispanica</i> L. sobre el edema plantar inducido por carragenina.....	64
<b>Figura 22.</b> Efecto de la fracción de 1-3 kDa de <i>S. hispanica</i> L. sobre el edema auricular inducido por TPA.....	67
<b>Figura 23.</b> Efecto de la fracción de 1-3 kDa de <i>S. hispanica</i> L. sobre la prueba de hipersensibilidad retardada inducida por DNFB.....	69



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Hidrolizados proteicos y péptidos derivados de alimentos vegetales con actividad anti-inflamatoria.....	16
<b>Cuadro 2.</b> Moléculas bioactivas identificadas en las semillas de <i>S. hispanica</i> L. ....	18
<b>Cuadro 3.</b> Cantidad de humedad y proteínas presentes en el aislado proteico de <i>S. hispanica</i> L. ....	47
<b>Cuadro 4.</b> Valores de grado de hidrólisis calculados para cada lote de hidrolizado proteico de <i>S. hispanica</i> L. ....	49
<b>Cuadro 5.</b> Concentración de proteínas presente en los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. ....	50
<b>Cuadro 6.</b> Valores obtenidos en la determinación de la viabilidad de macrófagos tratados con los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. ....	52
<b>Cuadro 7.</b> Valores obtenidos en la determinación de la producción de NO por macrófagos tratados con los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. ....	54
<b>Cuadro 8.</b> Valores obtenidos en la determinación de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por macrófagos tratados con los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. ....	55
<b>Cuadro 9.</b> Valores obtenidos en la determinación de la producción de IL-1 $\beta$ por macrófagos tratados con los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. ....	58
<b>Cuadro 10.</b> Valores obtenidos en la determinación de la producción de IL-6 por macrófagos tratados con los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. ....	59
<b>Cuadro 11.</b> Valores obtenidos en la determinación de la producción de TNF- $\alpha$ por macrófagos tratados con los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. ....	61
<b>Cuadro 12.</b> Valores obtenidos en la determinación de la producción de IL-10 por macrófagos tratados con los derivados proteicos de <i>S. hispanica</i> L. ....	62
<b>Cuadro 13.</b> Valores obtenidos en la evaluación del efecto de la fracción de 1-3 kDa de <i>S. hispanica</i> L. sobre el edema plantar inducido por carragenina.....	65
<b>Cuadro 14.</b> Valores obtenidos en la evaluación del efecto de la fracción de 1-3 kDa de <i>S. hispanica</i> L. sobre el edema auricular inducido por TPA.....	67
<b>Cuadro 15.</b> Valores obtenidos en la evaluación del efecto de la fracción de 1-3 kDa de <i>S. hispanica</i> L. sobre la prueba de hipersensibilidad retardada inducida por DNFB ....	69



## INTRODUCCIÓN

La inflamación ha sido descrita como la respuesta hacia una infección o lesión. El proceso inflamatorio es universalmente asociado con diabetes, cáncer, trastornos cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos.<sup>1</sup>

Las primeras señales de inflamación denotan un infiltrado de monocitos y células dendríticas hacia el tejido. También se puede observar una acumulación de neutrófilos.<sup>2</sup> Estas últimas células lideran la respuesta inflamatoria mediante la destrucción y remoción de partículas extrañas y tejido dañado, para que posteriormente los macrófagos se encarguen de continuar con el proceso de fagocitosis.<sup>3</sup> Asimismo, los macrófagos secretan citocinas que están relacionadas con las reacciones inflamatorias, ya sea estimulando a otras células para la producción de otras citocinas u ocasionando dolor patológico.<sup>4</sup>

Diversos fármacos son utilizados para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias. Sin embargo, los fármacos anti-inflamatorios usados clínicamente presentan una multitud de efectos secundarios y un elevado costo. Es por ello que la comunidad científica ha encontrado en los productos naturales una fuente de agentes anti-inflamatorios eficaces, ya que se han identificado muchos compuestos bioactivos que posteriormente han sido utilizados para el desarrollo de medicamentos.<sup>5</sup>

Entre estas plantas se encuentra *Salvia hispanica* L. (conocida como chía), de la cual se han identificado varios metabolitos, entre los que se encuentran miricetina, quercetina, kaempferol y ácidos grasos, los cuales son responsables de sus propiedades antidiabéticas, antioxidantes, antihipertensivas, entre otras.<sup>6</sup> Además, se ha reportado que las semillas de *S. hispanica* L. representan un recurso importante de proteínas y péptidos con actividad biológica.<sup>7</sup> Por otra parte, los péptidos bioactivos derivados de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias han demostrado un gran potencial para su aplicación contra numerosas enfermedades, incluyendo padecimientos de carácter inflamatorio.<sup>8</sup> Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado estudios que reporten el efecto anti-inflamatorio de hidrolizados proteicos o péptidos derivados de las semillas de *S. hispanica* L. Es por ello que se planteó como objetivo de este estudio evaluar la actividad anti-inflamatoria del hidrolizado proteico y de las fracciones peptídicas aisladas de las semillas de *S. hispanica* L., tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.



## ANTECEDENTES

### Enfermedades inflamatorias

La inflamación es una respuesta protectora, desencadenada por el organismo, que tiene como finalidad eliminar estímulos perjudiciales y fungir como un proceso de reparación del tejido dañado.<sup>9</sup> La respuesta inflamatoria típica está conformada por inductores, sensores, mediadores y tejidos diana. Los inductores son moléculas asociadas a patógenos o daño tisular e inician la respuesta inflamatoria.<sup>10</sup> Éstos son detectados por sensores como los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados en macrófagos y células dendríticas.<sup>9</sup> Dichos sensores inducen la producción de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas y prostaglandinas, que actúan sobre diversos tejidos diana para optimizar su adaptación a las condiciones perjudiciales causadas por los inductores.<sup>10</sup> Entonces, el proceso inflamatorio puede ser provocado por una variedad de estímulos nocivos y debido a esto, las respuestas inflamatorias son muy variadas en cuanto a los tipos de células y mediadores moleculares implicados.<sup>1</sup>

Un factor importante a tomar en consideración es el curso temporal de la inflamación. La inflamación aguda abarca las respuestas inmediatas y tempranas hacia un agente nocivo y se resuelve de manera rápida.<sup>11</sup> Estas repuestas involucran mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa, donde intervienen una amplia variedad de citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos secretados por las células tisulares residentes.<sup>12</sup> Una vez que el antígeno es removido, la respuesta inflamatoria termina y el tejido reparado recupera su funcionalidad. En cambio, la inflamación crónica se produce cuando el estímulo prejudicial persiste, asociándose a una variedad de trastornos cardiovasculares, metabólicos y neurodegenerativos.<sup>11</sup> Por ejemplo, la artritis reumatoide se caracteriza por un estado inflamatorio sistémico que abarca varios órganos, como articulaciones, piel, ojos, pulmones y vasos sanguíneos, donde diversas poblaciones de leucocitos, citocinas y quimiocinas se infiltran en los tejidos reumáticos e incrementan la lesión.<sup>13</sup> De igual manera, se ha descrito que las células dendríticas y los linfocitos T colaboran en la iniciación y progresión de la esclerosis múltiple, la cual es definida como un trastorno crónico inflamatorio de origen autoinmune propio del sistema nervioso central.<sup>14</sup> Por otro lado, se ha demostrado la participación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, linfocitos B, células dendríticas y macrófagos en el proceso inflamatorio de la diabetes mellitus tipo 1, padecimiento de carácter autoinmune que se origina como consecuencia de la destrucción de las células  $\beta$  productoras de insulina en los islotes de Langerhans dentro del páncreas.<sup>15</sup>

Entonces, la respuesta inflamatoria es una pieza clave en la gran mayoría de las enfermedades humanas como consecuencia de los mediadores producidos por los leucocitos o por las células tisulares residentes.<sup>16</sup> También hay que considerar la magnitud de la respuesta inflamatoria. Una débil respuesta podría resultar en una respuesta inmune insuficiente y deficiente, mientras que la inflamación excesiva conduce a otro tipo de complicaciones que, si no se controlan, ocasionan alguna patología grave como las descritas anteriormente.<sup>11</sup>

### **Manifestaciones clínicas**

En la antigüedad, se describieron cinco signos del proceso inflamatorio, los cuales consistían en vasodilatación periférica, fiebre, dolor, aumento de la permeabilidad capilar y fallo de los órganos, mejor conocidos como rubor, calor, dolor, tumor y disfunción, respectivamente.<sup>17</sup> Hoy en día se sabe que la mayoría de los signos y síntomas de la inflamación son causados por cambios en la vasculatura local del tejido afectado. El músculo liso de las arteriolas se relaja y ocasiona vasodilatación, eritema y calor; además, se da un aumento en la presión hidrostática de los vasos sanguíneos, lo que en combinación con los cambios en la permeabilidad de la barrera endotelial vascular, conduce la salida de fluido rico en proteínas hacia el tejido, provocando un edema.<sup>18</sup>

Es importante señalar que la inflamación y sus secuelas varían dependiendo del sitio. La inflamación normalmente comienza en un área localizada, pero se puede propagar rápidamente hacia la periferia dependiendo de la severidad de la infección o herida. Esta respuesta sistémica es activada por citocinas pro-inflamatorias, las cuales son liberadas en la circulación periférica provocando daño tisular.<sup>11</sup> Estudios recientes demostraron que las citocinas están implicadas no sólo en la iniciación, sino también en la persistencia del dolor patológico mediante la activación directa de neuronas sensoriales. La interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) puede producir hiperalgesia después de lesiones en microglía y astrocitos en el sistema nervioso central, la interleucina 6 (IL-6) contribuye al desarrollo de dolor neuropático seguido de lesiones en nervios periféricos y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) participa ocasionando hiperalgesia inflamatoria y neuropática.<sup>4</sup>

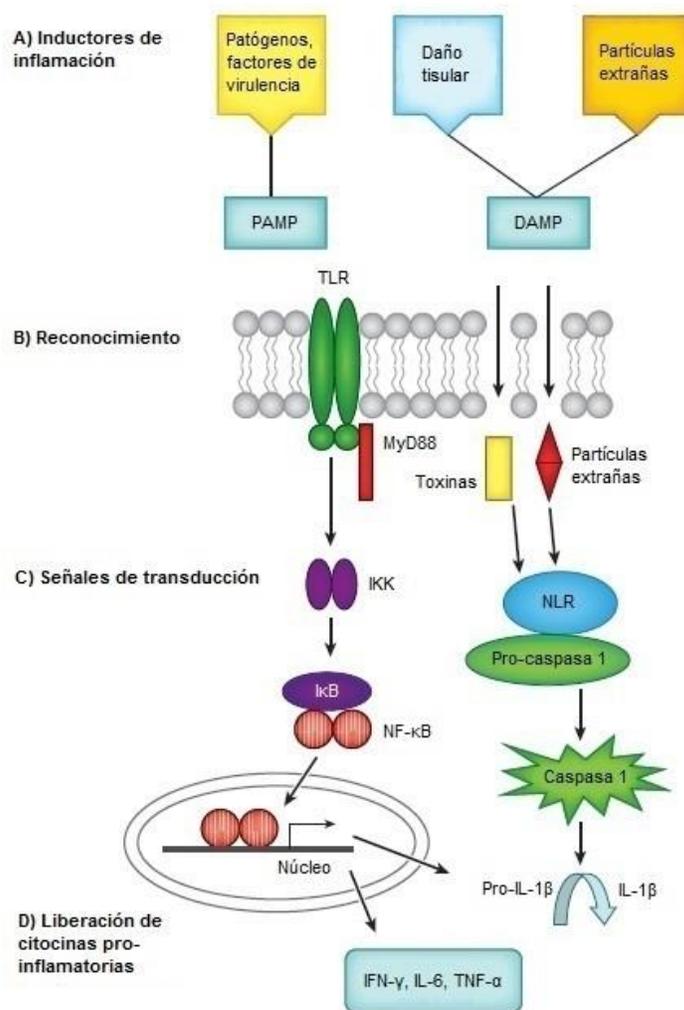
Otros ejemplos de perturbaciones en la fisiología del huésped que pueden ser causadas por las respuestas inmunitarias originadas durante el proceso inflamatorio son alteraciones en el metabolismo y en el equilibrio de electrolitos. Otros cambios provocados como consecuencia de los mecanismos de defensa del sistema inmune abarcan modificaciones en la presión arterial, deterioro de las funciones de absorción del epitelio intestinal y respiratorio, hipoxia tisular local y remodelación excesiva de la matriz extracelular.<sup>19</sup>

## Respuesta inmune innata en el proceso inflamatorio

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa del hospedero en la inflamación y desempeña un papel importante en el reconocimiento temprano de diversos patógenos. La respuesta innata es regulada principalmente por células presentadoras de antígenos (CPA), como macrófagos y células dendríticas, que se encargan de la detección de estructuras conservadas denominadas patrones.<sup>20</sup> Por consiguiente, el proceso inflamatorio inicia con el reconocimiento del agente infeccioso o de daño por las CPA (Figura 1). Esto es llevado a cabo mediante la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los cuales son moléculas expresadas por dichos patógenos y que son esenciales para su supervivencia. Las alarminas o patrones moleculares asociados a daño (DAMP) son moléculas endógenas que denotan daño tisular o necrosis y también dan inicio al proceso inflamatorio.<sup>11</sup> Estas estructuras son reconocidas a través de un número limitado de PRR codificados de línea germinal, como los receptores tipo toll (TLR) unidos a membrana y los receptores con dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (receptores tipo NOD o NLR) intracelulares.<sup>20</sup>

Una vez que el reconocimiento del ligando ocurre, los TLR activan una vía de transducción de señales dependiente del gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), que implica la fosforilación de la proteína inhibidora de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) por la quinasa de I $\kappa$ B (IKK). El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) es liberado de I $\kappa$ B y translocado hacia el núcleo, donde la transcripción de genes induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).<sup>11</sup> La actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B se termina mediante inhibidores de la familia I $\kappa$ B, donde I $\kappa$ B $\alpha$  es el más estudiado. I $\kappa$ B $\alpha$  recién sintetizado entra en el núcleo, remueve el NF- $\kappa$ B del ácido desoxirribonucleico (ADN) y lo traslada al citosol. En la inflamación aguda, estos bucles de retroalimentación negativa generalmente resultan en la desactivación completa del NF- $\kappa$ B. Sin embargo, en la inflamación crónica, la presencia persistente de los estímulos que activan al NF- $\kappa$ B supera los circuitos de retroalimentación negativa, permitiendo una elevada actividad del NF- $\kappa$ B.<sup>21</sup>

Por otra parte, los NLR intracelulares responden a un número creciente de DAMP, lo que proporciona una vía próxima para detectar la exposición a toxinas o contaminantes del medio ambiente. Estos NLR intracelulares activan a la caspasa 1, que tiene como función convertir a ciertas citocinas (principalmente IL-1 $\beta$ ) hacia sus formas activas, con la finalidad de provocar daño inflamatorio después de ser liberadas de la célula.<sup>11</sup>



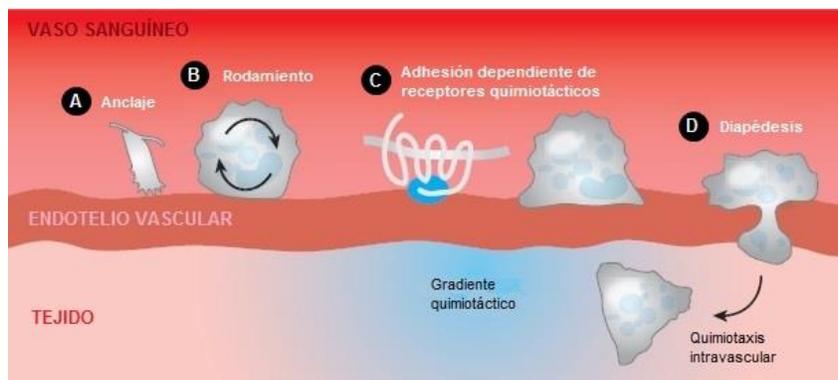
**Figura 1.** Inicio del proceso inflamatorio. A) Inducción de la inflamación por los estímulos antigénicos. B) Reconocimiento de los agentes perjudiciales por los receptores de membrana e intracelulares. C) Activación de las vías de señalización correspondientes. D) Producción y liberación de citocinas pro-inflamatorias (modificada de la referencia 11).

Las citocinas son potentes moléculas de señalización de bajo peso molecular que median la comunicación intercelular y son producidas por varios tipos celulares. Estas proteínas participan en una amplia variedad de procesos, como la proliferación celular, el metabolismo, quimiotaxis y reparación tisular. Además, tienen como función primordial la regulación de la inflamación local y sistémica. La IL-1β es producida principalmente por monocitos y macrófagos, así como también por células dendríticas y linfocitos B; estimula la producción de proteínas de fase aguda, potencia la expansión y diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, aumenta la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales e incrementa la expresión de genes que codifican para

sí misma. La IL-6 es una citocina sintetizada por macrófagos con funciones pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, ya que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas y el reclutamiento de monocitos al sitio de inflamación, pero también regula la inhibición de la apoptosis y la regeneración de células epiteliales.<sup>22</sup> El IFN- $\gamma$  es la citocina más importante de la inmunidad mediada por células y es producido por linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1; entre sus funciones se encuentran la de estimular la presentación antigénica y las funciones efectoras de los macrófagos, incluyendo la adherencia y fagocitosis, lo que permite la acumulación de estas células activadas en el sitio de inflamación. Por último, el TNF- $\alpha$  es secretado por macrófagos, neutrófilos y linfocitos; es considerado un potente activador de neutrófilos y un mediador del proceso de adherencia, quimiotaxis y degranulación, al igual que un inductor en la expresión de moléculas de adhesión por células endoteliales, permitiendo el ingreso de leucocitos al sitio de lesión.<sup>23</sup>

En respuesta a su activación por las citocinas o la estimulación de sus receptores por los antígenos, los leucocitos secretan diversas quimiocinas.<sup>24</sup> Las quimiocinas son polipéptidos con estructura homóloga cuya función consiste en estimular el movimiento de las células.<sup>25</sup> Quimiocinas como el ligando de quimiocina CC2 (CCL2 o MCP1) y el ligando de quimiocina CC7 (CCL7 o MCP3) estimulan el reclutamiento de monocitos.<sup>24</sup> Otras quimiocinas, como el ligando de quimiocina CXC1 (CXCL1) y el ligando de quimiocina CXC2 (CXCL2) funcionan como potentes factores quimiotácticos de neutrófilos.<sup>26</sup>

Estos factores quimiotácticos regulan el mecanismo de tráfico leucocitario, resumido en cuatro pasos: anclaje, rodamiento, adhesión y diapédesis (Figura 2). Varios receptores quimiotácticos controlan el posicionamiento de los leucocitos en todo el organismo a través de los procesos de adhesión y extravasación desde la sangre hacia los tejidos, así como su localización intratisular mediante quimiotaxis. Integrinas y selectinas concentradas en las puntas de las microvellosidades regulan los procesos de anclaje y rodamiento, permitiendo la detección de los diversos factores quimiotácticos que se encuentran localizados en el endotelio vascular. Como consecuencia, los receptores quimiotácticos activados y unidos a sus respectivos ligandos ocasionan un despliegue de integrinas que conduce rápidamente a la adhesión y fuerte fijación de los leucocitos en el endotelio.<sup>27</sup> Las moléculas generadas en el tejido extravascular o secretadas por las células vasculares penetran la pared venular y crean un gradiente quimiotáctico, lo que ocasiona el paso de los leucocitos desde el lumen hacia el tejido extravascular.<sup>28</sup> Finalmente, la secuencia del reclutamiento de las células fagocíticas está compuesta por una extravasación inicial de neutrófilos, seguido de una subsecuente migración de monocitos hacia el sitio de inflamación.<sup>29</sup>



**Figura 2.** Migración leucocitaria. A) Anclaje. B) Rodamiento. C) Adhesión. D) Diapédesis (modificada de la referencia 27).

En consecuencia, la ruptura de las paredes venulares no sólo proporciona un proceso regulado que facilita la migración de los leucocitos hacia tejidos inflamados, sino que también actúa como un proceso fundamental para que estas células infiltradas puedan desencadenar una respuesta inmune efectiva.<sup>28</sup>

Una vez en el sitio de lesión, los neutrófilos se encargan de fagocitar materiales extraños y patógenos, eliminándolos por medio de la secreción de enzimas proteolíticas, para luego entrar en apoptosis. Por otro lado, los monocitos se diferencian en macrófagos, células que poseen una vida media más prolongada que los neutrófilos y que colaboran con el proceso de fagocitosis.<sup>3</sup>

El proceso de fagocitosis es un mecanismo clave en la respuesta inmune innata y requiere de dos componentes cruciales, que son la internalización del antígeno y la maduración del fagosoma. Las células fagocíticas pueden internalizar partículas de gran tamaño (mayores o iguales a 0.5  $\mu\text{m}$ ), incluyendo microorganismos. Después de su internalización, los antígenos son atrapados en una vacuola o fagosoma derivada de la membrana plasmática.<sup>30</sup> Posteriormente, el fagosoma experimenta una serie de etapas de maduración (denominadas temprana y tardía), recibiendo material nuevo de endosomas tempranos y tardíos, al igual que eliminando moléculas que ya no son requeridas a través de la separación y reciclaje de endosomas. Finalmente, el fagolisosoma es formado cuando el fagosoma tardío se fusiona con lisosomas que contienen hidrolasas (nucleasas, lipasas, glucosidasas, proteasas y catepsinas) y un pH altamente ácido (4.5), componentes que favorecen la degradación de los antígenos.<sup>31</sup>

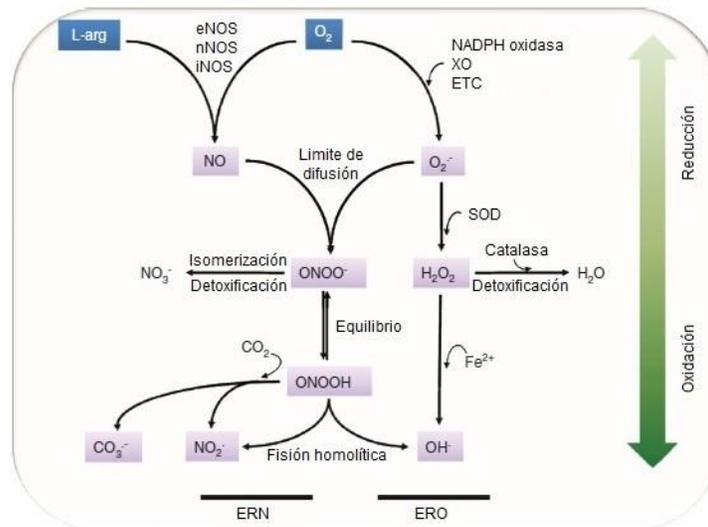
Los productos granulares comprenden el mecanismo de destrucción no oxidativo de los neutrófilos.<sup>32</sup> Hay dos tipos de gránulos, los primarios (azurófilos o peroxidasa positivo) y los secundarios (específicos o peroxidasa negativo), que a su vez pueden ser subdivididos en gránulos azurófilos ricos o pobres en defensinas, al

igual que gránulos peroxidasa negativo con una alta concentración de lactoferrina, gelatinasa y otras sustancias.<sup>33</sup> Estas proteasas son liberadas en el fagolisosoma una vez llevada a cabo la fusión de los gránulos con el fagosoma. Durante la maduración del fagolisosoma, el pH intravesicular es alterado y es desplazado hacia un nivel alcalino (8.5-9.5), proporcionando el medio ideal para la adecuada activación de las enzimas y una óptima función microbicida. Por lo tanto, la presencia y la adecuada función de los gránulos intracelulares son cruciales en los mecanismos de eliminación. Sin embargo, la activación descontrolada de los neutrófilos en un ambiente inflamatorio puede permitir daños colaterales en el tejido debido a la excesiva degranulación extracelular y la liberación de proteasas por parte de estas células.<sup>32</sup>

Los macrófagos también contribuyen con la destrucción de patógenos y partículas extrañas a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales desempeñan un papel importante en la progresión de la inflamación (Figura 3). Primero se genera el anión superóxido ( $O_2^-$ ) por la reducción de un electrón del oxígeno molecular ( $O_2$ ) a través de catálisis mediada por la dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADPH) oxidasa, la xantina oxidasa (XO) o durante las reacciones de la cadena transportadora de electrones (ETC) mitocondrial. El  $O_2^-$  experimenta una dismutación hacia peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) por medio de la superóxido dismutasa (SOD) y luego,  $Fe^{2+}$  reacciona con el  $H_2O_2$  para formar el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). El  $H_2O_2$  también es transformado a una molécula de agua ( $H_2O$ ) por acción de la enzima catalasa.<sup>34</sup>

Por otro lado, los macrófagos pueden producir especies reactivas de nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico (NO), el cual es formado a partir de L-arginina y  $O_2$  mediante la actividad de la sintasa endotelial del NO (eNOS), sintasa neuronal del NO (nNOS) o sintasa inducible del NO (iNOS). El NO y el  $O_2^-$  reaccionan rápidamente para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que puede ser convertido a nitrato ( $NO_3^-$ ) por isomerización; incluso, el  $ONOO^-$  puede formar radicales secundarios a través de la fisión homolítica (ruptura de un enlace covalente) o la reacción con dióxido de carbono ( $CO_2$ ) de su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), dando lugar a los radicales carbonato ( $CO_3^-$ ), dióxido de nitrógeno ( $NO_2\cdot$ ) u  $OH\cdot$ .<sup>35</sup>

El efecto dañino que causan las ERO y ERN sobre el cuerpo humano se denomina estrés oxidativo. Éste ocurre cuando hay un fallo en los procesos homeostáticos y la generación de especies reactivas empieza a exceder la capacidad defensiva del organismo, ocasionando lesiones celulares y daño tisular.<sup>36</sup>



**Figura 3.** Generación de ERO y ERN (modificada de la referencia 35).

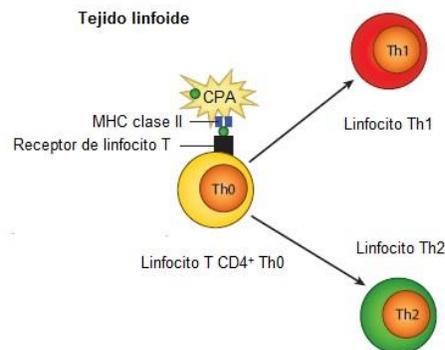
### Respuesta inmune adaptativa en el proceso inflamatorio

El sistema inmune adaptativo también colabora en la inflamación, teniendo como funciones la eliminación de patógenos en la última fase de un proceso infeccioso y la generación de memoria inmunológica. Además, la respuesta adaptativa se caracteriza por su especificidad, la cual es atribuida al desarrollo de receptores específicos (para antígenos en particular) presentes en los linfocitos T. Actualmente, varios estudios han demostrado que el sistema inmune innato está involucrado en la activación de los mecanismos de la inmunidad adaptativa, por lo que ambas respuestas están altamente relacionadas.<sup>20</sup>

Los componentes principales del sistema inmune adaptativo son las CPA y los linfocitos, siendo estos últimos los mediadores de la inmunidad celular (linfocitos T) y humoral (linfocitos B).<sup>25</sup> Las células fagocíticas, encargadas de la internalización y destrucción de microorganismos, también pueden presentar los péptidos de antígenos microbianos en su superficie, promoviendo el proceso de presentación antigénica.<sup>30</sup> El procesamiento de los antígenos exógenos es llevado a cabo por la acción de proteasas contenidas dentro del fagosoma. Asimismo, esta vacuola contiene moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II, que se unen a los fragmentos de antígenos y se translocan a la superficie celular, donde son reconocidos por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Por el contrario, los antígenos endógenos (antígenos propios de las CPA, como productos ribosomales) son degradados por el proteasoma en pequeños péptidos y luego son desplazados hacia el retículo endoplásmico, donde se unen a moléculas del MHC clase I para posteriormente ser presentados en la superficie celular a linfocitos T CD8<sup>+</sup>.<sup>37</sup>

Después del reconocimiento del antígeno, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se diferencian a linfocitos T citotóxicos, células que expresan gránulos tóxicos (perforinas y granzimas) y que eliminan células infectadas. Las perforinas favorecen la entrada de las granzimas al citoplasma de la célula diana, para que estas últimas desencadenen diversas vías de apoptosis.<sup>25</sup>

Por otra parte, cuando los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th0 (células sin previa exposición a un antígeno) son estimulados mediante los mecanismos de presentación antigénica, se diferencian hacia varios tipos de linfocitos efectores, como los Th1 y Th2 (Figura 4). Los linfocitos Th1 intervienen en los procesos de la inmunidad celular, la respuesta inflamatoria contra parásitos intracelulares y las reacciones de hipersensibilidad retardada mediante la secreción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e interleucina 2 (IL-2).<sup>11</sup> De igual forma, la IL-2 está involucrada en la activación de linfocitos natural killer (NK), linfocitos B, linfocitos T CD8<sup>+</sup> y macrófagos.<sup>23</sup> Por último, los linfocitos Th2 son células importantes en la inmunidad humoral, la protección contra infecciones por helmintos y las respuestas alérgicas. Estas células liberan citocinas de carácter anti-inflamatorio tales como la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 5 (IL-5).<sup>11</sup> La IL-4 induce la diferenciación hacia linfocitos Th2, así como la expresión de moléculas del MHC clase II en linfocitos B y el cambio de isotipo de inmunoglobulina M (IgM) a inmunoglobulina E (IgE); también inhibe la diferenciación de monocitos a macrófagos y la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . La IL-5 estimula la producción de eosinófilos, fungen como un factor quimiotáctico para estas células y potencia su actividad citotóxica.<sup>23</sup>



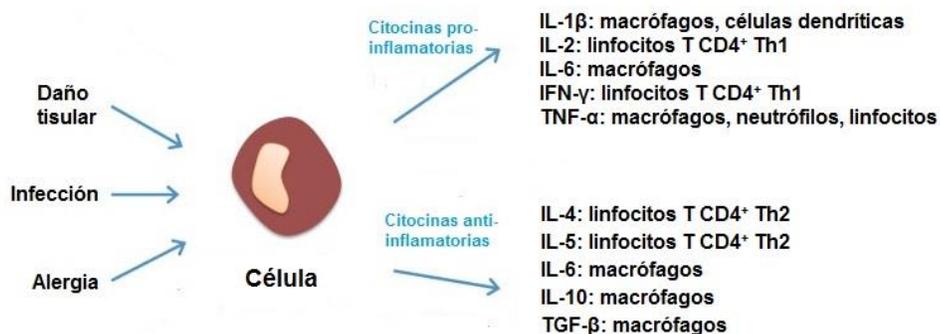
**Figura 4.** Diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (modificada de la referencia 11).

### Resolución del proceso inflamatorio

La última fase del proceso inflamatorio es la resolución, la cual es crítica para limitar los daños colaterales al organismo.<sup>11</sup> Esta etapa comprende la terminación de las vías de señalización pro-inflamatorias y el aclaramiento de las células participantes, culminando con la restauración de las funciones normales del tejido.<sup>12</sup>

Un componente importante del proceso de resolución es asegurar que los neutrófilos reclutados sean eliminados del sitio de lesión. Dichos procesos de eliminación impiden la progresiva activación y liberación de los mecanismos de defensa de los neutrófilos y su consecuente daño tisular. Entre los procesos que conducen a la eliminación de los neutrófilos se encuentran la apoptosis y eferocitosis (fagocitosis de neutrófilos apoptóticos) local, al igual que la remoción de estas células a través de los vasos linfáticos llegando hasta la superficie luminal del órgano inflamado.<sup>38</sup> Posteriormente, los macrófagos aparecen en esta etapa con la finalidad de remover restos celulares y neutrófilos apoptóticos, por lo que se dice que son los eliminadores clave del proceso inflamatorio.<sup>39</sup>

Los macrófagos producen mediadores lipídicos involucrados en el proceso de resolución. Durante esta fase, la vía del ácido araquidónico da lugar a la biosíntesis de resolvinas y protectinas derivadas de ácidos grasos  $\omega$ -3 insaturados, moléculas con características anti-inflamatorias.<sup>40</sup> Estos productos actúan induciendo la apoptosis de los neutrófilos y potenciando la fagocitosis de los macrófagos, contribuyendo con la depuración adicional de las células apoptóticas.<sup>38</sup> Los macrófagos también producen citocinas anti-inflamatorias como la interleucina 10 (IL-10), la cual tiene como funciones principales la supresión de la activación de los macrófagos y la producción de citocinas pro-inflamatorias (Figura 5). Esta citocina también inhibe la producción de IFN- $\gamma$ , al igual que la expresión del MHC clase II y los mecanismos de presentación antigénica. Asimismo, la IL-10 reduce la actividad microbicida de macrófagos activados y disminuye la capacidad de respuesta de dichas células al IFN- $\gamma$ .<sup>22</sup>



**Figura 5.** Principales citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (modificada de la referencia 40).

Además, los macrófagos representan un abundante depósito de otras citocinas, enzimas y factores de crecimiento implicados en el proceso de resolución, particularmente factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y colagenasa, los cuales activan queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales. Esto permite el

desarrollo de nuevo epitelio y la remodelación final del tejido, recuperando su estructura anatómica y sus funciones.<sup>3</sup>

### **Tratamientos para enfermedades inflamatorias**

La detección de factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B y marcadores pro-inflamatorios como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , han establecido una base molecular importante sobre el papel que tiene la inflamación en enfermedades crónicas. Esto ha marcado un nuevo camino en el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos que empleen compuestos sintéticos y naturales, los cuales eventualmente podrían disminuir la prevalencia de los mencionados padecimientos.<sup>41</sup>

Se han desarrollado diversas estrategias para prevenir y atenuar los efectos secundarios dañinos de las citocinas pro-inflamatorias, como los anticuerpos anticitocina que pueden inhibir la unión de las citocinas a sus receptores. También, ciertos receptores señuelo pueden unirse de forma similar a las citocinas y evitar que se adhieran a sus correspondientes receptores en la superficie celular.<sup>42</sup> Otro tratamiento en estudio es la administración terapéutica de mediadores lipídicos involucrados en el proceso de resolución, ya que hay evidencia de que los padecimientos inflamatorios crónicos pueden disminuir los niveles o el efecto de estas moléculas.<sup>43</sup>

Los glucocorticoides han sido ampliamente usados para tratar distintos trastornos de origen autoinmune, ya que entran a las células, se enlazan a receptores citoplasmáticos, se translocan al núcleo y son reconocidos por secuencias específicas del ADN. Como resultado, se efectúa la supresión de la activación del NF- $\kappa$ B y otros factores de transcripción, evitando la expresión de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias.<sup>44</sup>

Estudios han demostrado que células madre mesenquimales pueden ser aisladas, expandidas y utilizadas para una gran diversidad de aplicaciones terapéuticas, destacando el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Estas células se diferencian en células de linaje mesodérmico incluyendo hueso, grasa, cartílago, tendón y músculo. Además, contribuyen en la regulación de la hematopoyesis y la secreción de factores que ayudan en la cicatrización de heridas, evitando la apoptosis y estimulando la reparación celular endógena, así como también controlando ciertas reacciones inflamatorias.<sup>45</sup>

Recientemente, se ha demostrado que los productos naturales representan una gran diversidad estructural que no es vista comúnmente en compuestos sintéticos y diversos estudios han publicado la actividad anti-inflamatoria de dichos metabolitos a nivel de NO, NF- $\kappa$ B, citocinas, quimiocinas y otros factores. Es por ello que los productos naturales ofrecen una gran alternativa para el tratamiento de padecimientos de carácter inflamatorio.<sup>5</sup>

## **Alimentos funcionales**

Un alimento funcional es aquel que afecta de manera benéfica al organismo, ya sea mejorando el estado de salud y bienestar o reduciendo el riesgo hacia enfermedades específicas. Además, un alimento funcional siempre debe seguir siendo un alimento y debe demostrar sus efectos en cantidades que normalmente se pueden consumir en la alimentación.<sup>46</sup>

Los alimentos funcionales pueden clasificarse de la siguiente manera: alimentos fortificados con nutrimentos adicionales (denominados productos fortificados); alimentos con nutrimentos o componentes adicionales que no se encuentran normalmente en un alimento (productos enriquecidos), como los prebióticos y probióticos; alimentos a los cuales se les ha eliminado, reducido o reemplazado un componente perjudicial (productos alterados); alimentos cuyos componentes se han potenciado de forma natural (productos mejorados).<sup>47</sup>

Los beneficios a la salud de dichos alimentos se centran en diversas áreas, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, varios tipos de cáncer, diabetes e inflamación, así como una mejora en la respuesta inmune. En consecuencia, se han desarrollado tecnologías para el aislamiento, purificación, identificación y caracterización de compuestos biológicamente activos, los cuales son responsables de la eficacia de los alimentos funcionales en el tratamiento de las enfermedades. Asimismo, varios estudios han proporcionado datos importantes sobre los mecanismos químicos y fisiológicos de los efectos propios de los alimentos funcionales en la salud humana.<sup>48</sup>

Se ha comprobado que los numerosos productos naturales presentes en los alimentos funcionales pueden modular las respuestas inflamatorias, interactuando con una gran variedad de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios.<sup>49</sup> Entre estos compuestos se encuentran los carbohidratos, encontrados en forma de azúcares, oligosacáridos y almidones, de los cuales se ha reportado que la fructosa y la galactosa contribuyen en el desarrollo del sistema inmune. Por su parte, también se han estudiado los lípidos y ácidos grasos distribuidos en gran cantidad en varios tipos de aceites vegetales, como los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 que disminuyen la producción de citocinas pro-inflamatorias y ERO, demostrando efectos

inmunomoduladores y propiedades anti-inflamatorias.<sup>50</sup> Finalmente, se ha visto que las proteínas y péptidos derivados de alimentos de origen animal y vegetal poseen efectos antioxidantes y anti-inflamatorios.<sup>8</sup>

### **Péptidos con actividad anti-inflamatoria**

Por definición, los péptidos bioactivos son aquellos que provienen de proteínas alimentarias y que poseen propiedades farmacológicas importantes.<sup>8</sup> Durante el proceso digestivo, las proteínas de los alimentos se hidrolizan en una amplia variedad de péptidos. Algunos de estos péptidos comparten características estructurales con péptidos endógenos que actúan como hormonas, neurotransmisores o reguladores en el organismo. Por lo tanto, estos péptidos exógenos derivados de alimentos pueden interactuar con los mismos receptores para péptidos endógenos en el cuerpo humano y ejercer una actividad agonista o antagonista.<sup>51</sup>

En la actualidad, hay una tendencia creciente en el uso de péptidos derivados de proteínas de alimentos como agentes contra enfermedades crónicas y para el mantenimiento del bienestar general.<sup>8</sup> Investigaciones encargadas de evaluar los efectos biológicos de los péptidos han dirigido sus estudios de dos diferentes maneras: evaluando los hidrolizados de proteínas precursoras o los péptidos bioactivos.<sup>52</sup> La producción de hidrolizados proteicos comprende la liberación de fragmentos de péptidos con actividad biológica a través de la hidrólisis de los enlaces peptídicos, usualmente por la acción proteolítica de enzimas de origen endógeno (autólisis), exógeno (preparaciones de enzimas comerciales) o empleando procesos de fermentación (adición de cultivos iniciadores). Entonces, el hidrolizado proteico puede someterse a procesos de fraccionamiento para obtener una solución con ciertos péptidos o etapas de purificación adicionales para aislar a los péptidos individuales.<sup>53</sup> Estos péptidos permanecen inactivos dentro de la secuencia de una proteína, pero al ser liberados por hidrólisis enzimática, pueden ejercer diversas funciones biológicas, entre las que se encuentran su actividad inmunomoduladora, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatoria, entre otras.<sup>52</sup>

Dada la complejidad y diversidad de la respuesta inflamatoria, se han llevado a cabo investigaciones acerca del potencial anti-inflamatorio de péptidos bioactivos e hidrolizados proteicos derivados de alimentos vegetales mediante distintos modelos celulares y animales (Cuadro 1). Como resultado, estos productos han mostrado un potencial anti-inflamatorio importante en este tipo de ensayos.<sup>54</sup>

**Cuadro 1.** Hidrolizados proteicos y péptidos derivados de alimentos vegetales con actividad anti-inflamatoria (modificado de la referencia 54).

<b>Fuente</b>	<b>Preparación</b>	<b>Componente bioactivo</b>	<b>Modelo biológico</b>	<b>Efecto observado</b>
Proteínas de <i>Glycine max</i> L. (soya)	Fermentación	Chungkookjang	Células de cáncer de mama	Anti-inflamatorio, incremento de TGF- $\beta$
Proteínas de <i>G. max</i> L.	Hidrólisis enzimática	Lunasina	Macrófagos	Decremento de citocinas, inhibición de NF- $\kappa$ B
Proteínas de <i>G. max</i> L.	Hidrólisis enzimática	VPY	Ratones	Decremento de citocinas, disminución de estrés oxidativo
Gluten de <i>Zea mays</i> L. (maíz)	Hidrólisis enzimática	Diversos péptidos	Ratas	Reducción de lesiones inflamatorias
Gluten de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo)	Hidrólisis con proteasas de <i>Aspergillus oryzae</i> y fraccionamiento	Piro-glutamil leucina	Ratas	Anti-inflamatorio, desarrollo de enzimas hepáticas

Por lo tanto, los péptidos derivados de alimentos emergen como una alternativa para la prevención y tratamiento de padecimientos de carácter inflamatorio.<sup>8</sup> Un alimento funcional que también es una gran fuente de péptidos con actividad biológica es *Salvia hispanica* L., cuyas semillas otorgan numerosos beneficios a la salud.<sup>7</sup>

### ***Salvia hispanica* L.**

Es una planta herbácea perteneciente a la familia Lamiaceae, comúnmente conocida como chía y nativa del sur de México y del norte de Guatemala. Esta planta se ha cultivado de regiones tropicales a subtropicales y aunque es poco tolerable al frío, puede crecer en invernaderos distribuidos en algunas partes de Europa. Hoy en día es comercializada principalmente en México, Bolivia, Argentina, Ecuador y Guatemala.<sup>55</sup>

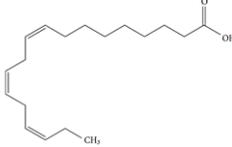
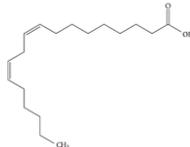
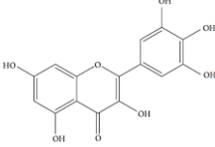
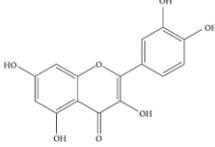
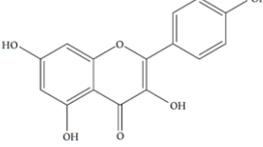
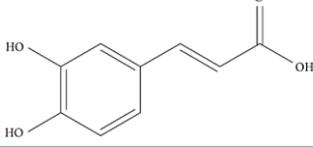
Esta planta florece durante los meses de verano y mide aproximadamente 1 m de altura, con hojas opuestas, pecioladas y dentadas que miden de 4-8 cm de largo y de 3-5 cm de ancho. Las flores crecen en racimos numerosos y están protegidas por brácteas pequeñas con puntas largas. La planta tiene tallos cuadrangulares, acanalados y velludos. Las semillas son pequeñas, ovaladas, aplanadas y varían en color, desde café oscuro hasta gris, con pequeñas manchas oscuras.<sup>56</sup>

### **Composición química de *Salvia hispanica* L.**

Las semillas de *S. hispanica* L. están constituidas por proteínas (15-25%), grasas (30-33%), carbohidratos (26-41%), fibra (18-30%) y cenizas (4-5%), así como vitaminas, minerales y materia seca (90-93%).<sup>57</sup> Particularmente, se encuentra fibra insoluble en una elevada proporción. Las semillas también contienen una cantidad relativamente balanceada de aminoácidos esenciales, especialmente metionina y cisteína, al igual que aminoácidos aromáticos.<sup>58</sup> Además poseen un alto contenido de calcio, fósforo y potasio, son una buena fuente de vitamina B, son libres de gluten y no albergan componentes tóxicos.<sup>56</sup>

De igual manera, diversas moléculas han sido identificadas en las semillas de *S. hispanica* L., incluyendo ácidos grasos esenciales y compuestos fenólicos (Cuadro 2). Adicionalmente, se ha demostrado que estos metabolitos contribuyen a la actividad biológica de las semillas de esta especie vegetal.<sup>57</sup>

**Cuadro 2.** Moléculas bioactivas identificadas en las semillas de *S. hispanica* L. (modificado de la referencia 57).

Moléculas bioactivas	Estructura
Ácido $\alpha$ -linoleico $\omega$ -3 (ácido graso poliinsaturado)	
Ácido linoleico $\omega$ -6 (ácido graso poliinsaturado)	
Miricetina (compuesto fenólico)	
Quercetina (compuesto fenólico)	
Kaempferol (compuesto fenólico)	
Ácido cafeico (compuesto fenólico)	

### Usos de *Salvia hispanica* L.

Las semillas de *S. hispanica* L. fueron consideradas como un alimento por civilizaciones aztecas y mayas, consumiéndose de manera frecuente. Recientemente, las semillas han sido utilizadas con fines medicinales para el tratamiento de malestares respiratorios, problemas renales, obstrucciones oculares e infecciones.<sup>59</sup> Asimismo, se ha reportado que consumir una porción de semillas es importante para la salud digestiva y cerebral, mantener fuertes los dientes y huesos, mejorar la salud cardiaca y ayudar en la pérdida de peso. *S. hispanica* L. también puede ser considerada como un alimento funcional porque además de contribuir a la alimentación humana, se ha comprobado que ayuda a prevenir enfermedades cardiovasculares, trastornos del sistema nervioso, diabetes y otros padecimientos.<sup>6</sup>

Actualmente, *S. hispanica* L. tiene diversos usos comerciales, ya que las semillas se han convertido en una de las principales fuentes de aceites con niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados. Por consiguiente, esta planta es ampliamente cultivada y comercializada por su alto contenido en ácido  $\alpha$ -linoleico  $\omega$ -3. El aceite extraído es incorporado en aceite de cocina, dulces o suplementos para consumo humano y las semillas también se consumen en ensaladas, bebidas, cereales y aderezos. Incluso, la industria alimentaria de todo el mundo, incluyendo Estados Unidos, Canadá, Chile, Australia y México, ha utilizado las semillas de *S. hispanica* L. o su aceite en productos tales como cereales para el desayuno, barras nutritivas, galletas, pasteles y yogurt.<sup>57</sup>

### **Actividad biológica de *Salvia hispanica* L.**

A pesar de que se ha descrito que las semillas de *S. hispanica* L. contienen un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, compuestos fenólicos y proteínas, pocos estudios han reportado las propiedades farmacológicas de esta planta.<sup>59</sup>

Coelho y Salas-Mellado<sup>60</sup> comprobaron que el extracto fenólico obtenido de las semillas de esta especie vegetal posee un elevado efecto antioxidante, concordando con lo reportado en la literatura acerca de la capacidad que tienen los compuestos polifenólicos de donar protones y atrapar radicales libres, en este caso el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

Da Silva Marineli y col.<sup>61</sup> también demostraron el potencial antioxidante del aceite aislado de las semillas de *S. hispanica* L. en un modelo de capacidad de absorción de radicales de O<sub>2</sub> (ORAC), atribuyendo el efecto biológico a los compuestos fenólicos presentes en el aceite y que le confieren estabilidad a pesar de su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados.

De igual forma, Capitani y col.<sup>62</sup> evaluaron la actividad antioxidante de fracciones ricas en fibra aisladas de harina previamente desgrasada por distintos métodos (por solvente y por presión), reportando una elevada actividad en la reducción del radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o ABTS por todas las fracciones obtenidas.

Orona-Tamayo y col.<sup>63</sup> aislaron diversas fracciones proteicas de las semillas de esta planta y obtuvieron como resultado que los péptidos de las fracciones de albúmina y globulina ejercen propiedades inhibitoras sobre la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que desempeña un papel importante en la regulación de la presión sanguínea.

El estudio llevado a cabo por Segura-Campos y col.<sup>7</sup> demostró que los hidrolizados proteicos producidos a distintos tiempos a partir de las semillas de *S. hispanica* L. también poseen actividad inhibidora sobre ACE, comprobando su efecto antihipertensivo. Incluso, probaron la capacidad inhibidora sobre ACE de crema de zanahoria y pan blanco suplementados con los diferentes hidrolizados proteicos derivados de las semillas, observando un efecto inhibidor por parte de ambos productos.

Por otra parte, Woldemariam y Van Winkle<sup>64</sup> reportaron que el extracto acuoso de esta especie vegetal posee propiedades antidiabéticas, lo cual fue observado mediante un incremento en la captación de glucosa usando un modelo con levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*.

Espada y col.<sup>65</sup> evaluaron la actividad antitumoral del aceite rico en ácidos grasos  $\omega$ -3 aislado de las semillas de esta planta sobre el crecimiento y formación de metástasis de adenocarcinoma de glándula mamaria inducido en ratones, mostrando una disminución en el peso del tumor y el número de metástasis.

El trabajo realizado por Fernandez y col.<sup>66</sup> demostró que la administración de las semillas y del aceite de *S. hispanica* L. a ratas no elevan los niveles séricos de IgE, la cual está relacionada con procesos alérgicos.

Por último, Gayathiri y col.<sup>67</sup> determinaron el efecto inmunomodulador del extracto hexánico de las semillas y observaron un aumento significativo en la fagocitosis de levaduras de *Candida albicans* por neutrófilos, incremento que podría deberse a la presencia de ácidos grasos, saponinas, terpenos y otros metabolitos.

### **Efecto anti-inflamatorio de *Salvia hispanica* L.**

El estudio llevado a cabo por Vidyasabbani y col.<sup>68</sup> evaluó el efecto de la administración de semillas de *S. hispanica* L. en ratas con edema plantar inducido por histamina, demostrando una inhibición dependiente de la dosis.

Ferreira y col.<sup>69</sup> mostraron que el tratamiento con semillas de esta especie vegetal en ratas con dislipidemia y resistencia a la insulina ocasiona un decremento en los niveles plasmáticos de IL-6 y TNF- $\alpha$ .

Finalmente, Jiménez-Rojas y col.<sup>70</sup> administraron un residuo rico en ácidos grasos obtenido de la cosecha de semillas de *S. hispanica* L. (compuesto por remanentes de hojas, tallos y semillas) a conejos con inflamación aguda inducida y observaron un decremento en la expresión génica de TNF- $\alpha$ , así como un incremento en la expresión génica de IL-10.

No obstante, a pesar de que se han reportado varios estudios sobre la actividad biológica de aceites, compuestos fenólicos o hidrolizados proteicos obtenidos de las semillas de *S. hispanica* L., no se han realizado estudios que determinen la actividad anti-inflamatoria de derivados proteicos aislados de esta planta, como hidrolizados o péptidos. Por lo tanto, se estableció como objetivo del presente trabajo evaluar el efecto anti-inflamatorio de derivados proteicos (hidrolizado proteico y fracciones peptídicas) obtenidos de *S. hispanica* L., de manera *in vitro* sobre las funciones de macrófagos (producción de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ ) e *in vivo* en modelos de inflamación, con la finalidad de contribuir al conocimiento que se tiene sobre la actividad biológica de esta planta, aportar información sobre el papel que tienen los alimentos funcionales en el proceso inflamatorio y elucidar el mecanismo anti-inflamatorio que siguen los péptidos contenidos en las semillas, sentando una base para que futuras investigaciones puedan desarrollar un posible tratamiento empleando estas moléculas.



## JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades inflamatorias constituyen un problema de salud pública a nivel mundial. Las diversas células, citocinas y otros factores implicados desarrollan un mecanismo complejo y ocasionan síntomas difíciles de manejar en los pacientes. El tratamiento depende del padecimiento en cuestión, aunque suele ser muy largo y los fármacos empleados en la actualidad para tratar las enfermedades inflamatorias tienen un alto costo y conllevan efectos secundarios. Es por ello que diversos grupos de investigación se han dedicado a buscar alternativas para mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen estas enfermedades y han descubierto que las especies vegetales ofrecen una importante fuente de moléculas con actividad biológica.

En los últimos años se ha incrementado el interés por investigar los alimentos funcionales, puesto que se ha demostrado que su contenido de fibra, ácidos grasos, proteínas, polifenoles y otras moléculas aisladas de las partes de dichos alimentos (hojas, semillas, frutos, etc.) aportan diversos efectos biológicos que podrían ayudar en la promoción de la salud y disminuir el riesgo de enfermedades de diversa índole, entre las cuales se encuentran las que desarrollan un proceso de carácter inflamatorio.

Una planta considerada como un alimento funcional es *Salvia hispanica* L., ya que investigaciones recientes se han enfocado en estudiar las propiedades biológicas de las semillas de esta especie y se ha visto que los metabolitos que contiene le confieren diversos efectos importantes, ya sea de carácter antioxidante, antitumoral, antidiabético, entre otros. De igual manera, se han evaluado las proteínas y péptidos provenientes de las semillas, demostrando su actividad biológica.

Por lo anterior, se planteó como objetivo de este estudio evaluar el efecto anti-inflamatorio del hidrolizado proteico y fracciones peptídicas aisladas de las semillas de *S. hispanica* L. Esto se realiza mediante ensayos *in vitro* usando un modelo con macrófagos, células fagocíticas del sistema inmune innato y adaptativo que colaboran en el proceso inflamatorio. La respuesta inflamatoria es determinada a través de la medición de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ ), moléculas importantes en la inflamación originada por infecciones y daño tisular. También se presentan estudios *in vivo* para determinar la actividad anti-inflamatoria del derivado proteico con el mayor efecto en los ensayos previos, empleando modelos murinos de edema inducido por carragenina, edema inducido por TPA e hipersensibilidad retardada por DNFB. Por consiguiente, con estas pruebas se puede determinar el efecto anti-inflamatorio de los derivados proteicos, contribuyendo al conocimiento sobre la actividad biológica de las semillas de *S. hispanica* L. y agregando más información sobre el papel que desempeñan los alimentos funcionales en el tratamiento de padecimientos inflamatorios.



## OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES

### Objetivo general

Evaluar las propiedades anti-inflamatorias del hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas aisladas de las semillas de *Salvia hispanica* L.

### Objetivos particulares

Obtener el hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas de las semillas de *S. hispanica* L. mediante un sistema enzimático y un proceso de ultrafiltración.

Determinar el efecto *in vitro* del hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas de *S. hispanica* L. sobre la viabilidad de macrófagos peritoneales murinos.

Evaluar el efecto anti-inflamatorio *in vitro* del hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas de *S. hispanica* L. mediante la cuantificación de especies reactivas (NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10) producidas por macrófagos peritoneales murinos.

Evaluar el efecto anti-inflamatorio *in vivo* de un derivado proteico de *S. hispanica* L. en modelos murinos de edema plantar inducido por carragenina, edema auricular inducido por TPA e hipersensibilidad retardada inducida por DNFB.



## HIPÓTESIS

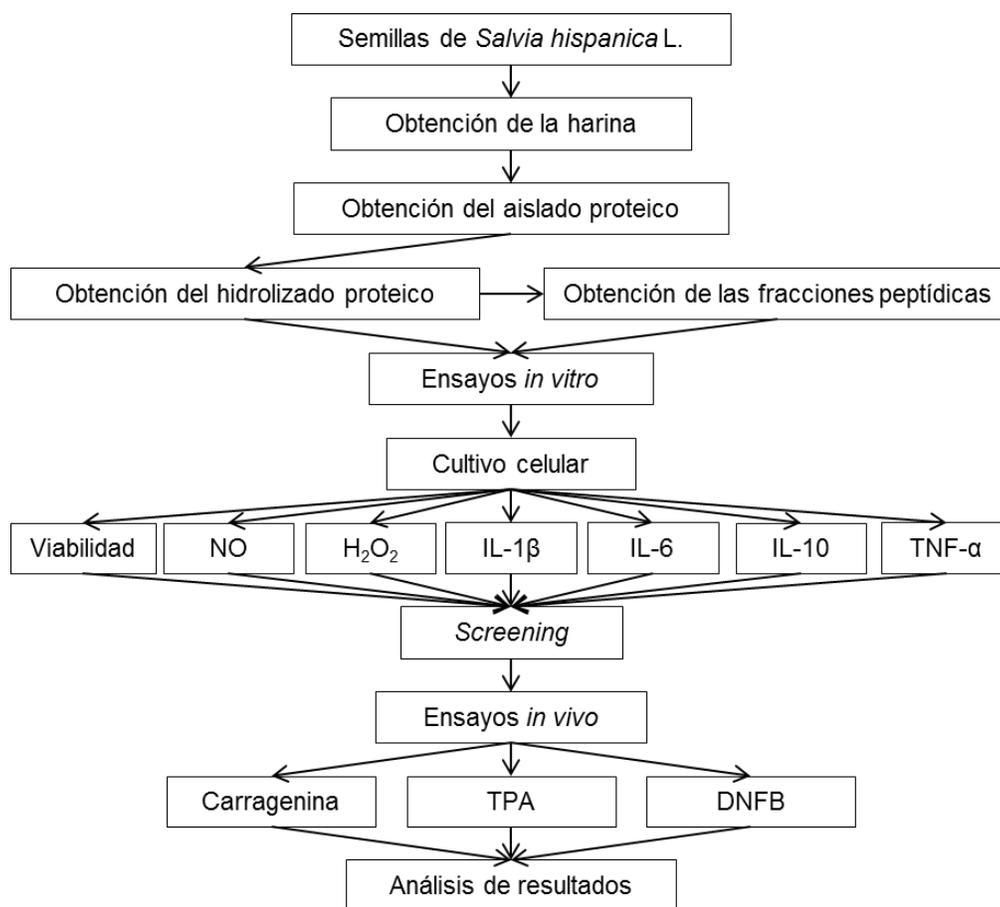
Los derivados proteicos aislados de las semillas de *Salvia hispanica* L. presentan propiedades anti-inflamatorias *in vitro* evidenciadas por un decremento en la producción de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  y un aumento en la producción de IL-10 por macrófagos peritoneales murinos, así como propiedades anti-inflamatorias *in vivo* evidenciadas por una disminución en el grosor del edema inducido en modelos murinos de edema plantar, edema auricular e hipersensibilidad retardada.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diagrama metodológico

El material vegetal fue procesado para la elaboración de la harina (Figura 6). Se obtuvo el aislado proteico y se determinó su contenido de humedad y proteínas. Se realizó la producción del hidrolizado proteico en dos lotes, se determinó el grado de hidrólisis y se llevó a cabo un proceso de ultrafiltración para la obtención de las fracciones peptídicas. Se determinaron las concentraciones de proteínas totales y se evaluó la actividad anti-inflamatoria *in vitro* del hidrolizado y las fracciones de un lote sobre macrófagos peritoneales aislados de ratones BALB/c, cuantificando los niveles de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y citocinas. Se realizó un *screening* y se seleccionó la fracción de 1-3 kDa, cuyo efecto anti-inflamatorio *in vivo* fue evaluado en modelos de edema inducido por carragenina, edema inducido por TPA e hipersensibilidad retardada.



**Figura 6.** Diagrama experimental del protocolo realizado en la evaluación de las propiedades anti-inflamatorias de los derivados proteicos de *Salvia hispanica* L.

## Material vegetal

Las semillas de *S. hispanica* L. (3 kg) fueron obtenidas en Diciembre de 2016 en el mercado local de la ciudad de Mérida, Yucatán, México (Figura 7). Las semillas fueron identificadas por el Biól. José Luis Tapia Muñoz y una muestra fue depositada en el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) para futuras referencias (número de identificación 69494).



**Figura 7.** Semillas de *S. hispanica* L.

## Obtención de la harina desgomada y desgrasada

Para la obtención de la harina desgomada y desgrasada se siguió el protocolo descrito por Salazar Vega,<sup>71</sup> con ligeras modificaciones. Primero, se removieron todas las impurezas y las semillas dañadas. Luego se procedió a extraer el mucílago de las semillas óptimas (proceso de desgomado) de *S. hispanica* L., para lo cual se preparó una suspensión con semillas enteras y agua destilada en una proporción 1:40 (p/v). Esta suspensión se mantuvo en agitación constante durante 90 min a temperatura ambiente, se filtró a vacío usando una tela no tejida y el líquido filtrado con el mucílago contenido fue desechado. Entonces, las semillas desgomadas se dejaron secar en una estufa Fisher Scientific<sup>®</sup> durante 24 h a 50°C, para luego ser trituradas y molidas en un molino Thomas-Wiley<sup>®</sup> modelo A, con la finalidad de obtener una harina gruesa.

Posteriormente, se realizó el proceso de desgrasado mediante el método Soxhlet para extraer los aceites contenidos en las semillas, empleando cartuchos con 30 g de harina gruesa cada uno, durante un total de 4 h a 70°C y usando hexano (High Purity<sup>®</sup>) como disolvente. La harina desgrasada se dejó secar en una campana de extracción durante 12 h para evaporar los residuos del disolvente. Después, se realizó otra molienda con una malla de 1 mm y la harina obtenida se sometió a otra etapa de desgrasado y secado. La harina resultante se molió con una malla de 0.5 mm y luego fue sometida a una etapa final de desgrasado y secado. Por último, la harina se dejó secar en la estufa Fisher Scientific<sup>®</sup> durante 24 h a 50°C y una vez transcurrido este

tiempo, fue tamizada a través de una malla de 140  $\mu\text{m}$  durante 20 min en un equipo Ro-Tap<sup>®</sup> modelo E, obteniendo una harina desgomada y desgrasada con una alta concentración de proteínas.

### **Obtención del aislado proteico**

La obtención del aislado proteico fue llevada a cabo por medio de la metodología reportada por Segura-Campos y col.,<sup>7</sup> con algunas modificaciones de acuerdo a las condiciones disponibles en el laboratorio. Se utilizó un método de solubilización alcalina y precipitación isoeléctrica de proteínas, para lo cual se mezclaron 5 g de la harina desgomada y desgrasada con 1 L de agua destilada, se ajustó a pH 12 con hidróxido de sodio (NaOH) 2 N y la solución obtenida se mantuvo en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez finalizado este tiempo, la solución fue centrifugada en un equipo Thermo Scientific<sup>®</sup> durante 1 h a 2,500 rpm y 10°C, para luego recuperar el sobrenadante y ajustar a pH 4 con ácido clorhídrico (HCl) 2 N. De nueva cuenta, la solución se mantuvo en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente fue centrifugada durante 1 h a 2,500 rpm y 10°C. El precipitado resultante fue recuperado, congelado y liofilizado en un equipo Labconco<sup>®</sup> a una presión de  $522 \times 10^{-3}$  bar y -47°C, obteniéndose el aislado proteico a utilizar en el proceso de hidrólisis enzimática. El porcentaje del rendimiento del proceso para la obtención del aislado proteico (%RA) por kilogramo de semilla fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 1. \%RA} = (P_{AP} / P_{HDD}) 100$$

Dónde:

$P_{AP}$  = Peso del aislado proteico liofilizado.

$P_{HDD}$  = Peso de la harina desgomada y desgrasada.

### **Determinación de humedad**

El contenido de humedad presente en el aislado proteico fue determinado por medio del método gravimétrico (925.09) descrito por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC).<sup>72</sup> La cantidad de humedad fue medida con base en la pérdida de peso de las muestras (0.5 g de muestra) después de una etapa de secado en la estufa Fisher Scientific<sup>®</sup> durante 2 h a 130°C. El porcentaje de humedad (%H) fue calculado con la siguiente fórmula:



luego  $H_3BO_3$  al 4% para la destilación. Las soluciones resultantes se titularon con HCl 0.1 N valorado y el porcentaje de proteínas (%P) en base húmeda y en base seca fue calculado empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 3. \%P} = \{[(V_{HCl}) (N_{HCl}) (6.25) (0.014)] / P_m\} 100$$

Dónde:

$V_{HCl}$  = Volumen de HCl consumido.

$N_{HCl}$  = Normalidad del HCl.

6.25 = Factor proteico.

0.014 = Peso molecular del nitrógeno dividido entre 1000.

$P_m$  = Peso exacto de la muestra.

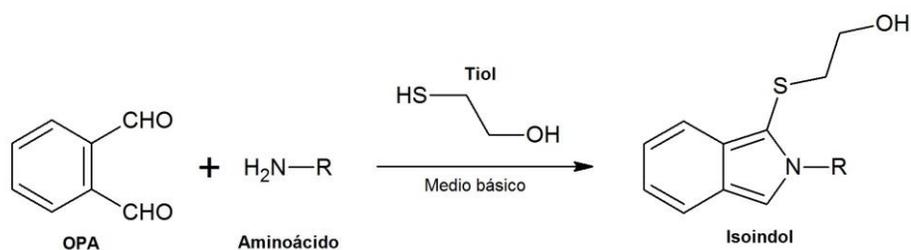
### Obtención del hidrolizado proteico

El hidrolizado proteico fue obtenido mediante el protocolo descrito por Herrera Chalé y col.,<sup>75</sup> modificado de acuerdo a las condiciones requeridas para este ensayo. Se utilizó un método enzimático de hidrólisis proteica para la escisión de los enlaces peptídicos, ya que permite la liberación de péptidos con actividad biológica y presenta una alta especificidad con el sustrato, lo cual ayuda al desarrollo de hidrolizados proteicos con características nutricionales y químicas más definidas.<sup>76</sup>

La obtención del hidrolizado proteico se realizó en dos lotes, empleando el sistema Pepsina<sup>®</sup>-Pancreatina<sup>®</sup> con base en las siguientes condiciones: concentración del sustrato (aislado proteico) de 4%, relación enzima-sustrato de 1:10 (p/v), así como las enzimas Pepsina<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>) y Pancreatina<sup>®</sup> (Sigma<sup>®</sup>), a pH 2 para la Pepsina<sup>®</sup> y pH 7.5 para la Pancreatina<sup>®</sup>. El tiempo final de reacción fue de 90 min y la hidrólisis se llevó a cabo de manera secuencial en agitación constante a una temperatura de 37°C, de tal forma que se ajustó a pH 2 con HCl 6 N, se adicionó la primera enzima y se dejó reaccionar durante 45 min; después, se ajustó a pH 7.5 con NaOH 6 N y se agregó la segunda proteasa durante los últimos 45 min. Posteriormente, la hidrólisis fue detenida inactivando las enzimas por calentamiento en un baño María VWR<sup>®</sup> a 80°C durante 20 min y luego se procedió a remover la porción insoluble mediante una etapa de centrifugado durante 20 min, 2,500 rpm y 4°C en un equipo Hermle<sup>®</sup> Z300K.

### Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) fue determinado empleando el método reportado por Wang y col.,<sup>77</sup> con pequeñas modificaciones, utilizando el O-ftaldialdehído (OPA). Este método se basa en la reacción específica entre el OPA con grupos aminos libres en presencia de un tiol, formando isoindoles sustituidos que pueden ser cuantificados por espectrofotometría (Figura 9).<sup>78</sup>



**Figura 9.** Reacción en la determinación de grupos aminos libres.

Para la determinación del grado de hidrólisis, se preparó una solución madre de cada lote del hidrolizado proteico a una concentración de 10 mg/mL en agua desionizada. Luego, se realizó una dilución 1:10 y seguidamente, una dilución 1:3 a partir de la dilución previa. Después, se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L de la dilución 1:3 y se mezclaron con 1.5 mL de reactivo OPA (Sigma<sup>®</sup>). Las soluciones resultantes fueron agitadas durante 5 s e incubadas durante 2 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific<sup>®</sup> y los equivalentes de aminos liberados por la hidrólisis enzimática fueron obtenidos utilizando una curva estándar (0-100  $\mu$ g/mL) de L-serina (Sigma<sup>®</sup>). Finalmente, el porcentaje del grado de hidrólisis (%GH) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 4. } \%GH = (N_{EPH} / N_{EPT}) 100$$

Dónde:

$N_{EPH}$  = Número de enlaces peptídicos hidrolizados.

$N_{EPT}$  = Número total de enlaces peptídicos por equivalente de proteínas.

### Obtención de las fracciones peptídicas

Para obtener las distintas fracciones peptídicas, cada uno de los lotes del hidrolizado proteico fueron sometidos a un proceso de fraccionamiento por ultrafiltración de acuerdo a la metodología descrita por He y col.<sup>79</sup> Para este fin, se utilizaron cuatro membranas de diferente corte de peso molecular: 1, 3, 5 y 10 kDa. El hidrolizado proteico correspondiente fue filtrado a través de cada una de las membranas, comenzando con la membrana de mayor porosidad (10 kDa), recolectando el material retenido en el contenedor del equipo y filtrando la solución no retenida en la membrana siguiente de menor tamaño (5 kDa); este procedimiento se realizó de manera sucesiva hasta llegar a la membrana de 1 kDa. Como resultado, se obtuvieron cinco fracciones peptídicas de diferente corte de peso molecular: fracción >10 kDa, fracción de 5-10 kDa, fracción de 3-5 kDa, fracción de 1-3 kDa y fracción <1 kDa.

## Cuantificación de proteínas

La cuantificación de los niveles de proteínas presentes en los derivados proteicos fue realizada siguiendo el protocolo reportado previamente por Redmile-Gordon y col.,<sup>80</sup> empleando el ensayo de Bradford modificado acorde a las condiciones disponibles en el laboratorio. Esta prueba se basa en la unión del reactivo de Bradford con las proteínas contenidas en las muestras, dando como resultado un complejo colorante-proteína cuantificable. Incluso, es un método bastante utilizado debido a su facilidad y practicidad, con un rango de linealidad aceptable.<sup>81</sup>

Primero, se preparó una solución madre del hidrolizado proteico y de las fracciones peptídicas de cada uno de los lotes, a una concentración de 5 mg/mL en agua destilada. Seguidamente, se adicionaron alícuotas de 4  $\mu$ L de cada solución a los pozos de una placa de reacción y se mezclaron con 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford 1X (5 mg de azul brillante de Coomassie G-250, 2.35 mL de etanol al 95% y 5 mL de ácido fosfórico al 85%, Sigma<sup>®</sup>). La placa fue incubada durante 30 min, a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Las absorbancias fueron medidas a 595 nm en un lector de placas Bio-Rad iMark<sup>®</sup> y los resultados de las concentraciones de proteínas fueron calculadas utilizando una curva estándar (0-2 mg/mL) de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma<sup>®</sup>). Finalmente, se seleccionó uno de los lotes y se evaluó su actividad anti-inflamatoria en distintos modelos. Las concentraciones a utilizar en cada uno de los ensayos *in vitro* e *in vivo* se calcularon con base en el contenido proteico obtenido para cada uno de los derivados seleccionados.

## Animales de experimentación

Para las pruebas de actividad biológica se emplearon ratones machos de la cepa BALB/c (Bagg's Albino) de 6-8 semanas de edad, proporcionados por el Bioterio del Centro de Investigaciones Regionales (CIR) "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Se utilizan ratones BALB/c puesto que son dóciles y poseen un genoma y sistema inmune similar al del ser humano. Asimismo, el manejo de animales de una misma cepa evita que se produzcan sesgos debido a diferencias genéticas, ya que todos los animales comparten el mismo genoma. De igual manera, el uso de una misma cepa facilita la comparación de los efectos producidos por los tratamientos.<sup>82</sup>

Los ratones fueron mantenidos en el Área de Manejo Experimental de Animales de la Facultad de Química de la UADY, en condiciones estandarizadas de acuerdo a lo indicado por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre las "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio": ambiente libre de patógenos y estrés, temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , foto-

periodos de luz-oscuridad de 12 h, así como alimento especial para roedores y agua purificada *ad libitum*.

## **Ensayos *in vitro***

### *Obtención de macrófagos peritoneales murinos*

En los ensayos se usaron 20 animales, los cuales fueron sacrificados siguiendo los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el procedimiento de dislocación cervical. Este método induce inconsciencia rápidamente en los animales experimentales y además no es necesario el uso de sustancias químicas, por lo que no se produce contaminación de los tejidos y no hay interferencia con los resultados de las pruebas.<sup>83</sup>

Para la obtención de los macrófagos peritoneales murinos se siguió el protocolo descrito previamente por Zhang y col.<sup>84</sup> En una campana de flujo laminar, se desinfectó el abdomen del ratón con alcohol etílico al 70% y posteriormente se administraron 10 mL de buffer de fosfatos salinos (PBS) estéril por vía intraperitoneal. Se dieron ligeros masajes al abdomen del animal y luego se extrajo el líquido peritoneal con ayuda de una jeringa. El líquido colectado fue vertido en un tubo cónico de 15 mL y fue centrifugado durante 10 min a 3,000 rpm y 4°C en un equipo Eppendorf® 5810R. Por último, se realizaron tres lavados con PBS durante 5 min, 2,000 rpm y 4°C, se desechó el sobrenadante y el botón celular obtenido se resuspendió en 3 mL de medio Eagle modificado de Dubelcco (DMEM, con alta glucosa, L-glutamina, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio y rojo de fenol, Gibco®) complementado al 10% con suero fetal bovino (SFB, Gibco®) y al 1% con penicilina-estreptomicina (Gibco®).

### *Conteo celular*

Para el conteo de los macrófagos peritoneales se empleó el método descrito por De Oliveira y col.,<sup>85</sup> utilizando como colorante el azul de tripano. Las células vivas poseen una membrana intacta que excluye ciertos colorantes como el azul de tripano, la eosina o el yoduro de propidio, mientras que las células muertas permiten el paso de dichos colorantes hacia al citoplasma. Por consiguiente, en la técnica con azul de tripano, el citoplasma se observa refringente en las células viables, mientras que el citoplasma de las células no viables se observa de color azul.<sup>86</sup>

Se tomó una alícuota de 10 µL del homogenizado celular y se realizó una dilución 1:1 con el azul de tripano al 0.04%. Luego, 10 µL de la solución fueron depositados en una cámara de Neubauer y se contaron las células viables en los

cuatro cuadrantes de las esquinas de la cámara. El número total de células viables por mL (NoCV/mL) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 5. NoCV/mL} = [(CV) (10,000) (FD)] / \text{NoQ}$$

Dónde:

CV = Número de células viables contadas.

10,000 = Factor de la cámara de Neubauer.

FD = Factor de dilución.

NoQ = Número de cuadrantes utilizados para el recuento.

Una vez realizado el conteo, se preparó una solución madre de 50,000 células/mL en medio DMEM complementado para el ensayo de viabilidad celular, mientras que para los ensayos de producción de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  se preparó una solución madre de 200,000 células/mL en medio DMEM complementado.

#### *Cultivo, tratamiento y activación de macrófagos*

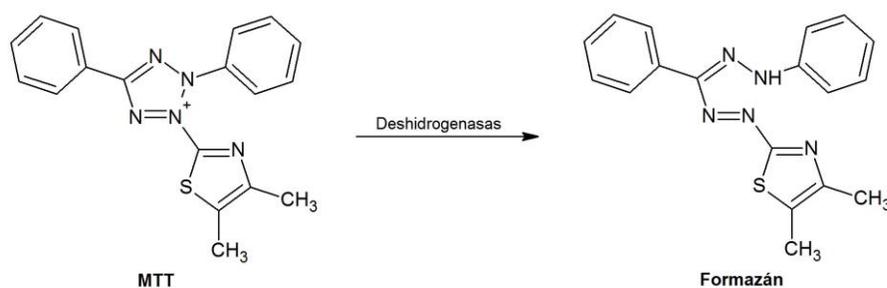
Para el cultivo, tratamiento y activación de los macrófagos se utilizó el protocolo descrito por Villa-de la Torre y col.,<sup>87</sup> con algunas modificaciones de acuerdo a los objetivos de este estudio. Para la prueba de viabilidad celular, se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L de la solución madre de 50,000 células/mL y se adicionaron a cada pozo de una placa estéril de 96 pozos, obteniéndose una concentración de 10,000 células/pozo. Para las pruebas de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , se adicionaron 500  $\mu$ L de la solución madre de 200,000 células/mL a cada pozo de una placa estéril de 24 pozos, teniendo una concentración de 100,000 células/pozo. Las placas con las células fueron mantenidas en una incubadora Thermo Scientific® durante 48 h, a una temperatura de 37°C y una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la completa adherencia de los macrófagos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al tratamiento de las células con los derivados proteicos. Para el ensayo de viabilidad celular, se desecharon los sobrenadantes de una placa con macrófagos cultivados previamente y se adicionaron 200  $\mu$ L del hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas (fracción >10 kDa, fracción de 5-10 kDa, fracción de 3-5 kDa, fracción de 1-3 kDa y fracción <1 kDa) a 1, 10, 100 y 200  $\mu$ g/mL en medio DMEM complementado. Para los ensayos de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y citocinas, se depositaron 500  $\mu$ L del hidrolizado proteico o las fracciones peptídicas a las concentraciones ya descritas. Nuevamente, las placas fueron incubadas durante 48 h, 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Finalmente, se realizó la activación de las células para determinar la producción de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ . Se descartaron cada uno de los sobrenadantes de una placa con macrófagos (100,000 células/pozo) tratados con los derivados proteicos y se depositaron 500  $\mu$ L de lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* (O111:B4, Sigma<sup>®</sup>) a una concentración de 1  $\mu$ g/mL en medio DMEM complementado. Las células fueron incubadas durante 48 h, 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### Viabilidad celular

En el ensayo de viabilidad celular se utilizó el método con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) descrito previamente por Mossman<sup>88</sup> y modificado de acuerdo a las condiciones necesarias para este estudio. El MTT es un compuesto amarillo soluble en agua, que se reduce por acción de las deshidrogenasas de células activas hacia cristales de formazán insolubles en agua (Figura 10). Los cristales de formazán son de color púrpura y pueden ser cuantificados por espectrofotometría después de ser solubilizados con dimetilsulfóxido (DMSO), obteniendo un porcentaje que es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.<sup>89</sup>



**Figura 10.** Reacción en la formación de cristales de formazán.

En primera instancia, se desecharon los sobrenadantes de una placa con macrófagos cultivados, sin activar y previamente tratados con el hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas de *S. hispanica* L. Luego se adicionaron 20  $\mu$ L de MTT (Sigma<sup>®</sup>) disuelto en PBS a una concentración de 5 mg/mL a cada pozo de la placa, completando hasta un volumen de 200  $\mu$ L con medio DMEM complementado. La placa se incubó durante 4 h, 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los sobrenadantes fueron eliminados y se adicionaron 100  $\mu$ L de DMSO al 100% (Sigma<sup>®</sup>). Finalmente, las absorbancias fueron medidas a 490 nm en el lector de placas. Como control negativo se utilizaron macrófagos sin tratamiento ni estímulo, mientras que como control positivo se usaron macrófagos con DMSO al 100%. El porcentaje de viabilidad celular (%V) fue calculado con la siguiente fórmula:

**Fórmula 6.**  $\%V = [Abs_{TXS} / Abs_{C(-)}] 100$

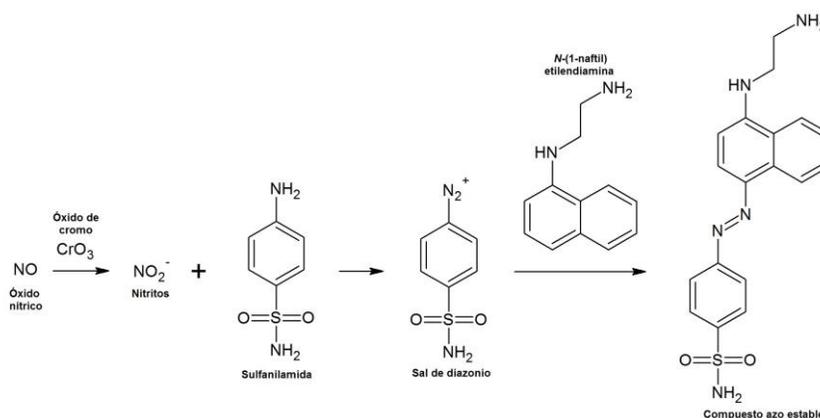
Dónde:

$Abs_{C(-)}$  = Media de las absorbancias obtenidas para el control negativo.

$Abs_{TXS}$  = Media de las absorbancias obtenidas para el control positivo o para cada uno de los tratamientos.

*Producción de óxido nítrico*

La producción de NO fue determinada siguiendo la metodología reportada por Alonso-Castro y col.<sup>90</sup> En esta reacción, el NO es oxidado por acción del óxido de cromo ( $CrO_3$ ), formando nitritos ( $NO_2^-$ ) como producto (Figura 11). Los  $NO_2^-$  reaccionan con sulfanilamida para formar sales de diazonio, que luego se acoplan a la *N*-(1-naftil) etilendiamina y dan como resultado compuestos azo estables, los cuales pueden ser cuantificados por espectrofotometría.<sup>91</sup>



**Figura 11.** Reacción en la determinación de NO.

Alícuotas de 50  $\mu$ L de los sobrenadantes de los pozos de una placa con macrófagos tratados y activados fueron colocados en una placa de reacción junto con 50  $\mu$ L del reactivo de Griess (Sigma®). La placa se incubó durante 10 min, a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Las absorbancias fueron medidas a 490 nm en el lector de placas y los resultados de las concentraciones de NO se obtuvieron utilizando una curva estándar (0-200  $\mu$ M) de nitrito de sodio ( $NaNO_2$ , Sigma®). Como control negativo se manejaron macrófagos sin tratamiento ni estímulo, mientras que como control positivo se emplearon macrófagos activados con LPS (1  $\mu$ g/mL). El porcentaje de inhibición de NO ( $\%INO$ ) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 7. } \%INO = \{1 - [NO_{Txs} / NO_{C(+)}]\} 100$$

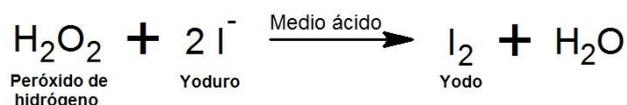
Dónde:

$NO_{C(+)}$  = Concentración de NO calculada para el control positivo.

$NO_{Txs}$  = Concentración de NO calculada para el control negativo o para cada uno de los tratamientos.

#### *Producción de peróxido de hidrógeno*

La producción de  $H_2O_2$  fue determinada usando el protocolo descrito por el fabricante (Hydrogen Peroxide Test Kit, Hanna Instruments®), donde el  $H_2O_2$  producido por las células reacciona lentamente con yoduro ( $I^-$ ) en una solución ácida, generándose una solución de color amarillo oscuro y obteniendo yodo ( $I_2$ ) como producto (Figura 12). Entonces, la cantidad de  $I_2$  generado es equivalente a la cantidad de  $H_2O_2$  en la muestra.<sup>92</sup>



**Figura 12.** Reacción en la producción de  $H_2O_2$ .

Alícuotas de 100  $\mu$ L de los sobrenadantes de los pozos de una placa con macrófagos tratados y activados fueron adicionados a una placa de reacción junto con 10  $\mu$ L de una solución de  $H_2SO_4$  al 15% (Hanna Instruments®). Inmediatamente, se añadieron 10  $\mu$ L de una solución de yoduro de potasio (Hanna Instruments®) a cada pozo y la placa fue incubada durante 15 min, a temperatura ambiente y en completa oscuridad. Las absorbancias fueron medidas a 490 nm en el lector de placas y los resultados de las concentraciones de  $H_2O_2$  se obtuvieron utilizando una curva estándar (0-50  $\mu$ M) de  $H_2O_2$  (Fermont®). Como control negativo se emplearon macrófagos sin tratamiento ni estímulo, mientras que como control positivo se usaron macrófagos activados con LPS (1  $\mu$ g/mL). El porcentaje de inhibición de  $H_2O_2$  ( $\%IH_2O_2$ ) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 8. } \%IH_2O_2 = \{1 - [H_2O_{2Txs} / H_2O_{2C(+)}]\} 100$$

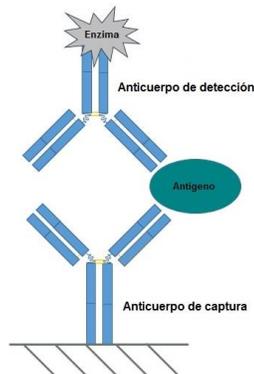
Dónde:

$H_2O_{2C(+)}$  = Concentración de  $H_2O_2$  calculada para el control positivo.

$H_2O_{2Txs}$  = Concentración de  $H_2O_2$  calculada para el control negativo o para cada uno de los tratamientos.

## Producción de citocinas

Para la medición de los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  producidas por los macrófagos peritoneales murinos se siguió la metodología descrita por el fabricante (Murine IL-1 $\beta$  ELISA Development Kit, Murine IL-6 ELISA Development Kit, Murine IL-10 ELISA Development Kit y Murine TNF- $\alpha$  ELISA Development Kit, PeproTech<sup>®</sup>), empleando como método el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich.<sup>87,93-96</sup> ELISA es una técnica inmunológica que permite la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos específicos en una muestra de interés. Existen varios tipos de ELISA y el ELISA sándwich es uno de ellos, en el cual la superficie del pocillo se prepara con una cantidad conocida de un anticuerpo primario (o de captura) específico para el antígeno deseado (Figura 13). Después se aplica la muestra que contiene el antígeno y luego se adiciona un anticuerpo secundario (o de detección) conjugado con una enzima (como fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, entre otras), formando un complejo anticuerpo primario-antígeno-anticuerpo secundario. Por último se añade un sustrato cromogénico y como resultado se produce un cambio de color que puede ser cuantificado.<sup>97</sup>



**Figura 13.** Complejo formado en el ELISA sándwich.

El anticuerpo de captura se empleó a una concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  para IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, mientras que para el TNF- $\alpha$  se utilizó a 1  $\mu\text{g/mL}$ . Se hicieron diluciones seriadas de una solución estándar de IL-1 $\beta$  (0-4,000 pg/mL), IL-6 (0-4,000 pg/mL), IL-10 (0-3,000 pg/mL) o TNF- $\alpha$  (0-2,000 pg/mL) en diluyente, las cuales fueron utilizadas para realizar la curva estándar. Se detectaron las citocinas presentes en los sobrenadantes de las placas con células por medio de un anticuerpo de detección a 0.5  $\mu\text{g/mL}$  para IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, mientras que para el TNF- $\alpha$  se usó un anticuerpo de detección a una concentración de 0.25  $\mu\text{g/mL}$ . Por último, se utilizó avidina peroxidasa y una solución de ABTS líquido como sustrato cromogénico para todas las pruebas. Las absorbancias fueron obtenidas a 490 nm en el lector de placas y los resultados de las concentraciones de citocinas se calcularon utilizando su respectiva curva estándar. Para las pruebas se emplearon macrófagos sin tratamiento ni estímulo como control

negativo, mientras que macrófagos activados con LPS (1 µg/mL) fueron utilizados como control positivo. El porcentaje de inhibición de cada citocina pro-inflamatoria (%ICIT), en este caso IL-1β, IL-6 y TNF-α, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 9. \%ICIT} = \{1 - [\text{CIT}_{\text{Txs}} / \text{CIT}_{\text{C(+)}}]\} 100$$

Dónde:

$\text{CIT}_{\text{C(+)}}$  = Concentración de IL-1β, IL-6 o TNF-α calculada para el control positivo.

$\text{CIT}_{\text{Txs}}$  = Concentración de IL-1β, IL-6 o TNF-α calculada para el control negativo o para cada uno de los tratamientos.

### *Screening de las muestras evaluadas*

Se analizaron los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* y se seleccionó el derivado proteico con la mayor actividad anti-inflamatoria, el cual fue la fracción de 1-3 kDa. Por lo tanto, se evaluó su efecto anti-inflamatorio en ensayos *in vivo* de edema plantar inducido por carragenina, edema auricular inducido por 12-*O*-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) e hipersensibilidad retardada inducida por 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenceno (DNFB).

### **Ensayos *in vivo***

#### *Inducción de edema plantar*

La inducción del edema plantar por carragenina se realizó empleando la metodología de Khajuria y col.,<sup>98</sup> con pequeñas modificaciones de acuerdo a lo requerido en este trabajo. La carragenina es un agente inductor de inflamación que ha sido ampliamente usado de manera experimental debido a que, al ser inyectada de manera local en la pata del animal de experimentación, produce una reacción inflamatoria discernible. Dicha reacción está regulada por la activación de mediadores como las prostaglandinas, en un mecanismo dependiente de ciclooxigenasas (COX).<sup>99</sup>

Para este ensayo se utilizaron un grupo experimental, un grupo control positivo y un grupo control negativo (cinco animales por grupo). Los ratones fueron pesados en una balanza digital y posteriormente, con ayuda de una cánula y por vía intragástrica, se administraron 100 µL de la fracción de 1-3 kDa a una concentración de 100 µg/kg en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% (PiSA<sup>®</sup>) al grupo experimental; al grupo control positivo se administraron 100 µL de indometacina (Sigma<sup>®</sup>) a 10 mg/kg en SSF al 0.9% (usada como fármaco de referencia) y al grupo control negativo solamente 100 µL de SSF al 0.9%. Las administraciones se realizaron una vez al día y durante cinco días. En el último día, se midió el grosor de ambas patas traseras de los

ratones con un micrómetro de precisión digital Truper® y se administraron los tratamientos correspondientes. Una hora después, se inyectaron 50 µL de una solución de carragenina (Sigma®) al 1% en SSF al 0.9% en el cojinete plantar de la pata trasera derecha de cada ratón. Finalmente, se midió el grosor de la pata derecha de cada animal 1, 2, 3, 4 y 5 h después de la aplicación de la inyección. La diferencia en el grosor de las patas traseras fue reportada como expresión del edema plantar. El porcentaje de inhibición del edema plantar (%IEP) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 10. \%IEP} = \{1 - [EP_{\text{TxS}} / EP_{\text{C(-)}}]\} 100$$

Dónde:

$EP_{\text{C(-)}}$  = Promedio del edema plantar calculado para el grupo control negativo.

$EP_{\text{TxS}}$  = Promedio del edema plantar calculado para el grupo control positivo o el grupo experimental.

#### *Inducción de edema auricular*

La inducción del edema auricular por TPA se llevó a cabo a través del protocolo reportado por Gómez y Gil,<sup>100</sup> con ligeras modificaciones. La inflamación local inducida por TPA tiene como característica el crecimiento en el grosor de la oreja del animal de experimentación. El engrosamiento se da debido al aumento de la permeabilidad vascular en respuesta a productos del ácido araquidónico, como las prostaglandinas, en un mecanismo mediado por COX.<sup>101</sup>

Para esta prueba se utilizaron un grupo experimental, un grupo control positivo y un grupo control negativo (cinco animales por grupo). De igual manera, los ratones fueron pesados en una balanza digital y posteriormente se administraron 100 µL de la fracción de 1-3 kDa a 100 µg/kg en SSF al 0.9% al grupo experimental (con ayuda de una cánula y por vía intragástrica); al grupo control positivo se administraron 100 µL de indometacina a 10 mg/kg en SSF al 0.9% y al grupo control negativo solamente 100 µL de SSF al 0.9%. Las administraciones se realizaron una vez al día y durante cinco días. En el último día, se midió el grosor de ambas orejas de los ratones con el micrómetro de precisión digital y se administraron los tratamientos correspondientes. Una hora después se aplicaron, por vía tópica, 2 µg de TPA (Sigma®) en 20 µL de acetona (Meyer®) en la oreja derecha de cada ratón, tanto en el lado interno como externo (10 µL por lado). Luego, se midió el grosor de la oreja derecha de cada animal 1, 2, 3, 4 y 5 h después de la aplicación. La diferencia en el grosor de las orejas fue reportada como expresión del edema auricular. Por último, el porcentaje de inhibición del edema auricular (%IEP) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 11. \%IEA} = \{1 - [EA_{Txs} / EA_{C(-)}]\} 100$$

Dónde:

$EA_{C(-)}$  = Promedio del edema auricular calculado para el grupo control negativo.

$EA_{Txs}$  = Promedio del edema auricular calculado para el grupo control positivo o el grupo experimental.

### *Hipersensibilidad retardada*

La prueba de hipersensibilidad retardada inducida por DNFB se realizó siguiendo el método descrito por Fu y col.,<sup>102</sup> con ligeras modificaciones. La inmunidad celular regula las reacciones de hipersensibilidad retardada (reacción de hipersensibilidad tipo IV), cuyo inicio involucra la participación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Este mecanismo se produce como respuesta contra una variedad de virus, hongos y parásitos, al igual que en el rechazo de injertos y en la sensibilización de la piel por contacto con agentes químicos.<sup>103</sup> La hipersensibilidad por contacto ha sido ampliamente analizada en modelos murinos y consta de dos fases, denominadas fase de sensibilización y fase de estimulación.<sup>104</sup> En la fase de sensibilización, la piel del animal entra en contacto por primera vez con un hapteno.<sup>105</sup> Los haptenos son compuestos de bajo peso molecular que, al interactuar con proteínas, desencadenan mecanismos propios del sistema inmune adaptativo.<sup>104</sup> Por lo tanto, estas moléculas no son inmunogénicas por sí mismas, pero al unirse a proteínas de la piel forman complejos altamente inmunogénicos. Los complejos son reconocidos por CPA, cuya función es presentar los péptidos haptenedados a linfocitos T y activarlos. Los linfocitos T activados proliferan y circulan entre los órganos linfoides y la piel. En la fase de estimulación, una nueva exposición de la piel al hapteno activa linfocitos T específicos y desencadena el proceso inflamatorio responsable de las lesiones.<sup>105</sup>

En este ensayo se emplearon un grupo experimental, un grupo control positivo y un grupo control negativo (cinco animales por grupo). De manera similar a las pruebas anteriores, los ratones fueron pesados en una balanza digital y posteriormente se administraron 100  $\mu$ L de la fracción de 1-3 kDa a 100  $\mu$ g/kg en SSF al 0.9% al grupo experimental (con ayuda de una cánula y por vía intragástrica); al grupo control positivo se administraron 100  $\mu$ L de indometacina a 10 mg/kg en SSF al 0.9% y al grupo control negativo solamente 100  $\mu$ L de SSF al 0.9%. Las administraciones se realizaron una vez al día y durante cinco días. En el último día, se midió el grosor de ambas orejas de los ratones con el micrómetro de precisión digital y se administraron los tratamientos correspondientes. Una hora después de la aplicación, se rasuró la región abdominal de los ratones con una navaja. Posteriormente, se colocaron de manera tópica en el abdomen, 20  $\mu$ L de una solución de DNFB (Sigma®) al 0.5% en una mezcla de acetona y aceite de oliva en proporción 4:1 (v/v), el cual ejerció la función de hapteno. A las 24

h se aplicó un segundo reto, adicionando nuevamente 20  $\mu$ L de la solución de DNFB al 0.5% en el abdomen. A los cinco días se realizó un tercer reto, aplicando de nueva cuenta 20  $\mu$ L de la solución de DNFB al 0.5% en el abdomen; además, se aplicaron 10  $\mu$ L de una solución de DNFB al 0.2% en el pabellón auricular derecho de cada ratón. A las 48 h de haber realizado el último reto, se midió el grosor de ambas orejas de cada animal. Entonces, la diferencia en el grosor de las orejas fue reportada como expresión del edema. Finalmente, el porcentaje de inhibición del edema (%IE) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 12. \%IE} = \{1 - [E_{\text{TxS}} / E_{\text{C(-)}}]\} 100$$

Dónde:

$E_{\text{C(-)}}$  = Promedio del edema calculado para el grupo control negativo.

$E_{\text{TxS}}$  = Promedio del edema calculado para el grupo control positivo o el grupo experimental.

### Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones de humedad y proteínas del aislado proteico, así como del grado de hidrólisis, fueron reportados como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de cada determinación realizada por triplicado. Las concentraciones de proteínas del hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas fueron reportadas como la media  $\pm$  DE de cada determinación realizada por triplicado, usando la prueba *t* de Student para la comparación entre pares de medias y considerando aquellos valores con un nivel de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativos. Los valores obtenidos en los ensayos *in vitro* fueron expresados como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado y fueron contrastados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, considerando aquellos valores con un nivel de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativos en comparación con su respectivo control. Los valores obtenidos en los ensayos *in vivo* fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (EE) de cada grupo evaluado y fueron contrastados mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Dunnett, considerando aquellos valores con un nivel de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativos en comparación con el grupo control. Los análisis se llevaron a cabo empleando el programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versión 7.00 (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos de América).<sup>87</sup>



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Rendimiento en la obtención del aislado proteico

El rendimiento en el procedimiento para la obtención del aislado proteico producido a partir de la harina desgomada y desgrasada de las semillas de *S. hispanica* L. fue calculado por kg de semilla procesada, obteniéndose un rendimiento total del 37.27%.

Investigaciones realizadas con otro tipo de derivados proteicos producidos a partir de las semillas de esta especie vegetal reportaron rendimientos comparables al rendimiento obtenido en este trabajo. Tal es el caso del estudio llevado a cabo por Segura-Campos y col.,<sup>7</sup> en el cual se obtuvo un rendimiento del 29.68% para la fracción rica en proteínas producida. En otro estudio, Salazar-Vega y Segura-Campos<sup>106</sup> reportaron un rendimiento del 40.47% en la producción del concentrado proteico. Las variaciones en los porcentajes podrían atribuirse a las modificaciones dadas entre procesos para la obtención de los derivados proteicos, debido a que cada uno de los productos presenta características y aplicaciones distintas de acuerdo a lo descrito en dichos estudios. Entre las modificaciones observadas se encuentran el tiempo programado para la extracción del mucílago o de los aceites presentes en las semillas, el tamaño del tamiz, entre otros. Sin embargo, se puede afirmar que el rendimiento calculado en la producción del aislado proteico obtenido en este trabajo coincide con los valores reportados en los estudios ya mencionados.

### Contenido de humedad y proteínas del aislado proteico

El contenido de humedad presente en el aislado proteico de las semillas de *S. hispanica* L. fue de 7.84% (Cuadro 3). También se determinó la cantidad de proteínas contenida en el aislado, cuyo valor fue de 90.29% en base seca.

**Cuadro 3.** Cantidad de humedad y proteínas presentes en el aislado proteico de *S. hispanica* L.

	Humedad (%)	Proteínas en base húmeda (%)	Proteínas en base seca (%)
Aislado proteico	7.84 ± 0.08	83.20 ± 1.23	90.29 ± 1.33

Los resultados representan la media ± DE de las determinaciones realizadas por triplicado.

Por definición, un aislado proteico es un producto refinado que se caracteriza por un contenido de proteínas mínimo del 90% en base seca, preparado a partir de harina previamente desgrasada.<sup>107</sup> El proceso de obtención de un aislado conlleva una

serie de etapas que disminuyen los componentes no proteicos (como fibra, lípidos, entre otros), teniendo como finalidad la elaboración del producto con una elevada concentración de proteínas. Debido a la creciente tendencia en reducir la ingesta de proteínas animales, los aislados proteicos de origen vegetal han adquirido un amplio interés.<sup>108</sup> En este sentido, diversas plantas han demostrado ser una importante fuente de proteínas de bajo costo para complementar la alimentación humana. Incluso, los aislados proteicos obtenidos son fáciles de digerir y se pueden incorporar de forma sencilla a diferentes productos alimenticios. Aunado a su alta concentración proteica y propiedades funcionales reportadas, los aislados se han convertido en un ingrediente ideal para ser usados en bebidas, alimentos y productos texturizados a base de proteínas.<sup>109</sup>

No obstante, solamente el estudio de un derivado proteico de las semillas de *S. hispanica* L. ha reportado un contenido proteico comparable al porcentaje obtenido para el aislado proteico de este trabajo. En dicho estudio, Salazar-Vega y Segura-Campos<sup>106</sup> obtuvieron el concentrado proteico a partir de la fracción rica en proteínas producida de las semillas y determinaron su contenido de proteínas, el cual fue de 83.59%. Lo anterior puede atribuirse a diversas razones. Por ejemplo, se eliminaron componentes como fibra soluble o aceites a través de los procesos de extracción del mucílago mediante agitación constante y de desgrasado con el método Soxhlet, respectivamente. Incluso se descartaron los componentes no proteicos restantes empleando un proceso de tamizado con una malla de 140  $\mu\text{m}$ , lo cual aumentó el rendimiento para la obtención de las proteínas. De la misma manera, el método de solubilización alcalina con NaOH y precipitación isoeléctrica con HCl contribuyó con el incremento en la concentración proteica. Sin embargo, la ligera diferencia en la cantidad de proteínas de los derivados proteicos podría deberse al tiempo empleado y al número de etapas utilizadas en el proceso de desgrasado, ya que la metodología reportada para el concentrado proteico del estudio previo hace mención de una sola etapa, mientras que en la obtención del aislado proteico se realizaron tres extracciones de aceite durante 4 h. Por consiguiente, todos estos factores ayudaron a la obtención del aislado con una elevada concentración de proteínas, convirtiéndolo en un buen material para la producción del hidrolizado proteico.

### **Grado de hidrólisis**

Como se describió con anterioridad, el hidrolizado proteico de *S. hispanica* L. fue preparado en dos lotes, obtenidos a partir del aislado proteico utilizando un sistema de hidrólisis secuencial con Pepsina<sup>®</sup>-Pancreatina<sup>®</sup>. Estas enzimas actúan mediante un ataque nucleofílico que involucra la formación de un complejo acil-enzima y su posterior ruptura, liberando los productos de la reacción y la enzima empleada. La Pepsina<sup>®</sup> tiene actividad endopeptidasa, por lo que actúa sobre los enlaces internos de las proteínas e hidroliza principalmente por el extremo carboxilo terminal de los

residuos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Por su parte, la Pancreatina® es una preparación comercial que incluye proteasas como tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasas, al igual que enzimas contenidas en el fluido pancreático tales como amilasa, lipasa pancreática y nucleasas; este conjunto de enzimas posee actividad endopeptidasa y exopeptidasa, dando como resultado una mezcla de pequeños oligopéptidos y aminoácidos libres.<sup>110</sup>

Posteriormente, se determinó el grado de hidrólisis a cada uno de los lotes del hidrolizado, obteniéndose valores de promedio de 38.31 y 39.83% (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Valores de grado de hidrólisis calculados para cada lote de hidrolizado proteico de *S. hispanica* L.

	<b>Grado de hidrólisis (%)</b>
Lote 1	38.31 ± 3.90
Lote 2	39.83 ± 4.99

Los resultados representan la media ± DE de las determinaciones realizadas por triplicado.

El grado de hidrólisis es una propiedad fundamental de un hidrolizado proteico, ya que ayuda a determinar en gran medida sus características y por tanto, su posible uso. Reportes previos han descrito que los hidrolizados que se producen para su uso en alimentación se pueden clasificar en tres tipos: hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (entre 1-10%), para la mejora de propiedades funcionales; hidrolizados con grado de hidrólisis variable, para su uso como saborizantes; hidrolizados extensivos con grado de hidrólisis superior al 10%, para su empleo en alimentación especializada debido a sus propiedades nutricionales, fisiológicas o biológicas.<sup>111</sup> La producción de hidrolizados extensivos requiere el uso de más de una proteasa, puesto que una sola enzima no permite obtener un grado de hidrólisis tan elevado dentro de periodos de tiempo razonables.<sup>112</sup> Debido a esta razón, aunado a las características ya descritas sobre las enzimas empleadas en el proceso, se optó por el uso de un sistema secuencial de hidrólisis enzimática. En cuanto a los resultados obtenidos y de acuerdo a la clasificación ya citada, los porcentajes de grado de hidrólisis calculados para ambos lotes de los hidrolizados proteicos elaborados a partir de las semillas de *S. hispanica* L. permiten categorizarlos como hidrolizados extensivos.

Los porcentajes obtenidos en este estudio son comparables a los valores de grado de hidrólisis reportados en otras investigaciones realizadas con hidrolizados proteicos de *S. hispanica* L. Segura-Campos y col.<sup>7</sup> reportaron un grado de hidrólisis de 43.80% utilizando las enzimas Alcalasa® y Flavorzima® durante un tiempo de reacción de 150 min. En otro estudio llevado a cabo por Segura Campos y col.<sup>112</sup> también se empleó el sistema Alcalasa®-Flavorzima® durante 150 min para la producción del hidrolizado proteico y se calculó el grado de hidrólisis del mismo, obteniendo un valor

de 51.60%. Las ligeras variaciones observadas en los porcentajes pueden deberse principalmente al tiempo de reacción, ya que un tiempo más prolongado puede generar un grado de hidrólisis más elevado. Sin embargo, estos datos sustentan el hecho de que *S. hispanica* L. es un buen recurso natural para la obtención de hidrolizados proteicos extensivos e indican que dichos productos poseen las propiedades idóneas para su evaluación en modelos biológicos de actividad anti-inflamatoria.

Adicionalmente, un hidrolizado proteico con las características ya descritas representa una importante fuente de péptidos bioactivos con diferente corte de peso molecular. Por consiguiente, los lotes del hidrolizado proteico fueron sometidos a una etapa posterior de fraccionamiento por ultrafiltración a través de membranas de diferente corte de peso molecular, teniendo como producto final las diferentes fracciones peptídicas (fracción >10 kDa, fracción de 5-10 kDa, fracción de 3-5 kDa, fracción de 1-3 kDa y fracción <1 kDa) con potencial actividad anti-inflamatoria.

### **Cuantificación de proteínas de los derivados proteicos**

Los niveles de proteínas de cada uno de los lotes del hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas aisladas de *S. hispanica* L. fueron cuantificados mediante el ensayo de Bradford, cuyas concentraciones resultaron no poseer significancia estadística con base en la comparación entre pares de medias y por ende, se puede mencionar que las muestras de ambos lotes poseen un contenido proteico similar (Cuadro 5). Al no existir una diferencia estadística entre los lotes, cualquiera de éstos pudo ser elegible para la evaluación de la actividad biológica, de manera que se seleccionaron los derivados proteicos correspondientes al lote 1 y se procedió a la evaluación del efecto anti-inflamatorio *in vitro* de cada una de las muestras. Para las concentraciones a evaluar se tomó como base la cantidad de proteínas obtenida en esta prueba, como se mencionó anteriormente.

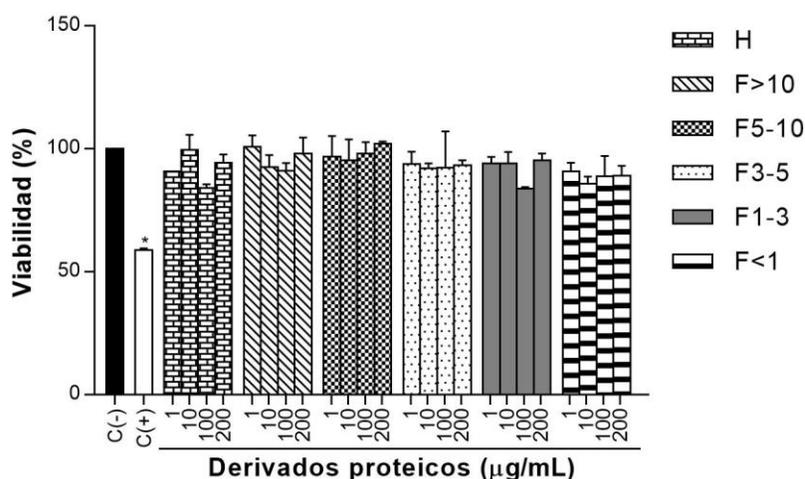
**Cuadro 5.** Concentración de proteínas presente en los derivados proteicos de *S. hispanica* L.

<b>Muestra de lote 1 (5 mg/mL)</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Muestra de lote 2 (5 mg/mL)</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Nivel de <i>p</i></b>
Hidrolizado	0.68 ± 0.01	Hidrolizado	0.58 ± 0.11	0.06
Fracción >10 kDa	1.07 ± 0.05	Fracción >10 kDa	1.02 ± 0.03	0.40
Fracción 5-10 kDa	0.24 ± 0.02	Fracción 5-10 kDa	0.25 ± 0.04	0.88
Fracción 3-5 kDa	0.09 ± 0.01	Fracción 3-5 kDa	0.06 ± 0.01	0.65
Fracción 1-3 kDa	0.09 ± 0.00	Fracción 1-3 kDa	0.04 ± 0.01	0.48
Fracción <1 kDa	0.07 ± 0.16	Fracción <1 kDa	0.01 ± 0.03	0.37

Los resultados representan la media ± DE de las determinaciones realizadas por triplicado, comparados entre pares de medias con la prueba *t* de Student y considerando aquellos valores con un nivel de *p* < 0.05 como estadísticamente significativos.

## Efecto de los derivados proteicos sobre la viabilidad celular

Se evaluó el efecto de cada uno de los derivados proteicos aislados de *S. hispanica* L. sobre la viabilidad de macrófagos murinos cultivados y una vez interpretados los resultados, se demostró que tanto el hidrolizado proteico como las fracciones peptídicas no ejercieron efectos tóxicos estadísticamente significativos sobre las células a las distintas concentraciones evaluadas en comparación con el control negativo, compuesto por macrófagos sin tratamiento y cuyo porcentaje fue considerado como el 100.00% de viabilidad (Figura 14). El porcentaje de viabilidad del control positivo de citotoxicidad fue de 58.66%, correspondiente a macrófagos tratados con DMSO al 100% (Cuadro 6).



**Figura 14.** Efecto de los derivados proteicos de *S. hispanica* L. sobre la viabilidad de macrófagos. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(-). C(-): control negativo; C(+): control positivo; H: hidrolizado; F: fracción.

**Cuadro 6.** Valores obtenidos en la determinación de la viabilidad de macrófagos tratados con los derivados proteicos de *S. hispanica* L.

	Viabilidad (%)			
	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
H	90.67 ± 0.17	99.61 ± 6.13	84.01 ± 1.58	94.30 ± 3.40
F>10	100.70 ± 4.72	92.62 ± 4.85	91.03 ± 3.13	98.06 ± 6.56
F5-10	96.75 ± 8.42	95.25 ± 8.57	97.96 ± 4.75	102.00 ± 0.98
F3-5	93.71 ± 5.06	91.98 ± 2.03	92.14 ± 14.94	93.31 ± 2.01
F1-3	94.03 ± 2.71	94.04 ± 4.60	83.66 ± 0.77	95.36 ± 2.74
F<1	90.70 ± 3.59	85.70 ± 3.03	88.74 ± 8.27	89.04 ± 4.03

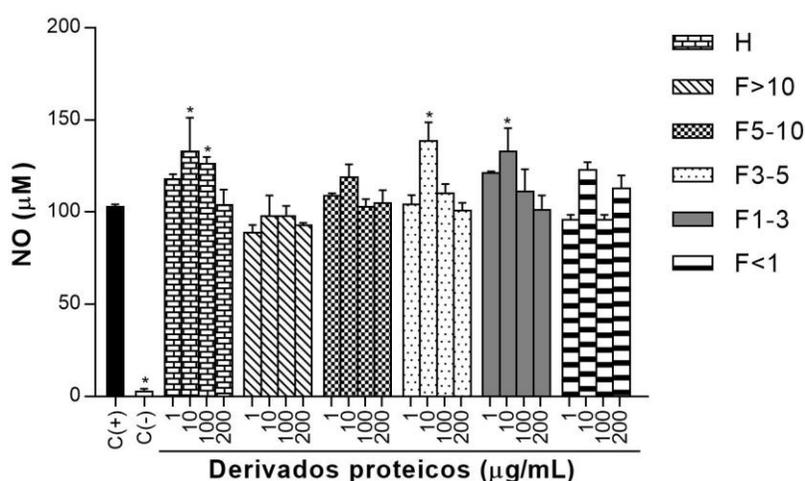
Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(-). C(-): control negativo, 100.00 ± 0.00%; C(+): control positivo, 58.66 ± 0.77%\*; H: hidrolizado; F: fracción.

Diversas investigaciones han demostrado que las proteínas o péptidos obtenidos de algunas semillas y granos de interés comercial no poseen efectos citotóxicos sobre macrófagos. Por ejemplo, el estudio llevado a cabo por Montoya-Rodríguez y col.<sup>113</sup> demostró que los hidrolizados proteicos obtenidos de la harina de los granos de *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto) no afectaron de manera significativa la viabilidad de líneas celulares de macrófagos RAW 264.7 y monocitos THP-1 diferenciados. En el estudio realizado por Wu y col.<sup>114</sup> con hidrolizados proteicos preparados a partir de harina desgrasada de germen de *Triticum vulgare* (una especie de trigo) se comprobó que dichos derivados tampoco poseen efectos tóxicos en células RAW 264.7. De igual forma, la investigación llevada a cabo por Udenigwe y col.<sup>115</sup> mostró que fracciones peptídicas de bajo peso molecular obtenidas de la harina desgrasada de semillas de *Linum usitatissimum* (lino) no ejercen efectos citotóxicos en la viabilidad de macrófagos RAW 264.7. Por lo tanto, debido a que el hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas de las semillas de *S. hispanica* L. no afectaron de manera significativa la viabilidad de los macrófagos murinos, se pudo descartar que cualquier efecto inhibitorio sobre los niveles de los parámetros evaluados en los ensayos de actividad anti-inflamatoria sea debido a un posible efecto citotóxico causado por los derivados proteicos.

### **Efecto de los derivados proteicos sobre la producción de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno**

Se evaluó la producción de ERN y ERO, en concreto NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por macrófagos murinos tratados con los derivados proteicos de las semillas de *S. hispanica* L. y activados con un potente agente estimulador del sistema inmune, en este caso, LPS de *E. coli* (1 µg/mL). Los resultados obtenidos en la producción de NO mostraron una disminución de manera dependiente de la concentración en algunas de

las muestras evaluadas (Figura 15). Como se puede notar, tanto el hidrolizado como la fracción de 3-5 kDa y fracción de 1-3 kDa presentaron este decremento dependiente de la concentración a partir de 10  $\mu\text{g/mL}$ , con valores mínimos a 200  $\mu\text{g/mL}$  (Cuadro 7). De estos derivados, la fracción de 1-3 kDa mostró una concentración de 132.80  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{g/mL}$ , resultado estadísticamente significativo en comparación con el control positivo conformado por macrófagos estimulados con LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) y considerado como la máxima producción de NO por las células (102.80  $\mu\text{M}$ ). De la misma manera, la fracción de 1-3 kDa presentó uno de los valores de NO más bajos a 200  $\mu\text{g/mL}$ , con una concentración de 101.30  $\mu\text{M}$  (1.39% de inhibición). En esta prueba también se empleó un control negativo, compuesto por células sin tratamiento ni estímulo y cuyo valor fue de 2.80  $\mu\text{M}$ , con un porcentaje de inhibición de 97.27%.



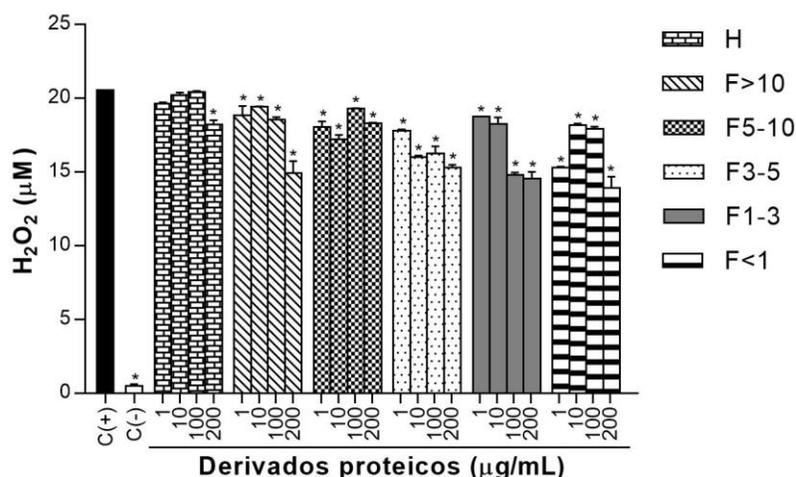
**Figura 15.** Efecto de los derivados proteicos de *S. hispanica* L. sobre la producción de NO por macrófagos. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo; C(-): control negativo; H: hidrolizado; F: fracción.

**Cuadro 7.** Valores obtenidos en la determinación de la producción de NO por macrófagos tratados con los derivados proteicos de *S. hispanica* L.

	Concentración de NO ( $\mu\text{M}$ ) (Porcentaje de inhibición de NO)			
	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
H	117.80 $\pm$ 2.82 (S/I)	132.80 $\pm$ 18.38*	126.30 $\pm$ 3.53*	103.80 $\pm$ 8.48 (S/I)
F>10	88.80 $\pm$ 4.24 (13.58 $\pm$ 5.31)	97.80 $\pm$ 11.31 (4.93 $\pm$ 9.69)	97.80 $\pm$ 5.65 (4.89 $\pm$ 4.19)	92.80 $\pm$ 1.41 (9.71 $\pm$ 2.61)
F5-10	108.80 $\pm$ 1.41 (S/I)	118.80 $\pm$ 7.07 (S/I)	102.80 $\pm$ 4.24 (0.01 $\pm$ 2.75)	104.80 $\pm$ 7.07 (S/I)
F3-5	104.30 $\pm$ 4.95 (S/I)	138.80 $\pm$ 9.89*	110.30 $\pm$ 4.95 (S/I)	100.80 $\pm$ 4.24 (1.96 $\pm$ 2.77)
F1-3	121.30 $\pm$ 0.70 (S/I)	132.80 $\pm$ 12.73*	111.30 $\pm$ 12.02 (S/I)	101.30 $\pm$ 7.77 (1.39 $\pm$ 8.92)
F<1	95.80 $\pm$ 2.82 (6.78 $\pm$ 4.03)	122.80 $\pm$ 4.24 (S/I)	95.80 $\pm$ 2.82 (6.78 $\pm$ 4.03)	112.80 $\pm$ 7.07 (S/I)

Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo, 102.80  $\pm$  1.41  $\mu\text{M}$ ; C(-): control negativo, 2.80  $\pm$  1.41  $\mu\text{M}$ \* (97.27  $\pm$  1.41%); H: hidrolizado; F: fracción; S/I: sin inhibición.

También se determinó la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por los macrófagos tratados con el hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas, observándose distintos comportamientos para cada uno de los derivados analizados (Figura 16). El hidrolizado proteico, la fracción >10 kDa y la fracción <1 kDa exhibieron valores elevados a las concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , teniendo 19.41  $\mu\text{M}$  (5.50% de inhibición) para la fracción >10 kDa y 18.18  $\mu\text{M}$  (11.51% de inhibición) para la fracción <1 kDa, ambas a 10  $\mu\text{g/mL}$ , así como 20.41  $\mu\text{M}$  (0.65% de inhibición) para el hidrolizado a 100  $\mu\text{g/mL}$  (Cuadro 8). En cuanto a la mayor concentración evaluada, se obtuvieron valores de 18.22 (11.29% de inhibición), 14.91 (27.40% de inhibición) y 13.92  $\mu\text{M}$  (32.23% de inhibición) para el hidrolizado, fracción >10 kDa y fracción <1 kDa, respectivamente. Por otro lado, sólo la fracción de 1-3 kDa presentó un decremento dependiente de la concentración, con un valor de 14.56  $\mu\text{M}$  y 29.13% de inhibición a 200  $\mu\text{g/mL}$ . Todos los valores mostraron significancia estadística en comparación con el control positivo (20.54  $\mu\text{M}$ ), a excepción de las concentraciones obtenidas para el hidrolizado a 1, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ; el control negativo empleado presentó una concentración basal de 0.50  $\mu\text{M}$  (97.53% de inhibición).



**Figura 16.** Efecto de los derivados proteicos de *S. hispanica* L. sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos. Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo; C(-): control negativo; H: hidrolizado; F: fracción.

**Cuadro 8.** Valores obtenidos en la determinación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por macrófagos tratados con los derivados proteicos de *S. hispanica* L.

	Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)			
	(Porcentaje de inhibición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )			
	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
H	19.63 ± 0.09 (4.42 ± 0.49)	20.19 ± 0.19 (1.71 ± 0.90)	20.41 ± 0.07 (0.65 ± 0.30)	18.22 ± 0.27* (11.29 ± 1.31)
F>10	18.85 ± 0.63* (8.26 ± 3.02)	19.41 ± 0.03* (5.50 ± 0.21)	18.53 ± 0.18* (9.77 ± 0.83)	14.91 ± 0.82* (27.40 ± 4.05)
F5-10	18.04 ± 0.39* (12.20 ± 1.88)	17.20 ± 0.30* (16.27 ± 1.53)	19.30 ± 0.01* (6.05 ± 0.05)	18.27 ± 0.07* (11.05 ± 0.31)
F3-5	17.81 ± 0.08* (13.32 ± 0.38)	16.02 ± 0.10* (22.02 ± 0.53)	16.23 ± 0.51* (20.98 ± 2.46)	15.28 ± 0.21* (25.60 ± 1.08)
F1-3	18.74 ± 0.01* (8.74 ± 0.13)	18.23 ± 0.46* (11.24 ± 2.32)	14.80 ± 0.17* (27.97 ± 0.86)	14.56 ± 0.44* (29.13 ± 2.22)
F<1	15.28 ± 0.09* (25.64 ± 0.44)	18.18 ± 0.09* (11.51 ± 0.51)	17.94 ± 0.12* (12.68 ± 0.57)	13.92 ± 0.76* (32.23 ± 3.74)

Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo, 20.54 ± 0.00 µM; C(-): control negativo, 0.50 ± 0.10 µM\* (97.53 ± 0.52%); H: hidrolizado; F: fracción.

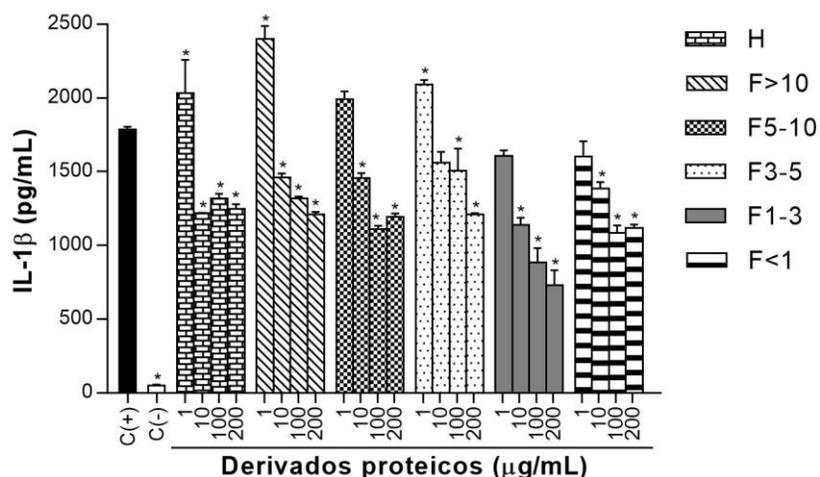
Entonces, una vez analizadas las concentraciones de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas para cada derivado proteico, al igual que sus porcentajes de inhibición, se puede mencionar que la fracción de 1-3 kDa fue la que mostró el mayor efecto anti-inflamatorio de acuerdo a la medición de estas moléculas.

Como se describió con anterioridad, el NO y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> están implicados en la respuesta inflamatoria y su liberación excesiva conduce a estrés oxidativo, contribuyendo al daño ocasionado por una gran variedad de padecimientos tales como la diabetes o el cáncer.<sup>35</sup> Tomando este antecedente, algunos trabajos han evaluado y demostrado el efecto supresor sobre la producción de ERO o ERN por proteínas o péptidos aislados de diferentes granos de importancia comercial. Un ejemplo es la investigación llevada a cabo por Ndiaye y col.,<sup>116</sup> en la cual se demostró que la fracción <3 kDa de las semillas de *Pisum sativum* L. (guisante de campo amarillo) ocasiona un decremento dependiente de la concentración en los niveles de NO producidos por macrófagos RAW 264.7. El estudio realizado por Udenigwe y col.<sup>115</sup> determinó la actividad en la producción de NO por macrófagos RAW 264.7 tratados con fracciones peptídicas de bajo peso molecular (<1 kDa) aisladas de las semillas de *L. usitatissimum* y obtenidas con diferentes enzimas, comprobando que estos productos también poseen un efecto inhibitorio dependiente de la concentración. Además, algunos estudios han demostrado que los distintos péptidos contenidos en otros derivados proteicos también inhiben ciertos marcadores relacionados con la producción de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por ejemplo, Dia y col.<sup>117</sup> aislaron el péptido lunasina a partir de harina desgrasada de *G. max* L. y evaluaron su efecto sobre la producción de NO por macrófagos RAW 264.7 y la expresión de iNOS por estas mismas células, observándose un decremento a las concentraciones más elevadas para ambos casos.

Todos estos estudios permiten establecer que las fracciones con péptidos de menor tamaño ejercen efectos significativos en la disminución de ERO y ERN. Asimismo, los péptidos contenidos en los derivados analizados en dichos trabajos contribuyen a una inhibición en la expresión de otros factores implicados en la producción de NO, como puede ser iNOS. Por lo tanto, es posible que los péptidos contenidos en los derivados proteicos de las semillas de *S. hispanica* L. presenten un mecanismo similar en la inhibición de los niveles de NO producidos por los macrófagos, aunque sería necesario evaluar el efecto de los péptidos de esta planta sobre otros marcadores. Igualmente, debido a la nula cantidad de reportes acerca de la regulación en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sería necesario evaluar algunos mediadores involucrados con esta molécula, como la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> o la expresión de SOD.

## Efecto de los derivados proteicos sobre la producción de citocinas

Se determinaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (citocinas pro-inflamatorias) producidos por los macrófagos tratados con los derivados proteicos, así como los niveles de IL-10 (citocina anti-inflamatoria) secretados por estas mismas células. Al igual que con los parámetros evaluados anteriormente, los valores de IL-1 $\beta$  presentaron tendencias diferentes en cada una de las muestras (Figura 17). La fracción >10 kDa y la fracción de 1-3 kDa fueron los únicos derivados proteicos que demostraron un efecto inhibitorio dependiente de la concentración (Cuadro 9). La fracción >10 kDa mostró el valor máximo en la producción de esta citocina, con una concentración de 2400.00 pg/mL a 1  $\mu$ g/mL y con significancia estadística en comparación con el control positivo, compuesto por macrófagos activados con LPS (1  $\mu$ g/mL) y cuya concentración fue de 1787.00 pg/mL. A diferencia de los valores de otros derivados, la fracción de 1-3 kDa presentó los niveles más bajos en la producción de IL-1 $\beta$ , con un valor de 732.20 pg/mL a 200  $\mu$ g/mL y con diferencia estadística significativa; de igual manera, el menor porcentaje de inhibición se observó a esta concentración (59.00%). Como control negativo se emplearon células sin tratamiento ni estímulo, obteniendo una concentración basal de 49.20 pg/mL y 97.24% de inhibición.



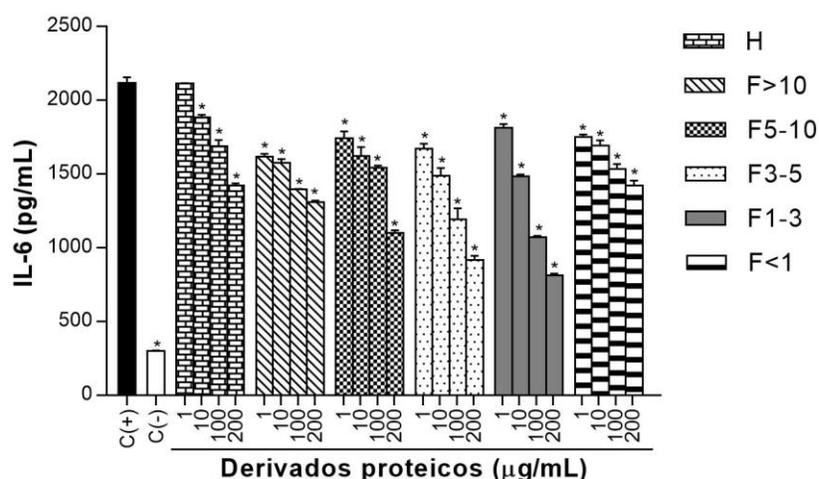
**Figura 17.** Efecto de los derivados proteicos de *S. hispanica* L. sobre la producción de IL-1 $\beta$  por macrófagos. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo; C(-): control negativo; H: hidrolizado; F: fracción.

**Cuadro 9.** Valores obtenidos en la determinación de la producción de IL-1 $\beta$  por macrófagos tratados con los derivados proteicos de *S. hispanica* L.

	<b>Concentración de IL-1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>			
	<b>(Porcentaje de inhibición de IL-1<math>\beta</math>)</b>			
	<b>1 <math>\mu</math>g/mL</b>	<b>10 <math>\mu</math>g/mL</b>	<b>100 <math>\mu</math>g/mL</b>	<b>200 <math>\mu</math>g/mL</b>
H	2034.00 $\pm$ 224.90* (S/I)	1218.00 $\pm$ 4.24* (31.83 $\pm$ 0.88)	1317.00 $\pm$ 33.94* (26.29 $\pm$ 2.59)	1249.00 $\pm$ 31.11* (30.09 $\pm$ 2.40)
F>10	2400.00 $\pm$ 88.39* (S/I)	1459.00 $\pm$ 30.41* (18.37 $\pm$ 2.47)	1320.00 $\pm$ 12.73* (26.12 $\pm$ 1.41)	1212.00 $\pm$ 15.56* (32.17 $\pm$ 1.51)
F5-10	1990.00 $\pm$ 55.15 (S/I)	1456.00 $\pm$ 34.65* (18.55 $\pm$ 1.16)	1112.00 $\pm$ 21.21* (37.77 $\pm$ 0.59)	1193.00 $\pm$ 24.75* (33.25 $\pm$ 2.01)
F3-5	2092.00 $\pm$ 29.70* (S/I)	1560.00 $\pm$ 74.95 (12.72 $\pm$ 3.36)	1505.00 $\pm$ 153.40* (15.76 $\pm$ 9.38)	1209.00 $\pm$ 10.61* (32.37 $\pm$ 0.04)
F1-3	1604.00 $\pm$ 41.01 (10.25 $\pm$ 1.44)	1141.00 $\pm$ 48.79* (36.18 $\pm$ 2.12)	884.20 $\pm$ 97.58* (50.50 $\pm$ 5.93)	732.20 $\pm$ 100.40* (59.00 $\pm$ 6.00)
F<1	1603.00 $\pm$ 104.70 (10.26 $\pm$ 6.70)	1384.00 $\pm$ 46.67* (22.53 $\pm$ 3.34)	1086.00 $\pm$ 50.20* (39.24 $\pm$ 3.38)	1119.00 $\pm$ 22.63* (37.38 $\pm$ 0.67)

Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo, 1787.00  $\pm$  16.97 pg/mL; C(-): control negativo, 49.20  $\pm$  8.48 pg/mL\* (97.24  $\pm$  0.50%); H: hidrolizado; F: fracción; S/I: sin inhibición.

A diferencia de IL-1 $\beta$ , los niveles de IL-6 producidos por las células exhibieron una tendencia similar en cada uno de los derivados analizados, donde tanto el hidrolizado proteico como las fracciones peptídicas presentaron un decremento en la producción de esta citocina, el cual fue dependiente de la concentración (Figura 18). La concentración más elevada de IL-6 se observó para el hidrolizado proteico a 1  $\mu$ g/mL, con un resultado de 2114.00 pg/mL y un porcentaje de inhibición de 0.18% (Cuadro 10). Sin embargo, una vez interpretados todos los datos, se pudo notar que la fracción de 1-3 kDa ejerció la mayor inhibición de IL-6, con un valor de 812.50 pg/mL (61.63% de inhibición) y significancia estadística en contraste con el control positivo, cuya concentración fue de 2118.00 pg/mL. También hay que destacar que se utilizó un control negativo, el cual tuvo una concentración de 298.80 pg/mL y un porcentaje de inhibición de 85.89%.



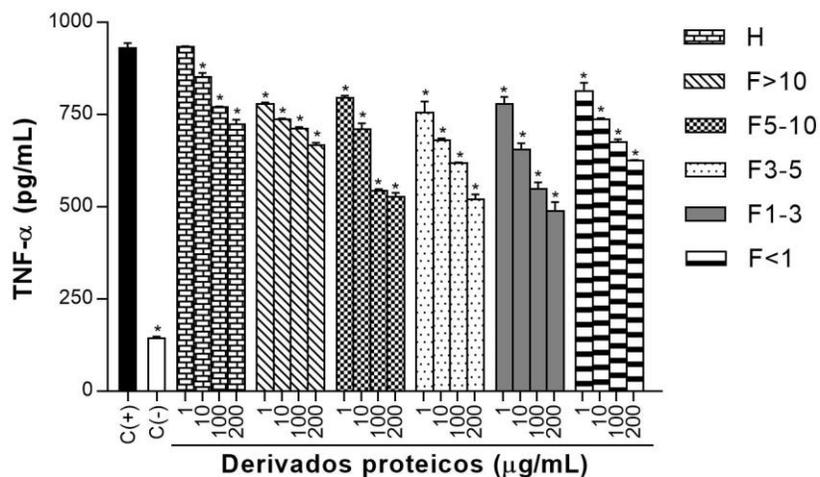
**Figura 18.** Efecto de los derivados proteicos de *S. hispanica* L. sobre la producción de IL-6 por macrófagos. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo; C(-): control negativo; H: hidrolizado; F: fracción.

**Cuadro 10.** Valores obtenidos en la determinación de la producción de IL-6 por macrófagos tratados con los derivados proteicos de *S. hispanica* L.

	Concentración de IL-6 (pg/mL)			
	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
H	2114.00 $\pm$ 1.76 (0.18 $\pm$ 1.87)	1883.00 $\pm$ 17.68* (11.12 $\pm$ 0.76)	1688.00 $\pm$ 42.43* (20.30 $\pm$ 3.43)	1423.00 $\pm$ 14.14* (32.82 $\pm$ 1.87)
F>10	1615.00 $\pm$ 21.21* (23.75 $\pm$ 0.36)	1576.00 $\pm$ 25.63* (25.59 $\pm$ 2.54)	1396.00 $\pm$ 1.76* (34.07 $\pm$ 1.26)	1310.00 $\pm$ 10.61* (38.14 $\pm$ 1.61)
F5-10	1743.00 $\pm$ 45.96* (17.70 $\pm$ 3.64)	1622.00 $\pm$ 60.99* (23.39 $\pm$ 4.25)	1543.00 $\pm$ 14.14* (27.16 $\pm$ 1.97)	1100.00 $\pm$ 17.68* (48.05 $\pm$ 1.76)
F3-5	1670.00 $\pm$ 35.36* (21.13 $\pm$ 3.08)	1486.00 $\pm$ 54.80* (29.80 $\pm$ 3.84)	1191.00 $\pm$ 76.01* (43.72 $\pm$ 4.59)	918.80 $\pm$ 26.52* (56.61 $\pm$ 2.03)
F1-3	1811.00 $\pm$ 26.52* (14.46 $\pm$ 2.78)	1481.00 $\pm$ 15.91* (30.05 $\pm$ 2.00)	1069.00 $\pm$ 12.37* (49.54 $\pm$ 0.32)	812.50 $\pm$ 10.61* (61.63 $\pm$ 1.18)
F<1	1750.00 $\pm$ 17.68* (17.37 $\pm$ 0.64)	1691.00 $\pm$ 37.12* (20.16 $\pm$ 0.32)	1533.00 $\pm$ 35.36* (27.65 $\pm$ 0.37)	1421.00 $\pm$ 33.59* (32.90 $\pm$ 0.38)

Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo, 2118.00  $\pm$  30.01 pg/mL; C(-): control negativo, 298.80  $\pm$  5.30 pg/mL\* (85.89  $\pm$  0.50%); H: hidrolizado; F: fracción.

Los niveles de TNF- $\alpha$  obtenidos en este ensayo también siguieron un comportamiento equivalente, ya que los derivados proteicos mostraron una disminución dependiente de la concentración para la producción de esta citocina por los macrófagos activados (Figura 19). Se observó el nivel más alto de TNF- $\alpha$  a la menor concentración evaluada para el hidrolizado proteico (1  $\mu\text{g/mL}$ ), teniendo un valor de 933.00 pg/mL (Cuadro 11). La fracción de 1-3 kDa presentó uno de los valores más bajos a la concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  (778.50 pg/mL y 16.27% de inhibición), mientras que a 200  $\mu\text{g/mL}$  se observó la menor concentración obtenida para esta citocina (488.50 pg/mL y 47.49% de inhibición). Todos los valores fueron estadísticamente significativos en comparación con el control positivo (excepto el hidrolizado proteico a 1  $\mu\text{g/mL}$ ), que exhibió una concentración de 930.00 pg/mL. En esta prueba también se empleó un control negativo, el cual presentó una concentración de 144.00 pg/mL (84.52% de inhibición).



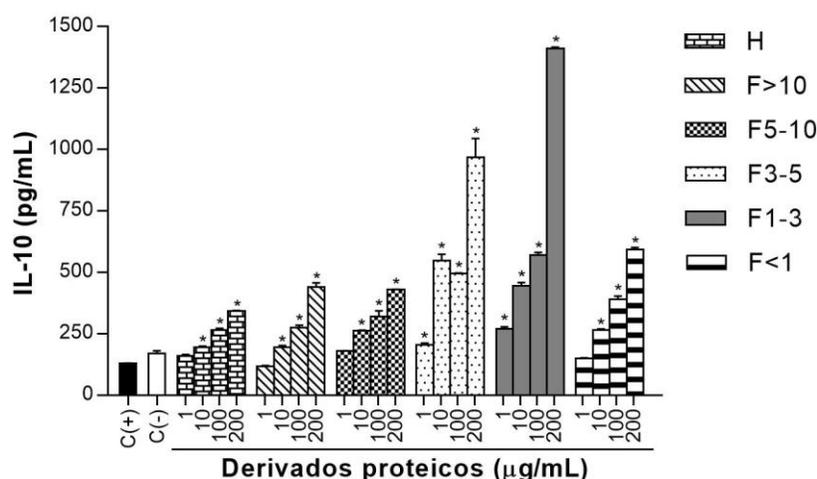
**Figura 19.** Efecto de los derivados proteicos de *S. hispanica* L. sobre la producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo; C(-): control negativo; H: hidrolizado; F: fracción.

**Cuadro 11.** Valores obtenidos en la determinación de la producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos tratados con los derivados proteicos de *S. hispanica* L.

	Concentración de TNF- $\alpha$ (pg/mL) (Porcentaje de inhibición de TNF- $\alpha$ )			
	1 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL
H	933.00 $\pm$ 2.12 (S/I)	851.00 $\pm$ 12.02* (8.47 $\pm$ 2.61)	769.50 $\pm$ 2.82* (17.25 $\pm$ 0.89)	723.50 $\pm$ 12.73* (22.19 $\pm$ 2.49)
F>10	779.00 $\pm$ 3.53* (16.23 $\pm$ 0.83)	736.50 $\pm$ 2.82* (20.80 $\pm$ 1.44)	711.00 $\pm$ 4.95* (23.54 $\pm$ 1.63)	667.00 $\pm$ 6.36* (28.28 $\pm$ 0.35)
F5-10	795.00 $\pm$ 6.36* (14.50 $\pm$ 1.91)	710.00 $\pm$ 16.26* (23.66 $\pm$ 0.64)	542.80 $\pm$ 5.30* (41.64 $\pm$ 0.27)	526.50 $\pm$ 11.31* (43.37 $\pm$ 2.03)*
F3-5	755.00 $\pm$ 30.41* (18.79 $\pm$ 4.44)	679.50 $\pm$ 5.65* (26.93 $\pm$ 0.44)	617.50 $\pm$ 2.82* (33.59 $\pm$ 1.26)	520.00 $\pm$ 13.44* (44.09 $\pm$ 0.63)
F1-3	778.50 $\pm$ 19.80* (16.27 $\pm$ 3.33)	655.50 $\pm$ 16.97* (29.52 $\pm$ 0.80)	547.50 $\pm$ 18.38* (41.14 $\pm$ 1.12)	488.50 $\pm$ 24.04* (47.49 $\pm$ 1.82)
F<1	813.00 $\pm$ 23.33* (12.55 $\pm$ 3.77)	737.00 $\pm$ 3.53* (20.74 $\pm$ 1.52)	675.30 $\pm$ 7.42* (27.38 $\pm$ 1.84)	625.50 $\pm$ 1.41* (32.74 $\pm$ 0.81)

Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo, 930.00  $\pm$  13.44 pg/mL; C(-): control negativo, 144.00  $\pm$  3.53 pg/mL\* (84.52  $\pm$  0.15%); H: hidrolizado; F: fracción; S/I: sin inhibición.

Por último, se determinaron las concentraciones de IL-10 producidas por las células tratadas con el hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas (Figura 20). Como se puede observar, todos los derivados proteicos presentaron un aumento dependiente de la concentración en la producción de esta citocina, con excepción de la fracción de 3-5 kDa, la cual exhibió un valor de 494.00 pg/mL a 100  $\mu$ g/mL (Cuadro 12). La menor producción de IL-10 se observó a 1  $\mu$ g/mL para la fracción >10 kDa, con una concentración de 118.00 pg/mL. Por el contrario, la mayor concentración de esta citocina se obtuvo a la máxima concentración evaluada para la fracción de 1-3 kDa (200  $\mu$ g/mL), presentándose un valor de 1410.00 pg/mL y con significancia estadística en comparación con el control positivo, cuyo valor fue de 129.00 pg/mL. El valor obtenido en la producción de IL-10 por los macrófagos utilizados en el control positivo se atribuye a que la síntesis de esta citocina es inferior en respuesta a estímulos antigénicos como el LPS, ya que es un mediador de carácter anti-inflamatorio implicado en el proceso de resolución de la inflamación. Tomando en consideración esto, aunado al incremento dependiente de la concentración mostrado por cada uno de los derivados proteicos, no se calcularon los porcentajes de inhibición en la producción de IL-10. También se empleó un control negativo, cuya concentración basal fue de 171.00 pg/mL.



**Figura 20.** Efecto de los derivados proteicos de *S. hispanica* L. sobre la producción de IL-10 por macrófagos. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo; C(-): control negativo; H: hidrolizado; F: fracción.

**Cuadro 12.** Valores obtenidos en la determinación de la producción de IL-10 por macrófagos tratados con los derivados proteicos de *S. hispanica* L.

	Concentración de IL-10 (pg/mL)			
	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
H	159.00 $\pm$ 7.07	195.00 $\pm$ 4.24*	266.00 $\pm$ 5.65*	343.00 $\pm$ 1.41*
F>10	118.00 $\pm$ 2.82	194.00 $\pm$ 8.48*	276.00 $\pm$ 8.48*	441.00 $\pm$ 15.56*
F5-10	179.00 $\pm$ 1.41	262.00 $\pm$ 2.82*	320.00 $\pm$ 22.63*	429.00 $\pm$ 1.41*
F3-5	204.00 $\pm$ 8.48*	548.00 $\pm$ 25.46*	494.00 $\pm$ 2.82*	967.00 $\pm$ 77.78*
F1-3	271.00 $\pm$ 7.07*	445.00 $\pm$ 12.73*	571.00 $\pm$ 9.89*	1410.00 $\pm$ 5.65*
F<1	151.00 $\pm$ 1.41	265.00 $\pm$ 4.24*	391.00 $\pm$ 12.73*	593.00 $\pm$ 7.07*

Los resultados representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(+). C(+): control positivo, 129.00  $\pm$  1.41 pg/mL; C(-): control negativo, 171.00  $\pm$  9.89 pg/mL; H: hidrolizado; F: fracción.

Después de analizar los niveles de citocinas producidos por los macrófagos tratados con los derivados proteicos, así como los porcentajes de inhibición calculados, se puede afirmar que la fracción de 1-3 kDa es la que presentó la mayor actividad anti-inflamatoria sobre estos marcadores.

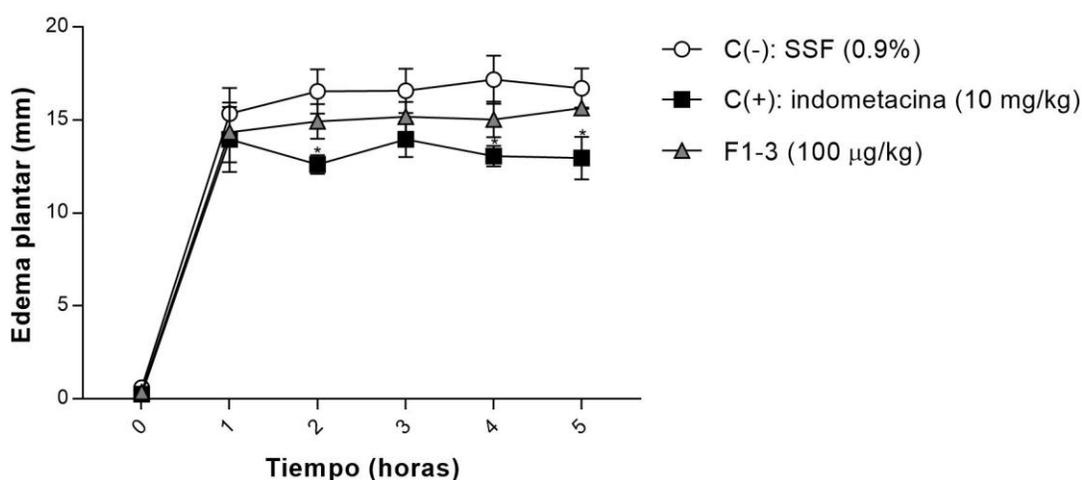
Las citocinas son proteínas que median el crecimiento, diferenciación y activación de las células del sistema inmune, así como la quimiotaxis celular y la naturaleza de la respuesta inmune.<sup>23</sup> Cada citocina se enlaza a un receptor específico en la superficie celular, generando una cascada de señalización que afecta las funciones de la célula en cuestión y que puede estimular la producción de otras citocinas, incrementar el número de receptores de superficie o eventualmente suprimir el efecto de la citocina misma. Entonces, desempeñan un papel fundamental en la regulación del proceso inflamatorio.<sup>22</sup> Considerando estos datos, diversos estudios han publicado el efecto de algunas proteínas o péptidos obtenidos de semillas de interés comercial y alimentario sobre la producción de citocinas. El trabajo realizado por Ndiaye y col.<sup>116</sup> con la fracción <3 kDa de las semillas de *P. sativum* L. mostró que este derivado proteico ocasiona un decremento dependiente de la concentración en los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  secretados por macrófagos RAW 264.7. Udenigwe y col.<sup>118</sup> evaluaron el hidrolizado y fracciones peptídicas aisladas de las semillas de *Prunus dulcis* (almendra), demostrando que la fracción >5 kDa produce efectos inhibitorios en la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  por macrófagos RAW 264.7; incluso, también comprobaron que esta fracción inhibe la expresión de los genes que codifican para dichas citocinas. Además, otros estudios han evaluado el efecto supresor sobre citocinas pro-inflamatorias por péptidos aislados de diversas fuentes. Por ejemplo, la investigación llevada a cabo por Hernández-Ledesma y col.<sup>119</sup> confirmó que el péptido lunasina (previamente reportado en *G. max* L.) potencia la inhibición de los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  producidos por macrófagos RAW 264.7.

Por consiguiente, también se puede decir que estos trabajos permiten establecer una relación entre el tamaño de los péptidos contenidos en las fracciones y la actividad anti-inflamatoria ya que, como se pudo notar, los péptidos de menor corte de peso molecular tuvieron efectos importantes. Igual se puede agregar que, a pesar de que los derivados proteicos de *S. hispanica* L. presentaron un comportamiento similar al reportado en los mencionados estudios, es importante la evaluación de otros factores relacionados con la secreción de estos mediadores. En primera instancia, se observó un incremento dependiente de la concentración en la producción de IL-10, por lo que la evaluación de otras citocinas anti-inflamatorias relacionadas con los macrófagos, como el TGF- $\beta$ , aportaría información importante sobre este tipo de moléculas. Asimismo, la evaluación de citocinas relacionadas con otras células propias del sistema inmune, como IL-4, IL-5 o IFN- $\gamma$ , contribuiría a conocer el efecto de los derivados proteicos sobre otros procesos involucrados en la inflamación. Finalmente, el análisis de la expresión del NF- $\kappa$ B u otro factor de transcripción, así como la expresión de genes que codifiquen para IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , permitiría elucidar de manera más clara el mecanismo por el cual se da la inhibición o el incremento en la liberación de dichas citocinas.

Por lo anterior, los derivados proteicos aislados de las semillas de *S. hispanica* L. presentaron actividad anti-inflamatoria a las distintas concentraciones empleadas, destacando el efecto observado en la fracción de 1-3 kDa, la cual fue seleccionada para su evaluación en tres ensayos *in vivo* mediante modelos de edema plantar inducido por carragenina, edema auricular inducido por TPA e hipersensibilidad retardada inducida por DNFB.

### Efecto de la fracción de 1-3 kDa sobre el edema plantar

Se evaluó el efecto de la fracción de 1-3 kDa, a una concentración de 100 µg/kg y durante un periodo de 5 h, en un grupo de ratones con edema plantar inducido por carragenina (Figura 21). Los resultados obtenidos para el grupo experimental demuestran un decremento en el desarrollo del edema, con un grosor de 15.03 mm y un porcentaje de inhibición máximo (12.42%) a las 4 h después de la inyección de la solución de carragenina (Cuadro 13). Sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo en contraste con el grupo control negativo (ratones a los cuales únicamente se les administró SSF al 0.9%), que presentó un grosor de 17.16 mm a las 4 h. Asimismo, se empleó un grupo control positivo compuesto por animales con indometacina a 10 mg/kg, los cuales exhibieron una reducción en el grosor del edema a las 2 y 5 h, con 12.60 mm (23.79% de inhibición) y 12.95 mm (22.45% de inhibición), respectivamente.



**Figura 21.** Efecto de la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. sobre el edema plantar inducido por carragenina. Los resultados representan la media  $\pm$  EE de cada grupo evaluado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(-). C(-): grupo control negativo; C(+): grupo control positivo; F1-3 (100 µg/kg): grupo experimental.

**Cuadro 13.** Valores obtenidos en la evaluación del efecto de la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. sobre el edema plantar inducido por carragenina.

	Edema plantar (mm)					
	(Porcentaje de inhibición del edema plantar)					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
C(-)	0.60 ± 0.20	15.33 ± 1.38	16.53 ± 1.19	16.56 ± 1.19	17.16 ± 1.28	16.70 ± 1.06
C(+)	0.25 ± 0.05 (58.33%)	13.95 ± 1.75 (9.02%)	12.60 ± 0.50 (23.79%)	13.95 ± 0.95* (15.79%)	13.05 ± 0.55* (23.98%)	12.95 ± 1.15* (22.45%)
F1-3 (100 µg/kg)	0.36 ± 0.03 (38.88%)	14.33 ± 1.60 (6.52%)	14.93 ± 0.93 (9.67%)	15.16 ± 0.81 (8.45%)	15.03 ± 0.95 (12.42%)	15.63 ± 0.03 (6.38%)

Los resultados representan la media ± EE de cada grupo evaluado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(-). C(-): grupo control negativo; C(+): grupo control positivo; F1-3 (100 µg/kg): grupo experimental.

Como se describió previamente, la carragenina es un inductor del proceso inflamatorio a través de una reacción que involucra dos fases. La fase temprana (90-180 min) se caracteriza por la liberación de histamina, serotonina y sustancias similares, mientras que la fase tardía (270-360 min) se da en respuesta a la activación de moléculas como las prostaglandinas. Todos estos factores contribuyen en la formación del edema mediante la extravasación de fluidos y la acumulación de leucocitos en el sitio de inflamación. El edema plantar inducido por carragenina es controlado con inhibidores de las COX, dado que el mecanismo del proceso inflamatorio es dependiente de dichas enzimas.<sup>99</sup> Por lo tanto, compuestos tales como los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) han sido utilizados debido a que ocasionan la inhibición de las COX, impidiendo la síntesis de las prostaglandinas y por consecuencia, disminuyendo la inflamación resultante.<sup>100</sup> Tomando en consideración estos datos, en este estudio se usó indometacina (AINE) como fármaco de referencia, ya que el decremento en el grosor del edema para los animales del grupo control positivo fue producido a través de este mecanismo.

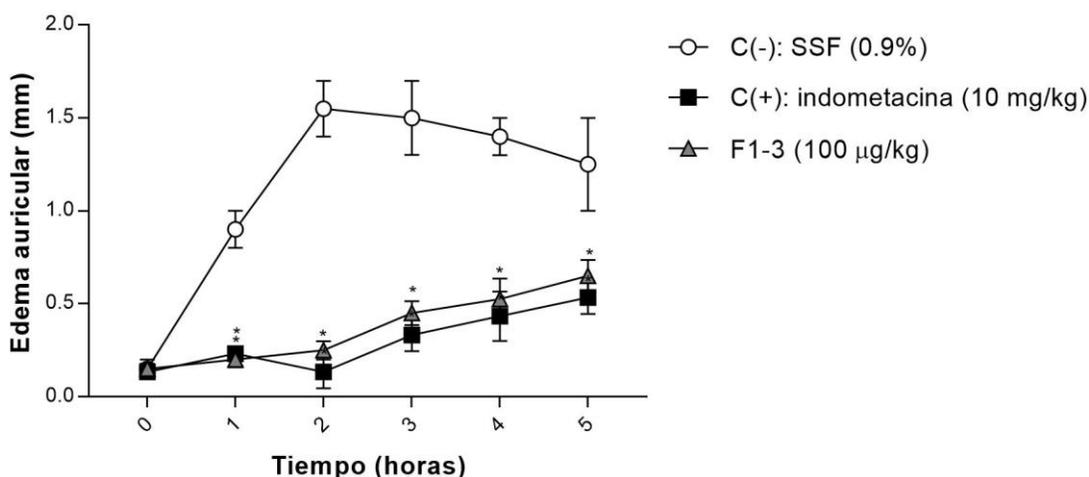
Pocos trabajos han reportado la actividad anti-inflamatoria de proteínas o péptidos aislados de diversas fuentes sobre el modelo de edema plantar inducido por carragenina. De Carvalho-Silva y col.<sup>120</sup> analizaron el efecto de un hidrolizado proteico de suero en ratones con edema plantar y mostraron que todas las concentraciones evaluadas de dicho derivado proteico producen una disminución en el desarrollo del edema 3 h después de la inducción del mismo. La investigación realizada por Tavares y col.<sup>121</sup> demostró que un concentrado peptídico producido a partir de proteínas de

suero ejerce un decremento en el edema inducido en ratones 4 h después de la inyección con carragenina. Estos estudios atribuyen el efecto anti-inflamatorio observado a una inhibición de las enzimas responsables de la producción de prostaglandinas, como COX, por lo que es posible que el leve efecto inhibitorio en el edema plantar inducido en los animales tratados con la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. sea producido a este nivel.

Cabe destacar que en los trabajos descritos con anterioridad se observaron los efectos inhibitorios a concentraciones por encima de 1 mg/kg, mientras que la fracción de 1-3 kDa fue evaluada a 100 µg/kg ya que esta concentración exhibió efectos significativos en las pruebas *in vitro*; igualmente, la obtención de los derivados proteicos conlleva un proceso largo y las fracciones peptídicas de menor peso molecular contienen una baja cantidad de proteínas, por lo que estos factores también colaboraron para el análisis de dicha concentración debido al tiempo limitado para obtener más muestra. Además, la concentración utilizada fue calculada con base en el contenido proteico obtenido en el ensayo de cuantificación de proteínas. Sin embargo, como ya se hizo mención, a pesar de que se observó un leve decremento en el edema plantar inducido, este no fue estadísticamente significativo. Entonces, la evaluación de una concentración más elevada de este derivado proteico y el análisis de otros mediadores implicados en el proceso de inflamación, como la expresión de genes que codifiquen para COX o la producción de prostaglandinas por células del sistema inmune (como los macrófagos), sería de utilidad para aclarar el mecanismo por el cual se podría originar la inhibición de la inflamación.

### **Efecto de la fracción de 1-3 kDa sobre el edema auricular**

El efecto de la fracción de 1-3 kDa (100 µg/kg) también fue evaluado en un modelo de edema auricular inducido por TPA (Figura 22). A diferencia del ensayo anterior, el grosor de las orejas de los animales del grupo experimental presentó un decremento significativo después de la inducción del edema, con un grosor de 0.25 mm y 83.87% de inhibición a las 2 h (Cuadro 14). De igual forma se utilizó un grupo control negativo, observándose el nivel más alto en el grosor del edema al mismo tiempo (1.55 mm). En cambio, los valores de los animales del grupo control positivo fueron considerados como la mayor inhibición del edema, mostrando un grosor de 0.13 mm y un porcentaje de inhibición de 91.39% a las 2 h.



**Figura 22.** Efecto de la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. sobre el edema auricular inducido por TPA. Los resultados representan la media  $\pm$  EE de cada grupo evaluado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(-). C(-): grupo control negativo; C(+): grupo control positivo; F1-3 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): grupo experimental.

**Cuadro 14.** Valores obtenidos en la evaluación del efecto de la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. sobre el edema auricular inducido por TPA.

	Edema auricular (mm)					
	(Porcentaje de inhibición del edema auricular)					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
C(-)	0.15 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.10	1.55 $\pm$ 0.15	1.50 $\pm$ 0.20	1.40 $\pm$ 0.10	1.25 $\pm$ 0.25
C(+)	0.13 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.03*	0.13 $\pm$ 0.08*	0.33 $\pm$ 0.08*	0.43 $\pm$ 0.13*	0.53 $\pm$ 0.08*
	(11.11%)	(74.07%)	(91.39%)	(77.77%)	(69.04%)	(57.33%)
F1-3 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0.15 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.04*	0.25 $\pm$ 0.05*	0.45 $\pm$ 0.06*	0.52 $\pm$ 0.11*	0.65 $\pm$ 0.08*
	(S/I)	(77.77%)	(83.87%)	(70.00%)	(62.50%)	(48.00%)

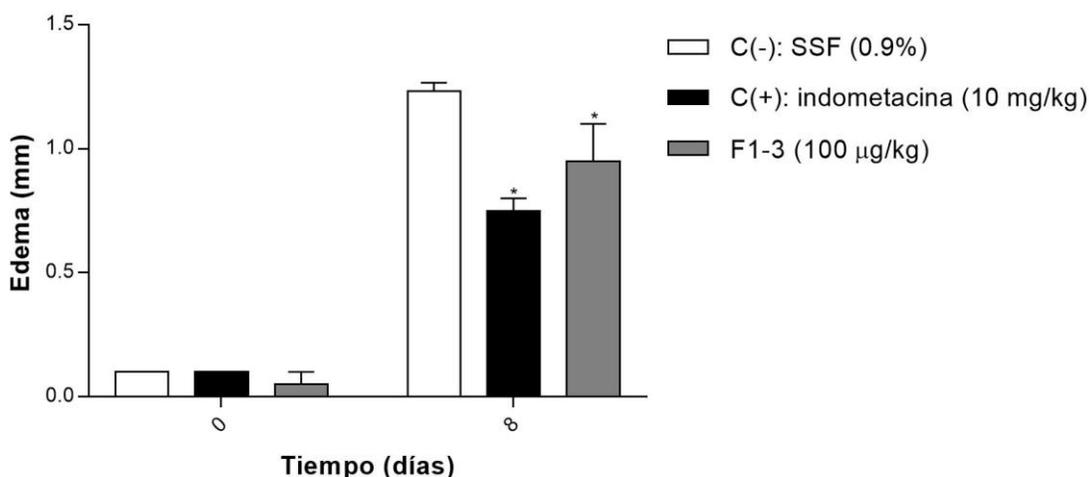
Los resultados representan la media  $\pm$  EE de cada grupo evaluado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(-). C(-): grupo control negativo; C(+): grupo control positivo; F1-3 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): grupo experimental.

El modelo de inflamación por TPA ha sido empleado para la identificación de compuestos con potencial actividad anti-inflamatoria. El TPA aplicado de manera tópica en la oreja del ratón estimula la infiltración celular con la consecuente liberación de mediadores como las prostaglandinas, los cuales incrementan la permeabilidad vascular y promueven la formación del edema dentro de un lapso de 1-4 h.<sup>101</sup> Al igual que en el ensayo con carragenina, los AINE se utilizan para disminuir la inflamación en el edema auricular inducido por TPA, puesto que el mecanismo de acción de estos fármacos comprende la inhibición de las COX.<sup>100</sup> Entonces, en esta prueba también se administró indometacina a los animales de experimentación del grupo control positivo, ocasionando un marcado efecto inhibitorio en el edema auricular.

Actualmente, no hay reportes acerca de la evaluación del efecto de proteínas o péptidos obtenidos de fuentes vegetales o animales sobre el edema auricular inducido por TPA. A pesar de esto, el efecto inhibitorio significativo observado en el edema de los ratones tratados con la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. podría deberse al mecanismo ya descrito, aunque la evaluación de la expresión de genes que codifiquen para las enzimas involucradas en la síntesis de prostaglandinas o la producción de estas mismas por las células del sistema inmune aportaría más información acerca del mecanismo por el cual se produce la inhibición del edema.

#### **Efecto de la fracción de 1-3 kDa sobre la prueba de hipersensibilidad retardada**

Por último, se analizó el efecto de la fracción de 1-3 kDa (100 µg/kg) en una prueba de hipersensibilidad retardada inducida por DNFB, obteniendo la diferencia en los grosores de las orejas de cada animal a los días 0 y 8 después de la aplicación del hapteno (Figura 23). Al igual que en la prueba anterior, se observó una reducción en el edema de los ratones del grupo experimental, con un grosor de 0.95 mm y un porcentaje de inhibición de 22.97% (Cuadro 15). Además, la disminución del edema fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo control negativo (1.23 mm). Los resultados obtenidos para el grupo control positivo empleado en este ensayo también exhibieron la mayor inhibición del edema, con un grosor de 0.75 mm y 39.18% de inhibición.



**Figura 23.** Efecto de la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. sobre la prueba de hipersensibilidad retardada inducida por DNFB. Los resultados representan la media  $\pm$  EE de cada grupo evaluado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(-). C(-): grupo control negativo; C(+): grupo control positivo; F1-3 (100 µg/kg): grupo experimental.

**Cuadro 15.** Valores obtenidos en la evaluación del efecto de la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. sobre la prueba de hipersensibilidad retardada inducida por DNFB.

	Edema (mm)	
	(Porcentaje de inhibición del edema)	
	Día 0	Día 8
C(-)	0.10 $\pm$ 0.00	1.23 $\pm$ 0.03
C(+)	0.10 $\pm$ 0.00	0.75 $\pm$ 0.05*
	(S/I)	(39.18%)
F1-3 (100 µg/kg)	0.05 $\pm$ 0.05	0.95 $\pm$ 0.15*
	(50.00%)	(22.97%)

Los resultados representan la media  $\pm$  EE de cada grupo evaluado. Los datos fueron comparados mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Dunnett, donde \* indica valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en contraste con C(-). C(-): grupo control negativo; C(+): grupo control positivo; F1-3 (100 µg/kg): grupo experimental; S/I: sin inhibición.

El DNFB es el hapteno que ha sido más utilizado en los modelos animales empleados para el estudio de la hipersensibilidad por contacto.<sup>102</sup> Como ya se detalló, la hipersensibilidad por contacto se puede clasificar como una reacción de hipersensibilidad retardada que posee dos fases, conocidas como fase de

sensibilización y fase de estimulación.<sup>104</sup> La fase de sensibilización es originada cuando la piel del abdomen del ratón entra en contacto con el hapteno. Los haptenos se enlazan a proteínas de la piel y forman complejos hapteno-proteína, los cuales son reconocidos por CPA y expresados en su superficie celular por medio del MHC clase I y clase II. Las CPA migran de la epidermis hacia los nódulos linfáticos, donde presentan los péptidos haptенados a linfocitos T. Los linfocitos T activados proliferan y migran hacia el torrente sanguíneo, donde circulan entre los órganos linfoides y la piel. La fase de estimulación ocurre después de que la piel del animal es expuesta nuevamente al hapteno, en un sitio diferente a la primera exposición (como la oreja). Esta fase involucra el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos T específicos, al igual que la producción de citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células circulantes, dando como resultado inflamación, vasodilatación y edema, el cual alcanza un máximo 24-48 h después del reto antigénico.<sup>105</sup>

Hasta la fecha, tampoco hay estudios que reporten la actividad de proteínas o péptidos aislados de diversas fuentes sobre el modelo de hipersensibilidad retardada inducida por DNFB. El decremento significativo en el edema de los animales tratados con la fracción de 1-3 kDa de *S. hispanica* L. podría ser atribuido a la inhibición de algún factor relacionado con las vías de señalización que dan inicio a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (como el NF- $\kappa$ B) o a la supresión de un mediador implicado en el proceso quimiotáctico. Por lo tanto, la evaluación de estos parámetros resultaría de interés en el entendimiento del papel que desempeña este derivado proteico en las reacciones de hipersensibilidad retardada.

Así, los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron que las fracciones con péptidos de menor tamaño ejercen efectos anti-inflamatorios significativos. La liberación excesiva de especies reactivas (NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) está implicada en el proceso inflamatorio, por lo que la inhibición de estas moléculas se reflejó en la disminución de la inflamación del auricular inducido a los animales de experimentación. De la misma forma, el decremento observado en la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) se pudo correlacionar con la inhibición en el desarrollo del edema de los modelos utilizados, debido a que dichos mediadores inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y leucocitos, estimulando el proceso quimiotáctico y favoreciendo el ingreso de células como los macrófagos al sitio de inflamación. Además, es importante mencionar que el presente estudio es el primero que evaluó las propiedades anti-inflamatorias de derivados proteicos aislados de las semillas de *S. hispanica* L., estableciendo una base para futuras investigaciones con esta planta y por consiguiente, considerar su futura aplicación en padecimientos que conlleven un proceso inflamatorio en su desarrollo.

## CONCLUSIONES

El hidrolizado proteico y las fracciones peptídicas de las semillas *S. hispanica* L. fueron producidos en dos lotes, con porcentajes de grado de hidrólisis de 38.31% para el hidrolizado proteico del lote 1 y 39.83% para el hidrolizado proteico del lote 2.

Los derivados proteicos de las semillas de *S. hispanica* L. no ejercieron efectos citotóxicos significativos en la viabilidad de macrófagos peritoneales murinos.

Los derivados proteicos de las semillas de *S. hispanica* L. ocasionaron un decremento en la producción de especies reactivas (NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ), así como un aumento en la producción de una citocina anti-inflamatoria (IL-10), por macrófagos peritoneales murinos, destacando el efecto de la fracción de 1-3 kDa.

La fracción de 1-3 kDa aislada de las semillas de *S. hispanica* L. ejerció efectos inhibitorios sobre modelos murinos de edema auricular inducido por TPA e hipersensibilidad retardada inducida por DNFB.

Los derivados proteicos de las semillas de *S. hispanica* L. presentaron efectos anti-inflamatorios significativos en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, resaltado el efecto de las fracciones peptídicas de menor peso molecular.



## REFERENCIAS

1. Okin, D.; Medzhitov, R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 17, 733-740.
2. Nathan, C.; Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* **2010**, *140*, 6, 871-882.
3. Velnar, T.; Bailey, T.; Smrkolj, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* **2009**, *37*, 5, 1528-1542.
4. Zhang, J. M.; An, J. Cytokines, inflammation and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* **2007**, *45*, 2, 27-37.
5. Gautam, R.; Jachak, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 5, 767-820.
6. Rangaraju, A.; Kumar, U. M. A pharmacognostic study on *Salvia hispanica*. *Am. J. Pharm. Health Res.* **2013**, *1*, 9, 27-37.
7. Segura-Campos, M. R.; Salazar-Vega, I. M.; Chel-Guerrero, L. A.; Betancur-Ancona, D. A. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 2, 723-731.
8. Udenigwe, C. C.; Aluko, R. E. Food protein-derived bioactive peptides production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.* **2012**, *71*, 1, 11-24.
9. Osamu, T.; Shizuo, A. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **2010**, *140*, 6, 805-820.
10. Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **2010**, *140*, 6, 771-776.
11. Ashley, N. T.; Weil, Z. M.; Nelson, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2012**, *43*, 385-406.
12. Lawrence, T.; Fong, C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- $\kappa$ B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 4, 519-523.

13. Montecucco, F.; Mach, F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Rheumatology* **2009**, *48*, 1, 11-22.
14. Gandhi, R.; Laroni, A.; Weiner, H. L. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2010**, *221*, 1, 7-14.
15. Bluestone, J. A.; Herold, K.; Eisenbarth, E. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* **2010**, *464*, 1293-1300.
16. Janssen, W. J.; Henson, P. M. Cellular regulation of the inflammatory response. *Toxicol. Pathol.* **2012**, *40*, 2, 166-173.
17. Vincent, J. M.; Opal, S. M.; Marshall, J. C.; Tracey, K. J. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* **2013**, *381*, 9868, 774-775.
18. Rock, K. L.; Latz, E.; Ontiveros, F.; Kono, H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 1, 321-342.
19. Medzhitov, R.; Schneider, D. S.; Soares, M. P. Disease tolerance as a defense strategy. *Science* **2012**, *335*, 6071, 936-941.
20. Mogensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 2, 240-273.
21. Hoesel, B.; Schmid, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Mol. Cancer* **2013**, *12*, 86, 1-15.
22. Arango Duque, G.; Descoteaux, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 491, 1-12.
23. Borish, L. C.; Steinke, J. W. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *111*, 2, 460-475.
24. Shi, C.; Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature* **2011**, *11*, 762-774.
25. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. *Inmunología celular y molecular*, 8a ed.; Editorial Elsevier España: Barcelona, 2015; pp 7, 39, 238.

26. De Filippo, K.; Dudeck, A.; Hasenberg, M.; Nye, E.; Van Rooijen, N.; Hartmann, K.; Gunzer, M.; Roers, A.; Hogg, N. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* **2013**, *121*, 24, 4930-4937.
27. Zabel, B. A.; Rott, A.; Butcher, E. C. Leukocyte chemoattractant receptors in human disease pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2015**, *10*, 51-81.
28. Nourshargh, S.; Alon, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* **2014**, *41*, 5, 694-707.
29. Soehnlein, O.; Lindbom, L.; Weber, W. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* **2009**, *114*, 21, 4613-4623.
30. Flannagan, R. S.; Cosío, G.; Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 355-366.
31. Smith, L. M.; May, R. C. Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochem. Soc. Trans.* **2013**, *41*, 2, 475-490.
32. Leliefeld, P. H. C.; Wessels, C. M.; Leenen, L. P. H.; Koenderman, L.; Pillay, J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit. Care* **2016**, *20*, 73, 1-9.
33. Häger, M.; Cowland, J. B.; Borregaard, N. Neutrophil granules in health and disease. *J. Int. Med.* **2010**, *268*, 1, 25-34.
34. Mittal, M.; Siddiqui, M. R.; Tran, K.; Reddy, S. P.; Malik, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signaling* **2014**, *20*, 7, 1126-1167.
35. Lugin, J.; Rosenblatt-Velin, N.; Parapanov, R.; Liaudet, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 2, 203-230.
36. Rahal, A.; Kumar, A.; Singh, V.; Yadav, B.; Tiwari, R.; Chakraborty, S.; Dhama, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1-19.
37. Savina, A.; Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* **2007**, *219*, 1, 143-156.

38. Headland, S. E.; Norling, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin. Immunol.* **2015**, *27*, 3, 149-160.
39. Wu, Y. S.; Chen, S. N. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 1, 1-6.
40. Mantovani, A.; Biswas, S. K.; Galdiero, M. R.; Sica, A.; Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* **2013**, *229*, 2, 176-185.
41. Laveti, D.; Kumar, M.; Hemalatha, R.; Sistla, R.; Naidu, V. G. M.; Talla, V.; Verma, V.; Kaur, N.; Nagpal, R. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflammation Allergy - Drug Targets* **2013**, *12*, 5, 349-361.
42. Venkatesha, S. H.; Dudics, S.; Acharya, B.; Moudgil, K. D. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 1, 887-906.
43. Tabas, I.; Glass, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* **2013**, *339*, 6116, 166-172.
44. Dinarello, C. A. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell* **2010**, *140*, 6, 935-950.
45. Newman, R. E.; Yoo, D.; LeRoux, M. A.; Danilkovitch-Miagkova, A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation Allergy - Drug Targets* **2009**, *8*, 2, 110-123.
46. Doyon, M.; Labrecque, J. Functional foods: a conceptual definition. *Br. Food J.* **2008**, *110*, 11, 1133-1149.
47. Bigliardi, B.; Galati, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *31*, 2, 118-129.
48. Shahidi, F. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 9, 376-387.
49. Kim, Y. S.; Young, M. R.; Bobe, G.; Colburn, N. H.; Milner, J. A. Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention. *Cancer Prev. Res.* **2009**, *2*, 3, 200-208.

50. El Sohaimy, S. A. Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. *World Appl. Sci. J.* **2012**, *20*, 5, 691-708.
51. Hernández-Ledesma, B.; García-Nebot, M. J.; Fernández-Tomé, S.; Amigo, L.; Recio, I. Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Int. Dairy J.* **2014**, *38*, 2, 82-100.
52. Sarmadi, B. H.; Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* **2010**, *31*, 10, 1949-1956.
53. Li-Chan, E. C. Y. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *1*, 28-37.
54. Chakrabarti, S.; Jahandideh, F.; Wu, J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1-11.
55. Ixtaina, V. Y.; Nolasco, S. M.; Tomás, M. C. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Ind. Crops Prod.* **2008**, *28*, 3, 286-293.
56. Muñoz, L. A.; Cobos, A.; Diaz, O.; Aguilera, J. M. Chia seed (*Salvia hispanica*): an ancient grain and a new functional food. *Food Rev. Int.* **2013**, *29*, 4, 394-408.
57. Mohd Ali, N.; Yeap, S. K.; Ho, W. Y.; Beh, B. K.; Tan, S. W.; Tan, S. G. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 1-9.
58. Sandoval-Oliveros, M. T.; Paredes-López, O. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1, 193-201.
59. Gazem, R. A. A.; Chandrashekariah, S. A. Pharmacological properties of *Salvia hispanica* (chia) seeds: a review. *J. Crit. Rev.* **2016**, *3*, 3, 63-67.
60. Coelho, M. S.; Salas-Mellado, M. d. I. M. Chemical characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) for use in food products. *J. Food Nutr. Res.* **2014**, *2*, 5, 263-269.
61. Da Silva Marineli, R.; Aguiar Moraes, E.; Alves Lenquiste, S.; Teixeira Godoy, A.; Nogueira Eberlin, M.; Maróstica Jr, M. R. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, *59*, 2, 1304-1310.

62. Capitani, M. I.; Spotorino, V.; Nolasco, S. M.; Tomás, M. C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Sci. Technol.* **2012**, *45*, 1, 94-102.
63. Orona-Tamayo, D.; Valverde, M. E.; Nieto-Rendón, B.; Paredes-López, O. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 1, 236-242.
64. Woldemariam, T.; Van Winkle, J. *In vitro* hypoglycemic effect of *Salvia hispanica* using a yeast glucose uptake model. *J. Pharm. Sci. Pharmacol.* **2015**, *2*, 2, 119-122.
65. Espada, C. E.; Berra, M. A.; Martinez, M. J.; Eynarda, A. R.; Pasqualini, M. E. Effect of Chia oil (*Salvia Hispanica*) rich in  $\omega$ -3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **2007**, *77*, 1, 21-28.
66. Fernandez, I.; Vidueiros, S. M.; Ayerza, A.; Coates, W.; Pallaro, A. Impact of chia (*Salvia hispanica* L.) on the immune system: preliminary study. *Proc. Nutr. Soc.* **2008**, *67*, 12.
67. Gayathiri, K.; Gopi Sudheer Kumar, J.; Kavimani, S. Evaluation of immunomodulatory activity of *Salvia hispanica*. L seeds. *Res. J. Pharm. Technol.* **2017**, *10*, 12, 4255-4260.
68. Vidyasabbani; Ramesh, A.; Snehalatha; Rahul, B.; Sriharitha; Sanjayvarma; Aparna. In- vitro and in-vivo anti-inflammatory activities of *Salvia hispanica* and *Linum usitatissimum* seeds in swiss albino rats. *Res. J. Pharm. Technol.* **2015**, *8*, 10, 1438-1444.
69. Ferreira, M. R.; Alvarez, S. M.; Illesca, P.; Giménez, M. S.; Lombardo, Y. B. Dietary Salba (*Salvia hispanica* L.) ameliorates the adipose tissue dysfunction of dyslipemic insulin-resistant rats through mechanisms involving oxidative stress, inflammatory cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 1, 83-94.
70. Jiménez-Rojas, M. I.; Vázquez-Euán, R.; Magaña-Sevilla, H.; Azcorra Perera, G. d. J.; Rodríguez Canul, R.; Zamora-Bustillos, R. Chia (*Salvia hispanica*) harvest residue induces cytokine expression in rabbits. *Ecosist. Recur. Agropec.* **2018**, *5*, 13, 35-43.

71. Salazar Vega, I. M. Evaluación de hidrolizados proteínicos de chía (*Salvia hispanica* L.) para su incorporación en alimentos funcionales. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 2008.
72. *Official Methods of Analysis of AOAC International Vol. II*, 16a ed. Cunniff, P., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, 1997; Capítulo 32, p 1.
73. *Official Methods of Analysis of AOAC International Vol. I*, 16a ed. Cunniff, P., Ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, 1997; Capítulo 4, p 13.
74. Tan, K. H. *Soil sampling, preparation, and analysis*, 2a ed.; CRC Press: Florida, 2005; pp 244, 245.
75. Herrera Chalé, F. G.; Ruiz Ruiz, J. C.; Acevedo Fernández, J. J.; Betancur Ancona, D. A.; Segura Campos, M. R. ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 10, 1691-1698.
76. Tavano, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *90*, 1-11.
77. Wang, J.; Su, Y.; Jia, F.; Jin, H. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 62, 1-8.
78. Spellman, D.; McEvoy, E.; O'Cuinn, G.; FitzGerald, R. J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 6, 447-453.
79. He, R.; Girgih, A. T.; Malomo, S. A.; Ju, X.; Aluko, R. E. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 1, 219-227.
80. Redmile-Gordon, M. A.; Armenise, E.; White, R. P.; Hirsch, P. R.; Goulding, K. W. T. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *67*, 166-173.
81. Okutucu, B.; Dinçer, A.; Habib, Ö.; Zihnioglu, F. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, *70*, 5, 709-711.

82. BALB/c (*Bagg's Albino*). Harlan Laboratories Inc.® 2009.
83. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Diario Oficial de la Federación, D. F., México, 6 de diciembre de 1999.
84. Zhang, X.; Goncalves, R.; Mosser, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* **2008**, *83*, 1, 1-18.
85. De Oliveira, B. J. N. A.; De Souza, L. A.; Eurides, D.; Da Silva, L. A. F.; Baungarten, L. B.; Busnardo, C. A. Aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de médula ósea de conejos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **2011**, *45*, 1, 113-118.
86. Castiblanco, J.; Correa, P. A. Separación y cultivo celular. En *Autoinmunidad y enfermedad autoinmune*; Anaya, J. M., Shoenfeld, Y., Correa, P. A., García-Carrasco, M., Cervera, R., Eds.; Corporación para Investigaciones Biológicas: Medellín, 2005; pp 512.
87. Villa-de la Torre, F.; Kinscherf, R.; Bonaterra, G.; Arana-Argaez, V. E.; Méndez-González, M.; Cáceres-Farfán, M.; Borges-Argáez, R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Critonia aromatisans* leaves: Downregulation of pro-inflammatory cytokines. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *190*, 174-182.
88. Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
89. Wang, H.; Cheng, H.; Wang, F.; Wei, D.; Wang, X. An improved 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *82*, 3, 330-333.
90. Alonso-Castro, A. J.; Ortiz-Sánchez, E.; Domínguez, F.; Arana-Argáez, V.; Juárez-Vázquez, M. d. C.; Chávez, M.; Carranza-Álvarez, C.; Gaspar-Ramírez, O.; Espinosa-Reyes, G.; López-Toledo, G.; Ortiz-Andrade, R.; García-Carrancá, A. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *141*, 3, 637-643.
91. Mur, L. A. J.; Mandon, J.; Cristescu, S. M.; Harren, F. J. M.; Prats, E. Methods of nitric oxide detection in plants: A commentary. *Plant Sci.* **2011**, *181*, 5, 509-519.

92. *Hydrogen Peroxide Test Kit*. Hanna Instruments®; registro HI 3844.
93. *Murine IL-1 $\beta$  ELISA Development Kit*. PeproTech®; registro 900-K47.
94. *Murine IL-6 ELISA Development Kit*. PeproTech®; registro 900-K50.
95. *Murine IL-10 ELISA Development Kit*. PeproTech®; registro 900-K53.
96. *Murine TNF- $\alpha$  ELISA Development Kit*. PeproTech®; registro 900-K54.
97. Gan, S. D.; Patel, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 9, 1-3.
98. Khajuria, V.; Gupta, S.; Sharma, N.; Kumar, A.; Lone, N. A.; Khullar, M.; Dutt, P.; Sharma, P. R.; Bhagat, A.; Ahmed, Z. Anti-inflammatory potential of hentriacontane in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *92*, 175-186.
99. Sengar, N.; Joshi, A.; Prasad, S. K.; Hemalatha, S. Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *160*, 140-148.
100. Gómez, M.; Gil, J. F. Topical anti-inflammatory activity of *Calea prunifolia* HBK (Asteraceae) in the TPA model of mouse ear inflammation. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 12, 2391-2395.
101. Bralley, E. E.; Greenspan, P.; Hargrove, J. L.; Wicker, L.; Hartle, D. K. Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation. *J. Inflammation* **2008**, *5*, 1, 1-7.
102. Fu, R.; Zhang, Y.; Peng, T.; Guo, Y.; Chen, F. Phenolic composition and effects on allergic contact dermatitis of phenolic extracts *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *162*, 176-180.
103. Kobayashi, K.; Kaneda, K.; Kasama, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Tech.* **2001**, *53*, 4, 241-245.
104. Honda, T.; Egawa, G.; Grabbe, S.; Kabashima, K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: Toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 2, 303-315.

105. Christensen, A. D.; Haase, C. Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **2012**, *120*, 1, 1-27.
106. Salazar-Vega, I.; Segura-Campos, M. Caracterización físico-mecánica de películas formuladas a partir de mucílago y concentrado proteínico de chía (*Salvia hispanica* L.) y su aplicación para evitar la oxidación de un aceite virgen. *8° Foro en Ciencias Químicas y Bioquímicas* **2015**, 26-27.
107. De Luna Jiménez, A. Composición y procesamiento de la soya para consumo humano. *Invest. Cienc.* **2007**, *15*, 37, 35-44.
108. Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Pedroche, J.; Yust, M. d. M.; Millán, F. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. *Grasas Aceites* **2001**, *52*, 2, 127-131.
109. Garba, U.; Sawinder, K. Protein isolates: production, functional properties and application. *Int. Res. J. Chem.* **2014**, *4*, 22-36.
110. León Espinosa, E. B.; Jiménez-Martínez, C.; Dávila-Ortiz, G. Péptidos bioactivos de fuentes vegetales: un nuevo ingrediente para alimentos funcionales. En *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*; Ramírez Ortiz, M. E., Ed.; OmniaScience: Ciudad de México, 2015; pp 55, 56.
111. Benítez, R.; Ibarz, A.; Pagan, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **2008**, *42*, 2, 227-236.
112. Segura Campos, M. R.; Peralta González, F.; Chel Guerrero, L.; Betancur Ancona, D. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of chia (*Salvia hispanica*) produced by enzymatic hydrolysis. *Int. J. Food Sci.* **2013**, *2013*, 1-8.
113. Montoya-Rodríguez, A.; González de Mejía, E.; Dia, V. P.; Reyes-Moreno, C.; Milán-Carrillo, J. Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF- $\kappa$ B signaling. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 5, 1028-1041.
114. Wu, W.; Zhang, M.; Sun, C.; Brennan, M.; Li, H.; Wang, G.; Lai, F.; Wu, H. Enzymatic preparation of immunomodulatory hydrolysates from defatted wheat germ (*Triticum Vulgare*) globulin. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 12, 2556-2566.

115. Udenigwe, C. C.; Lu, Y. H.; Han, C. H.; Hou, W. C.; Aluko, R. E. Flaxseed protein-derived peptide fractions: Antioxidant properties and inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophages. *Food Chem.* **2009**, *116*, 1, 277-284.
116. Ndiaye, F.; Vuong, T.; Duarte, J.; Aluko, R. E.; Matar, C. Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds. *Eur. J. Nutr.* **2012**, *51*, 1, 29-37.
117. Dia, V. P.; Wang, W.; Oh, V. L.; De Lumen, V. O.; Gonzalez de Mejia, E. Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1, 108-115.
118. Udenigwe, C. C.; Je, J. Y.; Cho, Y. S.; Yada, R. Y. Almond protein hydrolysate fraction modulates the expression of proinflammatory cytokines and enzymes in activated macrophages. *Food Funct.* **2013**, *4*, 5, 777-783.
119. Hernández-Ledesma, B.; Hsieh, C. C.; De Lumen, B. O. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 3, 803-808.
120. De Carvalho-Silva, L. B.; Bertoldo Pacheco, M. T.; Bertoldo, R.; De Carvalho Veloso, C.; Costa Teodoro, L.; Giusti-Paiva, A.; Barboza Lollo, P. C.; Soncini, R. Anti-inflammatory activities of enzymatic (alcalase) hydrolysate of a whey protein concentrate. *Afr. J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 12, 2993-2999.
121. Tavares, T. G.; Spindola, H.; Longato, G.; Pintado, M. E.; Carvalho, J. E.; Malcata, F. X. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of novel dietary protein hydrolysate produced from whey by proteases of *Cynara cardunculus*. *Int. Dairy J.* **2013**, *32*, 2, 156-162.



