



**Facultad
de Química**



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

**Estudio de fenoles con actividad antioxidante y
antiinflamatoria y su vinculación con el factor de
transcripción NFkB**

Tesis de Maestría en Química

B.C. Emiliana Fariña

Directora: Prof. Dra. Margot Paulino Zunini

Área Bioinformática

**Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus
Aplicaciones**

Facultad de Química - Universidad de la República - PEDECIBA Química

Índice

RESUMEN	3
1.INTRODUCCIÓN.....	4
1.1.Importancia de los polifenoles como nutraceuticos o productos de vida sana.	6
1.2.Los orujos de uva como fuentes de nutraceuticos basados en fenoles.....	7
1.3.Factores de transcripción	8
1.4.Factor Nuclear Kappa B (NFkB)	8
1.4.1.Vía de señalización del NFkB	11
1.4.1.1.Vía canónica	11
1.4.1.2.Vía alternativa o no canónica.....	11
1.5.Rol del NFkB en enfermedades.....	13
1.5.1.NFkB y su vinculación con la inflamación	13
1.5.2.NFkb y el cáncer.....	14
1.5.3.NFkB y su vinculación con enfermedades autoinmunes	14
1.5.4.NFkB como target terapéutico	15
1.6.Uso de los métodos in silico en el contexto del estudio de compuestos polifenólicos y su articulación con modelos experimentales	16
2.HIPÓTESIS.....	17
3.OBJETIVOS.....	17
4.MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1.Infraestructura Bioinformática: Software y Hardware	18
4.2.Investigación bibliográfica y creación de la base de datos de Compuestos Bioactivos.....	19
4.3.Preparación de la proteína	19
4.4.Ensayos In vitro.....	32
4.4.1.Modelo experimental in vitro	32
5.ESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1.Extractos y análisis de capacidad antioxidante de orujos de uva.....	38
5.2.Análisis por Espectrometría de Resonancia de Spin (ESR) de los extractos	46
5.3.Análisis In vitro de la capacidad antiinflamatoria de los extractos	47
5.4.Análisis in silico de la capacidad antiinflamatoria de los polifenoles contenidos en los extractos al interaccionar con el NFkB.	55
6.CONCLUSIONES	62
7.AGRADECIMIENTOS	64
8.BIBLIOGRAFIA	65

RESUMEN

La presente investigación aborda el estudio de polifenoles extraídos de orujos de uva y su potencial actividad antioxidante y antiinflamatoria, evaluada mediante metodología *in vitro* e *in silico*, con énfasis en su interacción con el factor de transcripción NFκB. Este factor es un regulador clave de la respuesta inflamatoria, el crecimiento celular y la apoptosis, y su activación crónica está vinculada con diversas patologías, incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y autoinmunes.

Los orujos de uva, subproductos de la industria vitivinícola, constituyen una fuente rica en compuestos fenólicos que poseen reconocida capacidad de neutralizar radicales libres (ROS) y de modular vías de señalización celular, lo que los convierte en candidatos con gran valor nutracéutico.

La hipótesis de este trabajo propone que los polifenoles presentes en orujos de uva actúan como atrapadores de ROS e interfieren en la función nuclear de NFκB, contribuyendo a efectos antioxidantes y antiinflamatorios. Para ello, se establecieron como objetivos: (i) obtener y caracterizar un extracto polifenólico de orujos de uva; (ii) determinar su contenido fenólico y capacidad antioxidante mediante diferentes ensayos químicos; (iii) evaluar su actividad antiinflamatoria frente al NFκB; y (iv) estudiar mediante métodos *in silico* posibles mecanismos de interacción entre polifenoles y el complejo NFκB-ADN.

La metodología incluyó el desarrollo de una técnica extractiva óptima y posterior extracción y caracterización de compuestos fenólicos de orujos de Tannat y Cabernet Franc, aplicando técnicas como Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS, ORAC, FRAP y ESR. El análisis por HPLC-MS/MS permitió identificar 43 polifenoles. Paralelamente, se realizaron estudios computacionales mediante docking y dinámica molecular, utilizando AutoDock 4.2.6 y MOE2022.02, empleando como base de datos los polifenoles previamente identificados en orujos uruguayos.

Se utilizaron células reporteras HT-29-NFκB-GFP para evaluar la actividad antiinflamatoria. Por citometría de flujo se midió la fluorescencia GFP como indicador de activación de NFκB tras estimulación con TNFα. Los ensayos ELISA de IL-8 validaron el mecanismo de acción.

Los resultados demostraron que los extractos poseen una elevada capacidad antioxidante y que, compuestos como quercetina, procianidina B4 y malvidina-3-O-glucósido, presentan interacciones favorables con los sitios de unión NFκB-ADN, estabilizando el complejo y reduciendo su capacidad de activación transcripcional.

En conclusión, este enfoque integrado (*in vitro/in silico*) demostró exitosamente el potencial de los polifenoles de orujos como agentes antiinflamatorios naturales mediante modulación de la vía NFκB.

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo en el que vivimos, existe una demanda creciente de alimentos seguros e inocuos pero que a la vez tengan propiedades bioactivas. El subproducto orujo de uvas, que incluye tallos y pieles obtenidos durante la cosecha, semillas y pulpas obtenidas luego de la trituración y prensado, es aproximadamente el 20% de la cantidad total de uvas cosechadas. Si bien parte del mismo se destina a la destilación, esto permite recuperar una cantidad mínima del material como constituyentes volátiles de bebidas alcohólicas. La calidad del orujo varía mucho de acuerdo al tipo de uva (tinta o blanca), variedad de uva y del procesamiento que haya sufrido. (Fernandez, A. 2021), condición que se tuvo especialmente en cuenta en el desarrollo de esta Tesis al muestrear orujos de varias especies y años .

Con respecto a estudios químicos llevados a cabo sobre los constituyentes del vino, los orujos de uva han sido escasamente investigados, pero son indudablemente ricos en polifenoles y otros componentes bioactivos. El contenido de proteínas de los orujos de uvas es del orden de 10% según informa la Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal (https://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/orujo-de-uva - Extraído el 14/01/25), lo que les impide ser alimento para animales o fertilizantes por su muy baja tasa de utilización digestiva y por la presencia de taninos, que son astringentes, por lo que se unen a las proteínas salivales y se adhieren a las membranas mucosas de la boca del rumiante, lo que disminuye la aceptabilidad de la ración. Sin embargo, los orujos de uvas podrían ser potencialmente útiles por su alta concentración de polifenoles, de bioactividad conocida como antiinflamatorios y antioxidantes (Ruberto G et al, 2007), los cuales podrían ser extraídos y posteriormente utilizados en áreas como la salud humana.

Los oxidantes son compuestos con tendencia a donar oxígeno a otras sustancias. Muchas especies reactivas de oxígeno son radicales libres. Un radical libre es cualquier especie química que tiene uno o más electrones no apareados. El cuerpo humano se expone de modo constante a los oxidantes y/o radicales libres que se generan fisiológicamente y que se incrementan en procesos fisiopatológicos como la inflamación, el metabolismo de compuestos extraños o la radiación (Benitez-Estrada, et al, 2020). Los radicales libres pueden afectar adversamente varias clases importantes de moléculas biológicas como los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas, lo que altera el estado redox normal y aumenta el estrés oxidante. Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, contrarrestan los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y se cree que ayudan a prevenir o retardar la progresión de muchas enfermedades no transmisibles que afectan a los seres humanos (Sun et al, 2015). La cuantificación y demostración de las propiedades antioxidantes de los alimentos y sus productos son materia de interés para la agricultura, la industria, los investigadores, los médicos y los profesionales de la nutrición. La capacidad antioxidante total (CAT) se define como

el potencial de una sustancia o compuesto para inhibir o dificultar la oxidación de un sustrato hasta en cantidades muy pequeñas (Benitez-Estrada, et al, 2020).

La respuesta inflamatoria es una respuesta protectora del huésped contra la infección y el daño tisular, lo que puede prevenir la propagación de patógenos o promover la reparación tisular (Zhao et al, 2021). La misma está caracterizada por la activación coordinada de varias vías de señalización que regulan la expresión de mediadores tanto pro como antiinflamatorios que residen en células del tejido dañado y en células reclutadas desde la sangre (Lawrance T, 2009). Los macrófagos y neutrófilos activados liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias que incluyen TNF α (Abbas et al., 2012). Tanto ROS como TNF α activan el Factor Nuclear kappa B (NFkB), un factor de transcripción proinflamatorio que es un regulador crítico de la respuesta inflamatoria (Liu et al., 2017; Kunnumakkara et al., 2020). NFkB regula una gran cantidad de genes involucrados en procesos del sistema inmunológico y respuestas inflamatorias, así como la expresión de enzimas involucradas en la generación de ROS, incluida la NADPH oxidasa (Anrather et al., 2006), NO sintasa (Li et al., 2002), ciclooxigenasa (Li et al., 2003, Paulino et al, 2015), xantina oxidasa (Alvareda et al 2019), y fosfolipasa A2 (Schutze et al., 1992; Szymczak-Pajor et al., 2020).

El NFkB es el encargado de la iniciación de la maquinaria transcriptor del genoma, estando, de este modo, involucrado en un gran número de procesos celulares normales como ser la respuesta inflamatoria e inmune, crecimiento celular y apoptosis. Por otro lado, también existe evidencia contundente de que estos factores de transcripción están persistentemente activos en una gran cantidad de patologías autoinmunes, es decir, cuando existe una reacción inmunitaria contra antígenos propios del organismo, como ser cáncer, artritis reumatoidea, inflamación crónica, enfermedades neurodegenerativas, patologías cardiovasculares, asma, Lupus eritematoso sistémico, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal (Gilmore T., 2004; Sun et al, 2013).

En células no estimuladas, el dímero NFkB se encuentra en citoplasma en estado inactivo ya que se encuentra ligado a proteínas inhibidoras kappa B (I κ B) (Stegmaier, P. et al, 2004). La activación de la NFkB es iniciada por la degradación señal-inducida de las proteínas I κ B. Esto ocurre primariamente mediante la activación de una quinasa llamada la I κ B quinasa (IKK). El complejo IKK consiste de dos subunidades de quinasa, I κ B α y I κ B β y una subunidad reguladora I κ B γ (NEMO).

Cuando la IKK es activada por señales, que usualmente llegan desde el exterior de la célula, ésta fosforila dos serinas (Ser32 y Ser36 I κ B α humana según estudio previos *in silico*) localizadas en un dominio regulatorio de la I κ B. Una vez fosforiladas, las moléculas del inhibidor I κ B son modificadas por un proceso llamado ubiquitinación, que las lleva a ser degradadas por una estructura celular llamada proteasoma 26S (Gilmore T, 2004).

Con la degradación del inhibidor, el complejo NFkB es liberado para entrar en el núcleo activando la expresión de genes específicos que tiene el sitio de enlace en ADN para NFkB. La activación de estos genes por NFkB induce a respuestas fisiológicas, por ejemplo, inflamatoria, inmune, de supervivencia o proliferación celular. NFkB activa la expresión de sus propios represores (I κ B) quienes vuelven a inhibir NFkB formando de esta manera un auto feedback (Basak, S. et al, 2007).

Por lo antes mencionado, no es sorprendente que NFkB se encuentre crónicamente activo en varias enfermedades inflamatorias como las que mencionamos anteriormente. De hecho, este gen es clave en el control de las respuestas inmunes innata y adaptativa. Existe, sin embargo, evidencia contundente de que varios productos naturales, incluyendo antioxidantes como por ejemplo los polifenoles, son capaces de modular la activación del NFkB (Romier B. et al, 2008). Éstos no interactúan solamente con radicales libres, sino que también actúan modulando procesos de señalización celular durante la inflamación ya que la activación de la sintasa óxido-nítrico inducible (iNOS) está directamente regulada por la activación del NFkB (Rahman I et al, 2006).

1.1. Importancia de los polifenoles como nutraceuticos o productos de vida sana.

Los nutraceuticos son suplementos dietéticos que se utilizan para mejorar la salud, retrasar el envejecimiento, prevenir enfermedades y mantener el correcto funcionamiento del cuerpo humano. Se denominan suplementos dietéticos o nutraceuticos porque tienen propiedades similares a los nutrientes e incluyen lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales y otros nutrientes. Los nutraceuticos actualmente están generando mucho interés debido a sus beneficios nutricionales y terapéuticos (Alharbi KS. et al, 2022). De hecho, en los últimos años, mucha de la atención ha sido dirigida a los compuestos naturales como aquellos altamente concentrados en polifenoles, sobre todo por evidencia epidemiológica de que la ingesta de frutas y verduras está asociada con una menor incidencia de patologías, sobre todo cardiovasculares y cáncer (Ferrari D. et al, 2016) que se encuentran dentro de las primeras causas de muerte en pacientes adultos en nuestro país.

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura al menos un anillo fenol. De hecho, muchos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas y tienen estructuras químicas que cuentan con más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles representan la familia más grande de compuestos antioxidantes naturales consistiendo básicamente en ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, estilbenos y otros polifenoles. Los flavonoides a su vez se subdividen en flavanoles, flavonas, flavanones, isoflavanones y antocianinos. Los flavonoides son los mas comunes de encontrar en frutas y verduras. (Marin-Canul et al, 2023), y dado que esta Tesis esta centrada en el estudio de un producto derivado de la uva, se espera encontrar como resultado esta amplia diversidad estructural luego de investigarla.

Poseen una gran variedad química considerando el número de anillos aromáticos y la posición que pueden adoptar los grupos fenol (Bravo L., 1998). Su efecto beneficioso se ha asociado mayoritariamente con el efecto antiinflamatorio y antioxidante debido no solo a su actividad como scavengers (atrapadores de radicales libres) sino también a su habilidad de modular proteínas de señalización en la respuesta adaptativa a antioxidantes, haciendo a esas células más resistentes a la acción tóxica de un estímulo externo. El contenido total de fenoles de alimentos y bebidas se correlaciona muy fuertemente con su actividad antioxidante.

Los polifenoles conjugados a polisacáridos son comúnmente extraídos de diferentes plantas, de hecho, estos son importantes para la fisiología de éstas, pues contribuyen a la resistencia de microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas y relativamente altas temperaturas (Gutierrez O. et al., 2002).

1.2. Los orujos de uva como fuentes de nutraceuticos basados en fenoles

Según José Hidalgo Togores en su libro “Tratado de Enología I” (2011), un orujo es “el residuo resultante del prensado de la uva fermentada o no”. La concentración y variedad de los compuestos fenólicos en los orujos de uva depende de numerosos factores: clima y terreno, una cosecha temprana o tardía, los diferentes procedimientos del procesado de la uva y del tiempo de fermentación del mosto. Diversos estudios han demostrado que la variedad de vid es uno de los factores que tiene mayor incidencia sobre la composición fenólica de la uva, ya que la capacidad de síntesis y de acumulación de los diversos compuestos estaría determinada genéticamente (González et al., 2006).

Por otro lado, se ha observado que los manejos relacionados con las condiciones que se le entrega al ecosistema por parte del humano, afectan la síntesis de compuestos fenólicos. Estudios antropológicos demuestran que las diferencias culturales, étnicas y educacionales que presente una localidad y/o comunidad influyen directamente en la manera en que se trabaja y en los resultados obtenidos (Milton, 2009; Krotz, 2011). Desde la elección del lugar de cultivo hasta las diversas prácticas agronómicas que se realizarán durante el proceso fenológico de la vid (por ejemplo poda, chapoda, y el deshoje) afectarán la síntesis de compuestos fenólicos (Navarrete, 2003)

Desde el punto de vista químico-estructural, los polifenoles son compuestos químicos cuya estructura varía desde moléculas simples a estructuras altamente polimerizadas, pero todas ellas se caracterizan por la presencia de uno o más anillos aromáticos que llevan una o más grupos hidroxilo (-OH). Además, existen derivados funcionales que incluyen ésteres, ésteres metílicos y glucósidos.

Los compuestos polifenólicos plausibles de ser encontrados en los orujos de uva incluyen, entre otros, a los ácidos fenólicos (cumarínico, cinámico, cafeico, gentísico, ferúlico y vanílico) y flavonoides (catequinas, quercetina y resveratrol), los que son

sintetizados por una vía metabólica común a partir de la fenilalanina. Todos provienen de las uvas moradas, particularmente de su piel, que los producen como una forma de protección contra las relativamente altas temperaturas a las que están expuestas (Gutierrez O. et al, 2002).

1.3. Factores de transcripción

Un factor de transcripción es una proteína que participa en la regulación de la transcripción del ADN pero que no forma parte de la ARN polimerasa. Los factores de transcripción pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas del ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la ARN polimerasa (Latchman D.,1997; Roeder R., 1996). Hay muchos tipos distintos de factores transcripcionales, pero pueden dividirse en constitutivos e inducibles. En términos generales, los factores de transcripción constitutivos son aquellos que regulan la expresión basal de los genes que codifican para todas las proteínas estructurales o de mantenimiento, es decir, las enzimas y los componentes proteicos presentes en todas las células y que son fundamentales para la función celular en general. Los factores de transcripción inducibles son aquellos que regulan la expresión de genes que solamente se utilizan en ciertos tipos celulares o en ciertos momentos de la vida de la célula (López C.B. et al, 2003).

Son numerosos los factores de transcripción existentes en células eucariotas. Ciertos factores de transcripción pueden sufrir mutaciones que los mantienen continuamente activos sin necesidad de señales externas, como por ejemplo los llamados oncogenes, transformándose y estimulando sin control la síntesis de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. Esto puede dar lugar al crecimiento incontrolado de las células y, por lo tanto, a un tumor.

1.4. Factor Nuclear Kappa B (NFkB)

El Factor Nuclear kappa B (NFkB) es un factor de transcripción que juega un rol biológico crucial por estar involucrado en un gran número de procesos celulares normales como ser la respuesta inflamatoria e inmune, crecimiento celular, diferenciación, adhesión celular y apoptosis (Park M.H., 2016)

La variedad de señales que pueden activar NFkB es reflejo de la cantidad de eventos con que éste ha sido relacionado. Los mejor caracterizados son aquellos que involucran citoquinas inflamatorias como Interleucina-1 beta (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), los estímulos mitogénicos como ésteres de forbol (PMA), los relacionados con agentes infecciosos como lipopolisacárido bacteriano (LPS, un constituyente de la membrana externa de bacterias Gram negativas) y expresión de antígenos virales (López, 2003). Se ha descrito que también puede ser activado por eventos relacionados con daño celular como radiación ultravioleta (UV) o estrés oxidativo (Schmidt, 1995), exposición a metales (Goebeler, 2001), y fenómenos particulares como el aumento de los niveles citoplasmáticos de calcio. La

activación de NFκB es sensible, en muchos casos, al estado redox o a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, por lo tanto, puede ser regulada por el estado de oxidorreducción general de la célula. Una activación aberrante del NFκB contribuye al desarrollo de varias enfermedades autoinmunes, inflamatorias y desórdenes malignos como los mencionados más arriba. Sin embargo, el NFκB también es importante para prevenir el desarrollo de la autoinmunidad a través de la regulación de tolerancia inmune (Cong Sun, et al, 2013).

En mamíferos, la familia del NFκB está compuesta por 5 miembros, incluidos el RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 y p100/p52 que forman varios complejos diméricos que transactivan numerosos genes target uniéndose al potenciador κB (κB enhancer). Ellos se asocian entre sí para formar distintos complejos homo y heterodiméricos que son activos transcripcionalmente. Mediante esta mencionada combinación, se pueden obtener hasta 15 dímeros diferentes, entre ellos, el más abundante es el p50/p65 que se halla en casi todos los tipos celulares.

Todos los integrantes de la familia de los NFκB tienen un dominio de homología Rel en el N-terminal. Una subfamilia de proteínas NFκB incluyendo el p65, RelB y c-Rel tienen un dominio de transactivación en su C-terminal

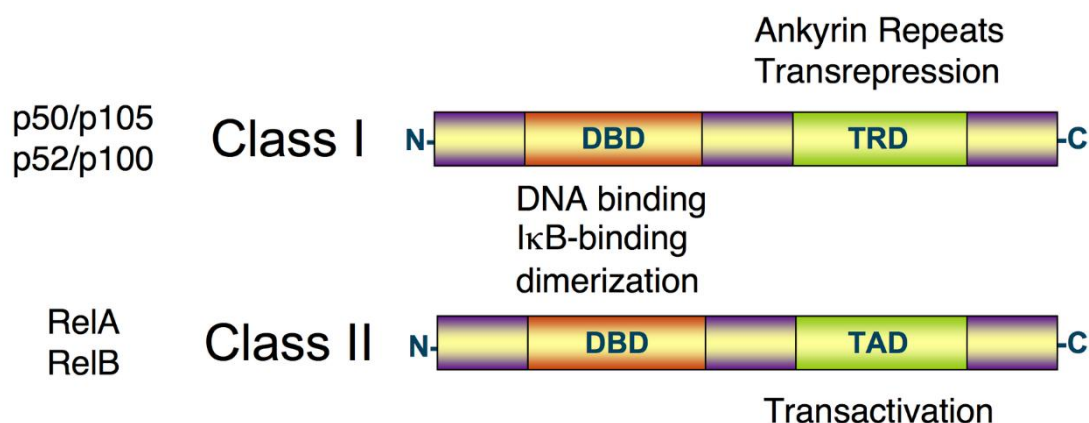


Figura 1. Dominio conservado de la familia de proteínas Rel. (Adaptación de T. Gilmore, 2015)

Tal como se mencionó anteriormente, NFκB normalmente está secuestrado en citoplasma por una familia de inhibidores llamados IκB (inhibidores de κB) que son proteínas que contienen múltiples copias de repetidos de ankirina, dándose esto en células no estimuladas. Las IκB “enmascaran” la señal de localización nuclear (NLS) del NFκB y así mantiene al factor de transcripción secuestrado en el citoplasma por virtud de esos dominios de repetidos de ankirina. El procesamiento mediado por la vía ubiquitin-proteasoma del p105 y p100, que consiste en la degradación selectiva de su región C-terminal que posee repetidos de ankirina, produce las proteínas maduras p50 y p52 respectivamente que resultan en la interrupción súbita de la función inhibitoria de estos precursores dando lugar a un factor de transcripción

nuclear maduro permitiéndole así su translocación a núcleo en donde va a desarrollar sus funciones de factor de transcripción nuclear. (M.H. Park., 2016). Mientras que la generación de la p52 a partir de la p100 es un proceso estrechamente regulado, la p50 es producida por un proceso constitutivo de la p105 (Senftleben, 2001).

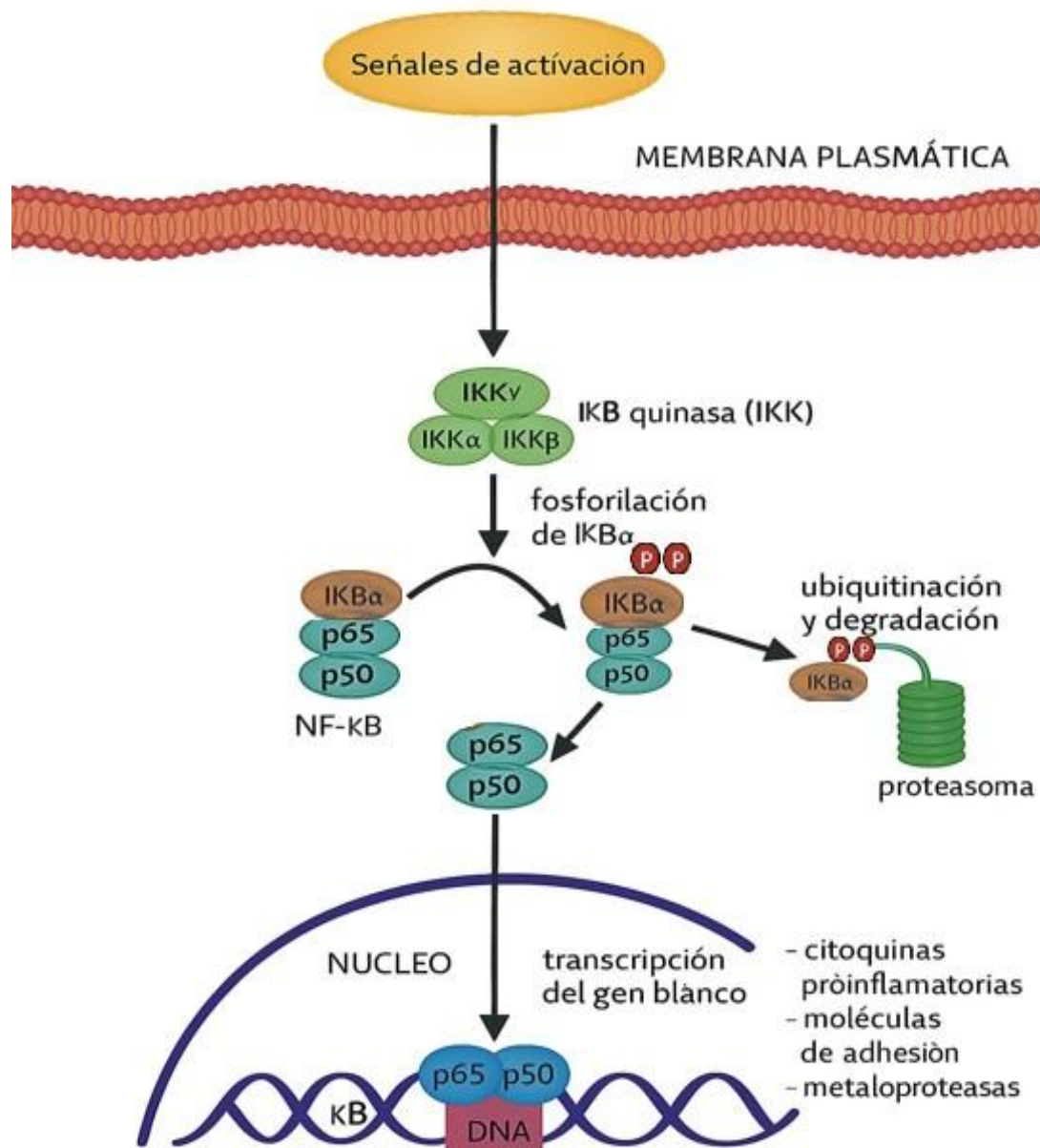


Figura 2. Resumen del mecanismo de activación del NF κ B desde que está inhibido en citoplasma hasta su translocación y comienzo de la transcripción a nivel nuclear. (Adaptación de T. Gilmore, 2015).

1.4.1. Vía de señalización del NFkB

En los últimos años, ha quedado claro que existen al menos dos vías para la activación de NFkB. Por un lado, la vía "canónica" que es desencadenada por productos microbianos y citoquinas proinflamatorias tales como TNFa e IL-1 (mencionadas anteriormente) que generalmente conduce a la activación de RelA o cRel. Por el otro lado, la vía "alternativa" o no canónica de NFkB, que se activa por citoquinas de la familia TNF—linfotóxina B (TNFSF3), ligando CD40 (CD40L y TNFSF5), factor activador de células B (BAFF y TNFSF13B) y activador del receptor de ligando NFkB (RANKL y TNFSF11) pero no TNFa, resultando en la activación del complejo RelB/p52. (Lawrance, T. 2009)

1.4.1.1. Vía canónica

El NFkB es activado luego de la degradación del Ikb α , que resulta en la translocación nuclear del complejo NFkB, principalmente como dímero p50/p65. La degradación del inhibidor se da mediante la fosforilación de Ikb por la IKK y su posterior degradación proteosomal.

Cuando llega a la célula la señal de activación, se fosforilan 2 residuos serina del Ikb (Ser32 y Ser36 de Ikb α en humanos) localizados en el dominio regulatorio del Ikb y entonces ésta se ubiquitina, lo que conduce a una degradación mediante una estructura celular llamada proteasoma. Con la degradación de este inhibidor Ikb el complejo NFkB ahora está "libre" y puede translocar al núcleo en donde activa la expresión de ciertos genes al unirse al sitio de unión para NFkB en ADN. La activación de estos genes produce una respuesta fisiológica, por ejemplo, una respuesta inflamatoria o inmune, de supervivencia o proliferación celular. Es el mismo NFkB quién enciende la expresión de su propio represor Ikb α por lo que, este inhibidor recientemente sintetizado, vuelve a unirse al NFkB inactivándolo y así se genera un feedback negativo que resulta en la oscilación de los niveles de actividad del NFkB (Karin, M. 2000; Basak, S. 2007)

1.4.1.2. Vía alternativa o no canónica

El procesamiento de p100 sirve tanto para generar p52 como para inducir la translocación del heterodímero RelB/p52 (N.S. Tapias, 2018). El complejo RelB/p52 se activa usando un mecanismo que se basa en la inducción del procesamiento de p100 en vez de la degradación por Ikb α . En esta vía entonces la activación del NFkB se da por una quinasa inducible (NIK) que lleva a la fosforilación y subsecuente procesamiento proteasomal del p100 para transformarse en la subunidad madura p52. Luego, p52 se une a RelB formando un dímero que puede translocar al núcleo uniéndose a sus regiones de unión sobre ADN y regular así la expresión génica. En contraste con la vía canónica, que el señalamiento se da por el regulador NEMO unido a IKK, en esta vía no canónica o alternativa el señalamiento depende de la enzima NIK para que p100 se transforme en p52. Estudios recientes muestran que la síntesis

de los constituyentes de la vía no canónica, RelB y p52, está controlada por la vía canónica a través de IKK- $\text{I}\kappa\text{B}$ -RelA. Esto sugiere que existe una red integrada del NF κ B que se basa en la activación de ambos, RelA(p65) y RelB, por lo que un mal funcionamiento de la vía canónica conducirá a una respuesta aberrante de la vía no canónica (Novack, D. 2003; Bonizzi G. 2004).

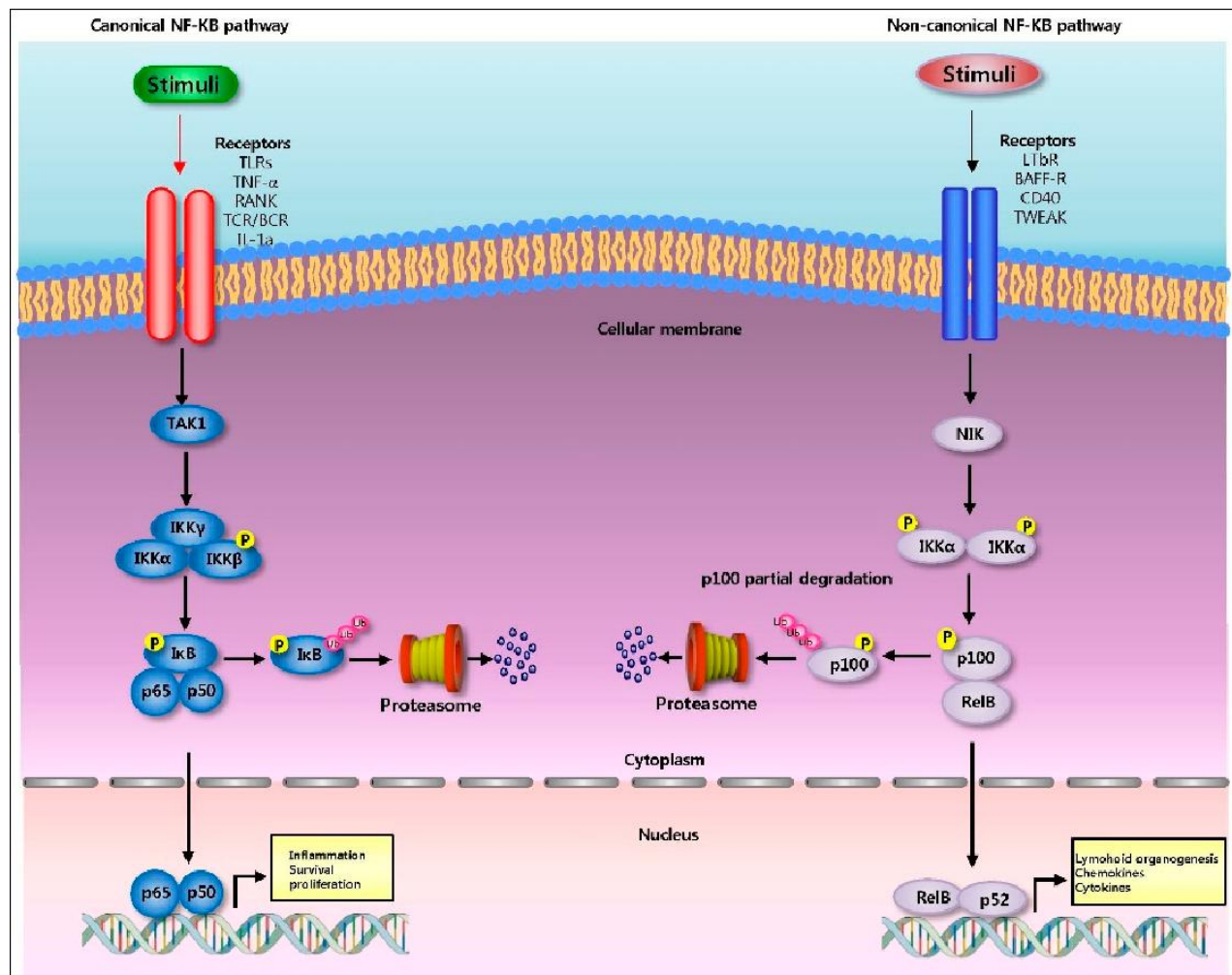


Figura 3. La vía canónica NF κ B (izquierda) inducida por señales que incluyen antígenos, ligandos de TLR y citoquinas tales como TNF utiliza una amplia variedad de adaptadores de señalización para acoplar y activar la subunidad IKK β del complejo IKK. La fosforilación de las proteínas I κ B unidas a dímeros de NF κ B por IKK β da como resultado ubiquitinación (Ub) de I κ B y degradación inducida por proteasoma. Esto permite NF κ B entrar en el núcleo y participar en el control de la transcripción de genes que codifican funciones tan diversas como la inflamación, la supervivencia celular y la división celular. **La vía no canónica (derecha)** en la que participan los miembros de la familia de citoquinas de tipo TNF requiere que NIK active IKK α , que luego fosforila p100 (NF- κ B2), desencadenando su procesamiento proteasomal necesario para la activación de dímeros p52-RelB. Entre sus funciones, este heterodímero específico de NF- κ B controla la expresión génica crucial para órganos linfoides. (Adaptación de Hee Park M., Tae Hong J., 2016)

1.5. Rol del NFkB en enfermedades

La activación del NFkB afecta las marcas distintivas del cáncer y enfermedades inflamatorias a través de la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular, supervivencia, angiogénesis, inflamación y promoción y metástasis tumoral. (Basak, S. 2007)

1.5.1. NFkB y su vinculación con la inflamación

El factor de transcripción NFkB regula genes responsables tanto de la respuesta inmune adaptativa como innata. Luego de la activación de los receptores celulares T o B, NFkB es activado por distintas señales. Por ejemplo, cuando se activan los receptores de las células T, una protein-quinasa llamada Lck es reclutada y ella fosforila los residuos tirosina del inmunoreceptor presentes en la cola citoplasmática de los CD3. Luego, se recluta ZAP70 que también fosforila los residuos tirosina del receptor ayudando a reclutar enlaces para la activación de la célula T y activa la fosfolipasa C que causa la activación directa de la proteinquinasa C (PKC). A través de esta cascada de fosforilación, un complejo de quinasas es activado y el NFkB entra al núcleo para regular positivamente a los genes involucrados en la proliferación celular, maduración y desarrollo.

Hay que recordar que NFkB está crónicamente activado en muchas enfermedades inflamatorias, incluidas la inflamación intestinal, artritis, sepsis, gastritis, asma y esclerosis, entre otras. También ha sido asociado con esquizofrenia (Song, X., 2009). Esto es importante de notar porque la elevación sérica de muchos marcadores de la activación del NFkB, como puede ser la osteoprotegerina, están asociados con una elevada mortalidad especialmente asociada a enfermedades cardiovasculares (Lieb W., 2010).

Durante la inflamación, la función de una célula depende de las señales en respuesta al contacto con las células adyacentes y a las combinaciones de hormonas, especialmente citoquinas que actúan sobre ella a través de receptores específicos (Hajishengallis, G. 2013). El fenotipo de una célula dentro de un tejido se desarrolla mediante la estimulación mutua de señales que coordinan su función con otras células, ya que las células alteran su fenotipo y gradualmente expresan combinaciones de genes que preparan el tejido para la regeneración después de eliminar la causa de la inflamación. Las respuestas de retroalimentación que se desarrollan entre las células residentes de tejidos y las células circulantes del sistema inmunológico son importantes. La fidelidad de las respuestas de retroalimentación entre diversos tipos de células y el sistema inmunológico depende de la integridad de los mecanismos que limitan la gama de genes activados por NFkB, permitiendo sólo la expresión de genes que contribuyen a una respuesta inmune eficaz y, posteriormente, una restauración completa de la función del tejido después de la resolución de la inflamación (Vidal, PM., 2013). Un detalle no menor es que, en células inflamatorias, la activación continua del NFkB puede promover la producción de

especies reactivas de oxígeno (ROS) y así dañar el ADN alrededor de las células epiteliales (Grivennikov, S, 2010) lo que podría conducir, eventualmente, a otras patologías como cáncer (que se explica su relación con NFkB más detalladamente a continuación). La inflamación es un proceso que prueba la veracidad de los componentes tisulares porque el proceso requiere coordinación de la expresión génica entre diversos tipos celulares (Mecollari V, 2014).

1.5.2. NFkb y el cáncer

Dado que el NFkB regula la proliferación y supervivencia celular, en muchos tipos de tumores humanos se sabe que este factor de regulación está constitutivamente activo (Hee Park M., Tae Hong J., 2016). Este hecho ha sido asociado con varios aspectos de la tumorigénesis dado que el NFkB es capaz de mantener la expresión de genes que mantienen a la célula proliferando en condiciones que normalmente causarían la apoptosis (Nelson, D, et al, 2004).

En células tumorales, el NFkB es activado por mutaciones en genes que codifican el factor de transcripción o en genes que controlan su actividad. Además, algunas células tumorales secretan factores que causan la activación del NFkB según reportan Y. Ben-Neriah (2011) y D. Guttridge (1999). Bloquear al factor de transcripción puede provocar que la proliferación celular finalice, que la célula muera o que se vuelva más sensible a la acción de agentes antitumorales, de ahí su importante rol en esta enfermedad. De hecho, varios estudios han documentado una actividad elevada o constitutiva del NFkB unido a ADN tanto en linajes celulares de carcinomas mamarios como en células de cáncer primario de mama (Sovak, M y Bellas, R).

En el cáncer, los mecanismos que regulan la expresión génica en respuesta a estímulos inflamatorios se vinculan a su supervivencia con los mecanismos que coordinan su fenotipo y su función con el resto de los tejidos. Esto es a menudo evidente en la regulación de la actividad gravemente comprometida de NFkB, que permite a las células cancerosas expresar cohortes anormales de los genes target del NFkB (Grivennikov, S. 2010). El resultado es que no sólo las células cancerosas funcionan anormalmente, sino también las células de los tejidos circundantes alteran su función. En realidad, la investigación ha demostrado que varios tipos de células en el microambiente del cáncer pueden cambiar sus fenotipos para apoyar el crecimiento de las células cancerosas (Bonavita, E. 2015).

1.5.3. NFkB y su vinculación con enfermedades autoinmunes

La autoinmunidad se produce como resultado de una reacción inmunitaria contra los autoantígenos, lo que conduce a una inflamación crónica y destrucción de tejidos. NFkB ha sido implicado en la patogénesis de una serie de enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes tipo I, esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal. Aunque la activación

de NFkB ocurre de forma transitoria durante una respuesta inmune normal, es crónicamente activado en los tejidos afectados de enfermedades autoinmunes.

Una acción patológica bien reconocida de NFkB es la inducción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, que median el reclutamiento de células inmunitarias y el establecimiento de la inflamación. Además, NFkB promueve la activación de células T autoinmunes directa o indirectamente mediante la modulación de la función de las células dendríticas. (Cong Sun, et al, 2013).

1.5.4. NFkB como target terapéutico

La metodología de inhibir al NFkB tiene potencial terapéutico para ser aplicado en cáncer y enfermedades inflamatorias. Muchos productos naturales poseen actividad anticancerígena y antiinflamatoria, habiendo demostrado que logran inhibir por algún mecanismo al factor de transcripción antes mencionado. El ejemplo más claro de este hecho son las wedelolactonas (Tanabe K, 2010), que inhiben la quinasa Ikb suprimiendo así tanto la inducción de la actividad por el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNFa) como la fosforilación de la Ser32 y la Ser36 del Ikb fundamentales para su acción.

Otros compuestos que han sido reportados como inhibidores de uno o más pasos en la cascada de activación del NFkB son lantolactonas (Wei, W, 2013), casticina (Koh, D, 2011), ácido pseudolarico B (Li, T, 2009), entre otros. Además, muchos antioxidantes como tioles, quelatos de calcio, derivados de vitamina C y E han sido utilizados para inhibir al peróxido de hidrógeno (Sen, C, 1996). Posiblemente, muchos de estos agentes actúen como scavengers de ROS.

Dentro de los polifenoles, compuestos que van a ser para nosotros el eje central de la tesis, se ha reportado que un éster de ácido cafeico puede interferir directamente con la unión del NFkB al ADN pero esto puede ser revertido utilizando ditiotreitól (Singh, S, 1995).

Por último, se ha reportado también que concentraciones elevadas de ácido acetilsalicílico (aspirina) pueden bloquear la actividad del NFkB por unión directa a la IKK reduciendo la capacidad de esta de unirse al ATP (Yin, M, 1998). Además, también se sabe que este fármaco inhibe la acción proteasomal y en consecuencia interfiere con la degradación del Ikb. Por lo tanto, se podría decir que, altas dosis de aspirina pueden tener aplicaciones en patologías en donde la actividad del NFkB está involucrada como por ejemplo cáncer, diabetes y enfermedad coronaria (Yuan, M 2001)

De todo lo antes planteado es que deducimos que existen dos localizaciones posibles para el NFkB (una en citoplasma y otra a nivel nuclear – ver Figura 2), por lo que es posible postular dos mecanismos de acción de los fenoles como antiinflamatorios: uno sería en el citoplasma, en donde se podrían unir a IKK y así impedir la

degradación del complejo inhibidor I κ B. La otra sería a nivel nuclear, a través de la unión al NF κ B, inhibiendo de ese modo la transcripción.

En esta Tesis, hemos preferido estudiar el potencial antiinflamatorio que poseen los polifenoles presentes en los orujos de uva sobre el NF κ B a nivel nuclear. En consecuencia, el modelo diseñado para realizar el estudio *in silico* es un complejo ternario NF κ B-DNA-inhibidor, siendo este último en nuestro caso el conjunto de fenoles extraídos de orujos de uvas y caracterizado por HPLC-MS (como se explica más adelante).

En particular, la estructura tridimensional del factor NF κ B existe en la base de datos PDB, lo cual puede representar una ventaja en el momento de pensar en desarrollar tratamientos computacionales de su vinculación con los polifenoles.

1.6. Uso de los métodos *in silico* en el contexto del estudio de compuestos polifenólicos y su articulación con modelos experimentales

Según expresa Richard Colquitt en su trabajo "*in silico modelling of physiologic systems*", el modelado *in silico* es "aquel en el que se desarrollan modelos informáticos para explicar un proceso farmacológico o fisiológico, es una extensión lógica de la experimentación controlada *in vitro*" (Colquitt R. et al, 2011). El modelado *in silico* combina las ventajas tanto de la experimentación *in vivo* como *in vitro*, sin someterse a las consideraciones éticas asociadas a los experimentos *in vivo*. A diferencia de los experimentos *in vitro*, que existen de forma aislada, los modelos *in silico* permiten al investigador incluir un conjunto virtualmente ilimitado de parámetros, lo que hace que los resultados sean más aplicables al organismo en su conjunto. Sin embargo, la utilidad de estos modelos se basa tanto en la validez del marco teórico como en las suposiciones que se realizan para su desarrollo siendo estas sus principales limitaciones.

Los análisis *in silico* nos permiten analizar las interacciones a nivel atómico-molecular lo que nos facilita, muchas veces, explicar la vinculación de la estructura con el efecto. En nuestro caso puntual, dado que el NF κ B toma relevancia en la respuesta inflamatoria al interaccionar el dímero p65/p50 con el ADN para comenzar la transcripción de factores pro-inflamatorios, nuestro objetivo es lograr modular tal efecto mediante una inhibición de la interacción, mediada por polifenoles. En este aspecto, tal como se explicó anteriormente, los métodos *in silico* son ideales para la visualización y medidas de parámetros fisicoquímicos de la interacción ADN/NF κ B.

Los métodos idóneos, dentro de la metodología *in silico*, para esta propuesta, son anclaje molecular (Docking) y Dinámica Molecular.

Los métodos de docking, denominados también programas de acoplamiento molecular, tal como lo indica su nombre, intentan predecir la conformación y la orientación del ligando en el sitio activo, realizando una exploración heurística de las posiciones relativas ligando-proteína, y evaluando las interacciones intermoleculares

en cada posición explorada. Como resultado de esta exploración, se obtiene una colección de posiciones probables de acoplamiento ligando-proteína, ordenadas según el valor que una función de evaluación (scoring function) que da a cada posición. Estos dos pasos consecutivos, exploración y evaluación (placement and scoring), son resueltos de diversas formas en los programas de docking disponibles (Wang, R, 2002).

La dinámica molecular (MD, Molecular Dynamics) es un tipo de simulación molecular computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante las ecuaciones del movimiento de Newton. Operacionalmente, es un método para generar las trayectorias de un sistema compuesto de “N” partículas por integración numérica directa de las ecuaciones de movimiento de Newton, con especificaciones de un potencial de interacción interatómico de condiciones iniciales y de frontera adecuadas. MD es un método de modelado y simulación a nivel atómico cuando las partículas en cuestión son los átomos que constituyen el material o sistema de estudio. Por medio de MD, se pueden calcular diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema como la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus dianas biomoleculares o receptores, e incluso, describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones (Lozano-Aponte, J, 2014).

En suma, en esta Tesis, enriquecemos los estudios computacionales *in silico* con la aplicación de metodología analítica de laboratorio húmedo para estudiar la capacidad antiinflamatoria y antioxidante que posea una mezcla polifenólica proveniente de orujos de uva y, en especial, su vinculación con el factor NFκB.

2. HIPÓTESIS

Los polifenoles contenidos en orujos de uva son capaces de atrapar especies reactivas de oxígeno e interferir con el normal funcionamiento del factor NFκB a nivel nuclear lo cual tendría como efecto provocar una actividad antioxidante y antiinflamatoria.

3. OBJETIVOS

Objetivos generales

- ❖ Desarrollar un extracto a partir orujos de uvas y caracterizar sus capacidades como antioxidante y antiinflamatorio por métodos *in vitro* e *in silico* y su vinculación con el factor de transcripción nuclear NFκB.

❖ **Objetivos específicos**

- ❖ Desarrollar un proceso de obtención de un “cóctel polifenólico” a partir de extractos de orujos de uvas
- ❖ Determinar el contenido fenólico en extractos orujos de uvas.
- ❖ Analizar la capacidad antioxidante midiendo la capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno (ROS).
- ❖ Analizar la capacidad antiinflamatoria de los fenoles del concentrado de vid (orujos) a través de la medición de su efecto sobre el factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB)
- ❖ Explicar mediante modelos *in silico* un posible mecanismo de acción de los polifenoles sobre el NFkB

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Infraestructura Bioinformática: Software y Hardware

Todos los estudios fueron realizados en el laboratorio del Área Bioinformática, Departamento DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República.

La estación de trabajo utilizada para docking contaba con el sistema operativo Linux Mint 18 Cinnamon 64-bit. Una unidad de proceso central (CPU) Intel(R) Core(TM) i7-2600 CPU @ 3.40GHz, tarjeta gráfica GPU GTX 980 Ti NVIDIA Corporation Device 1c02.

Para dinámica molecular se utilizó una estación de trabajo que contaba con el sistema operativo Linux Mint 18 Cinnamon 64-bit, una CPU Intel(R) Core(TM) i7-4790 CPU @ 3.60GHz tarjeta gráfica GPU GTX 980 Ti NVIDIA Corporation Device 1c02.

Además, se utilizaron 4 discos externos para backup totalizando 8 TB de capacidad de almacenamiento.

Los programas de simulación utilizados fueron:

MOE2022.02 (Molecular Operating Environment) para modelado molecular, cálculo de descriptores, docking molecular con el campo de fuerzas MMFF94x y el Amber99.

AutoDock 4.2.6 como alternativa de docking.

NAMD (Not (just) Another Molecular Dynamics program) para minimización de energía, optimización de la geometría y dinámica molecular con el campo de fuerzas CHARMM36.

4.2. Investigación bibliográfica y creación de la base de datos de Compuestos Bioactivos.

Se realizó una búsqueda exhaustiva en las editoriales y revistas ScienceDirect, American Chemical Society, Nature Published, Biomed Central, Science y Clinical Science.

Para la base de datos de Compuestos Bioactivos se partió de conocimiento previo de estructuras polifenólicas que se supuso están presentes en orujos de uva y propóleos (Paulino et al, 2015; Alvareda et al., 2019). En ese entonces, la base utilizada fue una base de 123 estructuras. Durante esta investigación se desarrolló un proyecto CSIC-VUSP “Provitis: Desarrollo de un extracto encapsulado concentrado en antioxidantes extraído de Propóleos y Orujos de uvas Uruguayos”, cuya responsable es la Prof. Margot Paulino, y del cual participé en toda su ejecución. A partir del 2019, se desarrolló un proyecto de vinculación con la empresa Grupo Traversa S.A. y financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (código de proyecto ALI_2_2018_1_153715), en el cual nos concentramos en el contenido de los polifenoles en los orujos de uvas Tannat, que concluyó en verificar la presencia de 43 polifenoles, los cuales fueron a continuación estudiados en esta Tesis y también publicados (Fariña et al, 2023).

La base de datos de ligandos fue importada al programa MOE2022.02 para compatibilizar el formato propio de este software. Las optimizaciones geométricas, minimizaciones energéticas y las cargas atómicas fueron calculadas utilizando el hamiltoniano semiempírico Austin Model 1 (AM1, Dewar M.J.S., et al, 1985) implementado en el módulo Mopac57 de MOE. El dataset fue almacenado en formato *.mdb (MOE DataBank), lo que permitió una lectura posterior conservando las cargas parciales calculadas.

4.3. Preparación de la proteína

- *Selección del modelo cristalográfico*

El modelo cristalográfico es un archivo de coordenadas cartesianas que representan la posición espacial de los átomos de la proteína de interés. En nuestro caso fue NFkB, cuya estructura tridimensional fue dilucidada por el método cristalográfico y extraída de la base de datos *Protein Data Bank (PDB)* bajo el código 1VKX.

Los datos cristalográficos han sido presentados con una resolución de 2.9 Å (Chen et al, 1998).

- *Protonación de la proteína*

Tal como es característico de los modelos cristalográficos, no se incluyen las coordenadas espaciales de los hidrógenos no polares. Por lo tanto, se agregaron y

optimizarán todos los hidrógenos, teniendo en cuenta las condiciones del entorno experimental, como el pH, temperatura y salinidad de un medio fisiológico.

En consecuencia, para la protonación de la estructura proteica, se consideró un modelo experimental a 300K, un pH de 7.0, y la salinidad 0.9, como si fuese el medio nuclear expuesto para estos tipos de proteínas (factores de transcripción).

- *Cargas parciales*

Un tercer requisito para preparar el archivo que corresponde al receptor, es adjudicar las cargas parciales a todos los átomos, incluyendo los hidrógenos recién insertados. Esto se hizo seleccionando el campo de fuerza Amber99, que además de todos los átomos, también considera los pares de electrones solitarios que se puedan encontrar en la estructura molecular.

- *Minimización energética*

Una vez que se obtuvo el archivo del receptor con todos los átomos y correspondientes cargas calculadas y asignadas, se procedió a minimizar la energía del sistema. Para ello se utilizó un método mecánico cuántico semiempírico utilizando el hamiltoniano AM1. En cada etapa se siguen ajustando las posiciones y cargas de todos los átomos incluyendo hidrógenos y pares electrónicos. Se estableció como límite para las sucesivas iteraciones entre una estructura y la siguiente en el proceso iterativo de minimización, que ambas presenten un Root Mean Standard Error (RMSE) máximo de 0.01 kcal/mol y se restringió la quiralidad de los aminoácidos presentes en la proteína, pero con la flexibilidad suficiente para las cadenas laterales.

- *Sitio de unión*

Dado que nos encontramos frente a una proteína co-cristalizada con ADN, en donde no existe un ligando que se pueda utilizar como “molde” para ubicar un posible sitio de unión o anclaje, se asumió que la mayor interferencia se lograría ubicando los compuestos anclados en el sitio de mayor interacción entre NF-KB y ADN.

Para ello, se identificaron los residuos importantes para la interacción proteína-ADN los cuales, basado en lo que se informa en el estudio cristalográfico (Chen et al, 1998), son:

- Para la subunidad p50: Phe15, Arg16, Arg18, Glu22, Ser25, His26, Gly27, Gly28, Lys39, Ser202, Lys203 y Lys211.
- Para la subunidad p65: Arg15, Arg17, Tyr18, Cys20, Glu21, Val102, Lys104, Lys105, Arg106 y Arg169.

En consecuencia, los residuos antes mencionados para cada subunidad fueron considerados como “sitio de unión” para los fenoles ensayados en el *docking* (anclaje molecular), para p50 y p65 respectivamente.

- *Metodología de placement*

Para la metodología de posicionamiento (*placement*) se consideraron dos alternativas. “*Triangle Matcher*” y “*Alpha Triangle*”. Se decidió utilizar “*Triangle Matcher*” por ser la opción recomendada por los desarrolladores de MOE para ligandos de tamaño similar a los polifenoles. Las poses en este método se generan alineando tripletes de átomos del ligando con tripletes de esferas alfa (que representan sitios de anclaje en el receptor) de una manera mucho más sistemática que el método “*Alpha Triangle*”.

- *Metodología de evaluación (scoring)*

Entre las varias funciones normalmente usadas para la evaluación de las poses de los ligandos con la proteína, utilizaremos la función *Affinity dG*.

En Affinity dG, se estima la contribución entálpica a la energía libre usando una combinación lineal de términos expresada en la *Ecuación 1* según se describe en MOE 2022.02.

$$G = Chb fHb + Cion fion + Cmlig fmlig + Chh fhh + Chp fhp + Caa faa$$

Ecuación 1

En donde:

f - describe aportes específicos a la energía libre

C - son coeficientes que pesan las contribuciones de la afinidad estimada.

hb - interacciones entre pares dadores y aceptores de hidrógeno.

ion - interacciones iónicas. Se utiliza un término del tipo Coulomb para evaluar las interacciones entre grupos cargados. Esto puede sumar o restar, según el caso, a la energía de unión.

mlig - interacciones entre Nitrógenos o Azufres y metales de transición.

hh - interacciones hidrofóbicas

hp - interacciones entre átomos polares e hidrofóbicos. Estas interacciones en general son desfavorables.

aa - interacciones entre cualquiera dos átomos. Esta interacción es débil y en general favorable.

- *Cálculo de acoplamiento molecular (Docking) mediante MOE*

El programa MOE puede utilizarse para generar y evaluar orientaciones de uno o varios ligandos. La búsqueda de la mejor pose puede realizarse entregando al programa una base de datos con las estructuras tridimensionales de cada ligando a

partir de la cual se proponen orientaciones para todas las estructuras de la base y se informan los ligandos con la mejor evaluación (score) o sea, con la mejor energía de interacción con el receptor.

Como es característica de los métodos de evaluación de este tipo, la interacción ligando-receptor se estudia en ausencia explícita de solvente, habiendo algunas funciones de score que contienen una parte del algoritmo con un coeficiente que depende del soluto que se considere. En nuestro caso puntual, los estudios de *docking*, la función *Affinity dG* no considera tal aporte y entonces se puede considerar que los cálculos se hicieron en vacío.

- *Cálculo alternativo de acoplamiento molecular mediante AutoDock*

Como primer paso se realizó un “*blind*” *docking*, lo que significa buscar poses sobre toda la superficie de la proteína, considerando todos los átomos como receptor, sin definir un lugar específico. Como ligandos se utilizó, como primera opción, una base de 123 polifenoles los cuales fueron identificados en trabajos previos en muestras variadas (orujos, propóleos y otras) (Alvareda et al., 2019) y como siguiente opción la base de 43 polifenoles identificados en orujos de uvas Tannat (Fariña et al., 2023). Este “*blind*” *docking* se llevó a cabo utilizando el programa Autodock/VINA (AutoDock Vina v1.2.x (2021–present): <https://github.com/ccsb-scripps/AutoDock-Vina>).

Luego de analizar el “*blind*” *docking*, se identificaron los sitios que contenían mayor cantidad de estructuras cerca de la región de interfase NFkB-DNA, localizada en el surco mayor del ADN. A continuación, se realizó una búsqueda en SiteFinder que confirmó que la interfase entre el NFkB y el ADN era el mejor sitio para hacer futuros *dockings*.

Un segundo *docking* molecular fue llevado a cabo con la misma base de 43 polifenoles de orujos de uva Tannat, pero esta vez en el sitio específico que se había encontrado previamente. La función de *Affinity Scoring*, implementada en VINA, fue utilizada para seleccionar así las mejores 9 poses.

- *Dinámica Molecular*

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron utilizando la base de 43 polifenoles de orujos de uvas Tannat. Para todas las simulaciones se utilizó el programa NAMD versión 2.14 con campo de fuerza Amber10 (Perlman et al, 1995). La parametrización de los ligandos se realizó de forma estándar, mediante el paquete de Antechamber se asignaron los tipos de átomos del campo de fuerza GAFF y las cargas de los átomos mediante el esquema AM1-BCC (Jakalian et al, 2002)

El complejo ADN-proteína-ligando se construyó con AmberTools. La caja de agua se construyó con el modelo de agua TIP3P (Pekka and Lennart, 2001), con una distancia de margen de 12 Å desde los átomos más externos a los bordes de la caja en cada

eje. Las moléculas de agua se consideraron rígidas y se utilizó el algoritmo de constricción de Settle para su simulación.

- **Sistemas simulados**

A continuación, se detallan los sistemas simulados por DM

Tabla 1. Sistemas simulados por DM en donde “M3O” corresponde a Malvidin-3-O-glucosido, “PB4” corresponde a Procianidina B4 y “QUE” corresponde a Quercetina.

Complejo	Nº de átomos	Masa total	Carga total	Densidad de masa	Densidad de átomos	Volumen
M3O	93994	582026	0	1.01262	0.0984792	953008
PB4	92222	571392	0	1.00272	0.0974586	953008
QUE	95230	589443	0	1.02223	0.0994536	953008

La celda periódica, centrada en el centro de masas del sistema, tiene un tamaño de 127 x 112 x 67 Å°.

La simulación constó con cuatro etapas:

- Refinamiento mediante minimización de energía hasta alcanzar un gradiente de 0.1 kcal/mol/Å² y aplicando restricciones armónicas sobre la cadena principal de la proteína para evitar posibles deformaciones en etapas iniciales.
- Etapa de calentamiento de 0 a 300 K en 100 ps de simulación, manteniendo la presión constante a 1 atm y las restricciones armónicas sobre la cadena principal
- Etapa de simulación de dinámica molecular a temperatura constante de 300 K durante 1 ns, manteniendo las restricciones armónicas de las etapas anteriores.
- Etapa de simulación de dinámica molecular a temperatura constante (300 K) durante 100 ns, sin restricciones armónicas para la recolección de datos.

Para todas estas condiciones periódicas se fijó un *time step* de 2 fs. La electrostática del sistema se calculó mediante PME con una grilla de 1 Å° en cada eje y un *cutoff* de 9 Å°.

Las ecuaciones de movimiento se resolvieron utilizando las ecuaciones dinámicas de Langevin (colectividad canónica o canonic ensamble NPT) algoritmo descrito en el Manual de MOE 2022.02 (Ecuación 2):

$$m_i \frac{d^2 x_i(t)}{dt^2} = F_i x_i(t) - \gamma_i \frac{dx_i(t)}{dt} m_i + R_i(t)$$

Ecuación 2. Ecuaciones dinámicas de Langevin dónde:

m_i es la masa del átomo “i”

$x_i(t)$ es la posición del átomo “i” al tiempo t

$F_i x_i(t)$ es la fuerza que actúa sobre el átomo “i” al tiempo t

γ_i es el coeficiente de fricción que actúa sobre el átomo “i” (5 ps-1)

$R_i(t)$ son las fuerzas aleatorias que actúan sobre el átomo “i” al tiempo t

El muestreo consistió en tomar medidas de propiedades como la energía, el RMSD, y medidas de interacción cada 2 ps. Luego de finalizar las etapas de simulación de los modelos, se analizó su comportamiento energético y estructural en el equilibrio.

- *Interacción Uab*

La energía de interacción del ligando con todo el sistema molecular modelado (proteína, ADN, solvente) se evaluó a lo largo de la dinámica molecular, de acuerdo a la ecuación definida en el programa MOE 2022.02 (Ecuación 3)

$$\langle U_{ab} \rangle = \langle U - U_a - U_b \rangle$$

Ecuación 3 donde,

U es la energía potencial total del sistema a analizar

U_a es la suma de la energía potencial del sistema a analizar excluyendo al ligando (el ligando es excluido del sistema)

U_b es la energía potencial del ligando

U_{ab} es la energía potencial de interacción ligando-sistema

La U_{ab} está compuesta por las componentes no enlazantes del campo de fuerza, que se separan en dos términos: las contribuciones de Van der Waals (VDW) y la componente electrostática (ELECT).

- *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MMPBSA)*

MMPBSA (Hou et al, 2011) es un método útil para la estimación de la energía libre de unión que combina mecánica molecular y modelos de solvente implícito continuo. Los procesos de unión receptor-ligando se descomponen en dos etapas: asociación en fase gaseosa y solvatación en fase acuosa. Mientras que la energía en fase gaseosa

se calcula con campos de fuerza de mecánica molecular, los términos de solvatación se cuantifican usando modelos de solvente implícito.

El muestreo de conformaciones se tomó de las trayectorias generadas durante las dinámicas moleculares de equilibrio. Se calcularon tres contribuciones energéticas siguiendo el método MMPBSA (Ecuación 4).

$$\Delta G_{binding} = \Delta H - T\Delta S = \langle \Delta MM_{gas} + \Delta G_{polar} + \Delta G_{nopolar} - T\Delta S \rangle$$

Ecuación 4 donde,

H es la entalpía

T es la temperatura absoluta (K)

S es la entropía del sistema

ΔMM_{gas} es la diferencia energética entre el complejo y la suma de las energías del receptor y el ligando por separado, calculada por mecánica molecular en fase gaseosa

ΔG_{polar} es la contribución polar a la energía libre de solvatación

$\Delta G_{nopolar}$ es la contribución no polar a la energía libre de solvatación

$T\Delta S$ es la contribución entrópica

Una asunción del método MMPBSA (Hou et al, 2011) es que, cuando se estudian diferencias entre las energías libres (expresadas como $\Delta\Delta G$) la contribución entrópica es similar y que por lo tanto los cambios de la energía libre debido al factor entrópico se anulan entre sí. En consecuencia, el término $T\Delta S$ puede ser ignorado en los métodos MMBPSA.

- **RMSD y RMSF**

El RMSD es la medida de la distancia promedio entre los átomos (generalmente los átomos de la cadena principal) de las proteínas superpuestas. En el estudio de conformaciones de proteínas, habitualmente se mide la similitud en la estructura tridimensional por el RMSD de las coordenadas atómicas de los carbonos alfa (C α) después de una superposición para remover los movimientos de cuerpo rígido como rotaciones y traslaciones, de este modo el RMSD mide el cambio estructural en un único escalar que engloba todos los cambios (Ecuación 5).

$$RMSD_{t_j} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i(t_j) - \underline{r_i})^2}$$

Ecuación 5. Algoritmo utilizado para el cálculo del RMSD en donde

N es el número de átomos usados para medir el RMSD, en general se utilizan los C α del sistema

$r_i(t_j)$ es la posición del átomo r_i al tiempo t_j

$\underline{r_i}$ es la posición de referencia del átomo r_i , como posición de referencia se suele emplear la estructura inicial, esto es átomo r_i al tiempo t igual a 0

La estabilidad estructural puede observarse como un valor bajo de RMSD en el tiempo, lo que indica que no existen grandes cambios conformacionales en la estructura.

El cálculo de la movilidad de los residuos que conforman a una proteína es una medida muy importante de su estabilidad. Una de las maneras de representarla es la fluctuación cuadrática media o RMSF (Root Mean Square Fluctuation), que es una medida de la desviación de las posiciones que ocupa el C α de cada residuo respecto a una ubicación espacial de referencia como puede ser el promedio de las coordenadas del *ensemble* (Ecuación 6):

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (\Gamma_i(t_j) - \underline{\Gamma_i})^2}$$

Ecuación 6. Algoritmo utilizado para el cálculo del RMSF en donde:

T es tiempo total de la simulación

$\Gamma_i(t_j)$ es la posición del centro de masas de la cadena principal del residuo Γ_i al tiempo t_j

$\underline{\Gamma_i}$ es el promedio de las posiciones del centro de masas de la cadena principal del residuo Γ_i , como posición de referencia.

Mientras mayor es el valor de RMSF de un residuo, este será más móvil.

Obtención y análisis de extractos

Extracción de polifenoles en orujos de uva

- *Preparado de las muestras de orujos de uva.*

Se obtuvieron muestras de orujos Tannat (5 muestras) y Cabernet Franc (1 muestra) ambas localizadas en el departamento de Canelones, todas provistas por dos empresas vitivinícolas colaboradoras del proyecto de investigación (Carrau S.A. y Amendola y Boido S.A.) que se desarrolló en el laboratorio en donde se implementó esta Tesis: “Provitis: Desarrollo de un extracto encapsulado concentrado en antioxidantes extraído de Propóleos y Orujos de uvas Uruguayos”, cuya responsable es la Prof. Margot Paulino, financiado por CSIC Programa VUSP y del cual participé en toda su ejecución.

Las muestras se guardaron protegidas de la luz en un freezer a -20°C hasta su procesamiento.

El primer paso que se realizó fue el secado a vacío de los orujos. Para ello, éstos se colocaron en una bandeja de aluminio y se los sometió a un secado en estufa de vacío a 200 mbar y 60°C hasta peso constante (aproximadamente 5 días). Luego del secado, se molieron con un mixer hasta obtener un fino polvo el cual fue almacenado protegido de la luz a temperatura ambiente hasta su posterior uso para extracción.

- *Obtención de los extractos de orujos de uva.*

Se decidió desarrollar un procedimiento extractivo para optimizar todas las condiciones que permitieran obtener la mayor concentración de polifenoles en el extracto filtrado. En una primera instancia, 1g de cada muestra (fino polvo) fue extraída con 25mL de distintas concentraciones de Etanol:Agua (EtOH:H₂O); las mezclas probadas fueron 100:0; 80:20; 50:50; 40:60; 20:80 y 0:100 EtOH:H₂O respectivamente. Posteriormente se caracterizaron fisicoquímicamente cada uno de ellos (como se explica en el próximo punto), resultando la mezcla extractiva 50:50 la mejor. El desarrollo continuó variando la cantidad inicial de masa, utilizándose 5g y 10g de las mismas muestras y extrayéndolas en la mezcla 50:50 EtOH:H₂O. Estas últimas muestras también fueron caracterizadas de la misma forma que las de 1g.

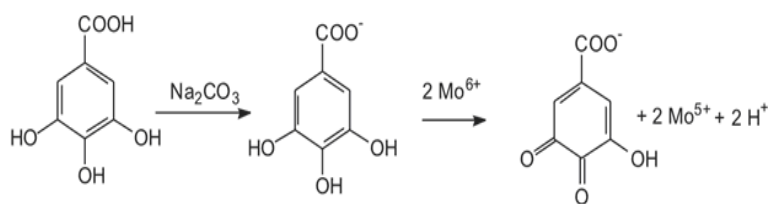
En todos los casos, el protocolo utilizado fue el siguiente: se pesó la cantidad indicada de polvo de orujo en balanza analítica y se la dejó macerando con 25mL de la mezcla EtOH:H₂O correspondiente durante 7 días a temperatura ambiente protegidos de la luz. En algunos casos se agregó agitación durante el proceso extractivo. A continuación, se filtraron los macerados a vacío utilizando un Büchner y filtro de papel. Los extractos se guardaron en heladera entre 4 y 8 $^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior caracterización. El sólido remanente en el filtro se descartó.

Análisis y caracterización de los extractos antes obtenidos

Para llevar a cabo esta parte del procedimiento se utilizaron varias técnicas, entre ellas Folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS, ORAC, FRAP y ESR.

- *Determinación de fenoles totales*

El método fue adaptado de Slinkard et al (1999). La determinación se realizó con la técnica de Folin-Ciocalteu, utilizando para ello una curva de calibración de ácido gálico.



El reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, compuestos que reaccionan con diferentes tipos de agentes reductores de la muestra (polifenoles, azúcares, ácido ascórbico, iones, etc). Así, el valor a informar será la máxima concentración o el máximo contenido de polifenoles según el caso. Las unidades empleadas serán miligramos de equivalentes de ácido gálico por litro de solución (mgeq/L).

Para el procesamiento de las muestras se preparó una solución de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) al 20 % m/V, pesando 4g de Na_2CO_3 y disolviendo en 20 mL de agua destilada a ebullición con agitación. En tubos eppendorfs se pipetea 10 μL de muestra (o ácido gálico para realizar la curva de calibración) y se agregaron 790 μL de agua destilada y 50 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agitó en vortex y a los 30 segundos se agregaron 150 μL de la solución de Na_2CO_3 antes mencionada. Los eppendorfs se incubaron en baño de agua a 40 °C por media hora en la oscuridad y se midió la absorbancia a 765 nm contra un blanco de agua destilada. El valor obtenido para las muestras se interpoló en la curva de calibración del ácido gálico obteniendo la concentración de polifenoles totales de la muestra. En caso de muestras que se fueron de escala, se realizaron diluciones 1/20 y 1/40 con agua destilada corrigiendo luego el valor obtenido en la curva por la dilución correspondiente.

- *Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH*

El método fue adaptado de Kuskoski et al (2005) y se basa en la reducción de la absorbancia a 517 nm del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) ocasionada por la presencia de antioxidantes en la muestra. Para la cuantificación de los mencionados antioxidantes se construyó una curva de calibración con ácido ascórbico y los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido ascórbico por litro de solución (mgeq/L).

Para el análisis se preparó una solución de unos 20 mg de DPPH• en 50 mL de metanol. La misma se diluyó luego unas 10 veces con el mismo solvente para obtener una absorbancia entre 0,8 y 1 a una longitud de onda de 517 nm. En tubos eppendorfs se agregaron 10 μL de muestra (o de ácido ascórbico para la curva de calibración) y posteriormente se le agregan 990 μL de DPPH• diluido (absorbancia entre 0,8-1), se incubó en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 517 nm contra un blanco de celda vacía (aire), según recomendaciones del método analítico. Se anota que el punto “cero” de la curva es una solución blanco.

El valor obtenido para las muestras se interpoló en la curva de calibración del ácido ascórbico obteniendo así la concentración de antioxidantes en las muestras. En caso de muestras que se fueron de escala, se realizaron diluciones 1/20 y 1/40 con agua destilada corrigiendo luego el valor obtenido por la dilución correspondiente.

- *Determinación de la capacidad antioxidante por el radical ABTS•*

Se adaptó el método de Re et al (1999). Es un ensayo basado en la reactividad del radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS•), que absorbe luz dando un color azul verdoso, el cual decrece en presencia de antioxidantes. El reactivo de ABTS• se forma a partir de la sal diamónica de ABTS• (38,4 mg) y $K_2S_2O_8$ (6,6 mg) al incubar en la oscuridad a temperatura ambiente por 16 horas en agua destilada y es estable por más de 2 días. Una vez formada la sal diamónica, ésta se diluyó unas 50 veces con etanol absoluto hasta llegar a una absorbancia de entre 0,6 y 0,8 a 734nm. Para cuantificar la capacidad antioxidante de las muestras, se construyó una curva de calibración de ácido ascórbico y los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido ascórbico por litro de solución (mgeq/L).

La reacción entre ABTS• y el ácido ascórbico (o las muestras) se alcanza cuando se tiene un valor de absorbancia constante. Para el ácido ascórbico esto ocurre aproximadamente entre 4 y 6 minutos luego de añadido el reactivo de ABTS•, mientras que para las muestras se necesitó un tiempo de al menos 15 minutos para que la reacción con los fenoles llegue al valor de absorbancia constante. Trabajando con poca luz, en tubos eppendorfs se agregaron 10 μ L de muestra (o ácido ascórbico) y 990 μ L de reactivo ABTS• y se midió la absorbancia a 734 nm a temperatura ambiente contra celda vacía como blanco. El valor obtenido para las muestras se interpoló en la curva de calibración del ácido ascórbico obteniendo así la concentración de antioxidantes en las muestras. En caso de muestras que se fueron de escala, se realizaron diluciones 1/20 y 1/40 con agua destilada corrigiendo luego el valor obtenido por la dilución correspondiente.

- *Determinación de la capacidad antioxidante por ORAC-FL*

Este método consiste en la pérdida de la fluorescencia de la sonda fluoresceína por parte de radicales peroxilo, los cuales se generan por descomposición térmica de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP)

Para llevar a cabo la reacción se deben pesar 1,51 mg de Fluoresceína y disolver en 1000 μ L de Buffer fosfato pH=7,4 (número MDL:MFCD00131855). De esta disolución se toman 10 μ L y se llevan a un volumen final de 1000 μ L en Buffer fosfato pH=7,4. Finalmente, de esta última disolución se toman 16 μ L y se llevan a 10 mL en Buffer fosfato pH=7,4.

En una placa de ELISA se colocaron 150 μ L de la dilución final de Fluoresceína (que tenía una concentración aproximada de 70 nM) y 25 μ L de la muestra. La placa se colocó en el multilector para un precalentamiento de 8 minutos, tiempo en el que se

preparó el ABAP pesando 81,36 mg y se disolvieron en 2 mL de Buffer fosfato pH=7,4. Al finalizar el mencionado tiempo, se adicionaron 25 µL de la solución de ABAP a cada pocillo y se dio inicio a la lectura del decaimiento en la intensidad de la fluorescencia. La fluorescencia se registró cada 1 min durante 50 min. En cada ensayo se utilizó un blanco con Fluoresceína y ABAP utilizando Buffer fosfato pH=7,4 en lugar de la solución compuesta. En cada ensayo también se utilizaron cinco soluciones de calibración de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, un análogo de la vitamina E soluble en agua CAS: 53188-07-01). Las concentraciones utilizadas fueron 2.0, 4.0, 6.0, 12.0 y 20.0 µM. La capacidad de inhibición se expresó como valores ORAC-FL y se cuantificó mediante la integración del área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia (AUC). Todas las mezclas de reacción se prepararon por triplicado y se realizaron al menos tres ensayos independientes para cada muestra.

Esta técnica se empleó solamente para los extractos de 5g y 10g de orujos de uva que fueron, tal como se explica en la discusión, los extractos seleccionados para continuar con la investigación, dado que tenían una concentración más elevada de bioactivos con respecto a la muestra inicial de 1g.

- *Determinación de la capacidad antioxidante por FRAP*

El ensayo FRAP fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain (1996) para medir el poder reductor en muestras de plasma, sin embargo, también se ha adaptado y utilizado para el ensayo de antioxidantes en productos botánicos (Prior et al., 2005). La reacción mide la reducción del complejo férrico-2,4,6,tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico (Fe^{3+} - TPTZ) se reduce a ion ferroso a bajo pH, causando la formación de un complejo ferroso-tripiridiltriiazina coloreado (Fe^{2+} - TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593nm (Benzie y Strain, 1996).

El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos en donde se agregaron 10 µL del extracto y 290 µL de reactivo FRAP recién preparado (Mezclar 1020 µL de solución tampón pH 3,6, 100 µL de TPTZ 10 mM y 100 µL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM). A continuación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 593nm a una temperatura de 37°C (lector termostatzado de placa). Para la curva de calibración se utilizó Trolox comercial (CAS: 53188-07-01) en las concentraciones de 0.14, 0.28, 0.56, 0.84, 1.12 y 1.14 mM. Los resultados de las muestras se interpolaron en dicha curva. El blanco en todos los casos fue agua HPLC.

Esta técnica se empleó solamente para los extractos de 5g y 10g de orujos de uva.

- *Capacidad scavenging por ESR.*

La resonancia de spin electrónico (ESR) mide la absorción de energía electromagnética por un centro paramagnético con uno o más electrones no apareados. Debido a la corta vida media del radical hidroxilo fue necesario utilizar la técnica de captura de espín (*spin trapping*).

La técnica de *spin trapping* consiste en identificar y detectar radicales libres de corta vida media que reaccionan con una molécula diamagnética (*spin trap*) dando lugar a la formación de un radical libre más estable (aducto) que el radical original, esta nueva especie puede ser detectada por ESR (Barriga-Gonzalez et al, 2015).

Los espectros de ESR se registraron en la banda X (9,85 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 con una cavidad rectangular y una modulación de campo de 50 kHz. Se estimó que las constantes de división hiperfina eran precisas dentro de 0,05 G.

La capacidad de eliminación de hidroxilo se evaluó mediante un sistema Fenton no catalítico y competitivo que utiliza DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido) como trampa de espín en medios básicos sin un Fe^{2+} catalizador de la formación de radicales (Yoshimura et al., 1999). La trampa de espín reacciona con los radicales hidroxilo para generar un aducto de espín que muestra una señal de control, que se cuantifica mediante ESR. La actividad de *scavenging* de cada muestra se estimó comparando las señales del aducto de DMPO-OH en la mezcla de reacción de radicales antioxidantes contra la reacción de control y se expresó como porcentaje *scavenging* del radical hidroxilo (Yoshimura et al, 1999). Las muestras se prepararon como sigue: Se mezclaron 100 μL de agua destilada y 50 μL de NaOH (25 mM), seguido de la adición de 50 μL de DMPO spin trap (concentración final 30 mM), 50 μL de muestra (1:1:2 En EtOH / H_2O / DMF) y finalmente 50 μL de peróxido de hidrógeno (30%). Para el blanco se utilizó la misma secuencia pero sustituyendo los 50 μL de muestra por el mismo volumen de agua destilada. La mezcla se puso en la celda ESR y el espectro se registró después de cinco minutos de reacción (Figura 4).

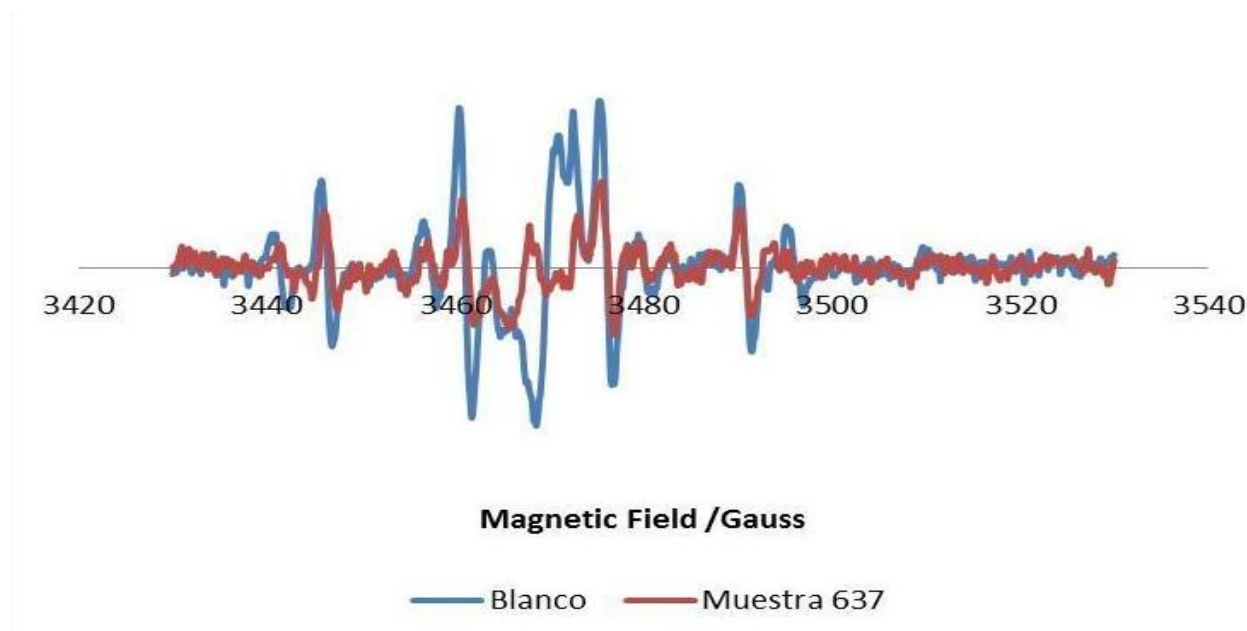


Figura 4. Ejemplo de espectro obtenido por ESR para la muestra 637 comparada contra el blanco.

Esta técnica se aplicó solamente a las muestras de 5g y 10g de orujos de uva.

● Determinación de correlaciones entre métodos analíticos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para cada extracto en cuanto a polifenoles totales y capacidad antioxidante (ABTS• y DPPH•), se analizó la existencia de correlaciones lineales entre ellas.

Perfil fenólico de los extractos

Se utilizó el equipo HPLC-DAD-MS/MS triple cuadrupolo Shimadzu 8040. La columna es una Nucleodur 100-5 C18 , 5 µm, 150 mm x 4.6 mm.

Los solventes utilizados para la fase móvil del HPLC son:

- (A) solución acuosa (0.1%) de ácido tricloroacético (TFA)
- (B) 100% acetonitrilo calidad HPLC.

Para la corrida se utilizó un gradiente creciente de reactivo (B) en la fase móvil según se explica a continuación: de 4% a 30% B durante 40 min, de 30 a 98% B durante 5 min, isocrático 98% B por 2 min, de 98 a 5% durante 1 min, isocrático 5% durante 4 min.

El flujo de fase móvil utilizado fue 1.3 mL/min durante toda la corrida, split 1:4, las muestras fueron diluidas 1/4 para su inyección y el volumen de inyección fueron 5 µL. Esta parte de la tesis se desarrolló gracias a la cooperación del Prof. Dr. Eduardo Boido uno de los coautores del manuscrito publicado en base a esta investigación (Fariña et al. 2023).

4.4. Ensayos In vitro

4.4.1. Modelo experimental in vitro

In vitro, del latín “dentro del vidrio”, hace referencia a una técnica experimental en un ambiente controlado fuera del organismo vivo. Muchos experimentos de biología celular son llevados a cabo bajo estas condiciones, en células previamente preparadas.

Este tipo de investigación apunta a describir los efectos de una variable experimental en un subconjunto de las partes constitutivas de un organismo. Es una técnica muy apropiada para deducir un mecanismo de acción, con menos variables que un ensayo *in vivo* y reacciones amplificadas que facilitan la comprensión.

La principal ventaja de trabajar *in vitro* es que permite una gran simplificación del sistema en estudio, por lo que el investigador puede centrarse en un pequeño número

de componentes. Por otro lado, la principal desventaja de este tipo de ensayos es que a veces puede ser muy difícil extrapolar, a partir de resultados obtenidos *in vitro*, a la biología de un organismo intacto (*in vivo*).

Toda esta parte de la Tesis se realizó bajo la orientación de la Dra. Mariela Bollati (responsable de la Unidad de Biología Celular - UBC - del Instituto Pasteur Montevideo) y la participación de la Dra. Hellen Daghero, en el laboratorio de la Unidad antes mencionada.

- *Elección del linaje celular.*

En esta instancia se eligió la línea reportera HT-29-NFkB-GFP que expresa la proteína fluorescente verde (GFP por sus siglas en inglés) una vez que se activa con un estímulo inflamatorio. Estas células pertenecen al linaje celular HT-29 y, según informa ATCC, pertenecen a un adenocarcinoma de colon de una paciente sexo femenino de 44 años.

Cuando las células se encontraban en una confluencia del 80% éstas fueron transfectadas con un plásmido pNF-KB-GFP empleando lipofectamine 2000 tal como se describe en Mastropietro et al (2015). La selección de las células efectivamente transfectadas se llevó a cabo con 100 ug/mL de higromicina por dos meses. A continuación se realizó un *single cell deposition* y un posterior enriquecimiento.

- *Ensayo de toxicidad celular por el vehículo (WST-1).*

La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. Esta técnica es sensible, rápida y sencilla.

Este análisis de citotoxicidad se llevó a cabo tanto para el vehículo (medio hidroalcohólico en el cual se encontraban los extractos (50:50 EtOH:H₂O) como para las muestras propiamente dichas (extractos completos) para observar si el linaje celular soportaba estas concentraciones de solventes sin sufrir daños mayores y a que concentraciones eran viables los ensayos posteriores.

Para esto se sembraron entre 10.000 y 20.000 células por pocillo en un volumen final de 100 µL de RPMI suplementado al 10% de suero fetal bovino (SFB) en una placa de 96 pocillos. Se dejaron incubar por 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y se observó la confluencia debiendo está encontrarse entre un 70-80%.

Se prepararon soluciones stock del vehículo (50:50 EtOH:H₂O) y se realizaron diluciones seriadas al medio en RPMI antes de agregarlas a la placa con células. Se

cambió el medio de cada pocillo y se agregaron 5 μ L de cada una de las diluciones antes mencionadas a cada pocillo previamente identificado.

Como controles de esta corrida se utilizaron 3 pocillos control (solo vehículo, sin células), 3 pocillos con células sin tratar (células y medio de cultivo solamente) y 3 pocillos con células muertas (tratadas con 1% de Triton al 100X).

Se dejó incubar la placa 24 horas más en las mismas condiciones de temperatura y CO₂ antes mencionadas. Transcurrido este tiempo, se agregaron 20 μ L de WST-1, se incubó la placa 30 minutos a 37°C y se leyó la absorbancia a 492 nm y a 650 nm (para ver el fondo; medida que se restó para hacer los cálculos).

Este ensayo se repitió 3 veces para confirmar la dilución con la cual se trabajará a continuación.

- *Preparación de las células.*

Antes de comenzar con el análisis propiamente dicho, lo primero que se hizo fue descongelar un criotubo de la línea reportera HT-29-NFkB-GFP que tenía $3,5 \times 10^6$ células congeladas en 90% SFB y 10% DMSO congeladas el día 22/12/2014. Dado que el DMSO es tóxico para las células, lo que se hizo fue un descongelamiento rápido y se agregó 1 mL de medio RPMI a 37°C en el criotubo. Posteriormente se llevó a un volumen final de 6 mL con el mismo medio en las mismas condiciones.

Se centrifugó el criotubo a 250G por 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante para deshacernos del DMSO y al pellet (parte sólida que queda en la zona inferior del tubo) se lo resuspendió en 5 mL de medio completo (RPMI suplementado con 10% de SFB). Se tomó una alícuota y se hizo un recuento celular. En base al número de células viables obtenido de tal recuento se traspasa el total del volumen a una botella de cultivo T25 o T75. Estas células se incuban a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Al día siguiente post-descongelado, se cambia el medio de cultivo y se agregan 25 μ L de higromicina (si la botella es una T25, sino hay que hacer el cálculo correspondiente para la botella de T75). Este agregado de antibiótico es fundamental para la selección de los clones que realmente están transfectados, ya que, dentro del plásmido, además del NFkB-GFP se codifica un gen de resistencia a higromicina por lo que aquellas células que sobreviven a las condiciones antes mencionadas, es porque efectivamente poseen el plásmido.

- *Curva para activación celular.*

La activación de las células se realizó con Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNFa).

Para conocer cuál era la concentración óptima de TNFa a utilizar para obtener una activación considerable que nos permita ver si hubo atenuación de la señal o no, se realizó una curva de TNFa utilizando concentraciones de 1 ng/mL, 2 ng/mL, 4 ng/mL y 10 ng/mL.

Para esto se sembraron aproximadamente 100.000 células en cada pocillo, utilizando una placa de 48 pocillos, y se realizó un ensayo por triplicado para cada concentración de TNFa. También se corrió un control que eran células sin TNFa, este valor de fluorescencia que se tomó como cero.

En base a los resultados obtenidos de esta curva y del WST-1 es que se diseñaron los análisis de activación/desactivación del NFkB como se explica a continuación.

- *Estudio de la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de los extractos.*

Se cultivaron aproximadamente 100.000 células por pocillo en una placa de 48 pocillos con un volumen final de medio de 500 µL. A estas células se las dejó incubando a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ por 24 horas o hasta que su confluencia llegara a un 70-80%.

En estas condiciones, se agregaron 2,5 µL de extracto a 6 pocillos por muestras como se observa en la figura 5.

Los extractos utilizados en todos los casos fueron aquellos formulados con 10g de las respectivas muestras de orujos y que habían sido previamente caracterizados por FC, ABTS, DPPH, ORAC, FRAP y ESR por lo que se conocía su concentración exacta de polifenoles totales.

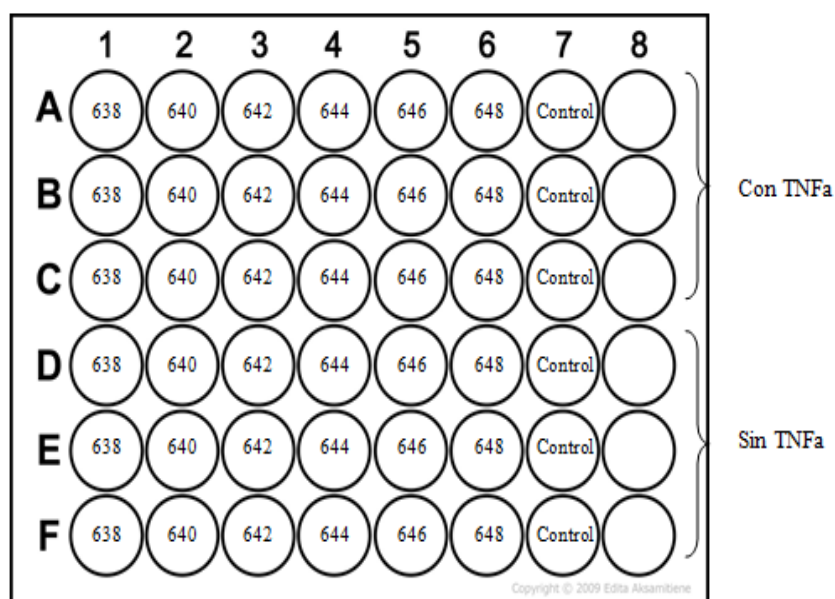


Figura 5. Placa con la cual se trabajó. Los números representan un control interno del extracto que se corrió. Control refiere a células solas, sin extracto, que se utilizaron como blanco. A 3 pocillos se les agrega TNFa y a otros 3 no, tal como se describe en la imagen.

Se volvió a incubar la placa en las condiciones antes mencionadas por 2 horas. Transcurrido ese tiempo se agregaron 10 ng/mL de TNFa a los pocillos correspondientes tal como se muestra en la Figura 5. La placa se incubó por otras 24 horas.

Para despegar las células del pocillo se utilizaron 50 µL de tripsina, se incubó la placa en estufa durante 5 minutos y se inactivó la tripsina con 100 µL de medio completo.

Ese volumen se traspasó a un tubo de plástico útil para citometría de flujo y posteriormente se midió fluorescencia por tal método.

Citometría de Flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y, por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo o monitoreada mediante la expresión de una proteína fluorescente. Actualmente esta técnica está ganando cada vez más terreno, no solo en investigaciones biomédicas sino que también en la práctica de diagnóstico clínico, ya que permite analizar tejidos humanos como sangre, líquido cefalorraquídeo, etc. con gran precisión y exactitud en sus resultados (Barrera, L. et al, 2004)

El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Figura 6) las cuales luego son interpretadas por el técnico.

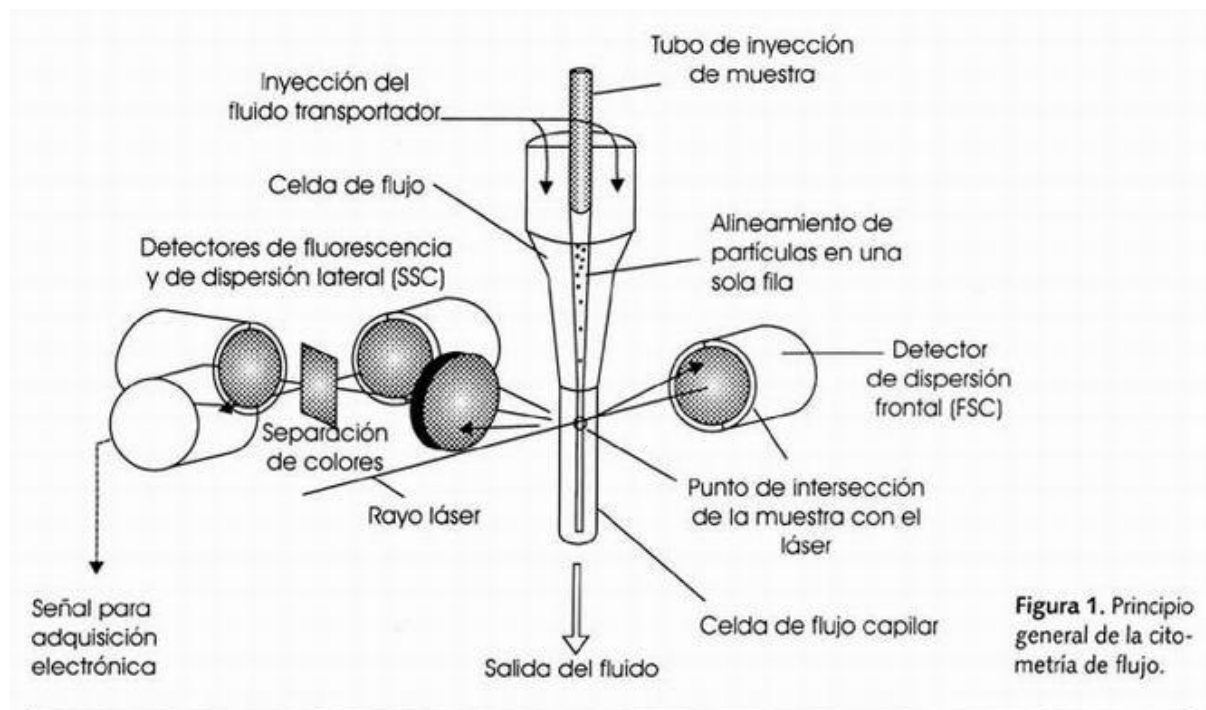


Figura 6: esquema general de cómo funciona la citometría de flujo.

- *Obtención de datos.*

Para obtener los datos necesarios se utilizó el citómetro de flujo CyAn High-Performance Flow Cytometer (DakoCytomation). El mismo posee dos láseres, uno azul a 488nm y uno rojo a 640nm, que son capaces de analizar 9 parámetros simultáneamente: forward y side light scatter (FSC/SSC) y 7 fluorocromos diferentes, a velocidades hasta de 20.000 eventos/segundo. Este analizador es útil para la detección de células que se encuentran en baja proporción y para aquellas aplicaciones que requieren más de 4 fluorocromos para definir una población celular (UBC, Institute Pasteur).

En nuestro caso, se analizaron los datos de FSC (tamaño de la célula), SSC (complejidad celular), GFP (FL1) e Ioduro de Propidio (FL2) utilizando el software Summit V4.3.

Tal como se ve en la Figura 7, tanto el GFP como el Ioduro de Propidio (IP- marcador de muerte celular) se excitan con el mismo láser (azul) y sus espectros de emisión se solapan. Esto indica la necesidad de siempre tener que realizar una compensación de la radiación parásita.

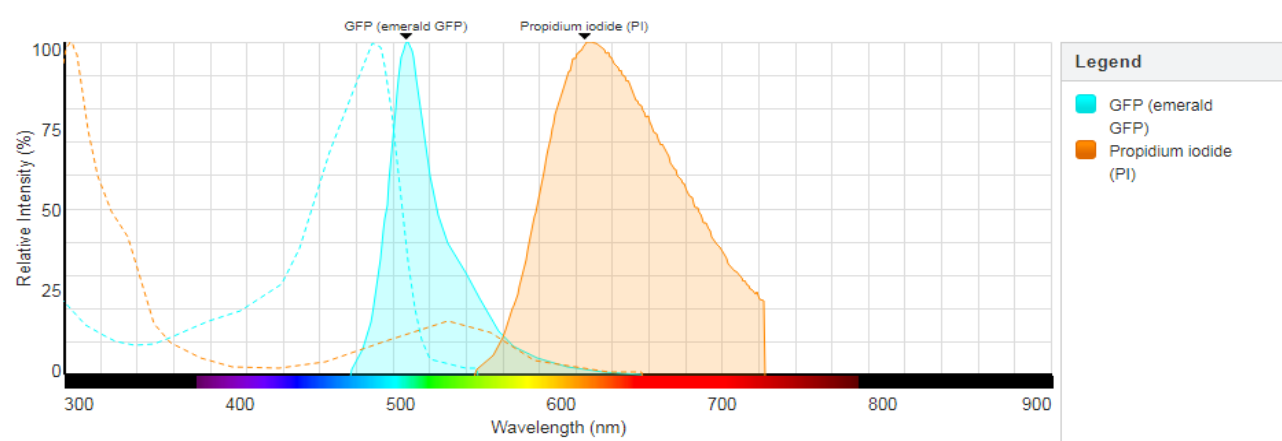


Figura 7. Espectro de excitación (línea punteada) y de emisión (línea continua) para el GFP (azul) y el IP (naranja).

- *Validación del método in vitro: medida de IL8.*

Como se muestra en la Figura 2, la activación del NFκB lleva consigo la producción de citoquinas inflamatorias, siendo la de mayor relevancia IL-8. El fin de medir la concentración que queda en el sobrenadante celular de IL-8 es verificar si los polifenoles realmente “apagan” al NFκB luego de activado o simplemente no permiten su activación. Si sucediera el primer caso, al ya haberse activado NFκB (aunque sea por un breve periodo de tiempo como son 2 horas previo a la incubación de los extractos), la concentración de IL-8 en sobrenadante debería ser detectable. Sin

embargo, de interferir los polifenoles con la activación del NFkB, este nunca va a ser translocado por lo que la IL-8 en el sobrenadante va a ser indetectable.

Para la detección de IL-8 utilizamos un kit comercial de la marca BioLegend (número de catálogo 431505) el cual se basa en un análisis de ELISA tipo sándwich en donde, la intensidad del color azul es directamente proporcional a la concentración de IL-8 de la muestra. Cuando se agrega solución STOP el color azul vira a amarillo y la placa se lee en un lector de placas de ELISA a 450nm y a 570nm para obtener el fondo, este valor debe ser restado a la absorbancia medida a 450nm.

Procedimiento de análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante Análisis de la Varianza, las comparaciones múltiples de medias mediante el método Duncan. El nivel de significación estadística para las comparaciones se estableció al 5% de probabilidad de Error. Todo el análisis se llevó adelante mediante el software estadístico InfoStat versión 2020.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extractos y análisis de capacidad antioxidante de orujos de uva

El primer paso fue el desarrollo del procedimiento extractivo, era necesario saber a qué concentración de Etanol:agua (EtOH:H₂O) se extraían la mayor cantidad de polifenoles. Para realizar los extractos utilizamos 1g de orujo de uva seco y molido de cada una de las muestras y las dejamos macerando 7 días a temperatura ambiente en 25mL de las distintas concentraciones EtOH:H₂O. Para el análisis de polifenoles totales utilizamos la técnica de Folin-Ciocalteu (FC).

El análisis de la varianza indica diferencias altamente significativas en los valores de FC entre las muestras, entre valores de concentración de EtOH utilizadas y la interacción entre las muestras y concentraciones de EtOH, todos con p-valor <0.0001

Comparación según las muestras: El orden de FC según las muestras es Tannat B > Tannat 4 > Tannat 2 > Tannat 1 > Tannat 3 > Cabernet Franc. Con valores de FC que van desde 442.17 a 89.16 mgeq/L. Todas ellas estadísticamente diferentes entre sí al compararlas con el método Duncan al 5% de probabilidad de error.

En base a lo que se puede observar en la Figura 8 y al comparar los promedios de valores de FC obtenidos a distintas concentraciones, se observa que el valor más alto de FC, es decir, la concentración a la que se extraen la mayor cantidad de polifenoles totales, es cuando ambos diluyentes se encuentran en proporciones iguales (50:50 de EtOH:H₂O). El método Duncan (5% de probabilidad de error) de comparación de medias nuevamente indica que los valores de FC son estadísticamente distintos entre sí a cada concentración de EtOH.

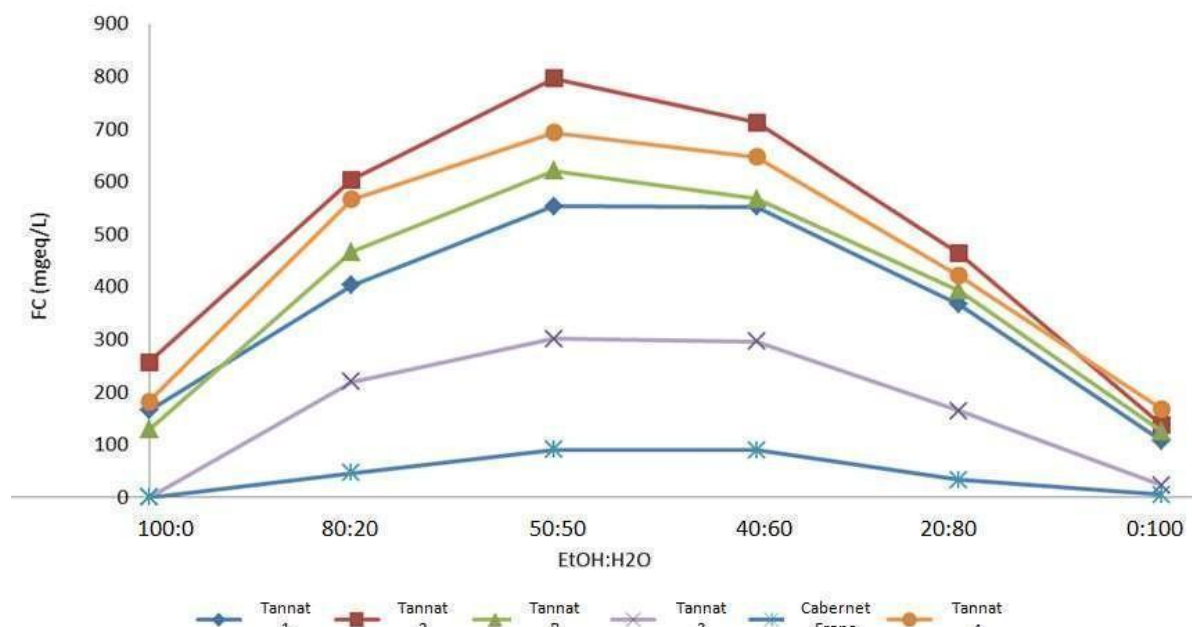


Figura 8. Curvas de polifenoles totales obtenidas en el proceso extractivo a distintas concentraciones de etanol/agua para 1g de orujo de uva seco y molido de las diferentes muestras estudiadas.

Este resultado no es sorprendente ya que, si se piensa en la polaridad de los fenoles que mayormente componen a los orujos de uva, nos encontramos con que estando la gran mayoría glicosilados, serian mayormente hidrofílicos o polares y por eso se extraigan con esta concentración de EtOH:H₂O. Surge entonces la duda de que, si los fenoles son hidrofílicos, ¿por qué no se extraen mas cantidad con un 100% de agua? Una posible explicación para este hecho es que en una fase puramente acuosa no se extraigan aquellos polifenoles polares y solamente se extraigan los hidrofílicos. Los perfiles polifenólicos obtenidos para cada una de las concentraciones de extracción se discutirán más adelante cuando mencionemos los resultados obtenidos con HPLC-MS.

En la Figura 8 se puede ver claramente el efecto de la polaridad del solvente en la extracción. Se observa que las concentraciones de ambos solventes necesitan estar dentro de cierto rango para llegar al óptimo de extracción que, en nuestro caso, como se mencionó anteriormente, son partes iguales de etanol y agua. Otra conclusión que podemos sacar de la figura antes mencionada es que si bien la tendencia general es parecida, aumentando el nivel de valores de FC a 50% de EtOH, las variedades Tannat otorgan valores superiores de FC comprado con el Cabernet Franc, esta diferencia es estadísticamente significativa según se observa en el cuadro de Análisis de la Varianza(p-valor para la interacción <0.0001)

En base a los resultados antes obtenidos para 1g de las respectivas muestras, se procedió a pesar 5g y 10g de los mismos orujos secos y se extrajeron en las mismas condiciones antes mencionadas, pero utilizando 50:50 EtOH:H₂O con y sin agitación constante durante toda la maceración (7 días a temperatura ambiente). Los valores obtenidos se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de Folin-Ciocalteu expresados en miligramos de equivalentes de ácido gálico por litro (mgeq/L) para las diferentes muestras analizadas, con y sin agitación constante durante su extracción.

Muestra	Masa (g)	FC (mgeq/L)	
		Con agitación	Sin agitación
Tannat 1 (2016)	5,0	3238,66±5,82	2742,33±37,78
	10,0	4219,84±51,55	4892,25±43,26
Tannat 2 (2016)	5,0	4320,64±22,71	3757,96±75,47
	10,0	6140,10±58,33	6081,41±37,09
Tannat B (2016)	5,0	3273,11±28,69	3329,25±65,03
	10,0	4816,97±66,24	5257,16±30,89
Tannat 3 (2016)	5,0	1920,64±9,09	1976,78±10,04
	10,0	2917,13±7,82	2691,29±16,59
Cabernet Franc (2016)	5,0	566,28±7,96	434,86±19,53
	10,0	802,33±15,34	628,80±35,99
Tannat 4 (2016)	5,0	3253,97±13,52	2080,13 ± 29,58
	10,0	5185,71±22,08	3981,62 ± 7,96

El análisis de la varianza indica diferencias altamente significativas en los valores de FC entre el tipo de muestra, masa de la muestra utilizada y el uso o no de agitación de la muestra todos con p-valor <0.0001. No se observa interacción estadística significativa entre la interacción masa utilizada y la agitación (p-valor = 0.89). Si bien es claro que la agitación aumenta la extracción de polifenoles de manera significativa, consideramos que este paso podría ser introducido a nivel industrial solo en el caso de que no entorpezca el procedimiento a esa escala.

También se puede deducir de esta tabla que, a mayor cantidad de masa, mayor es la cantidad de polifenoles extraídos como era de esperarse.

Comparación según las muestras: El orden de valores de FC según las muestras es Tannat B > Tannat 2 > Tannat 1 > Tannat 4 > Cabernet Franc = Tannat 3 Con valores de FC que van desde 1247.24 a 595.55 mgeq/L.

Cuando se comparan los promedios de valores de FC obtenidos con distintas masas

de muestra se observa que el valor más alto de FC se obtiene cuando se utilizan 10g (1035.91 mgeq/L), estadísticamente diferente cuando se compara con las que se obtienen a partir de 5 (697.16 mgeq/L).

A todos los extractos, además de la determinación de fenoles totales por FC, se les realizó el análisis de su capacidad atrapadora de radicales libres por dos métodos: DPPH y ABTS, mostrando en las Figuras 9, 10 y 11 la relación entre ellos.

Para las muestras de 1g (Figura 9) la correlación entre el FC y el DPPH (ambos expresados como mgeq/L) es de un 94%, mientras que entre FC y el ABTS (también expresado en mgeq/L) es de aproximadamente un 97%. Valores similares se observan para las muestras de 5g y 10g (Figura 10, 11 y Tabla 3). Si nosotros comparamos los métodos de DPPH y ABTS se observa que ambos radicales presentan una excelente estabilidad bajo las condiciones experimentales y la relación entre ellos es de un 96% (para las muestras de 1g).

Tomando en cuenta el mecanismo de generación del radical se tiene que, mientras DPPH es un radical libre que se obtiene directamente sin preparación previa, el ABTS debe ser generado mediante una reacción química entre la sal diamónica de ABTS y $K_2S_2O_8$ al incubar en la oscuridad a temperatura ambiente por 16 horas en agua destilada. Además, otra diferencia es que ABTS es mayoritariamente útil para medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos mientras que DPPH solamente puede ser disuelto en medios orgánicos (de rangos de polaridad mas limitada). Por último, el radical de ABTS posee la ventaja de que su espectro posee varios máximos de absorbancia, a 414nm, 654nm, 754nm y 815nm en medios hidroalcohólicos mientras que el DPPH posee un único máximo a 515 nm (Schaich K, 2015).

Es de destacar que, para las muestras extraídas de 5g y 10g, se decidió ampliar los análisis y se realizó la determinación por los métodos ORAC y FRAP para aquellas muestras que no habían sido incubadas en condiciones de agitación continua. Los resultados se muestran en las Figuras 10 y 11 y en la Tabla 3.

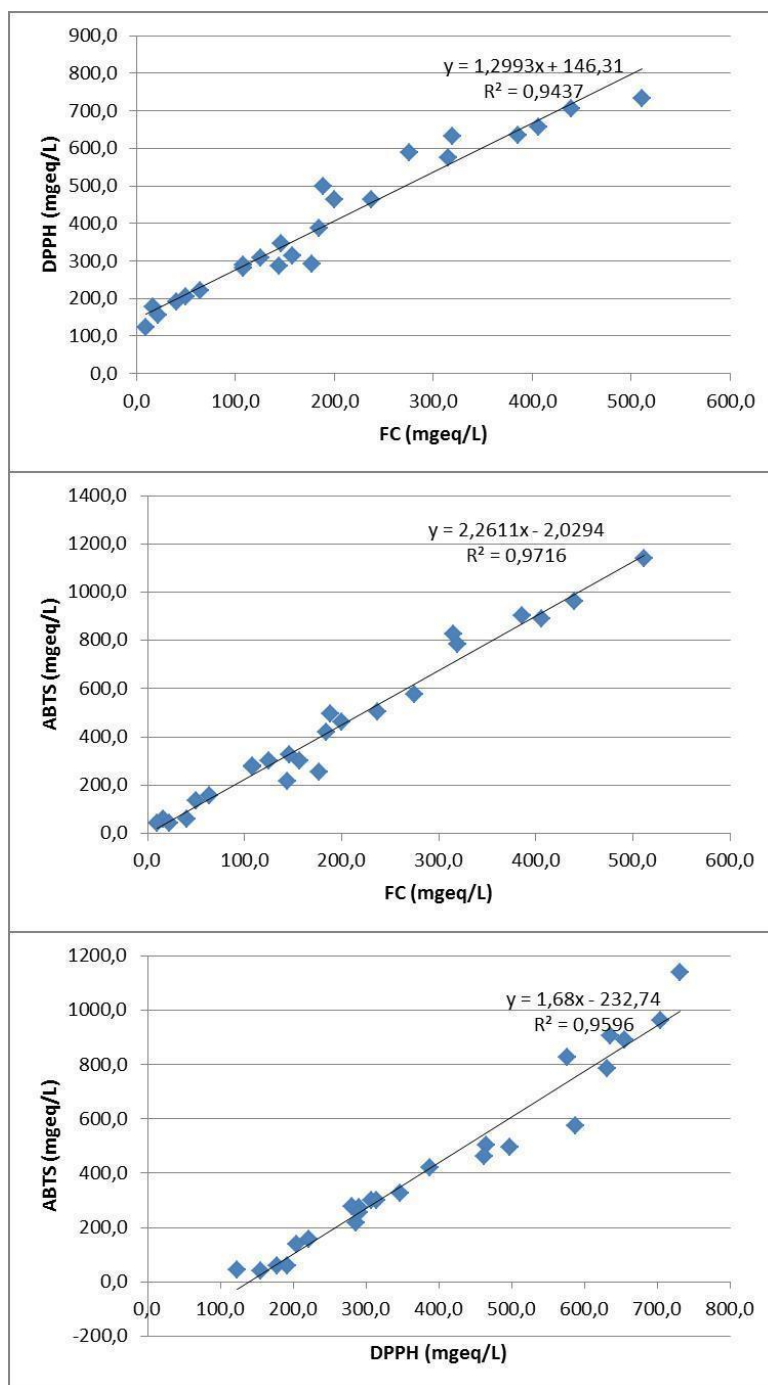


Figura 9. Gráficas para 1g de muestra. (1) FC (mgeq/L) vs %DPPH (2) FC (mgeq/L) vs %ABTS (3) DPPH(mgeq/L) vs ABTS(mgeq/L).

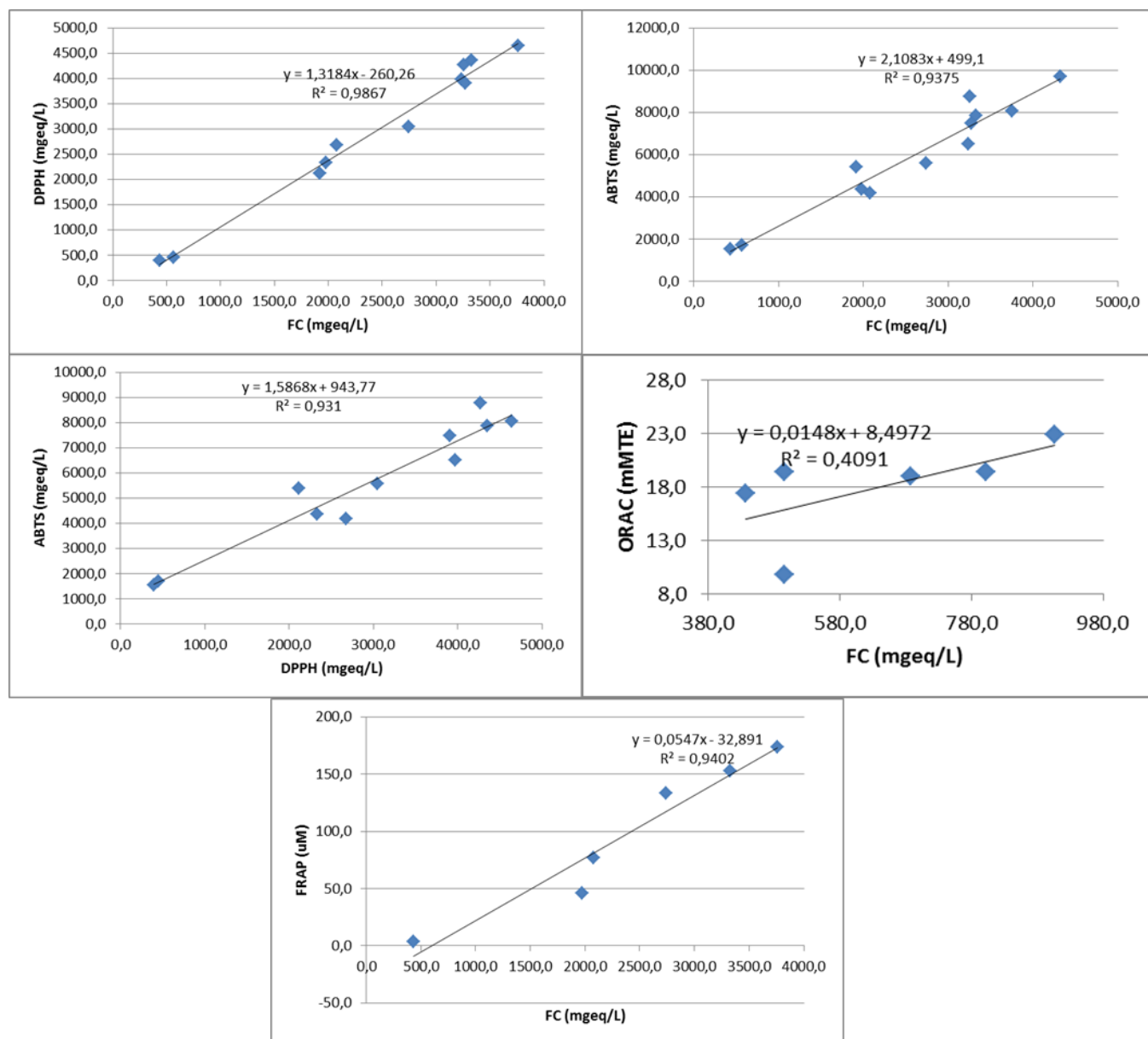


Figura 10. Gráficas para 5g de muestra obtenido sin agitación continua.

- (1) FC (mgeq/L) vs DPPH (mgeq/L)
- (2) FC (mgeq/L) vs ABTS (mgeq/L)
- (3) DPPH (mgeq/L) vs ABTS (mgeq/L)
- (4) FC (mgeq/L) vs ORAC (mMTE)
- (5) FC (mgeq/L) vs FRAP (μ M)

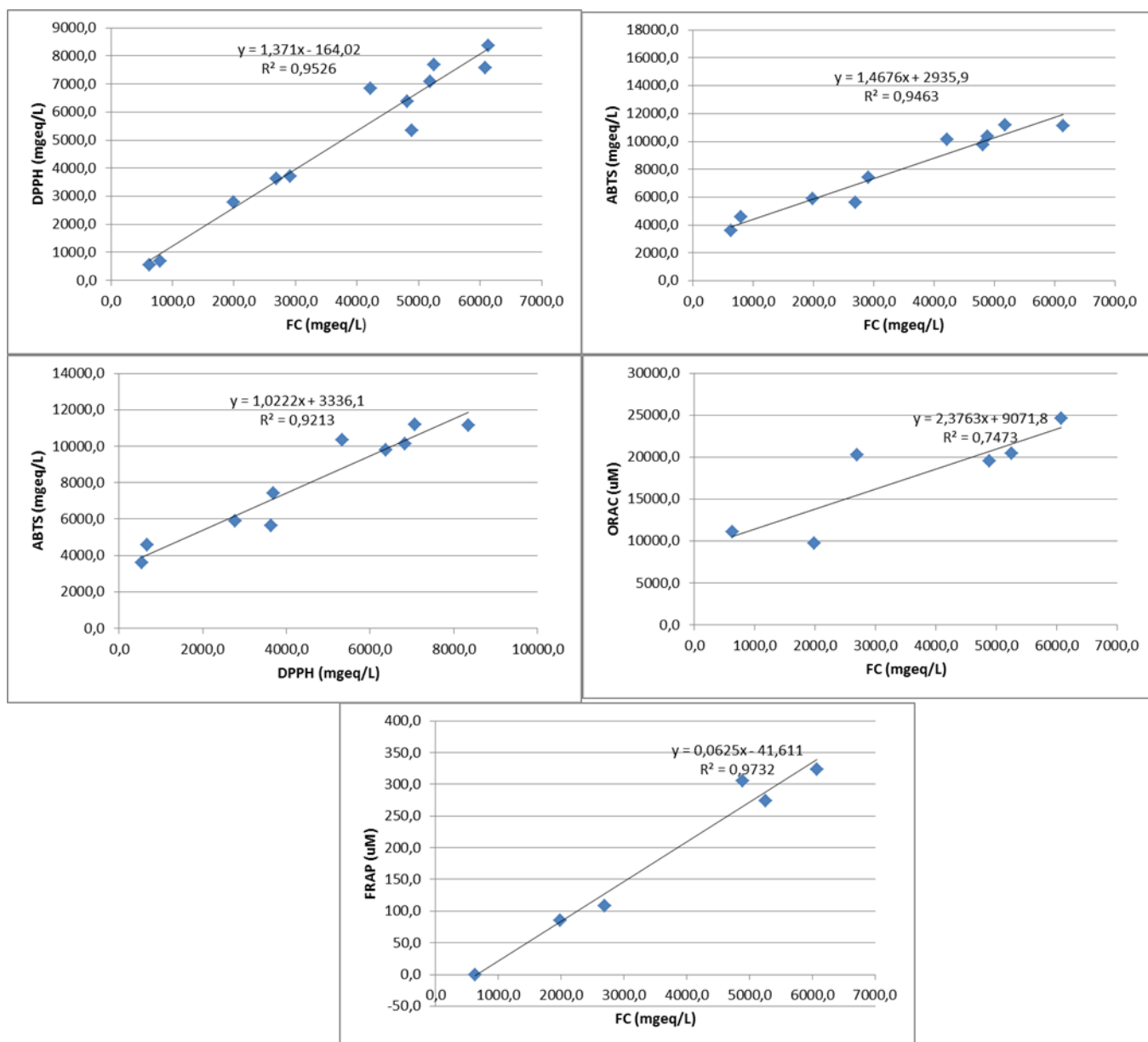


Figura 11. Gráficas para 10g de muestra obtenido sin agitación continua.

- (1) FC (mgeq/L) vs DPPH (mgeq/L)
- (2) FC (mgeq/L) vs ABTS (mgeq/L)
- (3) DPPH (mgeq/L) vs ABTS (mgeq/L)
- (4) FC (mgeq/L) vs ORAC (mMTE)
- (5) FC (mgeq/L) vs FRAP (μM).

De la Figura 10 y 11 se observa que, la correlación entre FC y DPPH para 5g es de aproximadamente un 99% mientras que para para 10g de orujo seco alcanza el 95%. La correlación entre FC y ABTS es muy similar tanto para 5g como para 10g (94% y 95% respectivamente), lo mismo ocurre en el caso de ABTS y DPPH (93% en el caso de 5g y 92% para 10g) y para FRAP y FC (94% para muestras de 5g y 97% para muestras de 10g) . La alta correlación que presentan estas últimas 2 técnicas se puede adscribir a que ambos procedimientos se basan en la evaluación de la capacidad antioxidante de la muestra como una medida de la capacidad reductora de

Fe^{3+} en el caso del FRAP y del fosfomolibdato y fosfotungstato para FC. Por otro lado, la relación de FC con ORAC no es tan buena, alcanzando apenas el 41% para 5g de orujos y el 75% para muestras de 10g. Una explicación de esto es que, si bien existe una correlación en donde se observa que a mayor ORAC mayor es la concentración de polifenoles totales, las diferencias en los métodos de medida determinan diferentes estados de los componentes de los extractos luego de ser sometidos a la medida de su capacidad antioxidante. La metodología ORAC mide la capacidad antioxidante de una muestra en base a su capacidad de donar átomos de hidrógeno al radical centrado en el átomo de oxígeno (mecanismo HAT), mientras que en Folin-Ciocalteu el poder reductor de la muestra es medido a través de una transferencia electrónica (ET).

En la Tabla 4, se muestra una comparación entre los valores obtenidos para las diferentes cantidades de muestras extraídas. De la misma se desprende que, si bien esperaríamos obtener para 10g el doble de lo obtenido para 5g, vemos que en ningún caso pasa esto. Una posible explicación para este hecho es que el solvente de extracción se haya alcanzado su capacidad extractiva y no nos permita extraer la totalidad de los polifenoles presentes en 10g de orujos de uva. Sin embargo, el uso de esta cantidad de masa podría justificarse con el objetivo de llevar el procedimiento a escala industrial, logrando así que una mayor cantidad de este desecho sea transformado en un producto nuevo con valor agregado en una sola etapa, tal cual es uno de los objetivos genéricos de esta investigación. Por lo tanto, nuestra recomendación en base a los datos obtenidos es que, cuando se desee escalar a nivel industrial, se recomienda utilizar una masa de 10g/25mL extracto y un conjunto de análisis en 2 etapas:

- a) como screening básico: FC (correlacionado en más del 90% con el resto de los parámetros analíticos); y
- b) para un control analítico de los componentes antioxidantes, a través del análisis de los siguientes parámetros: ABTS, DPPH, ORAC y FRAP.

Es importante recordar que, según datos de la Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal en su sección sobre orujos de uvas (https://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/orujo-de-uva), el orujo de uva obtenido luego del proceso de vinificación posee grandes cantidades de agua (entre un 50-60%) por lo que antes de poder molerlo y hacerlo polvo debemos secarlo a temperatura controlada (60°C) y al vacío. No llama la atención entonces que, una vez que se coloca el polvo en solución hidroalcohólica para su extracción, el mismo se rehidrate en pequeñas cantidades lo que no nos permite a nosotros obtener como volumen final el volumen total inicial utilizado. En cuanto a un posible escalado a nivel industrial de este proceso debemos decir que el secado a vacío no sería posible por lo que se debería evaluar una transferencia a un método con temperatura controlada (60°C) y presión atmosférica.

Tabla 3: valores de los distintos parámetros medidos sobre los extractos extraídos de muestras de 5g y 10g de orujos de uva.

Muestra	Masa aprox (g)	FC (mgeq/L)	DPPH (mgeq/L)	ABTS (mgeq/L)	ORAC (mMTE)	FRAP (ugTE/mL)	%scavenging de radical OH
Tannat 1	5	2742,33 ± 37,78	3048,60 ± 7,53	5582,71 ± 7,60	18,97 ± 2,47	133,46 ± 1,21	33,4 ± 1,5
	10	4892,25 ± 43,26	5341,73 ± 20,88	10340,76 ± 6,58	19,52 ± 3,26	305,74 ± 2,04	59,2 ± 1,7
Tannat 2	5	3757,96 ± 75,47	4639,28 ± 24,43	8684,22 ± 9,73	22,90 ± 4,93	173,81 ± 1,37	94,9 ± 2,1
	10	6081,40 ± 37,09	7586,04 ± 10,15	13041,78 ± 27,18	24,60 ± 0,14	323,58 ± 2,01	85,8 ± 1,1
Tannat B	5	3329,25 ± 65,03	4351,89 ± 7,25	7864,96 ± 15,12	19,32 ± 5,14	152,86 ± 2,11	50,2 ± 1,1
	10	5257,16 ± 30,89	7687,65 ± 9,56	14226,42 ± 18,49	20,45 ± 4,03	273,92 ± 1,35	67,5 ± 2,0
Tannat 3	5	1976,78 ± 10,04	2330,68 ± 6,42	4358,32 ± 15,44	19,37 ± 0,74	45,77 ± 1,14	76,4 ± 1,2
	10	2691,29 ± 16,59	3631,99 ± 33,82	5632,23 ± 13,34	20,24 ± 4,81	108,63 ± 2,03	68,1 ± 1,3
Cabernet Franc	5	434,86 ± 19,53	395,45 ± 7,10	1546,70 ± 3,07	17,34 ± 2,74	No detectable	90,2 ± 1,8
	10	628,80 ± 35,99	541,24 ± 16,62	2624,13 ± 18,99	11,09 ± 1,45	3,36 ± 0,43	67,3 ± 1,9
Tannat 4	5	2080,13 ± 36,60	2679,70 ± 29,58	4164,75 ± 1,44	9,72 ± 1,01	76,56 ± 1,10	25,7 ± 1,1
	10	1990,81 ± 25,69	2783,74 ± 7,96	5888,81 ± 16,30	11,31 ± 1,25	85,35 ± 1,27	66,5 ± 1,3

Tabla 4: Valores de FC, ABTS, DPPH y %scavenging de radical OH para muestras de 5g y 10g y su % de extracción en 10g relativo al de 5g.

Identificación de la muestra	Masa aprox (g)	FC (mgeq/L)	FC (mgeq/L)/ g muestra	DPPH (mgeq/L)	DPPH (mgeq/L)/ g muestra	ABTS (mgeq/L)	ABTS (mgeq/L)/ g muestra	%scavenging de radical OH	%scavenging de radical OH/ g muestra
Tannat 1	5	2742,33	548,47	3048,60	609,72	5582,71	1116,54	33,40	6,68
	10	4892,25	489,22	5341,73	534,17	10340,76	1034,08	59,20	5,92
% de extracción en 10 relativo al de 5			89,20		87,61		92,61		88,62
Tannat 2	5	3757,96	751,59	4639,28	927,86	8684,22	1736,84	94,90	18,98
	10	6081,40	608,14	7586,04	758,60	13041,78	1304,18	85,80	8,58
% de extracción en 10 relativo al de 5			80,91		81,76		75,09		45,21
Tannat B	5	3329,25	665,85	4351,89	870,38	7864,96	1572,99	50,20	10,04
	10	5257,16	525,72	7687,65	768,77	14226,42	1422,64	67,50	6,75
% de extracción en 10 relativo al de 5			78,95		88,33		90,44		67,23
Tannat 3	5	1976,78	395,36	2330,68	466,14	4358,32	871,66	76,40	15,28
	10	2691,29	269,13	3631,99	363,20	5632,23	563,22	68,10	6,81
% de extracción en 10 relativo al de 5			68,07		77,92		64,61		44,57
Cabernet Franc	5	434,86	86,97	395,45	79,09	1546,70	309,34	90,20	18,04
	10	628,80	62,88	541,24	54,12	2624,13	262,41	67,30	6,73
% de extracción en 10 relativo al de 5			72,30		68,43		84,83		37,31
Tannat 4	5	2080,13	416,03	2679,70	535,94	4164,75	832,95	25,70	5,14
	10	1990,81	199,08	2783,74	278,37	5888,81	588,88	66,50	6,65
% de extracción en 10 relativo al de 5			47,85		51,94		70,70		129,38

5.2. Análisis por Espectrometría de Resonancia de Spin (ESR) de los extractos

Para todas las muestras se observó un decaimiento en la intensidad de la señal comparándolo con la intensidad del aducto DMPO-OH lo que nos confirma que las muestras poseen realmente capacidad *scavenging* de radicales libres. En algunos casos se puede observar un leve aumento de la señal que se atribuye a la capacidad atrapadora de radicales del carbono que son el producto de reacción del radical hidroxilo con los polifenoles de las muestras analizadas.

En las Figuras 12A y 12B se muestra en rojo la disminución de la señal del aducto DMPO-OH y en recuadro verde el aumento de la señal de aducto DMPO-CR. La asignación de estas señales se realizó a partir del registro de los espectros ESR de los aductos correspondientes al atrapamiento del radical hidroxilo y de los radicales centrados en el carbono, Figuras 12C y 12D, respectivamente.

Figura 12: espectros ESR obtenidos para las muestras. En rojo se muestra la disminución de aducto DMPO-OH mientras que en verde se señala el aumento de la señal atribuible al aducto DMPO-CR.

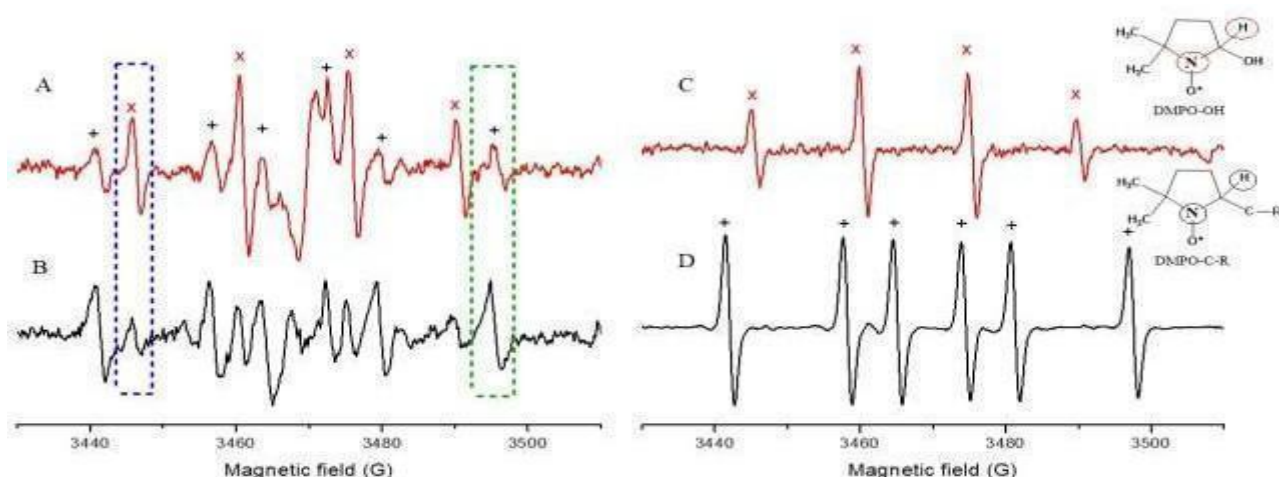


Figura 12: espectros ESR obtenidos para las muestras. En rojo se muestra la disminución de aducto DMPO-OH mientras que en verde se señala el aumento de la señal atribuible al aducto DMPO-CR.

Por un lado, la técnica *Spin Trapping* permitió estudiar el radical hidroxilo a través del aumento de su vida media mediante la formación de un aducto de espín con el atrapamiento de DMPO. Esta es una diferencia con la técnica ORAC en la que se realiza una observación indirecta de la reactividad del radical de oxígeno y en la que se postula que se forma principalmente un radical peroxilo o, alternativamente, un radical alcoxi. En base a lo anterior, la resonancia electrónica de espín (ESR) junto con la técnica de atrapamiento de espín parece ser una herramienta útil en la determinación de la capacidad antioxidante de los productos de origen natural, ya que fue posible estudiar la reactividad frente a un radical libre. Además, se obtuvo información sobre la formación de nuevas especies radicales centradas en el carbono, posiblemente derivadas de compuestos polifenólicos. Por lo tanto, se postula que la mezcla de solventes utilizada en la extracción permite obtener compuestos fenólicos con capacidad antioxidante.

5.3. Análisis In vitro de la capacidad antiinflamatoria de los extractos

Tal como se explicó en la sección de materiales y métodos, lo primero que se realizó para comenzar a trabajar con el linaje celular HT29-NFkB-GFP, fue un análisis de citotoxicidad del vehículo (solución 50:50 etanol/agua) y de los extractos para ver si las células soportaban las condiciones. El mismo se llevó a cabo utilizando el procedimiento WST-1 y tomando como corte la IC50, que se entiende como la

concentración de un compuesto necesaria para reducir en un 50 por ciento el crecimiento poblacional *in vitro*.

Los resultados obtenidos muestran que, tras diluciones seriadas al medio del vehículo, se obtiene una IC50 equivalente a una dilución 1/32 tanto a las 24 como a las 48 horas post incubación. Sin embargo, cuando se testean las muestras (extractos de orujos) se observa un IC50 muy superior a las 48 horas post incubación, alcanzando, en el peor de los casos, una equivalencia con una dilución 1/200. En base a este último resultado es que, los futuros análisis sobre las células se realizan utilizando diluciones de los extractos 1/200 realizados con el medio de cultivo utilizado para el crecimiento celular.

En una siguiente etapa se procede a testear los extractos para ver si son capaces de atenuar la activación del NFkB. Las medidas se realizaron por citometría de flujo.

Se realizó una curva de activación para ver qué concentración de TNFa era necesaria para generar una activación celular medible en el citómetro de flujo como fluorescencia (GFP+) llegando a la conclusión de que se utilizarán 10 ng/mL. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5.

TNFa	%GFP+
1 ng/mL	2,78 ± 0,74
2 ng/mL	3,78 ± 0,90
4 ng/mL	8,47 ± 1,69
10 ng/mL	17,86 ± 5,02

Tabla 5: porcentaje de activación de GFP para el linaje células HT29-NFkB-GFP utilizando distintas concentraciones de TNFa.

Con fines de lograr un tratamiento estadístico adecuado, el análisis para orujos de uva se repitió 9 veces utilizando, en todos los casos, 10ng/mL de TNFa para activar y una dilución de extractos de 1/200. Los resultados mostrados en la Figura 13 fueron normalizados al 100% de fluorescencia para el control positivo.



Figura 13: valores de fluorescencia normalizados obtenidos tras incubación con distintos extractos de orujos de uva en dilución 1/200. TNF corresponde a TNFa, 638 corresponde a muestra Tannat 1, 640 corresponde a muestra Tannat 2, 642 corresponde a muestra Tannat B, 644 corresponde a muestra Tannat 3, 646 corresponde a muestra Cabernet Franc, 648 corresponde a muestra Tannat 4 y STD corresponde a ácido gálico.

Como se observa en la Figura 13, todas las muestras lograron atenuar, en mayor o menor medida, la activación del NFkB lo que confirma nuestra hipótesis de que los polifenoles presentes en los extractos de orujos de uva interfieren con la actividad del factor de transcripción nuclear en estudio.

Dentro de los orujos de uvas se destaca la muestra Tannat 2 (muestra 640) quien logra disminuir la señal en casi un 35% con respecto al control positivo.

Antes de sacar conclusiones es importante destacar que también se corrió, en todas las instancias, un estándar (STD en la Figura 13) correspondiente a ácido gálico, quien solamente logra atenuar alrededor de un 0,5% en todos los casos.

Finalmente, para validar el método, se realizó la dosificación de interleukina 8 (IL-8) en el sobrenadante de las células incubadas con la dilución 1/200 de los extractos de orujos de uva y para el control y el estándar de ácido gálico (Numero MDL: MFCD00002510). La solución a ensayar fue generada tomando 150 μ L de los sobrenadantes de cada una de las 9 corridas realizadas para los orujos para así tener un valor más real.

Los valores obtenidos para el ensayo anterior se muestran en la Figura 14. Podemos ver que, en todos los casos, la concentración de IL-8 es detectable en el sobrenadante lo que nos sugiere que, efectivamente, hubo una activación del NFkB que fue “detenida” por los polifenoles presentes en las muestras ensayadas en distintos puntos, lo que se expresa como distintas concentraciones de IL-8 secretadas. Comparando con el control, vemos que en la mayoría de los casos la atenuación es significativa excepto en el caso de la muestra Tannat 3 cuyo valor más elevado que el control positivo y no concordante con los valores de atenuación antes obtenidos

(Figura 13), nos podría guiar al hecho de que hubo un error analítico a la hora de su determinación.

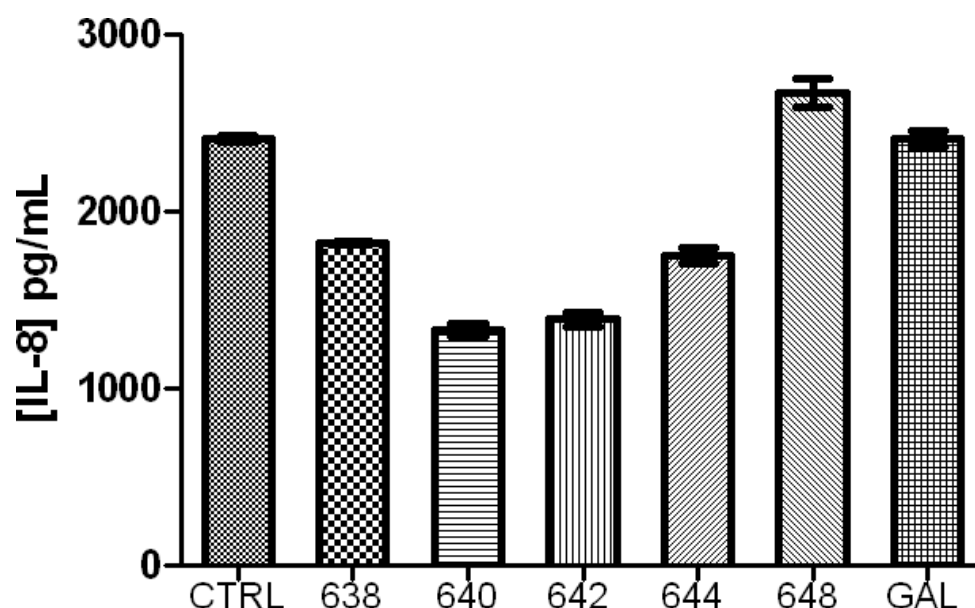


Figura 14: concentración de IL-8 (pg/mL) detectada en los distintos sobrenadantes obtenidos de los ensayos anteriores de extractos de orujos de uva. CTRL corresponde a control realizado con TNF α , 638 corresponde a muestra Tannat 1, 640 corresponde a muestra Tannat 2, 642 corresponde a muestra Tannat B, 644 corresponde a muestra Tannat 3, 646 corresponde a muestra Cabernet Franc, 648 corresponde a muestra Tannat 4 y GAL corresponde al estándar de ácido gálico.

De todo lo anteriormente planteado, se dedujo que, dado que los orujos de uvas consisten en una mezcla compleja de polifenoles de distintos tamaños y con distintas características (distintos tipos de glicosilación, enlaces internos, etc), y que el estándar (ácido gálico) testado es una molécula pequeña que solamente logra atenuar un 0,5% la actividad del NF κ B, las moléculas que mayormente interfieren y logran atenuar la actividad del factor de transcripción nuclear en estudio son aquellos polifenoles de mayor tamaño.

Finalmente, en vista de que la discusión antes planteada indica como trascendente el conocer el perfil de polifenoles contenidos en tales extractos, se llevó a cabo un análisis separativo por HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS del departamento DQO de la Facultad de Química, Udelar) para los extractos realizados en una de las condiciones antes descritas (5g de muestra extraídos por maceración a temperatura ambiente durante 7 días en 25 mL de solvente de extracción 50/50 EtOH-H₂O).

Los resultados se muestran a continuación (Tabla 6):

Tabla 6. Compuestos encontrados por HPLC-MS a distintas longitudes de onda (280nm y 520nm) con sus respectivas áreas bajo la curva (AUC), tiempos de retención (Rt(min)) y fracción porcentual en la que se encuentra en el extracto.

Id	Compuesto	Clase estructural	$\lambda_{\max}$	Rt	AUC	Fracción (%)
1	delphinidin-3-O-glucósido	antocianina	520	16,377	44475	0,148
2	cyanidin-3-O-glucósido	antocianina	520	18,349	8867	0,029
3	petunidin-3-O-glucósido	antocianina	520	19,396	74001	0,246
4	peonidin-3-O-glucósido	antocianina	520	21,361	30264	0,101
5	malvidin-3-O-glucósido	antocianina	520	22,12	246379	0,818
6	delfinidin-3-O-(6'-acetil)glucósido	antocianina	520	23,821	5490	0,018
7	petunidin-3-O-(6'-acetil)glucósido	antocianina	520	26,6	15340	0,051
8	peonidin-3-O-(6'-acetil)glucósido	antocianina	520	29,129	9585	0,032
9	malvidin-3-O-(6'-acetil)glucósido	antocianina	520	29,361	47261	0,157
10	delfinidin-3-O-(6-p-coumaroil)glucósido	antocianina	520	29,799	52391	0,174
11	malvidin-3-O-(6-caffeoil)glucósido	antocianina	520	31,465	21549	0,072
12	cianidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	antocianina	520	31,803	16157	0,054
13	petunidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	antocianina	520	32,293	81375	0,27
14	peonidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	antocianina	520	34,49	70515	0,234
15	malvidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	antocianina	520	34,68	467693	1,553
Total de compuestos de pigmentación						3,957
16	ácido cis-caftárico	ácido fenólico	280	3,806	68021	1,647
17	ácido trans-caftárico	ácido fenólico	280	5,072	12280	0,297
18	ácido trans-cutárico	ácido fenólico	280	7,292	173386	4,197
19	p-coumaroil hexosa(1)	ácido fenólico	280	9,805	42092	1,019
20	p-coumaroil hexosa (2)	ácido fenólico	280	11,058	80846	1,957
Total de ácidos fenólicos						9,117
21	procianidina trímero C2	flavan-3-ols	280	5,8	13376	0,324
22	procianidina dímero B1	flavan-3-ols	280	10,223	53601	1,297
23	procianidina dímero B3	flavan-3-ols	280	12,037	73849	1,788
24	(+)-catequina	flavan-3-ols	280	12,547	289603	7,01
25	procianidina trímero	flavan-3-ols	280	13,581	176894	4,282
26	procianidina dímero B4	flavan-3-ols	280	14,213	193870	4,693
27	procianidina dímero B6	flavan-3-ols	280	15,154	771559	18,677
28	(-)-epicatequina	flavan-3-ols	280	15,687	135473	3,279
29	procianidina dímero galloilado	flavan-3-ols	280	16,39	335850	8,13
30	procianidina trímero	flavan-3-ols	280	17,778	13224	0,32
31	procianidina trímero	flavan-3-ols	280	18,119	132934	3,218
32	procianidina dímero B2	flavan-3-ols	280	18,784	168691	4,083
33	procianidina dímero galloilado	flavan-3-ols	280	19,494	132598	0,274
34	(-)-epicatequina galato	flavan-3-ols	280	19,821	313241	0,634
35	procianidina dímero B7	flavan-3-ols	280	23,44	275773	0,384
36	miricetin-3-O-galactosido	flavan-3-ols	280	24,65	31102	0,292
Total de flavan-3-oles						75,322
37	miricetin-3-O-glucósido	flavan-3-ols	280	20,323	88291	2,137
38	quercetina-3-O-galactosido	flavan-3-ols	280	21,371	93796	2,27
39	quercetina-3-O-glucósido	flavonoles	280	24,006	42083	1,019
40	siringetin-3-O-glucósido	flavonoles	280	24,659	94150	2,279
41	quercetina-7-O-neohesperidosido	flavonoles	280	28,014	8886	0,215
42	quercetina aglicona	flavonoles	280	29,795	65789	1,593
43	kaempferol-3-O-glucósido	flavonoles	280	36,718	86379	2,091
Total de flavonoles						11,604
Total de compuestos identificados (%)						100

De la Tabla 6 se desprende que, en los extractos de orujo de uva existen 4 familias principales de fenoles: ácidos fenólicos, flavonoles, antocianos y flavan-3-oles. Para cada uno de estos tipos de compuestos existen múltiples evidencias sobre su

bioactividad, lo que hace que esta mezcla diseñada por la naturaleza sea extremadamente interesante. El principal resultado de esta parte de nuestra investigación es que por primera vez, se están aportando evidencias contundentes sobre las estructuras contenidas en los extractos (perfil polifenólico de los mismos). Los flavonoles, y particularmente la quercetina, se están utilizando ampliamente debido a sus probados efectos antioxidantes, así como los antiinflamatorios y acciones neuroprotectoras (Mastropietro G., et al, 2015; Santi M., et al, 2018; Carvalho D., et al, 2017). Por otra parte, los flavan-3-oles se utilizan ampliamente asociados a su capacidad antioxidante.

Cuarenta y tres compuestos fueron identificados sin ambigüedad incluyendo: siete flavonoles, quince antocianinas, cinco ácidos fenólicos y dieciséis flavan-3-oles. El set de flavan-3-oles incluye el trímero de procianidina C2 (fila 21) y cuatro conjuntos de trímeros de procianidina (filas 25, 26, 31 y 32). En estos últimos casos, dado que todos los trímeros de procianidina tienen el mismo peso molecular, para completar la identificación de cada uno de los presentes en la mezcla se utilizaron métodos computacionales, idóneos como complemento y para proporcionar una comprensión exhaustiva de la estructura y las propiedades de estos importantes compuestos bioactivos. También se podrían utilizar combinaciones de técnicas analíticas para superar los retos que plantean el isomerismo y la complejidad estructural. Por ejemplo, idealmente se podría integrar técnicas que se acoplen la de HPLC a RMN, Ionización por Electrospray (ESI) or MALDI-TOF, IR, o difracción de rayos X.

Entonces, en este caso. para superar esta ambigüedad se plantearon computacionalmente todas las posibles combinaciones triméricas posibles de catequina (C) y monómeros de epicatequina (E) que son CCC, ECC, CEC, CCE, EEC, ECE, CEE y EEE. Además sabemos que los enlaces entre ellos solo pueden ser C4-C8 (48) o C4-C6 (46), lo que generó cuatro enlaces putativos que fueron señalizados en las estructuras como 4848, 4846, 4648 y 4646. De este modo totalizaron treinta y dos estructuras trímeras modeladas. La elucidación estructural de los trímeros de procianidina requiere una combinación de técnicas para superar los retos que plantean el isomerismo y la complejidad. La integración de datos de RMN, EM, HPLC y cristalografía, complementada con métodos computacionales, proporcionará una comprensión exhaustiva de la estructura y las propiedades de estos importantes compuestos bioactivos.

En total, se creó una base de datos de setenta compuestos para los procedimientos *in silico* que nos permiten racionalizar la supuesta relación entre la composición de nuestra mezcla de fenoles y su capacidad de interferir con el complejo NF- κ B-ADN.

En la Tabla 7 se muestran los resultados del HPLC-MS para distintas concentraciones de extracción (0, 20, 40, 50, 80, 100 % Etanol). Es evidente que los perfiles polifenólicos son muy distintos entre ellos, por ejemplo, hay compuestos que aparecen a 0% etanol, pero no a 100% del mismo. Esto confirma nuestra hipótesis de que, a distintas concentraciones de EtOH:H₂O se extraen polifenoles con distinta polaridad (Tabla 8).

Tabla 7: Compuestos encontrados por HPLC-MS a distintas concentraciones de mezcla Etanol/Agua. Valores expresados como área debajo de la curva.

	PORCENTAJE ETANOL					
	0%	20%	40%	50%	80%	100%
compuestos de pigmentación	27.204	80.733	223.026	1.191.342	122.955	9.343
delphinidin-3-O-glucósido	3.920	9.844	25.791	44.475	23.323	0
cyanidin-3-O-glucósido	34.511	107.109	342.853	8.867	271.799	25.250
petunidin-3-O-glucósido	7.141	22.244	94.531	74.001	178.854	19.681
peonidin-3-O-glucósido	99.679	272.152	905.826	30.264	968.057	156.784
malvidin-3-O-glucósido	1.423	6.154	18.931	246.379	16.320	0
delphinidin-3-O-(6'-acetil)glucósido	0	1.609	8.323	5.490	6.873	0
petunidin-3-O-(6'-acetil)glucósido	1.471	10.571	60.002	15.340	62.352	6.270
peonidin-3-O-(6'-acetil)glucósido	1.356	4.963	17.872	9.585	16.444	0
malvidin-3-O-(6'-acetil)glucósido	7.386	26.173	183.000	47.261	253.787	78.009
delphinidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	626	4.171	83.476	52.391	239.483	127.156
malvidin-3-O-(6'-caffeoil)glucósido	454	2.988	51.684	21.549	81.755	13.983
cianidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	0	0	25.736	16.157	61.721	26.326
petunidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	1.031	5.867	123.341	81.375	369.586	199.831
peonidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	0	1.429	3.337	70.515	7.661	0
malvidin-3-O-(6'-p-coumaroil)glucósido	7.975	27.593	711.845	467.693	2.243.341	1.264.167
suma	194.177	583.600	2.879.574	2.382.684	4.924.311	1.926.800
ácidos fenolicos						
ácido cis-caftarico	38.567	151.915	189.504	68.021	21.530	66.710
ácido trans-caftarico	17.319	83.502	153.568	12.280	102.402	67.956
ácido trans-cutarico	64.761	104.290	201.892	173.386	108.406	52.346
p-coumaroil hexosa (1)	265.893	309.317	575.529	42.092	472.244	103.068
p-coumaroil hexosa (2)	168.223	344.413	747.003	80.846	734.468	126.741
suma	554.763	993.437	1.867.496	753.250	1.439.050	416.821
flavan-3-ols						
procianidina trímero C2	11.217	274.770	512.818	13.376	465.910	267.728
procianidina dímero B1	96.819	93.796	213.605	53.601	85.640	22.652
procianidina dímero B3	185.880	212.191	289.630	73.849	189.105	62.133
(+)-catequina	91.205	419.765	865.452	289.603	355.994	214.929
procianidina trímero	104.396	90.802	146.105	370.764	82.340	15.005
procianidina dímero B4	275.488	645.106	1.706.695	193.870	1.509.148	674.673
procianidina dímero B6	224.351	232.779	300.489	771.559	210.553	37.877
(-)-epicatequina	124.651	154.396	474.543	135.473	320.371	107.129
procianidina dímero galloilado	0	24.782	27.436	335.850	2.881	0
procianidina trímero	35.745	56.274	181.317	13.224	105.590	52.819
procianidina trímero	69.033	52.179	93.951	132.934	23.860	0
procianidina dímero B2	5.449	242.795	580.140	168.691	338.615	129.327
procianidina dímero galloilado	0	42.489	149.578	132.598	89.794	0
(-)-epicatequina galato	0	17.542	37.816	313.241	15.401	11.458
procianidina dímero B7	23.066	176.543	470.397	275.773	336.825	133.474
suma	1.247.300	2.736.209	6.049.972	6.386.044	4.132.027	1.729.204

Además, sumando los totales de las áreas obtenidas de todos los componentes obtenidos en cada una de las concentraciones de extracción vemos que la gráfica que se obtiene (Figura 15) es muy similar a la Figura 8 en donde se muestra la curva de polifenoles totales obtenidas en el proceso extractivo a distintas concentraciones de etanol/agua para 1g de las diferentes muestras. Esto confirma y apoya el hecho de seguir trabajando con un solvente de extracción que contenga 50/50 EtOH:H₂O.

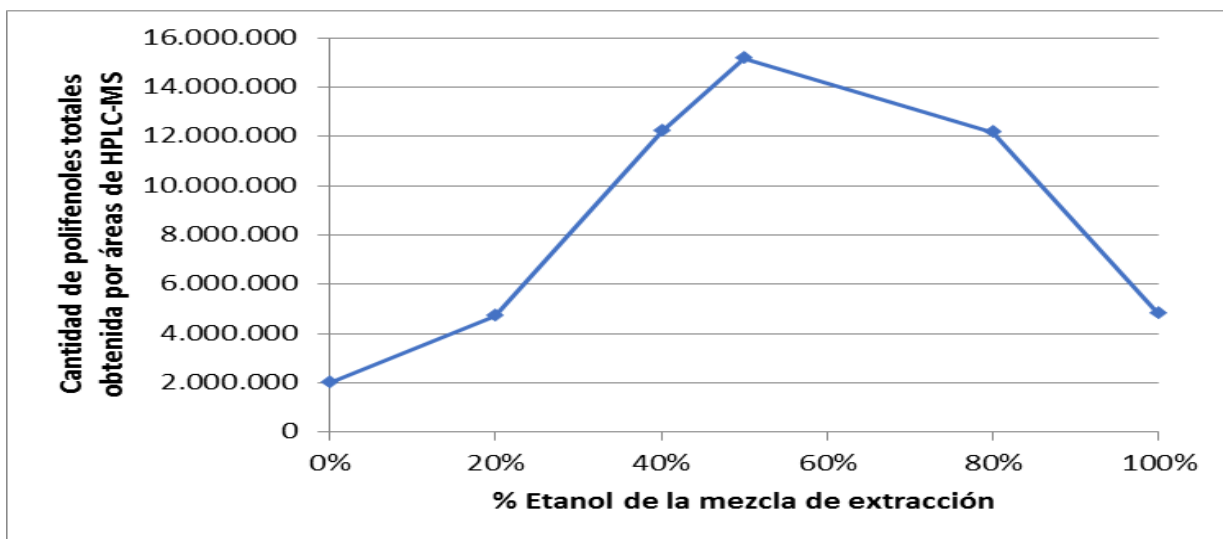


Figura 15: Total de polifenoles obtenidos por suma de áreas en HPLC-MS-MS vs % de Etanol en la mezcla de extracción.

En la Figura 16 se muestran las cantidades relativas de cada uno de los compuestos obtenidos para las distintas concentraciones de EtOH:H₂O (a la izquierda) y los mismos graficados exclusivamente para la concentración hidroalcohólica trabajada (50:50 EtOH/H₂O - a la derecha).



Figura 16: Cuantificación de compuestos (expresados como áreas debajo de la curva - AUC-) encontrados por HPLC-MS a distintas concentraciones de mezcla Etanol/Agua y a 50% de etanol separados por familias.

5.4. Análisis in silico de la capacidad antiinflamatoria de los polifenoles contenidos en los extractos al interactuar con el NFkB.

Docking molecular

Se realizó un anclaje molecular con técnicas *in silico* para estudiar la posible asociación entre los polifenoles detectados en el HPLC-MS y el factor de transcripción NFkB (definido en nuestro trabajo como blanco asociado a la capacidad

antiinflamatoria). El mismo también fue estudiado en los ensayos *in vitro* antes presentados.

El programa Site Finder (parte del paquete de Molecular Operating Environment (MOE), Montreal, QC, Canadá, H3A 2R7) se utilizó para predecir sitios de unión putativos en la estructura NFkB. Este procedimiento detectó tres regiones principales: dos sitios de contacto fuera de la interfase ADN-proteína y un tercer sitio que se localiza en la interfase, donde suponemos que debería ocurrir la principal interferencia con la unión de proteínas al ADN. El resultado se muestra en la Figura 17.

Posteriormente, se realizó un “blind” docking (con el espacio de búsqueda que abarca todo el complejo NFkB-ADN) utilizando Autodock Vina y los compuestos fenólicos identificados por HPLC-MS. Estas simulaciones indicaron que el sitio más poblado era cerca de la región de interfase NFkB-DNA. Por lo tanto, después del “blind” docking inicial, se procedió a realizar un docking molecular con las 69 estructuras fenólicas en la región de la interfaz del NFkB-DNA (Figura 17).

Estos docking dieron como resultado 69 complejos con valores de score entre -10,78 y -7,60 kcal/mol (Figuras 17 y 18).

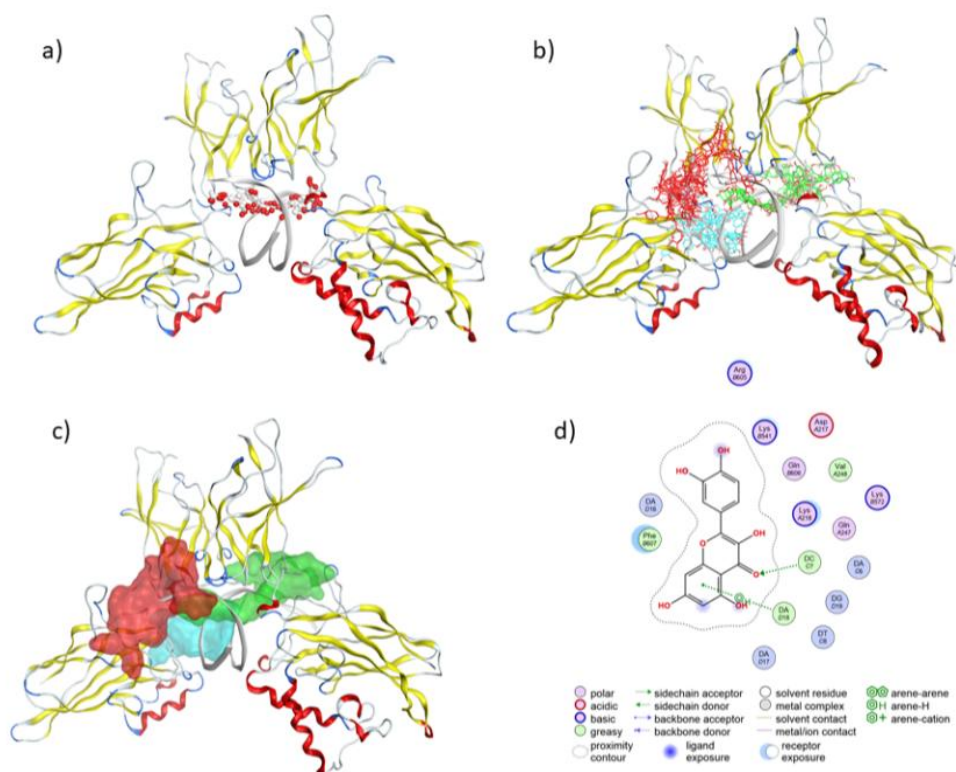


Figura 17: a) Sitio más grande identificado por Site Finder, dibujado como esfera alfa celeste (apolar) y rojo (polar), colocadas en la interfase entre el surco mayor del ADN; b) El 50% de las conformaciones con mejor score se muestran en celeste (surco menor de ADN), verde (surco mayor de ADN) y rojo (un sitio fuera de la interfase ADN-proteína); c) Mejor sitio acoplado, ubicado en la interfaz entre el surco principal de ADN y el factor de transcripción NF-κB dibujado como un sitio molecular verde que rodea los fenoles acoplados; d) El fenol con mejor puntuación, la quercetina, se

muestra junto con el principal contactos, en una vista bidimensional. El código de color de las esferas se da en la leyenda.

De la Figura 17, surge un escenario estructural muy interesante al observar el 50% de las mejores poses del *docking*. Por un lado, el Site Finder (Figura 17a), expuso un surco en la interfase ADN-proteína, con propiedades electrostáticas polares (esferas rojas) e hidrofóbicas (esfera gris). En la Figura 17b, luego de un procedimiento de agrupamiento, pudimos visualizar tres regiones preferidas para las moléculas (coloreadas en verde, rojo o celeste). Las moléculas verdes se sitúan en el surco principal del ADN, las celestes en el surco menor, y las rojas interactúan con una región más expuesta al ADN pero no en la interfase proteína-ADN. Esta observación desencadenó la hipótesis de que la diversidad estructural identificada hace posible una amplia gama de interacciones fuertes de fenoles en la interfase del factor de transcripción NFκB con el ADN. La figura 17c refuerza y grafica la comprensión de tal escenario estructural y la figura 17d da detalles sobre las cadenas laterales que interactúan con la quercetina, seleccionada como el fenol ejemplo para demostrar el ambiente molecular de los fenoles acoplados.

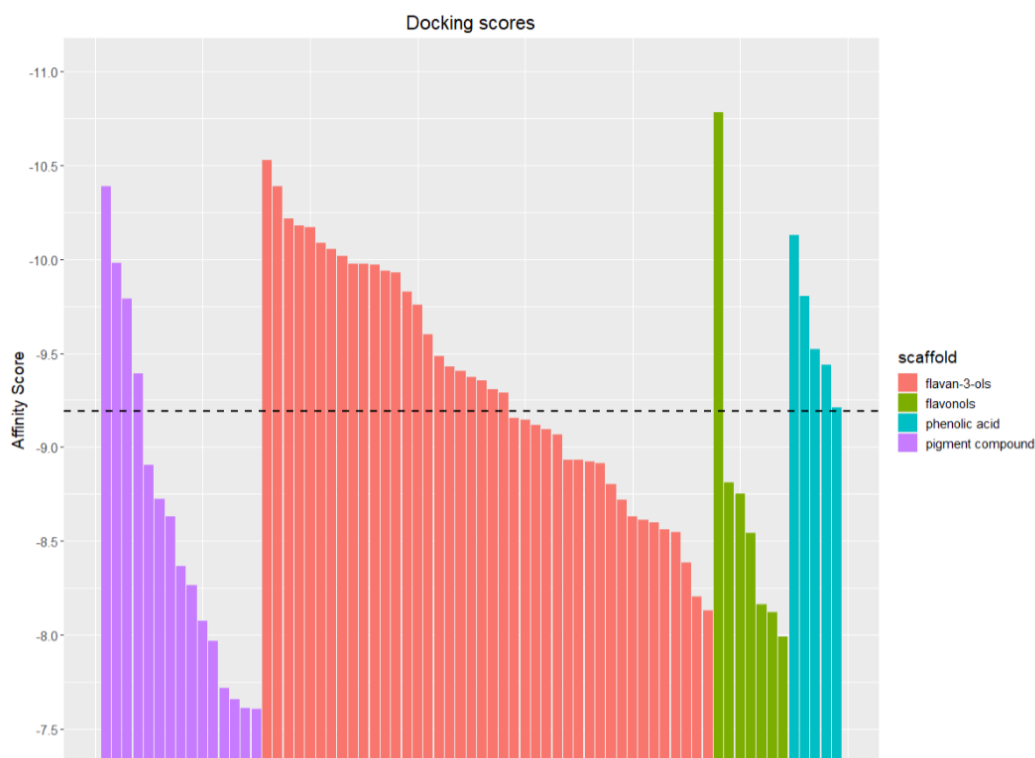


Figura 18. Score de afinidad (kcal/mol) del conjunto completo de fenoles estudiados, agrupados en cuatro familias: flavan-3-oles (naranja); flavonoles (verde); ácidos fenólicos (celeste) y compuestos pigmentarios (antocianinas, en color violeta). Una línea negra punteada marca un nivel de puntuación del 50 % (-9,19 kcal/mol) del rango total (-7,60 a -10,78 kcal/mol).

En la figura 18 podemos observar que, para las cuatro familias de compuestos identificados por HPLC-MS, el rango del score muestra un amplio rango para los compuestos pigmentarios (antocianinas) y altos puntajes para los flavan-3-oles, ácidos fenólicos, y flavonoles. Es evidente que todas las familias contienen

compuestos con puntuaciones superiores a -9,19 kcal/mol, es decir, en el percentil 50% de los superiores. Luego, cuando se consideran los “mejores cinco dockeados” (Tabla 8), el primero en el ranking es un flavonol, la quercetina, seguido por dos flavan-3-oles en dos etapas de polimerización (CCE4846 y CEE4846), (+)-catequina y una antocianina, la Malvidin-3-O-(6-p-cafeoil)-glucósido.

Id	Molécula	Tipo	Afinidad (% / Av %)
1	Quercetina aglicona	Flavonol	-10.78 (11.61 / 7.7)
2	(+)-catequina	Flavan-3-ol	-10.53 (75.32 / 4.7)
3	procianidina trímero CCE4846	Flavan-3-ol	-10.39 (75.32 / 4.7)
4	Malvidina-3-O-(6-p-cafeoil)-glucósido	Antocianina	-10.39 (3.96 / 0.3)
5	procianidina trímero CEE4846	Flavan-3-ol	-10.22 (75.32 / 4.7)

Tabla 8: Los cinco compuestos con mejor score identificados a través del docking molecular. Última columna: la puntuación de afinidad está en kcal/mol. Entre paréntesis, % indica el porcentaje de cada clase de compuesto con respecto al número total de compuestos y Av% es este porcentaje dividido por el número de compuestos de esa clase.

Todos los compuestos mostrados en la Tabla 8 tienen gran importancia como compuestos bioactivos: la quercetina, o sus posibles derivados, son moléculas clave en la hipótesis de la neuroprotección. En este estudio además se le ha dado una importancia especial a la quercetina aglicona por ser esa estructura la de mejor energía de anclaje. Por otro lado, el subgrupo de las antocianinas están intensamente asociados con el desarrollo del color en las uvas y los flavan-3-oles se consideran compuestos antioxidantes y antiinflamatorios muy interesantes.

Finalmente, debemos realizar ciertas consideraciones adicionales si se toma en cuenta el porcentaje promedio. Desde este punto de vista, se podría conjeturar que en esta mezcla tan diversa de compuestos, los flavonoles y los flavan-3-oles deberían tener el mayor impacto en términos de actividad biológica, siendo las antocianinas menos importantes dado su contenido relativamente bajo en la mezcla de compuestos (Según Tabla 6).

Dinámica molecular

Se realizaron dinámicas moleculares (MD) de 100 ns del complejo NFkB con los tres mejores compuestos que cumplieran con dos requisitos:

- 1- ser uno de los 3 compuestos con mayor abundancia dentro de su familia en la mezcla polifenólica de los extractos de orujo de uva, en la composición 50/50 EtOH/H₂O analizados por HPLC-MS,
- 2- se ubicaran por encima de la posición 20 del docking molecular. Si bien la quercetina no cumple con los requisitos antes planteados al no ser el compuesto más abundante dentro de su familia, nos interesaba particularmente analizar su MD dado que fue el compuesto mejor dockeado. Por todo lo antes dicho es que decidimos realizar la DM de quercetina aglicona (QUE), procianidina dímero B4 (PB4) y Malvinidina-3-O-glucósido (M3O).

Según los valores de RMSD obtenidos (Figura 19), la simulación se estabilizó aproximadamente a los 3 ns, no observándose cambios conformacionales entre la proteína y los ligandos (fenoles testeados)

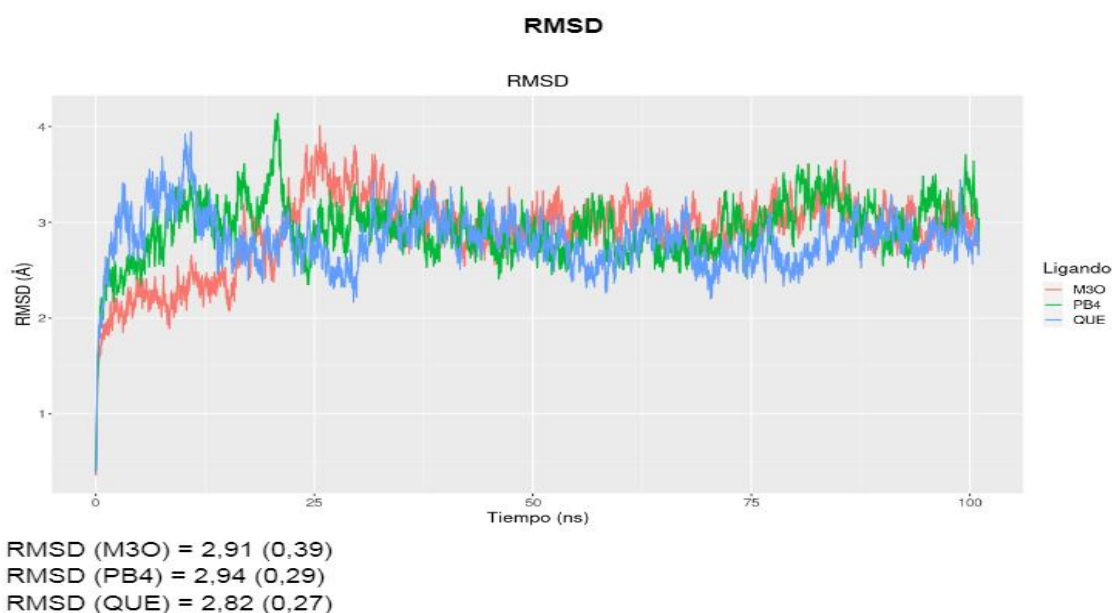


Figura 19. Valores de RMSD obtenidos para los distintos ligandos (M3O, PB4, QUE).

En la Tabla 9 podemos ver la energía de unión de los fenoles antes mencionados, desglosada en sus componentes electrostática y de Van Der Waals, a la proteína (NFkB), al ADN y al solvente. La última columna muestra la energía total de la interacción del fenol con el complejo NFkB-proteína.

Componentes	Proteína-M3O (Kcal/mol)	ADN-M3O (Kcal/mol)	Solvente-M3O (Kcal/mol)	Energía total (Kcal/mol)
Electrostática	158.23 (17.85)	-378.08 (25.10)	74.03 (16.56)	-145.82 (18.28)
VDW	-26.63 (20.35)	-23.29 (3.22)	-6.29 (3.97)	-56.21 (6.17)
Total	131.60 (20.35)	-401.38 (24.64)	67.74 (16,38)	-202.03 (14.97)

Componentes	Proteína-PB4 (Kcal/mol)	ADN-PB4 (Kcal/mol)	Solvente-PB4 (Kcal/mol)	Energía total (Kcal/mol)
Electrostática	-114.85 (30.90)	6,59 (9.87)	-60.40 (21.80)	-168.66 (16.92)
VDW	-20.01 (5.44)	-1.86 (1.74)	-16.26 (4.96)	-38.13 (6.85)
Total	-134.87 (29.49)	4.73 (10.10)	-76.66 (20.78)	-206.79 (14.92)

Componentes	Proteína-QUE (Kcal/mol)	ADN-QUE (Kcal/mol)	Solvente-QUE (Kcal/mol)	Energía total (Kcal/mol)
Electrostática	-24.13 (11.28)	-19.73 (7.38)	-18.44 (8.53)	-62.30 (9.84)

VDW	-17.97 (1.81)	-17.95 (2.60)	-3.78 (3.17)	-39.70 (4.15)
Total	-42.10 (11.31)	-37.68 (6.85)	-22.23 (7.23)	-102.01 (8.21)

Tabla 9: Energía de unión de Malvidina-3-O-glucósido (M3O), Procianidina B4 (PB4) y quercetina (QUE) con el NFkB (proteína), ADN y solvente, todas las energías expresadas en Kcal/mol. Entre paréntesis al lado de cada valor su desvío estándar. Se destaca en color fúor los valores de la energía total.

De la Tabla 9 se desprende en primer lugar que, al haberse medido para todas las moléculas estudiadas energías totales de interacción negativas, existe una interferencia con la formación de un complejo NFkB-ADN funcional.

No debemos perder de vista el hecho de que la simulación de dinámica molecular está basada en la interacción entre átomos, y que estas interacciones son el resultado del uso de algoritmos que estiman los mismos. Por lo que las dinámicas moleculares nos permiten proponer hipótesis sobre mecanismos de acción del evento de interferencia que estamos comprobando.

Un análisis pormenorizado de las componentes de la energía total (electrostática y de Van Der Waals) nos permite indicar cuál de estas componentes puede influir más, lo cual nos permite proponer un mecanismo de acción molecular para la interferencia ADN-proteína.

En el caso de M3O, la energía electrostática de interacción con el NFkB es positiva mientras que la misma con el ADN es negativa, siendo la suma de ambos negativa (como se observa en la Tabla 9). Esto permite sugerir que el mecanismo de acción para inhibir la respuesta inflamatoria de la molécula M3O sería unirse selectivamente al ADN no permitiendo así la transcripción del mismo por el NFkB.

Por otro lado, en base a esta simulación, se puede conjeturar un mecanismo de acción distinto para la PB4 dado que las energías electrostáticas son, en este caso, negativa para la interacción con la proteína y positiva para la interacción mediada con el ADN. Entonces, para el caso de la PB4, es probable que este fenol se una al NFkB modificando su conformación en el espacio e inhibiendo, de este modo, la posibilidad de que el mismo se una al ADN, bloqueando así la transcripción de factores pro inflamatorios.

En el caso de la QUE, no queda tan claramente definida la situación como en los casos anteriores si nos atenemos a la componente electrostática de la energía de interacción. En este caso, ambas son negativas, y por lo tanto podemos asumir que cualquiera de las dos biomoléculas participantes (proteína o ADN) podría tener un rol desencadenante para explicar el mecanismo de acción de la QUE, participando ambas del mismo.

Con respecto a la componente de Van Der Waals de la energía de interacción, todas ellas, en todos los casos medidos, son negativas, si bien en general, de menor valor absoluto que las componentes electrostáticas. Esto amerita concluir que la interacción de Van Der Waals es a favor de la interferencia ADN-proteína, si bien no es una fuente de energía de interacción como la electrostática particularmente para los dos primeros

casos mostrados en la Tabla 9. Esto notoriamente se está originando en la estructura atómica de los fenoles medidos en los cuales la carga o la polarizabilidad de carga siempre es importante. Si bien estas conclusiones están respaldadas por los resultados de score obtenidos, se debe notar que las medidas de docking en general son poco sensibles y que en general las diferencias son menores que las que se podrían medir con cálculos *in silico* de mayor precisión.

Finalmente, se completó el estudio de las energías de interacción utilizando una medida más precisa del delta G total mediante la técnica MMPBSA, en la cual se introduce la interacción con el solvente en forma explícita.

La misma se realizó para cada uno de los fenoles testeados y el resultado se presenta en la Tabla 10.

Una importante conclusión es que, en todos los casos, los valores obtenidos son negativos, lo que corrobora una vez más y mediante un método más completo de medida de la interacción, que la misma entre fenoles y NFkB es energéticamente favorable.

El mismo comentario realizado para las medidas de interacción mediante anclaje molecular, se mantiene en este caso (Ver Tabla 9). Por un lado, los valores absolutos de las energías electrostáticas son de un orden de magnitud mayor que las de Van Der Waals. Por otro lado, las energías de solvatación son positivas, lo que se explica por el tipo de hidrofobicidad intermedia que poseen estos fenoles, los cuales no son tan solubles en agua (esto condice con los resultados obtenidos del desarrollo del método extractivo, en el cual las mejores concentraciones extraídas se obtuvieron con la mezcla 50/50 EtOH/H₂O). En tercer lugar, las energías totales medidas de Delta G son todas negativas y son similares para M3O y PB4, siendo menores para QUE. Esto es una razonable coincidencia con los valores medidos por anclaje molecular, pero pone de relevancia el efecto del solvente en cada caso.

	M3O		PB4		QUE	
Componente	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Elec (gas)	-363.9139	18.8197	-108.6230	30.0104	-44.0179	10.2536
VDW (gas)	-52.8251	6.2982	-24.0857	6.0482	-37.6062	2.9710
Total (gas)	-416.7390	17.0636	-132.7087	29.7320	-81.6241	10.0226
PB (Solv)	401.8420	14.0860	112.5655	24.1776	82.3927	12.8949
SA (Solv)	-6.5758	0.1984	-5.5348	0.6031	-4.7933	0.1157
Total (Solv)	395.2662	14.0789	107.0307	23.6821	77.5994	12.8567
Total polar	37.9281	10.3508	3.9425	10.2903	38.3748	9.1177
Total no polar	-59.4009	6.3940	-29.6205	6.3017	-42.3995	2.9879
Delta G	-21.4728	7.6518	-25.6780	8.3939	-4.0247	7.8848

Tabla 10: valores de Delta G (en kcal/mol) obtenidos para los complejos proteína-ligando testeados.

Finalmente, es de destacar que, tal como se planteó en la introducción de esta Tesis, existen dos escenarios posibles para la acción de los fenoles en la cadena inflamatoria: el citosólico y el nuclear.

En base a nuestros resultados, podemos concluir lugares diferentes de acción dependiendo de la estructura:

Para el caso de la M3O: podría actuar principalmente a nivel del núcleo, uniéndose al ADN y bloqueando la transcripción del mismo, mientras que la PB4 se uniría al NFκB a nivel citosólico, muy probablemente, no permitiendo su translocación hacia el núcleo. Por lo tanto, utilizando un modelo en el cual únicamente se consideró la interacción de los fenoles con el NFκB a nivel nuclear, se ha podido opinar sobre cuál de los dos mecanismos de bloqueo del NFκB alternativos se podría considerar y se sugiere que el mismo sería estructura dependiente del tipo de fenol interactuante.

6. CONCLUSIONES

De todo lo antes planteado es que podemos sacar las siguientes conclusiones:

- ❖ Los orujos de uva analizados, obtenidos luego del proceso de vinificación, poseen grandes cantidades de agua (entre un 50-60%) por lo que debemos secarlos a temperatura controlada (60°C) y a vacío para que se mantengan sus cualidades y se inhiba el desarrollo microbiano. De este modo podríamos conservarlos durante largos periodos de tiempo inalterados.
- ❖ El desarrollo del procedimiento extractivo fue muy eficiente, siendo 50:50 la mejor concentración etanol:agua (EtOH:H₂O) para extraer la mayor cantidad de

polifenoles con actividad antioxidante utilizando la técnica de maceración a temperatura ambiente durante 7 días.

❖ Las concentraciones de EtOH:H₂O necesitan estar dentro de cierto rango (40:60 – 60:40 EtOH:H₂O) para llegar al óptimo de extracción

❖ Según la caracterización fisicoquímica por FC, DPPH y ABTS que se les realizó a los extractos de distintas cepas de orujos de uva, se concluye que los orujos de uva Tannat poseen mayor cantidad de polifenoles que los orujos de uva Cabernet Franc. Estos tres métodos brindan una descripción complementaria entre ellos que brinda una caracterización fisicoquímica completa de la muestra analizada.

❖ Si se desea escalar a nivel industrial el procedimiento extractivo, se recomienda utilizar una masa de 10g/25mL EtOH:H₂O en concentraciones 50:50 y un conjunto de análisis en 2 etapas:

a) como screening básico: FC (correlacionado en más del 90% con el resto de los parametros analíticos); y

b) para un control analítico de los componentes antioxidantes, agregar ABTS, DPPH, ORAC y FRAP.

❖ La técnica de ESR nos permitió saber con certeza que los compuestos fenólicos obtenidos en la extracción poseen efectivamente actividad antioxidante ya que para todas las muestras se observó un decaimiento en la intensidad de la señal comparándolo con la intensidad del aducto DMPO-OH.

❖ La resonancia electrónica de espín (ESR) junto con la técnica de atrapamiento de espín parece ser una herramienta útil en la determinación de la capacidad antioxidante de los productos de origen natural, ya que fue posible estudiar la reactividad frente a un radical libre.

❖ Pudimos comprobar que todos los extractos de orujos de uva lograron atenuar, en mayor o menor medida, la activación del NFκB lo que confirma que los polifenoles presentes en extractos de orujos de uva interfieren con la actividad del factor de transcripción nuclear en estudio.

❖ Se determinó la IC₅₀ para los extractos de orujos sobre el linaje celular con el que se trabajó (HT29-NFκB-GFP) y además observamos que todas las muestras lograron atenuar, en mayor o menor medida, la activación del NFκB.

❖ La concentración de IL-8 detectable en el sobrenadante de las células incubadas con los extractos de orujo de uva nos sugiere que, efectivamente, hubo una activación del NFκB que fue “detenida” por los polifenoles presentes en las muestras ensayadas en distintos puntos.

❖ Los resultados obtenidos por HPLC-MS fueron de gran utilidad para conocer el perfil estructural de los fenoles obtenidos en los extractos de orujos de uva.

❖ Los perfiles polifenólicos son muy distintos entre ellos, por ejemplo, hay compuestos que aparecen a 0% etanol, pero no a 100% del mismo. Esto confirma nuestra hipótesis de que, a distintas concentraciones de EtOH:H₂O se extraen polifenoles con distinta polaridad.

- ❖ Los polifenoles con mayor presencia en el perfil polifenólico obtenido por HPLC-MS a una concentración de 50:50 EtOH:H₂O, son malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-(6`cumaroil)glucósido, ambos muy importantes para la pigmentación de la uva.
- ❖ De los análisis *in silico* realizados se desprende que las moléculas que interfieren mayormente en la atenuación de la señal son aquellos polifenoles de mayor/gran tamaño (apoyado también en los perfiles obtenidos por HPLC-MS).
- ❖ Cuatro de los cinco polifenoles mejores rankeados en el *docking* molecular pertenecen a la familia de las antocianinas, que están asociadas de una manera muy fuerte con el color de las uvas.
- ❖ El polifenol mejor rankeado en el *docking* molecular consiste en una quercetina aglicona.
- ❖ Del *docking* molecular surge que la diversidad estructural identificada en los orujos de uva hace posible una amplia gama de interacciones fuertes de fenoles en la interfase del factor de transcripción NFκB con el ADN.
- ❖ En base a los resultados obtenidos en la dinámica molecular, podemos concluir lugares diferentes de acción dependiendo de la estructura del fenol. Así es que la Malvidin-3-O-glucósido podría actuar principalmente a nivel del núcleo, uniéndose al ADN y bloqueando la transcripción del mismo, mientras que la Procianidina B4 se uniría al NFκB a nivel citosólico, muy probablemente, no permitiendo su translocación hacia el núcleo.
- ❖ Utilizando un modelo en el cual únicamente se consideró la interacción de los fenoles con el NFκB a nivel nuclear, se ha podido sugerir que el sitio donde se da el bloqueo del mismo sería estructura dependiente del tipo de fenol interactuante.
- ❖ Todo el procedimiento *in silico* en el que estudió la interacción NFκB-fenoles se basó en el hallazgo novedoso de los perfiles polifenólicos obtenidos por HPLC-MS. Esto valida una estrategia de articulación de estudios experimentales y computacionales que permiten explicar el modo de acción antiinflamatoria de los polifenoles presentes en los orujos de uva.

7. AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Dra. Mariela Bollati y a la Msc Hellen Daghero, ambas pertenecientes a la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo, por permitirme trabajar en su unidad y asesorarnos en la realización de nuestros ensayos *in vitro*.

Agradezco también al Dr. Eduardo Boido por su gran participación para poder realizar el perfil polifenólico de los extractos de orujos de uva por HPLC-MS, un paso muy importante para la realización de esta tesis.

Al Dr. Claudio Olea y al Dr. Mauricio Moncada de la Universidad de Chile por ayudarme a realizar las técnicas de ORAC, FRAP y ESR.

A mi familia, esposo e hija, quienes siempre me han apoyado y motivado a seguir adelante logrando así poder ser una mejor profesional.

Otro agradecimiento especial va para mi tutora de tesis, la Dra. Margot Paulino, quien me ha apoyado, asesorado, motivado y hasta me tuvo muchísima paciencia para que hoy la defensa de mi Maestría en Química sea una realidad.

A mis compañeros de la cátedra de Bioinformática, especialmente al Msc. Jorge Cantero quien me dio una mano increíble con las Dinámicas Moleculares y los cálculos estadísticos.

A todos uds, GRACIAS! Sin Uds nada de esto hubiera sido posible!

8. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, W., Khan, K. A., Tripathy, M. K., Dichamp, I., Keita, M., Rohr, O., & Herbein, G. (2012). Inhibition of ER stress-mediated apoptosis in macrophages by nuclear-cytoplasmic relocation of eEF1A by the HIV-1 Nef protein. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.32>
2. Alharbi, K. S., Afzal, O., almalki, W. H., Kazmi, I., Javed Shaikh, M. A., Thangavelu, L., Gulati, M., Singh, S. K., Jha, N. K., Gupta, P. K., Chellappan, D. K., Oliver, B. G., Dua, K., & Gupta, G. (2022). Nuclear factor-kappa B (NF-κB) inhibition as a therapeutic target for plant nutraceuticals in mitigating inflammatory lung diseases. *Chemico-Biological Interactions*, 354, 109842. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2022.109842>
3. Alvareda, E., Iribarne, F., Espinosa, V., Miranda, P., Santi, D., Aguilera, S., Bustos, S., & Zunini, M. P. (2019). In Silico and in Vitro Approach for the Understanding of the Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Uruguayan Tannat Grape Pomace and Propolis Polyphenols. *Journal of Biophysical Chemistry*, 10(01), 1–14. <https://doi.org/10.4236/JBPC.2019.101001>
4. Anrather, J., Racchumi, G., & Iadecola, C. (2006). NF-κB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5657–5667. <https://doi.org/10.1074/JBC.M506172200/ATTACHMENT/6AD56A5A-D771-47FE-99C8-1504AE48FC6F/MMC1.PDF>
5. BARRERA RAMÍREZ, L. M., DRAGO SERRANO, MA. E., PÉREZ RAMOS, J., SAINZ ESPUÑES, T. D. R., ZAMORA, A. C., GÓMEZ ARROYO, F., & MENDOZA PÉREZ, F. (2013). Revista del instituto nacional de enfermedades respiratorias. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42–55. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=

6. Barriga-Gonzalez, G., Olea-Azar, C., Zuniga-Lopez, M., Folch-Cano, C., Aguilera-Venegas, B., Porcal, W., Gonzalez, M., & Cerecetto, H. (2015). Spin Trapping: An Essential Tool for the Study of Diseases Caused by Oxidative Stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(5), 484–495. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150206155108>
7. Basak, S., Kim, H., Kearns, J. D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S. L., Benedict, C. A., Ware, C. F., Ghosh, G., Verma, I. M., & Hoffmann, A. (2007). A Fourth I κ B Protein within the NF- κ B Signaling Module. *Cell*, 128(2), 369–381. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.12.033>
8. Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
9. Ben-Neriah, Y., & Karin, M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunology*, 12(8), 715–723. <https://doi.org/10.1038/ni.2060>
10. Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
11. Bonavita, E., Gentile, S., Rubino, M., Maina, V., Papait, R., Kunderfranco, P., Greco, C., Feruglio, F., Molgora, M., Laface, I., Tartari, S., Doni, A., Pasqualini, F., Barbatì, E., Basso, G., Galdiero, M. R., Nebuloni, M., Roncalli, M., Colombo, P., ... Mantovani, A. (2015). PTX3 Is an Extrinsic Oncosuppressor Regulating Complement-Dependent Inflammation in Cancer. *Cell*, 160(4), 700–714. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.01.004>
12. Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, 25(6), 280–288. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2004.03.008>
13. Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/56/11/317/1901722>
14. Carvalho, D., Paulino, M., Polticelli, F., Arredondo, F., Williams, R. J., & Abin-Carriquiry, J. A. (2017). Structural evidence of quercetin multi-target bioactivity: A reverse virtual screening strategy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.028>
15. Colquitt, R. B., Colquhoun, D. A., & Thiele, R. H. (2011). In silico modelling of physiologic systems. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 25(4), 499–510. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2011.08.006>
16. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F., & Stewart, J. J. P. (1985). Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, 107(13), 3902–3909. <https://doi.org/10.1021/ja00299a024>

17. Fariña, E., Daghero, H., Bollati-Fogolín, M., Boido, E., Cantero, J., Moncada-Basualto, M., Olea-Azar, C., Polticelli, F., & Paulino, M. (2023). Antioxidant Capacity and NF- κ B-Mediated Anti-Inflammatory Activity of Six Red Uruguayan Grape Pomaces. *Molecules*, 28(9), 3909. <https://doi.org/10.3390/molecules28093909>
18. Ferrari, D., Speciale, A., Cristani, M., Fratantonio, D., Molonia, M. S., Ranaldi, G., Saija, A., & Cimino, F. (2016). Cyanidin-3-O-glucoside inhibits NF- κ B signalling in intestinal epithelial cells exposed to TNF- α and exerts protective effects via Nrf2 pathway activation. *Toxicology Letters*, 264, 51–58. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2016.10.014>
19. Gilmore, T. D. (2004). The Rel/NF- κ B/I κ B Signal Transduction Pathway and Cancer. *Signal Transduction in Cancer*, 241–265. https://doi.org/10.1007/0-306-48158-8_10
20. Goebeler, M., Gillitzer, R., Kilian, K., Utzel, K., Bröcker, E. B., Rapp, U. R., & Ludwig, S. (2001). Multiple signaling pathways regulate NF- κ B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood*, 97(1), 46–55. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V97.1.46>
21. González-Neves, G., Gil, G., Barreiro, L., Ferrer, M., & Franco, J. (2006). Composición fenólica de las uvas de las principales variedades tintas de *Vitis vinifera* cultivadas en Uruguay. *Agrociencia*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.31285/AGRO.10.918>
22. Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.025>
23. Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nuñez, G., & Fernandez-Luna, J. L. (2002). Induction of Nod2 in Myelomonocytic and Intestinal Epithelial Cells via Nuclear Factor- κ B Activation. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206473200>
24. Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G., & Baldwin, A. S. (1999). NF- κ B Controls Cell Growth and Differentiation through Transcriptional Regulation of Cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5785–5799. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.8.5785>
25. Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2013). Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. *Trends in Immunology*, 34(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2012.08.003>
26. Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2011). Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(1), 69–82. <https://doi.org/10.1021/ci100275a>
27. Jakalian, A., Jack, D. B., & Bayly, C. I. (2002). Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry*, 23(16), 1623–1641. <https://doi.org/10.1002/jcc.10128>

28. JOSE HIDALGO TOGOES. (2018). Tratado de Enología. In Tratado de Enología: Vol. Volumen I.
29. Karin, M. B.-N. Yinon. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-(kappa)B activity - ProQuest. Annual Review of Immunology, 18, 621–663. <https://www.proquest.com/openview/510db481537cea28d06df681f29cc077/1?pq-origsite=gscholar&cbl=47332>
30. Koh, D., Ahn, H., Chung, H.-S., Lee, H., Kim, Y., Lee, J., Kim, D., Hong, M., Shin, M., & Bae, H. (2011). Inhibitory effects of casticin on migration of eosinophil and expression of chemokines and adhesion molecules in A549 lung epithelial cells via NF-κB inactivation. Journal of Ethnopharmacology, 136(3), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.014>
31. Krotz, E. (1991). Viaje, trabajo de campo y conocimiento antropológico. In ALTERIDADES (Vol. 1, Issue 1).
32. Kunnumakkara, A. B., Shabnam, B., Girisa, S., Harsha, C., Banik, K., Devi, T. B., Choudhury, R., Sahu, H., Parama, D., Sailo, B. L., Thakur, K. K., Gupta, S. C., & Aggarwal, B. B. (2020). Inflammation, NF-κB, and Chronic Diseases: How are They Linked? Critical Reviews™ in Immunology, 40(1), 1–39. <https://doi.org/10.1615/CRITREVIMMUNOL.2020033210>
33. Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25(4), 726–732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
34. Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: An overview. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 29(12), 1305–1312. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00085-X)
35. Lawrence, T. (n.d.). The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
36. Li, M.-Y., Deng, H., Zhao, J.-M., Dai, D., & Tan, X.-Y. (2003). PPARγ pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. World Journal of Gastroenterology, 9(6). <http://www.wjgnet.com/1007-9327/9/1220.asp>
37. Li, Q., & Verma, I. M. (2002). NF-κB regulation in the immune system. Nature Reviews Immunology, 2(10), 725–734. <https://doi.org/10.1038/nri910>
38. Li, T., Wong, V. K. W., Yi, X. Q., Wong, Y. F., Zhou, H., & Liu, L. (2009). Pseudolaric acid B suppresses T lymphocyte activation through inhibition of NF-κB signaling pathway and p38 phosphorylation. Journal of Cellular Biochemistry, 108(1), 87–95. <https://doi.org/10.1002/jcb.22230>
39. Lieb, W., Gona, P., Larson, M. G., Massaro, J. M., Lipinska, I., Keaney, J. F., Rong, J., Corey, D., Hoffmann, U., Fox, C. S., Vasan, R. S., Benjamin, E. J., Odonnell, C. J., & Kathiresan, S. (2010). Biomarkers of the Osteoprotegerin Pathway. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 30(9), 1849–1854. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.199661>

40. Liu, Q., Chen, Y., Auger-Messier, M., & Molkentin, J. D. (2012). Integrative Physiology Interaction Between NFB and NFAT Coordinates Cardiac Hypertrophy and Pathological Remodeling. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111>
41. Ló Pez, C. B., García-Sastre, A., Williams, B. R. G., & Moran, T. M. (2003). Type I Interferon Induction Pathway, but Not Released Interferon, Participates in the Maturation of Dendritic Cells Induced by Negative-Strand RNA Viruses. In *The Journal of Infectious Diseases* (Vol. 187). <https://academic.oup.com/jid/article/187/7/1126/801158>
42. Lozano-Aponte, J., & Scior, T. (19 C.E.). ¿Qué sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(1), 86–88. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
43. Marín-Canul, J. E., Mut-Martín, M., Espinoza-García, A. S., Pérez-Izquierdo, O., Ávila-Escalante, M. L., Góngora-Alfaro, J. L., & Aranda Gonzalez, I. I. (2023). Consumo y principales fuentes alimentarias de polifenoles en egresados de la Licenciatura en Nutrición de una universidad pública del sureste de México. *Acta Universitaria*, 33, 1–16. <https://doi.org/10.15174/au.2023.3863>
44. Mark, P., & Nilsson, L. (2001). Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>
45. Mastropietro, G., Tiscornia, I., Perelmuter, K., Astrada, S., & Bollati-Fogolín, M. (2015). HT-29 and Caco-2 Reporter Cell Lines for Functional Studies of Nuclear Factor Kappa B Activation. *Mediators of Inflammation*, 2015(1). <https://doi.org/10.1155/2015/860534>
46. Mecollari, V., Nieuwenhuis, B., & Verhaagen, J. (2014). A perspective on the role of class iii semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(October), 328. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00328/BIBTEX>
47. Milton, K. (2009). *Ecologías: antropología, cultura y entorno*.
48. Nelson, D. E., Ihekweba, A. E. C., Elliott, M., Johnson, J. R., Gibney, C. A., Foreman, B. E., Nelson, G., See, V., Horton, C. A., Spiller, D. G., Edwards, S. W., McDowell, H. P., Unitt, J. F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D. B., & White, M. R. H. (2004). Oscillations in NF-κB Signaling Control the Dynamics of Gene Expression. *Science*, 306(5696), 704–708. <https://doi.org/10.1126/science.1099962>
49. Novack, D. V., Yin, L., Hagen-Stapleton, A., Schreiber, R. D., Goeddel, D. v., Ross, F. P., & Teitelbaum, S. L. (2003). The IκB Function of NF-κB2 p100 Controls Stimulated Osteoclastogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 198(5), 771–781. <https://doi.org/10.1084/JEM.20030116>
50. Núria Solà Tapias. (2018). The involvement of the three main inflammatory bowel disease pathways and the secretion of trypsin proteolytic activity on intestinal epithelial cells - TEL - Thèses en ligne. Université Paul Sabatier - Toulouse III. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02337194/>

51. Ortega-Farias, S., Acevedo, C., Moreno, Y., & Pardo, C. (n.d.). "Merlot": ¿Un desequilibrio hídrico del viñedo?
52. Park, M., & Hong, J. (2016). Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/cells5020015>
53. Paulino, M., Alvareda, E., Iribarne, F., Miranda, P., Espinosa, V., Aguilera, S., & Pardo, H. (2016). Toward the understanding of the molecular basis for the inhibition of COX-1 and COX-2 by phenolic compounds present in Uruguayan propolis and grape pomace. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/07391102.2015.1124808](http://Dx.Doi.Org/10.1080/07391102.2015.1124808), 34(12), 2643–2657. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1124808>
54. Pearlman, D. A., Case, D. A., Caldwell, J. W., Ross, W. S., Cheatham, T. E., DeBolt, S., Ferguson, D., Seibel, G., & Kollman, P. (1995). AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications*, 91(1–3), 1–41. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00041-D](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00041-D)
55. Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1439–1452. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2006.07.004>
56. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
57. ROEDER, R. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(9), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)10050-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)10050-5)
58. Romier, B., de Walle, J. van, During, A., Larondelle, Y., & Schneider, Y.-J. (n.d.). Modulation of signalling nuclear factor- κ B activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. <https://doi.org/10.1017/S0007114508966666>
59. Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., & Tommasi, N. de. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100(1), 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.09.041>
60. Santi, M. D., Paulino Zunini, M., Vera, B., Bouzidi, C., Dumontet, V., Abin-Carriquiry, A., Grougnet, R., & Ortega, M. G. (2018). Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) in vitro and molecular docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 577–582. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.071>
61. Schmidt, K. N., Amstad, P., Cerutti, P., & Baeuerle, P. A. (1995). The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. *Chemistry & Biology*, 2(1), 13–22. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90076-4](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90076-4)

62. Schütze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., & Krönke, M. (1992). TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "Acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell*, 71(5), 765–776. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90553-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90553-O)
63. Sen, C. K., Roy, S., & Packer, L. (1996). Involvement of intracellular Ca²⁺ in oxidant-induced NF- κ B activation. *FEBS Letters*, 385(1–2), 58–62. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00346-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00346-8)
64. Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., & Karin, M. (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*, 293(5534), 1495–1499. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1062677/SUPPL_FILE/1062677S3_THUMB.GIF
65. Singh, S., & Aggarwal, B. B. (1995). Protein-tyrosine Phosphatase Inhibitors Block Tumor Necrosis Factor-dependent Activation of the Nuclear Transcription Factor NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 270(18), 10631–10639. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10631>
66. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent (pp. 152–178). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
67. Song, X. Q., Lv, L. X., Li, W. Q., Hao, Y. H., & Zhao, J. P. (2009). The Interaction of Nuclear Factor-Kappa B and Cytokines Is Associated with Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 65(6), 481–488. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2008.10.018>
68. Sovak, M. A., Bellas, R. E., Kim, D. W., Zanieski, G. J., Rogers, A. E., Traish, A. M., & Sonenshein, G. E. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 100(12), 2952–2960. <https://doi.org/10.1172/JCI119848>
69. Stegmaier, P., & Kellardar, A. E. (2004). Systematic DNA-Binding Domain Classification of Transcription Factors. *Genome Informatics*, 15(2), 276–286.
70. Sun, S. C., Chang, J. H., & Jin, J. (2013). Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends in Immunology*, 34(6), 282–289. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2013.01.004>
71. Szymczak-Pajor, I., Drzewoski, J., & Sliwí Nska, A. (n.d.). Molecular Sciences The Molecular Mechanisms by Which Vitamin D Prevents Insulin Resistance and Associated Disorders. <https://doi.org/10.3390/ijms21186644>
72. Tanabe, K., Matsushima-Nishiwaki, R., Yamaguchi, S., Iida, H., Dohi, S., & Kozawa, O. (2010). Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *Journal of Neuroinflammation*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-16>
73. Vidal, P. M., Lemmens, E., Dooley, D., & Hendrix, S. (2013). The role of "anti-inflammatory" cytokines in axon regeneration. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2012.08.008>

74. Wang, R., Lai, L., & Wang, S. (2002). Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 16(1), 11–26. <https://doi.org/10.1023/A:1016357811882>
75. Wei, W., Huang, H., Zhao, S., Liu, W., Liu, C.-X., Chen, L., Li, J.-M., Wu, Y.-L., & Yan, H. (2013). Alantolactone induces apoptosis in chronic myelogenous leukemia sensitive or resistant to imatinib through NF- κ B inhibition and Bcr/Abl protein deletion. *Apoptosis*, 18(9), 1060–1070. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0854-2>
76. Yin, M.-J., Yamamoto, Y., & Gaynor, R. B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature*, 396(6706), 77–80. <https://doi.org/10.1038/23948>
77. Yoshimura, Y., Inomata, T., Nakazawa, H., Kubo, H., Yamaguchi, F., & Ariga, T. (1999). Evaluation of Free Radical Scavenging Activities of Antioxidants with an H₂O₂/NaOH/DMSO System by Electron Spin Resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4653–4656. <https://doi.org/10.1021/jf990422w>
78. Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.-W., Karin, M., & Shoelson, S. E. (2001). Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of I κ B β . *Science*, 293(5535), 1673–1677. <https://doi.org/10.1126/science.1061620>
79. Zhao, H., Wu, L., Yan, G., Chen, Y., Zhou, M., Wu, Y., & Li, Y. (2021). Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>