

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA



Evaluación preliminar del efecto neuroprotector de la emulsión LMH-E1410 en cerebro de ratas obesas *Sprague Dawley*

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CARLA MANRIQUE ENCISO

LIMA – PERÚ

2016

ASESORES:

Ana Colarossi Salinas, Msc.
Percy Rojas Puente, MSc. (c).

MIEMBROS DEL JURADO

MSc. Carla Gallo López – Aliaga

Presidente

MSc. León Villegas Vilchez

Secretario

Dra. Carla Gonzales Arimborgo

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mis asesores la Dra. Ana Colarossi y el Dr. Percy Rojas por la dedicación de su tiempo en la orientación, supervisión, y apoyo en la mejora de la presente tesis.

Gracias a mis padres y a mi familia por su apoyo incondicional, a mi novio por darme su confianza. A mis compañeros del laboratorio de micronutrientes, por sus aportes durante la realización de la tesis. Finalmente, quiero agradecer al financiamiento de FINCyT Contrato N° 046-FINCyT-PITEI-2010, del proyecto "Desarrollo de un producto natural de una fuente vegetal nativa que contenga altas concentraciones de OMEGA 3 para tratamiento de hiperlipidemias" y HERSIL S.A. laboratorios industriales farmacéuticos

ABREVIATURAS

1. AchE: Acetilcolinesterasa
2. PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados (PolyUnsaturated Fatty Acids)
3. ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
4. ω -3: Ácidos grasos ω -3
5. ALA: Ácido α -linolénico
6. CMC: Carboximetilcelulosa
7. DHA: Ácido docosahexaenoico
8. EPA: Ácido eicosapentaenoico
9. TNF α : Factor de necrosis tumoral α
10. FRAP: Capacidad reductora de hierro férrico en plasma (Ferric reducing ability of plasma)
11. IL-4: Interleuquina 4
12. IL-10: Interleuquina 10
13. ICV: Intracerebroventricular
14. LDL: Lipoproteínas de baja densidad
15. MCP-1: Proteína quimio atrayente de monocitos
16. MDA: Malondialdehído
17. NF- κ β : Factor nuclear kappa β
18. ON: Óxido nítrico
19. PPAR: Receptores activados por proliferadores de peroxisomas

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad mundial que modifica el gasto energético, el apetito y los ejes neuroendocrinos, y que depende de la dieta, edad, género y susceptibilidad genética entre otros factores. En la actualidad existe una alta mortalidad por este trastorno y se busca alternativas para contrarrestarla, como los suplementos nutricionales que regulan el metabolismo para generar una homeostasis.

La obesidad genera un incremento del estrés en todo el cuerpo, causando inflamación en diferentes tejidos, entre ellos el cerebro. Una manera de modular la inflamación provocada por la obesidad es la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados ω -3,

El objetivo del estudio fue evaluar el posible efecto neuroprotector de dos diferentes dosis de la emulsión LMH-E1410 (0.25g de ω -3/día y 0.5g de ω -3/día) proveniente de *Plukenetia huayllabambana*, administradas a lo largo de 12 semanas, sobre el cerebro de ratas *Sprague Dawley*, que fueron inducidas a obesidad. La emulsión LMH-E1410, es un producto estandarizado que contiene principalmente el ácido ω -3 α -linolénico, entre otros ingredientes csp.

Se determinó el nivel de la concentración del malondialdehído y óxido nítrico en el cerebro de ratas como indicadores del grado de estrés oxidativo y la capacidad antioxidante total mediante las pruebas de FRAP y ABTS. El grado de inflamación se evaluó con la medición de los niveles de las citoquinas IL-4, IL-10, TNF- alfa y MCP-1.

En el grupo de ratas tratadas con una dosis de 0.5g ω -3/ día se observó una disminución en la concentración de nitrato y en la concentración de la citoquina IL-10 en tejido cerebral, además de un incremento de la capacidad antioxidante medido por la prueba de ABTS respecto al grupo obeso no tratado, mostrando así que la emulsión LMH-E1410 evidencia un efecto neuroprotector.

Palabras clave: *Plukenetia huayllabambana*, Inflamación, Estrés Oxidativo, Neuroprotección, Obesidad.

SUMMARY

Obesity is a global disease that modifies the energy expenditure, appetite and neuroendocrine axes, and depends on diet, age, sex and genetic susceptibility among other factors. This disorder is associated to high mortality rates, and methods to counteract it are being sought, such as nutritional supplements regulating metabolism in order to generate homeostasis.

Obesity results in increased stress throughout the body, causing inflammation in many tissues, including the brain. One way to modulate the inflammation caused by obesity is the consumption of ω -3 polyunsaturated fatty acids,

The aim of this study was to evaluate the possible neuroprotective effect of two different doses of LMH-E1410 emulsion (0.25g de ω -3/day y 0.5g de ω -3/day) from *Plukenetia huayllabambana* on the brain of *Sprague Dawley* rats that were induced to obesity. The LMH-E1410 emulsion, is a standardized product containing mainly α -linolenic acid.

In this study we determined the concentration of malondialdehyde and nitric oxide in the brain of rats as indicators of the degree of oxidative stress, and total antioxidant capacity by FRAP and ABTS tests. The degree of inflammation was evaluated by measuring cytokines IL-4, IL-10, TNF-alpha and MCP-1 levels.

Brain group rats at a dose of 0.5 g ω -3 / day had a decrease in nitrate concentration and the concentration of the cytokine IL-10, besides an increase in antioxidant capacity measured by ABTS test compared to obese group thus showing that LMH -E1410 emulsion has a neuroprotective effect.

Key words: *Plukenetia huayllabambana*, Inflammation, Oxidative stress, Neuroprotective, Obesity.

INDICE

Introducción	1
Hipótesis y Objetivos.....	15
Materiales y métodos.....	16
Resultados	27
Discusión	38
Conclusiones	45
Referencias Bibliográficas	46
Anexos	58

I. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica a nivel mundial que causa la muerte de 2.8 millones de personas al año (OMS). En el Perú hubo 21.1% de prevalencia de obesidad en adultos mayores de 18 años en el año 2014 (OMS), esto ha ido aumentando cada año y es algo preocupante para la salud y calidad de vida de estas personas.

La obesidad tiene varios factores que pueden ser distales como los sociales y económicos o proximales como los factores que causan el hambre, saciedad, gasto energético y absorción de nutrientes (Sansbury y Bradford. 2014). Además, la obesidad está asociada a varias enfermedades como son la hipertensión, diabetes, enfermedades cardíacas y algunos tipos de cáncer (IASO). También se sabe que la obesidad causa estrés oxidativo e inflamación sistémica (Bastarrachea R. et al. 2007).

Se puede combatir esta enfermedad con ejercicio y con una dieta balanceada. Se ha visto que los alimentos que contienen ácidos grasos ω -3 contribuyen a disminuir la inflamación y el estrés oxidativo asociado a la obesidad (Enciso J. 2013; Barrera P. 2015).

Los ácidos grasos ω -3, principalmente el ácido α -linolénico (ALA), se encuentran en aceites vegetales como el de linaza, chía y sachá inchi (género *Plukenetia*). Recientemente se ha encontrado que la especie *Plukenetia huayllabambana* tiene semillas con mayor contenido de ω -3 (53.9%) que la especie *Plukenetia volubilis* (50.6%) (Ruiz C, Diaz C, Anaya J, Rojas R. 2013).

El objetivo del presente estudio es determinar el posible efecto neuroprotector de la emulsión LMH-E1410, que es un producto que contiene principalmente el ácido ω -3 α -linolénico de las semillas de *Plukenetia huayllabambana*, entre otros ingredientes csp, evaluando la disminución del estrés oxidativo y la inflamación, y el aumento de la capacidad antioxidante en cerebro de ratas Sprague Dawley que fueron inducidas a obesidad.

II. MARCO TEORICO

2.1. Obesidad

La obesidad se define como la acumulación excesiva de grasa en el cuerpo, causada por un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las calorías gastadas que puede ser perjudicial para la salud (Organización Mundial de la salud, 2014).

La evidencia actual indica que la obesidad se originaría por la interacción de factores biológicos (entre ellos, factores genéticos) y factores ambientales (Sansbury y Bradford. 2014).

La grasa es el nombre que se le da al tejido adiposo, que tiene como unidad básica al adipocito. La diferenciación del adipocito se da a partir de células precursoras bajo el estímulo de hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y nutrientes. El tejido adiposo funciona como un órgano endocrino secretando hormonas como leptina, adiponectina entre otras y factores denominados adipoquinas, que influyen en diversos sistemas del cuerpo como el cerebro (Marcano Y. *et. al*, 2006).

Se ha demostrado que existe un mayor número de células inflamatorias en el tejido adiposo de animales y de humanos obesos (Reyes M. 2010). Un aumento del tejido graso causa una acumulación de lípidos en los adipocitos llevando a una producción elevada de citoquinas proinflamatorias secretadas por los adipocitos (Bastarrechea R. *et al*. 2007), como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Marcano Y. *et. al*, 2006). Los adipocitos también expresan la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 10 (IL-10), interleuquina 15 (IL-15), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento del hepatocito (HGF), apolipoproteína A3 (SAA3), factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIMF), moduladores inflamatorios potentes como leptina, adiponectina y resistina, así como la proteína C reactiva (CRP) (Blancas FG. *et al*, 2009). Esta liberación de citoquinas pro-inflamatorias se debe al cambio de predominancia de macrófagos M2 a M1, que ocurre como

consecuencia del aumento de la producción de la citoquina TNF- α en la obesidad (Kim-Tiu T. *et al.* 2014)

La obesidad es considerada una inflamación crónica, esto se debe al aumento en el número y tamaño de adipocitos, por lo que se secretan citoquinas proinflamatorias, llevando a un proceso inflamatorio sistémico que no se resuelve y por lo tanto se hace crónico (Blancas FG. *et al.*, 2009).

Los efectos de la obesidad por una dieta alta en grasa están asociados a un estado de estrés oxidativo, esto se ha visto en humanos y roedores (Lima *et al.* 2004, Vincent y Taylor. 2006, Al-Aubaidy y Jelinek. 2011, Fan *et al.* 2013), lo que lleva a una peroxidación lipídica y activación de citoquinas proinflamatorias (Dalle-Donne *et al.* 2006, Di Minno *et al.* 2012, Savini *et al.* 2013).

En el estudio de Pistell P. *et al.* 2010, se ha observado la existencia de una relación entre dieta alta en grasa y la neuroinflamación, al haber un incremento de MCP-1 y TNF- α en el cerebro de ratones con ese tipo de dieta en comparación con ratones con una dieta control (Pistell P. *et al.*, 2010). Además, se ha observado tanto en animales de experimentación como en humanos que la obesidad, al igual que otras enfermedades neurodegenerativas, genera lesiones asociadas a inflamación, y estrés oxidativo (Matsuda M, 2013); (Moraes J. *et al.*, 2009); (Wu A, Ying Z, Gomez F, 2004) ; (Williams L, 2011).

2.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el desbalance entre la producción de especies oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Bernabe J, 2014). Este desequilibrio puede ser causado por un aumento de los oxidantes (especies reactivas) y/o una disminución de los antioxidantes, lo que provoca daños en estructuras biológicas como en el cerebro y puede llevar a una muerte celular (Dorado C, Rugerio C, Rivas S, 2003).

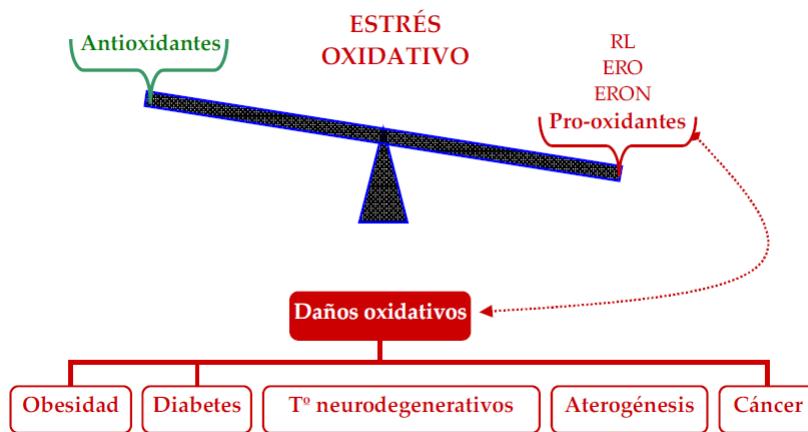


Figura 1. Esquema del desequilibrio de oxidantes y antioxidantes (Bernabe J, 2014)
 RL = radicales libres; ERO = especies reactivas de oxígeno; ERON = especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Las especies reactivas de oxígeno son compuestos inestables, la gran mayoría de éstas especies son radicales libres por tener electrones desapareados en uno de sus orbitales más externos (Bernabe J, 2014). Los radicales libres al tener electrones desapareados reaccionan con un elevado número de moléculas, oxidándolas y luego atacan la estructura de estas moléculas (Soledad J, 2007). Su principal fuente son las mitocondrias de las células por el metabolismo del oxígeno en los complejos I y III. Las especies de oxígeno no radicales, a pesar de tener todos sus electrones apareados son altamente reactivos, se originan principalmente en los peroxisomas y en la mitocondria por dismutación del radical superóxido (Bernabe J, 2014).

La obesidad causa daños en lípidos, proteínas y DNA como consecuencia del incremento de las especies reactivas de oxígeno, se ha comprobado que estos daños se encontrarían en el cerebro (Ma W, Yuan L, Yu H, Xi Y, Xiao R, 2014). En otro estudio también se observó el aumento de especies reactivas de oxígeno en la corteza por la obesidad y un deterioro en la función del cerebral (Freeman LR. et al. 2012), lo que apoyaría la hipótesis que la obesidad puede aumentar el riesgo de enfermedades neurodegenerativas (Luchsinger JA y Mayeux R. 2007).

2.2.1. Malondialdehído (MDA)

La generación de especies reactivas de oxígeno causa la peroxidación de los lípidos de membrana, afectando a las membranas en su fluidez, potencial y permeabilidad iónica ocasionando finalmente una pérdida de su integridad (Soledad J, 2007).

El MDA es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica (Dorado C, Rugerio C, Rivas S, 2003). Esta molécula reacciona con las proteínas de membrana causando alteraciones en su estructura (Dorado C, Rugerio C, Rivas S, 2003); (Soledad J, 2007).

Se ha encontrado mayor cantidad de MDA en cerebro de ratas obesas con una dieta alta en grasa que ratas no obesas (Amin K, Kamel H, Eltawab M, 2011), por lo que la obesidad estaría generando un estrés oxidativo en el cerebro.

2.2.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un neurotransmisor que sirve para la comunicación entre las neuronas, participa en la plasticidad sináptica y la neurotoxicidad, estimula las fibras pre sinápticas aumentando la eficacia de la transmisión por un mayor tiempo (Adan A, Prat G, 2005).

Adicionalmente el óxido nítrico es neurotóxico por ser precursor de agentes oxidantes como el peroxinitrito, incrementando radicales libres los cuales llevan a una muerte celular (Adan A, Prat G, 2005).

Además, se ha visto que el ON se correlaciona positivamente con el incremento de la actividad del óxido nítrico sintasa inducido (iNOS) ya que esta isoforma se activa por la acción de diferentes sustancias como las citoquinas (Skalicky J. *et. al*, 2008).

En un estudio experimental se encontró mayores niveles de la proteína iNOS en el tejido del hipotálamo de ratones con alimentación rica en grasas en comparación de los que tenían una alimentación normal (Cintra D. *et. al*, 2012).

El óxido nítrico al ser oxidado forma nitritos y posteriormente nitratos, estos metabolitos del óxido nítrico son estables y por tener el óxido nítrico una vida media de unos segundos (Pérez- Neri I. 2015), se miden estos productos para cuantificar al óxido nítrico.

2.2.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante son los sistemas antioxidantes constituidos por los sustratos antioxidantes, co-sustratos antioxidantes y los antioxidantes endógenos y exógenos que reducen los oxidantes para disminuir su capacidad oxidativa (Quintanar M, Calderon J, 2009).

En varios estudios donde experimentaron con ratas inducidas a obesidad y tratadas con una dieta de alta capacidad antioxidante, se observó una disminución del efecto inflamatorio (Hogan S, Canning C, Sun X, Sun S, Xhou K, 2010); (Shen C. *et. al*, 2012).

2.3. Inflamación

La inflamación es una respuesta biológica del sistema inmune contra daños en los tejidos (Cai D, 2013), el sistema nervioso recibe señales sensoriales desde el sistema inmunológico mediante proteínas como TNF- α y otros mediadores inmunológicos que acceden a los centros cerebrales carentes de la barrera hematoencefálica, como la región circunventricular cerebral (Garcia P, 2008).

Las citoquinas son pequeñas proteínas mediadoras de la comunicación entre células del sistema inmune (Abbas A, Lichtman A, Pillai S, 2012). Se pensaba que solo eran producidas por células del sistema inmune pero ahora se conoce que también son producidas por otros tejidos como el tejido adiposo (Marcano Y. *et. al*. 2006)

El sistema nervioso central tiene una barrera hemato-encefálica que se encuentra entre los capilares sanguíneos al parénquima cerebral, esta barrera regula el paso de células inflamatorias del sistema al cerebro (Romano M. 2011). La respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central comienza con la activación de la microglía y de los astrocitos con una invasión de células inflamatorias periféricas por mediadores inflamatorios que regulan las moléculas de adhesión y aumentan la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica (Romano M. 2011). La microglía se activa y comienza a producir citoquinas inflamatorias y a fagocitar (Cuenca-Lopez MD. Et al. 2010).

El cerebro tiene receptores específicos para citoquinas, también pueden secretarlas y sintetizarlas. Hay cuatro hipótesis de como las citoquinas sistémicas estimulan el cerebro, la primera menciona que hay una difusión pasiva de las citoquinas hacia el cerebro en los sitios circunventriculares, donde no hay barrera hemato-encefálica, la segunda propone que los receptores específicos en la barrera hemato-encefálica se unen con su citoquina específica y se produce óxido nítrico y prostaglandina que llevan a una secreción de citoquinas por los astrocitos y la microglía, la tercera propone que hay transportadores para citoquinas para poder cruzar la barrera hemato-encefálica y la cuarta sugiere que hay terminaciones nerviosas aferentes vagales desde el lugar donde las citoquinas son secretadas hasta el cerebro (Pavon L. Eugenia M. Loria F. Sandoval G, 2004).

Además, se ha visto que la dieta está relacionada con la producción de mediadores inflamatorios y en un estudio se encontró que la sobrealimentación conlleva a la inflamación y estrés oxidativo (Cai. D. 2013).

2.3.1. Interleuquina 4 (IL-4)

La interleuquina 4 una citoquina antiinflamatoria, liberada por la activación de la inmunidad adquirida humoral de los linfocitos tipo 2 (Th2) (Garcia-Bueno B, Leza JC, 2008).

Se ha observado que la función de la IL-4 secretada por tejido adiposo en respuesta a la obesidad es inhibir las citoquinas pro-inflamatorias como respuesta a la obesidad .

Además, se ha demostrado que la citoquina IL-4 tiene efecto neuroprotector al disminuir el TNF- α (Gadani S, Cronk J, Norris G, Kipnis J. 2012)

2.3.2. Interleuquina 10 (IL-10)

La interleuquina 10 es una citoquina antiinflamatoria, liberada por la activación de la inmunidad adquirida humoral de los linfocitos tipo 2 (Th2) (Garcia-Bueno B, Leza JC, 2008) .

Se ha visto que la citoquina IL-10 tiene un papel antiinflamatorio y se encuentra aumentada para tener este efecto, se encontró aumentados los niveles de IL-10 en un estudio con ratones inducidos a una dermatitis de contacto con una dieta de ω -3 (Sierra S. et al. 2004). Pero también recientes estudios han reportado mayores niveles de IL-10 en individuos obesos que fueron suplementados con EPA (Satoh-Asara et al. 2012). Además, se ha reportado que los niveles de EPA aumentan en un grupo de individuos que fueron alimentados con aceite de alto contenido de ω -3 (Kim y Choi. 2005, Ayerza y Coates. 2007, Gonzales G. y col. 2014, Valenzuela et al. 2014), esto se podría deber entre otros factores a que la citoquina IL-10 tiene un efecto antiinflamatorio observándose que estos niveles se incrementan por el consumo de ω -3.

2.3.3. Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

Es una citoquina proinflamatoria liberada por macrófagos activados por la respuesta celular inmune de los linfocitos tipo 1(Th1) (Garcia-Bueno B, Leza JC, 2008).

Esta citoquina es producida normalmente en estado de inflamación crónica, es sintetizada por el tejido adiposo y esta correlacionado positivamente con el tamaño de los depósitos de grasa (Marcano Y. *et. al*, 2006). Su producción se ve aumentada a causa de trauma cerebral aguda, isquemia, infecciones o enfermedades neurodegenerativas (Wang CX, Shuaib A, 2002) .

La citoquina TNF- α inducida por el daño tisular funciona como mediador de muerte celular, pero también puede ser neuroprotector en enfermedades desmielinizantes y daño traumático (Von Bernhardt R, 2007).

2.3.4. Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)

MCP-1 es un péptido proinflamatorio implicado en la regulación de señales de insulina y lipólisis (Bouchard C, 2010). El MCP-1 secretado por adipocitos y macrófagos, se cree que promueve la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en humanos obesos (Bouchard C, 2010).

La expresión de MCP-1 se incrementa en la obesidad y recluta células inflamatorias en respuesta a un estímulo inflamatorio (Bastarrechea R. *et al*. 2007). Se ha observado un incremento de MCP-1 en ratones obesos en comparación con ratones normales (Terao S. *et. al*, 2008) .

2.4. Ácidos grasos poli-insaturados ω -3 en la neuroprotección

Los ácidos grasos poliinsaturados tienen uno o más dobles enlaces entre los átomos de carbono (Campbell NA, Reece JB, 2007). Tienen un rol estructural en los fosfolípidos de las membranas celulares y son sustratos metabólicos. Una familia de los ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos ω -3, estos son esenciales ya que nuestro organismo no los puede sintetizar por eso tenemos que añadirlos en nuestra alimentación (Valenzuela R, Tapia G, Gonzales M, Valenzuela A, 2011). La ingesta de PUFAs ω -3 recomendada es de 0.250 a 2 g/día. (FAO y FINUT. 2012).

El principal ácido graso ω -3 es el ácido α -linolénico (ALA) el cual por medio de desaturasas y elongasas se puede transformar en el ácido eicosapentaenoico (EPA) y después en el ácido docosahexaenoico (DHA). La mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados son de origen vegetal (Valenzuela R. Tapia G. Gonzales M. Valenzuela A. 2011) .

Existen diversos estudios sobre la acción de los ácidos grasos ω -3 en la neuroprotección, en animales con diabetes mellitus se observó que la suplementación diaria con ácidos grasos ω -3 (0.5 g./kg.) previno el deterioro anatomofuncional en las neuronas (Gerbi A. et al. 1999), también en otro estudio ratas con lesión cerebral traumática y una dieta de 12.4%DHA más 13.5%EPA tuvieron una disminución del daño oxidativo y los problemas de aprendizaje a comparación de las ratas con una dieta regular (Wu A, Ying Z, Gomez F. 2004).

Los efectos neuroprotectores de los ácidos grasos ω -3 también se han observado en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer en el cual los niveles de DHA son bajos. En un modelo animal (ratones con Alzheimer) con una dieta rica en ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA), se observó una reducción del péptido β -amiloide que tiene una acción neurotóxica (Lim G. et al.2005). Además, se sabe que el DHA es precursor de mediadores antiinflamatorios como las resolvinas y las protectinas que inhiben la neuroinflamación, esto se debe a que estos mediadores, inhiben la transcripción del factor NF- κ β , este factor es importante para el desarrollo de la inflamación neuronal (Farooqui A, Horrocks L, Farooqui T. 2007).

Otro mecanismo activado por los ácidos grasos ω -3 que modula procesos antiinflamatorios en el cerebro es su unión a receptores activados por la proliferación de peroxisomas (PPAR α y PPAR γ), la cual produce inhibición de la activación de macrófagos y de la microglía, disminuyendo las citoquinas proinflamatorias. (Figura2) (Bordet R, Gelé P, Duriez P, Fruchart JC. 2006)

Se ha observado que con una dieta de ácidos grasos insaturados hay una disminución de TNF- α y un incremento del IL-10 en ratones, el mismo resultado se obtuvo con una inyección intracerebroventricular de ácidos grasos ω -3, siendo todas las diferencias significativas (Cintra D. et. al, 2012).

Tabla 1. Mecanismo de acción de los PUFAs a nivel sistémico y en el cerebro (Valenzuela R, Tapia G, Gonzales M, Valenzuela A. 2011; Farooqui A, Horrocks L, Farooqui T. 2007)

Sistémico	Cerebro
Disminuye inflamación (IL-6, TNF- α , IL-1)	Disminuye inflamación (se expresa gen antiapoptótico Bcl2, inhibe NFk- β)
Disminuye estrés oxidativo	Disminuye estrés oxidativo
Disminuye triglicéridos, HDL, LDL	Disminución de neurotoxicidad (Reducción del péptido β -amiloide)
Aumenta capacidad antioxidante	Aumenta capacidad antioxidante

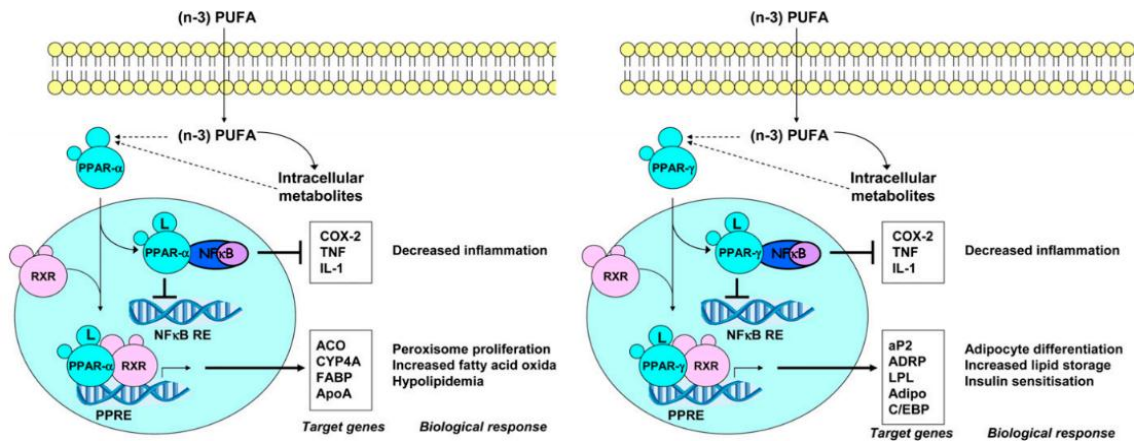


Figura 2. Mecanismo de acción de los ácidos grasos ω -3 donde modulan los PPAR α y γ para inhibir NFk β (Calder P. 2012)

2.5. Atorvastatina

Es un fármaco del grupo de las estatinas, este medicamento sintético sirve para disminuir los niveles del colesterol y LDL en plasma (LTATION Lop14 \l 10250

de 2014). Esta disminución del colesterol se debe a que la atorvastatina inhibe la HMG-CoA reductasa, que es una enzima necesaria para la síntesis del colesterol (Spalvieri M, Oyola, E. 2011).

La atorvastatina también bloquea la formación de isoprenoides y por consecuencia disminuyen los niveles de proteínas G preniladas como Rho, Rac, Rab y Ras. La atorvastatina además tiene efecto inhibitorio en la secreción de la proteína C y otras moléculas generando un efecto antiinflamatorio y antioxidante (Mazón P. 2015; Mennickent S, Bravo M, Calvo C, Avello M. 2008)

Este medicamento también ha reportado tener efectos colaterales como presentar un riesgo para desarrollar diabetes mellitus 2 aunque los beneficios que aporta son mayores que estos efectos colaterales (Suazzo J. Rigotti A, 2014).

Además, se observó una disminución significativa de la concentración de MDA en cerebro de ratones con una dieta alta en grasas y atorvastatina en comparación de ratones con dieta alta en grasas (Shen KP. et al. 2009). También se ha reportado que la atorvastatina puede bloquear el desarrollo de convulsiones, además de reducir la peroxidación lipídica en tejido cerebral de ratones (Sehar N, Agarwal NB, Vohora D, Raisuddin S, 2015).

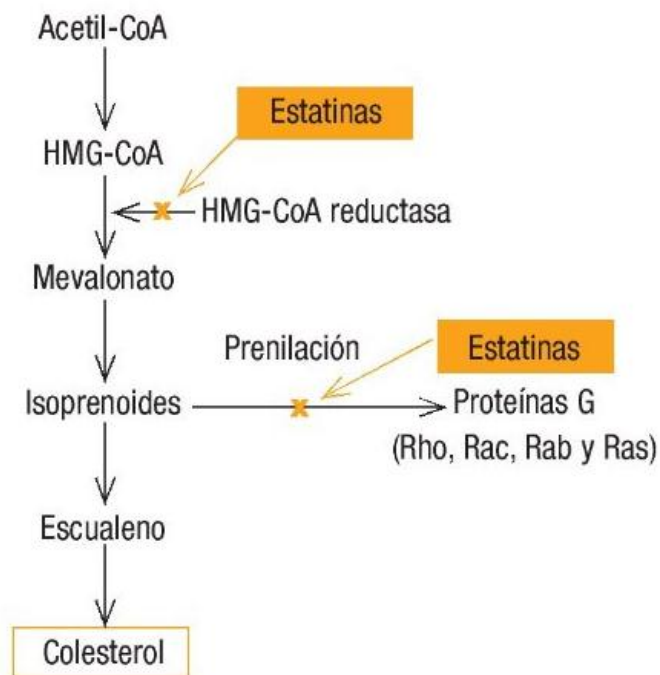


Figura 3. Mecanismo de acción de la atorvastatina (Mazón P. 2015)

2.6. Emulsión LMH-E1410

La emulsión LMH-E1410 es un producto elaborado por Laboratorios HERSIL S.A., que contiene principalmente la porción lipídica de la semilla de la especie *Plukenetia huayllabambana*, entre otros excipientes csp. (LMH-6028), los cuales tienen una protección de datos. El componente lipídico de la emulsión contiene un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (54.79%) particularmente de ω -3 (Anexo 1).

2.7. *Plukenetia* spp.

El género *Plukenetia* L. está constituido por 19 especies (Ruiz C, Diaz C, Anaya J, Rojas R, 2013), las cuales son conocidas como Sacha inchi. Esta especie es una planta hermafrodita originaria de la selva amazónica peruana. Según los estudios, su fruto es rico en ácidos grasos ω -3 (Maurer NE, Hatta-Sakoda B, Pascual-Chagman G, Rodriguez-Saona LE, 2012), ω -6 y ω -9, también es rica en antioxidantes, proteínas y vitaminas, destacando las especies *Plukenetia huayllabambana* y *Plukenetia volubilis* Linneo por su mayor contenido de ω -3 en relación a los ω -6 .

Plukenetia huayllabambana es una especie que crece en la selva alta y su contenido de ácidos grasos ω -3 es mayor que la especie *Plukenetia volubilis* (Ruiz C, Diaz C, Anaya J, Rojas R, 2013), además tiene como ventaja que su semilla es de un mayor tamaño, es más resistente a las plagas y enfermedades (Bussmann RW, Téllez C, Glenn A, 2009).

Plukenetia volubilis Linneo crece en la selva baja, tiene un mayor contenido de ω -6 a comparación de la *Plukenetia huayllabambana* como se observa en la tabla 2. Su cultivo tiene problemas fitosanitarios, aunque cuenta con mayor investigación de sus propiedades a comparación de *Plukenetia huayllabambana* (Ruiz C, Diaz C, Anaya J, Rojas R, 2013).

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de semillas y tortas de dos especies de *Plukenetia* Referencia: Ruiz C, Diaz C, Anaya J, Rojas R. 2013.

	Composición Relativa (%)			
	<i>Plukenetia huayllabambana</i>		<i>Plukenetia volubilis</i>	
Ácido graso	Semillas (AI-RM-05)	Torta (TRM)	Semillas (AI-SM-06)	Torta (TSM)
Palmítico (16:0)	5.3	6.1	3.8	4.5
Esteárico (18:0)	1.9	1.2	2.3	1.9
Oleico (18:1)	9.6	9.7	8.7	10.5
Linoleico (18:2)	29.3	28.4	34.6	36
Linolénico(18:3)	53.9	54.6	50.6	47.1
Saturados	7.2	7.3	6.1	6.4
Monoinsaturados	9.6	9.7	8.7	10.5
Poliinsaturados	83.2	83	85.2	83.1

El estudio tiene como objetivo determinar el efecto neuroprotector de la emulsión LMH-E1410 en los cerebros de ratas *Sprague Dawley*, para ello se utilizó las muestras obtenidas de cerebros de ratas provenientes de los grupos de animales de experimentación que fueron inducidas a obesidad con una dieta alta en grasas (45% Kcal Lípidos) y posteriormente sometidas a tratamientos con la emulsión LMH-E1410, para evaluar finalmente el efecto neuroprotector que produce con respecto al grupo control.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La emulsión LMH-E1410 tiene un efecto neuroprotector al disminuir el estrés oxidativo y la inflamación en cerebro de ratas que fueron inducidas a obesidad por una dieta alta en consumo de grasas

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto neuroprotector de la emulsión LMH-E1410, un compuesto rico en ácidos grasos ω -3, en muestras de cerebro de ratas obesas Sprague Dawley.

Objetivos Específicos

1. Determinación de la capacidad antioxidante en muestras de los cerebros de ratas obesas, con y sin tratamiento de la emulsión LMH-E1410, mediante la técnica de Ferric reducing ability of plasma (FRAP) y 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-suphonic acid (ABTS).
2. Determinación del daño oxidativo en muestras de los cerebros de ratas obesas, con y sin tratamiento de la emulsión LMH-E1410, mediante la medición de la concentración de MDA y ON
3. Medición de las citoquinas IL-4, IL-10, TNF- α y MCP-1 en las muestras de los cerebros de ratas obesas, con y sin tratamiento de la emulsión LMH-E1410.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Muestras Biológicas

Las muestras utilizadas en este estudio son cerebros de ratas provenientes del Proyecto “Desarrollo de un producto natural de una fuente vegetal nativa que contenga altas concentraciones de ω -3 para tratamiento de hiperlipidemias” (Código SIDISI 57018). Los procedimientos realizados en dicho proyecto se resumen a continuación y no fueron realizados como parte de la presente tesis.

En dicho estudio 100 ratas de la cepa *Sprague Dawley*, de aproximadamente de 180 g de peso corporal (6 semanas de edad), obtenidas del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, fueron inducidas a obesidad por una dieta alta en grasa (HFD; D12451, rodent diet, Research Diets. Inc., USA) (Farley et al., 2003; Gajda, 2009; Hariri y Thibault, 2010) durante 16 semanas proporcionándoles una dieta en la cual el 45% de la energía provenía de lípidos (45%Kcal), carbohidratos (35% Kcal) y proteínas (20% Kcal) y para el grupo control solo el 10% de la energía provenía de los lípidos de la dieta (10%Kcal), 70% Kcal carbohidratos, y 20% Kcal proteínas (LFD; D12450B, rodent diet, Research Diets. Inc., USA). El 40% de los animales alimentados con la dieta HFD resultaron obesos y el 60% resistentes a obesidad.

Para confirmar que los animales eran obesos se determinó el peso corporal, el índice de Lee y Rohrer y los niveles de colesterol total y triglicéridos en suero (Ambulay J. 2015).

Una vez inducida la obesidad, se seleccionó al grupo de animales sensibles a obesidad, a los cuales se les procedió a suministrar los diversos tratamientos vía oral, siendo la dosis de 2.5ml/día de la emulsión LMH-E1410 a dos concentraciones de ω -3 (0.25 y 0.5g ω -3 /día. El promedio del peso antes del tratamiento con la emulsión LMH-E1410 del grupo de ratas control no obeso fue de 463.5 ± 28.3 g. y de 545.9 ± 59.7 g. para el grupo de ratas obesas, siendo

estos grupos diferentes significativamente ($p=0.02$) (Anexo 3). Los pesos finales es decir después de los tratamientos tuvieron diferencias significativas también entre el grupo control no obeso (479.5 ± 29.6) y el grupo obeso (538.03 ± 61.7) ($p=0.031$).

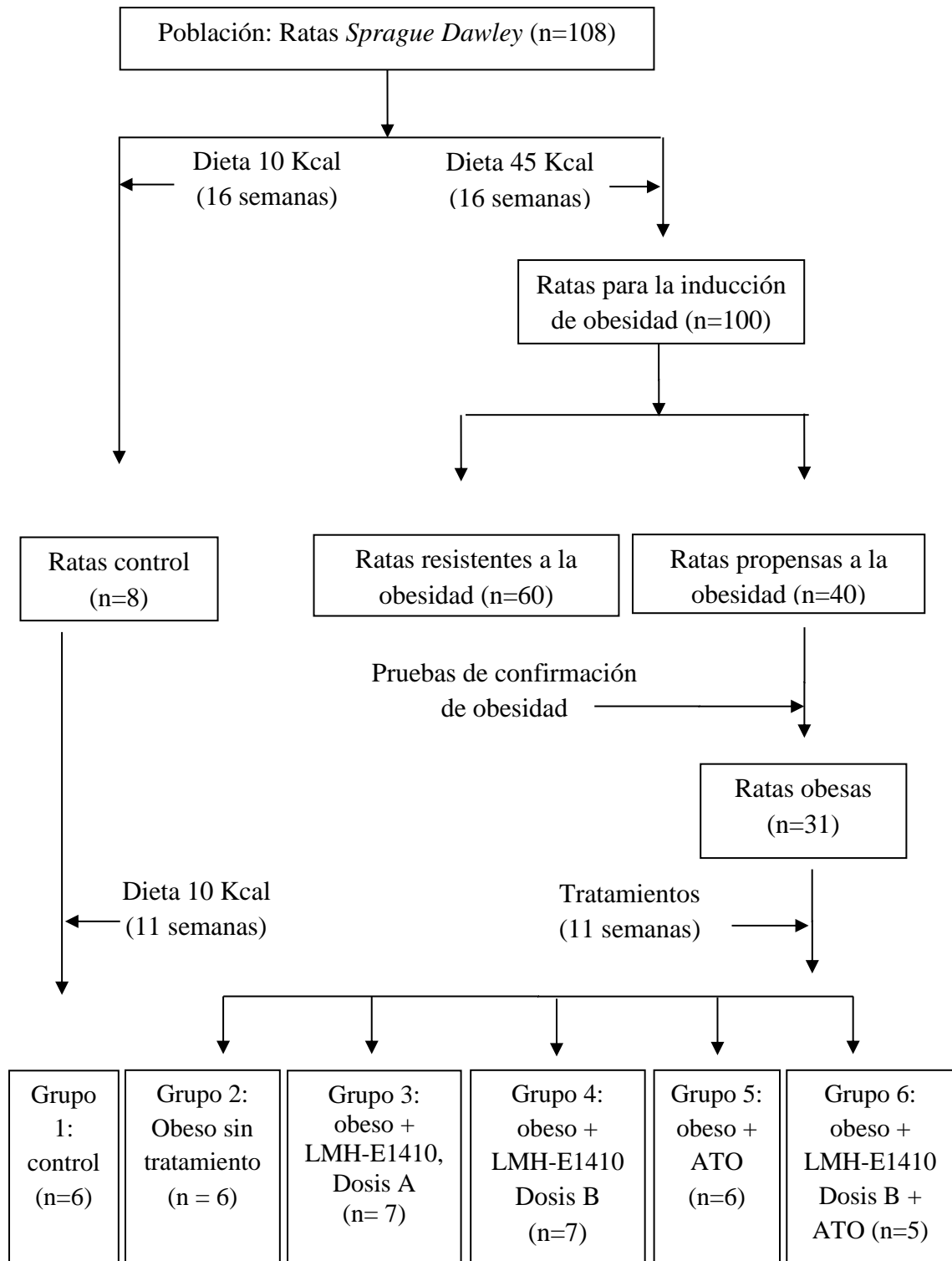
Se definieron 6 grupos experimentales:

- Grupo 1: control no obesas (CNO), ratas no obesas.
- Grupo 2: control obesas (CO), ratas obesas
- Grupo 3: Dosis A (DA), ratas obesas tratadas con la emulsión LMH-E1410 (0.25g ω -3/día).
- Grupo 4: Dosis B (DB), ratas obesas tratadas con la emulsión LMH-E1410 - (0.5g ω -3/día).
- Grupo 5: Control obesas con Atorvastatina (OAv), Ratas obesas tratadas con atorvastatina (10 mg/kg peso)
- Grupo 6: Obesas con Atorvastatina + Dosis B (OAvDB), ratas obesas tratadas con la emulsión LMH-E1410 DB (0.5g ω -3/día) y Av (10 mg/kg peso)

El grupo 1 continuó recibiendo la dieta en la cual el 10% de la energía provenía de los lípidos (10%Kcal) por 11 semanas adicionales, mientras los otros grupos (2 al 6) continuaron con la dieta HFD (45%Kcal) por el mismo periodo de tiempo (Anexo 2). Todos los grupos de animales con o sin tratamiento recibieron 2.5 ml de volumen final con el vehículo de la emulsión.

Al final del estudio, los animales de experimentación fueron sacrificados con una dosis de pentobarbital (sobredosis, 60 mg/Kg) y las muestras del tejido cerebral fueron inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El siguiente diagrama representa los diversos procesos que pasaron los animales de experimentación para la obtención de las muestras.



Referencia: Ambulay Briceño, Johnny. Tesis para optar el grado de Maestría en Bioquímica y Biología molecular. Efecto de la emulsión LMH-E1410 sobre el perfil lipídico, el estrés oxidativo, la inflamación y la expresión de los genes PPAR α , ACO, FAS, ACC Y NF-K β en ratas obesas, 2015.

4.1.2 Distribución de los grupos de ensayo con muestras de cerebro de ratas

Para el desarrollo de la presente tesis se utilizó las muestras del tejido cerebral, y se desarrolló las diferentes pruebas, para ello se contó con 35 muestras de cerebro de ratas, según se resume en la siguiente Tabla:

Tabla 3. Distribución de los grupos de tratamientos

Grupos	Tratamientos	Número de muestras
CON	Cerebros de ratas no obesas sin tratamiento	4
CO	Cerebros de ratas obesas sin tratamiento	6
Dosis A (DA)	Cerebros de ratas obesas tratadas con 2.5ml de la emulsión LMH-E1410 (0.25g ω -3/día)	7
Dosis B (DB)	Cerebros de ratas obesas tratadas con 2.5ml de la emulsión LMH-E1410 (0.5g ω -3/día)	7
OAv	Cerebros de ratas obesas tratadas con atorvastatina	6
OAvDB	Cerebros de ratas obesas tratadas con dosis alta y atorvastatina	5

4.1.3 Aspectos éticos

El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia N° 63234 (Anexo 9), así como de los laboratorios HERSIL S.A. para la utilización de las muestras biológicas mencionadas, provenientes del proyecto “Desarrollo de un producto natural de una fuente vegetal nativa que contenga altas concentraciones de ω -3 para tratamiento de hiperlipidemias” (Código SIDISI 57018) para el desarrollo de la presente tesis (Anexo 10).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Procesamiento de las muestras biológicas

Las muestras fueron descongeladas en el momento que iban a ser ensayadas, para ello primero fueron traspasadas de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 2 horas y luego a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El cerebro de la rata fue dividido en dos partes (hemisferio derecho e izquierdo), una de las mitades del cerebro fue homogenizado 25 veces por 2 minutos en buffer RIPA (NaCl 150 mM, Tris-Cl pH 7,4 50 mM, EDTA 5 mM) que sirve para lisar las células y solubilizar proteínas, a una proporción de 1g. por 10 ml., todo este proceso fue realizado sobre hielo. La otra mitad del cerebro de rata fue homogenizado con KCl 1.15% también 25 veces por 2 minutos y a la misma proporción de 1 g por 10 ml., luego se procedió a centrifugar el homogenizado dependiendo de la prueba que se realizaría según la siguiente figura:

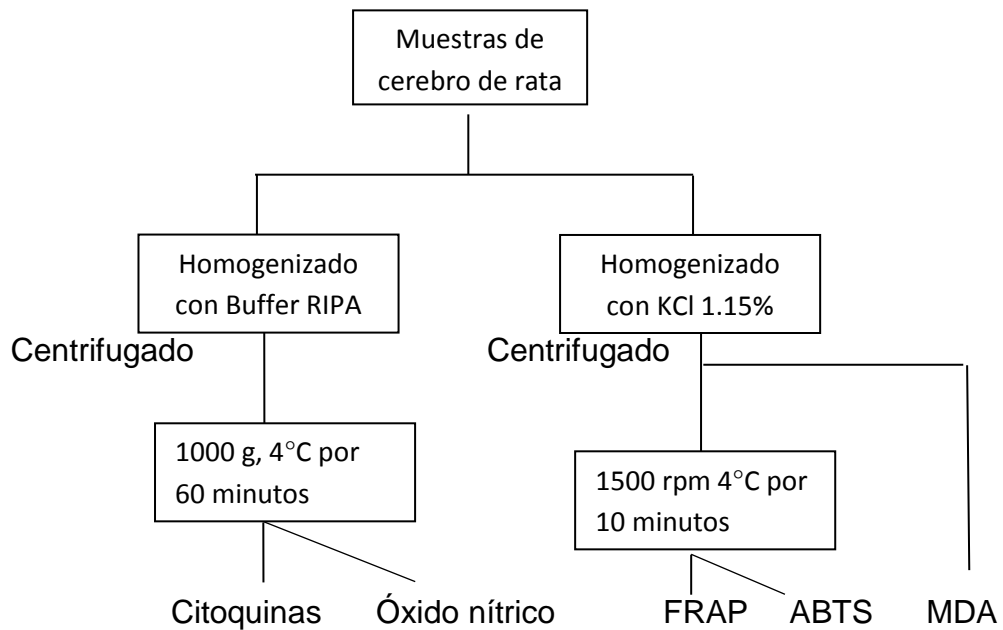


Figura 4. Esquema del procesamiento de las muestras

4.2.2 Pruebas para determinar Capacidad Antioxidante Total

La capacidad antioxidante total de los tejidos fue determinada mediante las técnicas de FRAP y ABTS.

4.2.2.1 Ferric reducing ability of plasma (FRAP)

Esta prueba permite determinar la capacidad antioxidante en el plasma y también en tejidos como del corazón, riñón, hígado y cerebro (Katalinic V. Modun, D. Music I. Boban M. , 2005), además esta prueba se correlaciona directamente con ácido úrico (Benzie y Strain, 1996). Se midió la capacidad antioxidante de muestras de los cerebros de los diferentes grupos de tratamiento. Se empezó colocando 30 uL del centrifugado de la muestra, estándar y blanco de muestra en los pocillos de la placa Falcon, luego se agregó 225 uL del reactivo FRAP (10 volúmenes de buffer acetato pH 3.6, 1 volumen de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) en HCl y 1 volumen de Cloruro férrico.) y para el blanco de las muestras se colocó 225 uL de buffer acetato pH 3.6 (Katalinic V. Modun, D. Music I. Boban

M. , 2005). Se realizó la lectura a 593 nm a una temperatura de 37°C en los tiempos de 0, 5, 10 y 15 minutos y se eligió el tiempo de 15 minutos por presentar los valores más altos de las concentraciones (mM Fe (II)/ mg proteína) de cada muestra. Se usó una dilución ½ del homogenizado de las muestras de cerebro de rata con los diferentes tratamientos por estar dentro de la curva de estandarización.

Tabla 4. Procedimiento de la prueba de FRAP

	Reactivo FRAP	Buffer acetato	Homogenizado o estándar
Muestras	225 ul.	--	30 ul
Blanco de la muestra	--	225 ul.	30 ul.
Blanco FRAP	225 ul.	30 ul.	--
Curva estandarización	--	225 ul.	30 l.

4.2.2.2 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-suphonic acid) (ABTS)

ABTS (ensayo de decoloración del radical catión, ABTS) según (Erel O, 2004) en cerebro de ratas. Para esta prueba se prepararon dos reactivos, para el reactivo 1 se preparó el buffer acetato (pH 5.8) a una concentración de 0.4 mol/L. y 22.8 ml. de ácido acético glacial en 1000 ml de agua desionizada a 0.4 ml/L. Se mezcló 940 ml. de buffer acetato con 60 ml. de ácido acético con un pH de 5.8

Para el reactivo 2 se prepararon dos soluciones, para la solución A se preparó buffer acetato (pH 3.6) a una concentración de 30 mmol /L. y 1.705 ml. de ácido acético en 1000 ml de agua desionizada. Se mezcló 75 ml de buffer acetato con

925 ml. de ácido acético (pH 3.6). Para la solución B se diluyó 278 ul. De H₂O₂ en 1000 ml de la solución A, luego se agrega 0.549 g. de ABTS en 100 ml. de la solución B. Se incubó por una hora a temperatura ambiente y se guardó a 4°C. Se colocó las muestras según la tabla 5 que se muestra a continuación:

Tabla 5. Procedimiento de la prueba de ABTS

	Reactivo1	Muestra	Reactivo2
Muestra	200 ul.	5 ul.	20 ul.
Blanco	--	230 ul. buffer PBS	--
ABTS	200 ul.	--	30 ul.

Se leyó a 660 nm. en una lectora de placa Versa MAX (Molecular Devices).

4.2.3 Pruebas para determinar estrés oxidativo

Cabe mencionar que está demostrado que el mal funcionamiento de la mitocondria y el daño oxidativo, en cerebro de ratas inducidas a obesidad por una dieta rica en grasas, puede ser medido por marcadores como el MDA (Ma W, Yuan L, Yu H, Xi Y, Xiao R, 2014). Adicionalmente se utilizó el ON como marcador de estrés oxidativo.

4.2.3.1 Malondialdehído (MDA)

La determinación de MDA se realizó según el método de Estepa y col (Estepa V, Rodenas S, Martin MC, 2001). Esta prueba sirve para medir la peroxidación lipídica de las muestras, que en este caso fue tejido de cerebro de ratas con diferentes tratamientos.

El procedimiento consistió en añadir 20 µL de BHT (Hidroxitolueno butilado 2.2 g/L), 20 µl de muestra, estándar o blanco en sus respectivos tubos, luego se agregó 20 µL de Cl₃Fe, 300 µl de buffer acetato pH 3.5 y 300 µl de TBA 5g/L (ácido tiobarbiturico), entre cada paso y por 20 segundos se usó el vortex y se incubó por una hora a 93 °C. Se enfrió los tubos por 5 minutos y se colocó 400 µl de butanol, se vortexeo por 1 minuto y se centrifugo a 4000 rpm por 10

minutos. Se colocó el sobrenadante del tubo en una placa Falcon y se realizó la lectura a 532 nm.

4.2.3.2 Óxido nítrico

La medición del Óxido nítrico se realizó midiendo el nitrato y nitrito, el óxido nítrico se convierte en nitrato y posteriormente en nitrito con el nitrato reductasa, luego se agregó N-(1-naftil) etilendiamina que convierte el nitrito en un compuesto purpura. Esta prueba se realizó con el kit de medición colorimétrica de nitrato/nitrito de Cayman chemical. El rango de sensibilidad del kit es 2.5 uM.

Para la medición de nitrato + nitrito, se agregó 200 µl. de agua para el blanco en la placa, se colocaron 80 µl de la dilución de las muestras, luego 10 µl de la mezcla del cofactor de la enzima, posteriormente 10 µl de nitrato reductasa. Se cubrió la placa y se incubó una hora, luego se agregó 50 µl del reactivo R1, inmediatamente se agregó 50 µl del reactivo R2. Se esperó 10 minutos para que aparezca el color y se leyó la absorbancia a 540 nm.

Posteriormente se midió nitrito, se colocó 20 µl de agua, se colocó 100 µl de las muestras, se agregó 50 µl del reactivo 1 y se adicionó 50 µl del reactivo 2. Se esperó 10 minutos para que aparezca el color y se midió a 540 nm. Para hallar la concentración de nitrato se restaron las absorbancias de nitrato + nitrito con la absorbancia de nitrito.

4.2.4 Prueba para determinar citoquinas en Inflamación

Se realizó la prueba de Elisa con el kit BD Biosciences, donde se colocaron los anticuerpos de captura diluido en buffer fosfato de Sodio pH 6.5 en una placa de Elisa, luego se colocaron las muestras, se añadió el detector de trabajo (detector de Ab + SAV-HRP), el substrato (tetrametilbencidina y peróxido de hidrogeno) y se detuvo la reacción con 2NH₂SO₄ cuando se colorea, según las indicaciones del kit. Se realizó la lectura a 570 nm. (Anexo 11, 12, 13 y 14). Se eligieron diferentes concentraciones de los homogenizados de cerebro de rata dependiendo de la curva de estandarización de cada citoquina como se aprecia en la siguiente figura:

Homogenizados de cerebro de ratas con y sin tratamiento

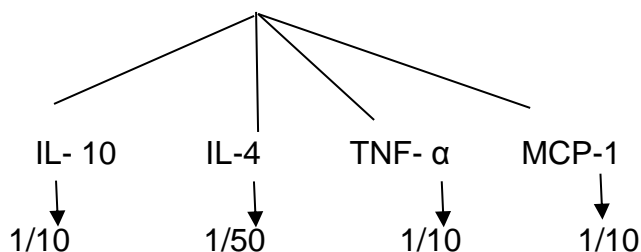


Figura 5. Dilución de los homogenizados de cerebro de rata para la prueba de citoquinas.

La sensibilidad del kit para las diferentes citoquinas, fue de 1.6 pg/mL. para la citoquina IL-4, 15.6 pg/mL. para la citoquina IL-10, 31.3 pg/mL. para la citoquina TNF- α y 31.3 pg/mL. para la citoquina MCP-1.

4.2.5. Cuantificación de proteínas (método BCA)

Se midió la concentración de proteínas (mg/mL) de cada muestra por duplicado, usando como estándar BSA (albumina de suero bovino) a diferentes concentraciones (Brown R. y col. 1989). Para realizar esta prueba primero se colocó 25 μ L. de cada muestra correspondiente a homogenizado de cerebro de rata y las diluciones del estándar en la placa de Elisa, luego se colocó el reactivo Working Reaction del kit BCA y finalmente se incubó a 37°C por media hora. Se leyó la absorbancia a 562 nm en una lectora de placa Versa MAX (Molecular Devices).

4.2.6 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el programa Stata versión 10.0. Se realizó la prueba de Shapiro Wilk para verificar si los grupos de las pruebas medidas

tienen distribución normal. Se realizó la prueba de Bonferroni para los resultados de óxido nítrico y de la citoquina IL-4 por presentar distribución normal.

Para los grupos que no presentaron distribución normal se realizó la prueba de Kruskal Wallis, seguida de la prueba de rangos de Wilcoxon. La correlación entre los niveles de citoquinas IL-10 y MCP-1 se midió con la prueba de Pearson. Para la determinación del efecto de la emulsión sobre los cambios de las variables se consideró un $p < 0.05$.

Los resultados (tablas y gráficos) de las variables se presentan como medias y desviación estándar (media \pm DS) o medias y error estándar (media \pm ES), según corresponda.

V. RESULTADOS

5.1 Determinación de Capacidad Antioxidante Total

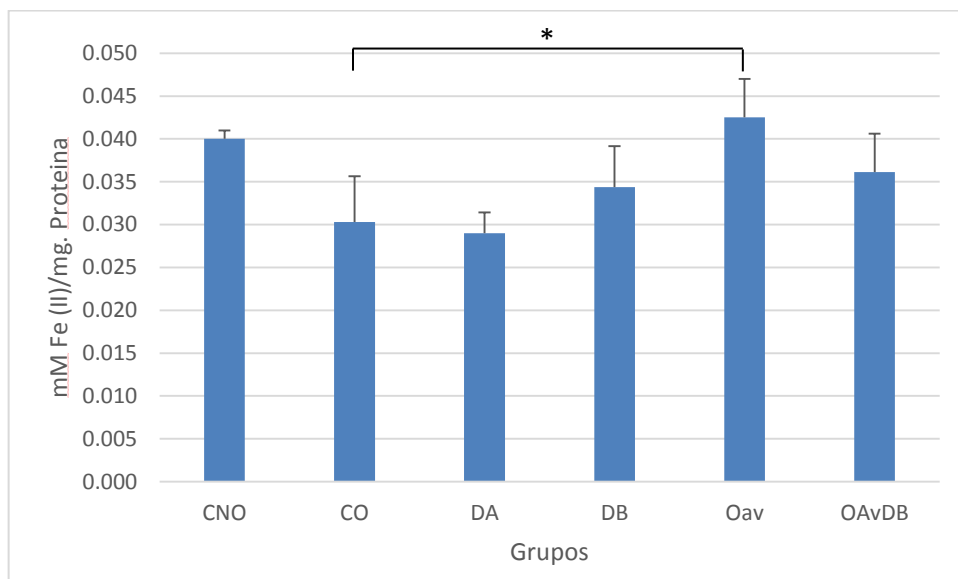
5.1.1 **Medición de la Capacidad antioxidante Total por la técnica de FRAP**

El grupo de ratas obesas (CO) presenta menor capacidad antioxidante que el grupo control no obeso (CNO) pero no muestra diferencias significativas. .

El grupo obeso (CO) no presenta diferencias significativas con los grupos de ratas con tratamiento de la dosis A 0.25g ω -3/día (DA) y la dosis B 0.5g ω -3/día (DB) de la emulsión.

El grupo de ratas obesas (CO) y el grupo con tratamiento de Atorvastatina (OAv) si presentó diferencias significativas ($p=0.03$).

Gráfica 1. Capacidad antioxidante medida en concentración de Fe (II)/ mg proteína de los diferentes grupos de tratamiento por el método FRAP.



Los datos se representan como media \pm ES. Se realizó el análisis estadístico de Kruskal Wallis.

* diferencia estadísticamente significativa, $p<0.05$

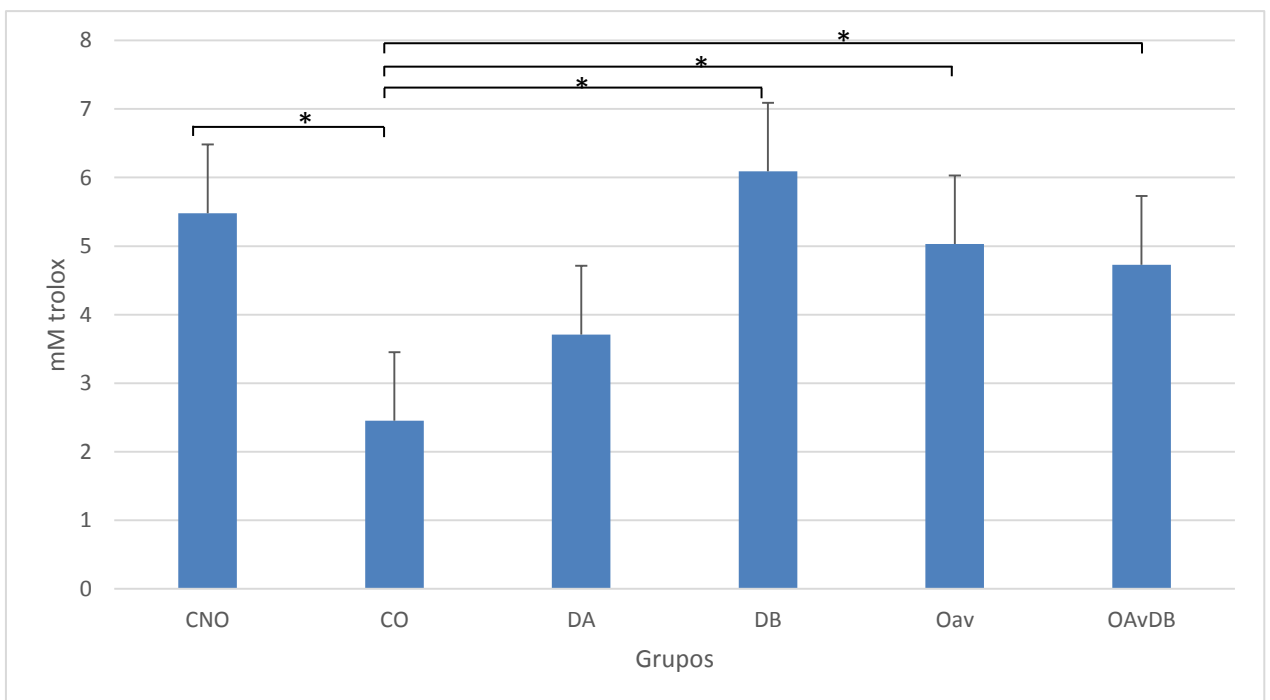
5.1.2 Medición de la capacidad antioxidante por el método de ABTS

Los resultados encontrados, mostraron una diferencia significativa entre el grupo de ratas obesas (CO) y el grupo de ratas control no obesas (CNO) ($p=0.03$).

El grupo DB presenta diferencia significativa con respecto al grupo de ratas obesas (CO) ($p=0.04$).

También existen diferencias significativas entre el grupo de ratas obesas con los grupos de ratas obesas con tratamiento de Atorvastatina (OAv) ($p= 0.02$) y Atorvastatina con la emulsión 0.5g ω -3/día (OAv + DB) ($p= 0.04$). Siendo menor la capacidad antioxidante del grupo de ratas obesas a comparación de los demás grupos de ratas.

Gráfica 2. Capacidad antioxidante medida por concentración de trolox en el homogenizado del cerebro de ratas con diferentes tratamientos.



Los datos se representan como media \pm DS. Se realizó el análisis estadístico de Kruskal Wallis.

* diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$

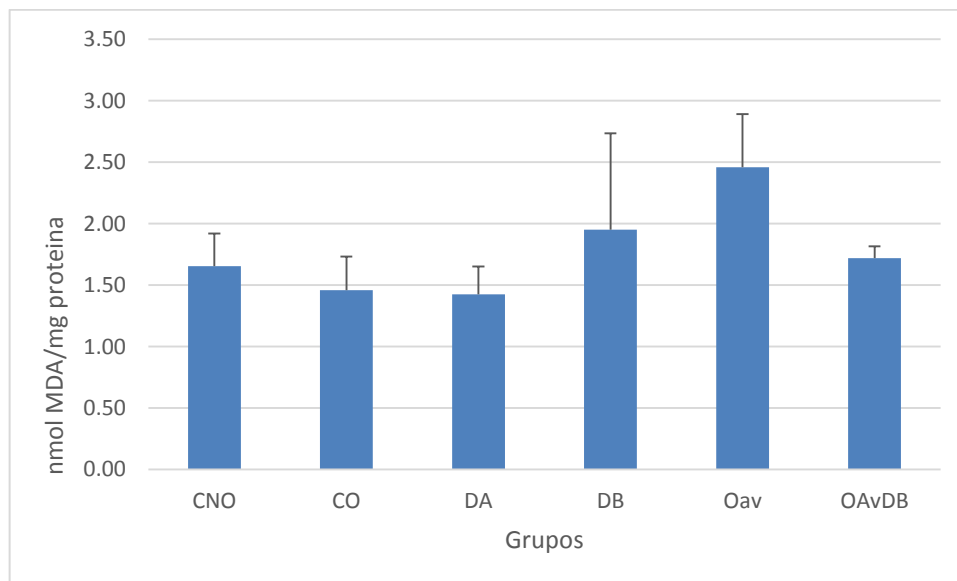
5.2 Determinación de Estrés Oxidativo

5.2.1 Medición del estrés oxidativo por el método de MDA

El grupo de ratas obesas (CO) no presentó diferencias significativas respecto al grupo control no obeso (CNO), al igual que los grupos de ratas con tratamientos de la emulsión (DA y DB) con el grupo obeso ($p > 0.05$).

Se observa que el grupo de ratas obesas con tratamiento 0.25 g ω -3/día(DA) (1.4 ± 0.6) es diferente significativamente con el grupo de ratas obesas con tratamiento de Atorvastatina (2.4 ± 1.05) ($p=0.04$), siendo mayor la concentración de peroxidación lipídica en el grupo de ratas obesas con tratamiento de atorvastatina.

Gráfica 3. Concentración de nmol MDA/ mg proteína de los diferentes grupos de tratamiento por el método MDA



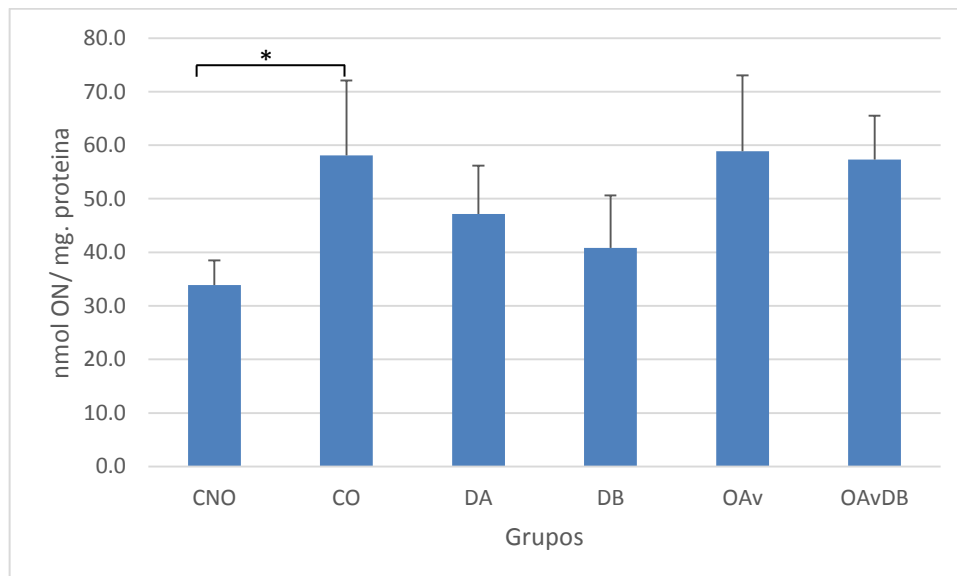
Los datos se representan como media \pm ES. Se realizó el análisis estadístico de Kruskal Wallis, no hubo diferencias significativas.

5.2.3 Medición del óxido nítrico

Con respecto a la medición de óxido nítrico, existen diferencias significativas entre el grupo de ratas no obesas (CNO) y el grupo de ratas obesas (CO) ($p=0.02$), siendo mayor la concentración de óxido nítrico en el grupo de ratas obesas.

Se encontraron diferencias significativas entre el grupo de ratas no obesas (CNO) y los grupos de ratas obesas con tratamiento de Atorvastatina (OAv) ($p=0.02$) y Atorvastatina con dosis 0.5g ω -3/día (OAvDB) ($p=0.04$).

Gráfica 4. Concentración de óxido nítrico en el homogenizado de cerebro de ratas con diferentes tratamientos.



Los datos se representan como media \pm DS. Se realizó el análisis estadístico de Bonferroni.

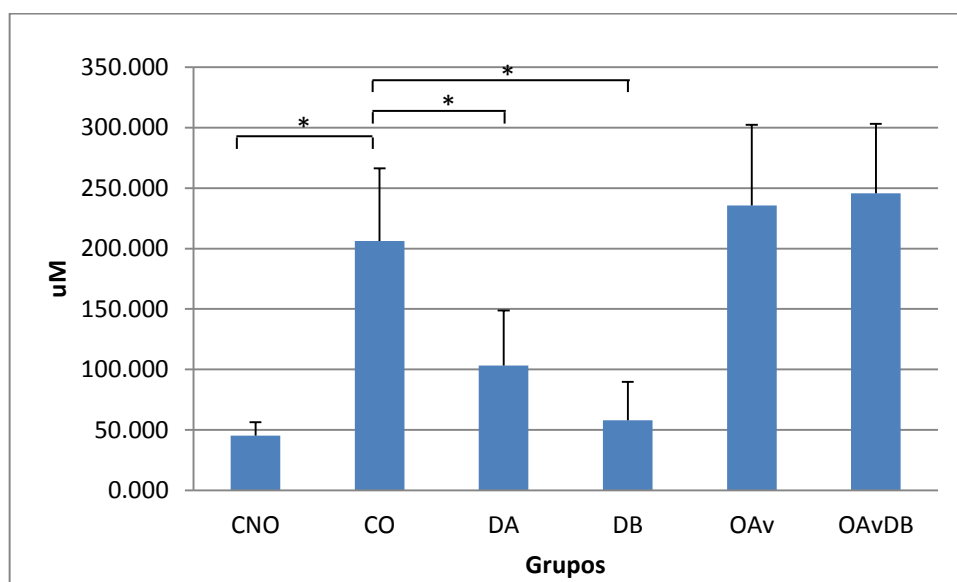
*diferencia estadísticamente significativa, $p<0.05$

Con respecto a la medición de nitrato, existen diferencias significativas entre el grupo de ratas no obesas (CNO) y el grupo de ratas obesas (CO) ($p=0.01$), siendo mayor la concentración de nitrato en el grupo de ratas obesas.

También hay diferencias significativas entre el grupo de ratas obesas (CO) con los grupos de tratamiento de la emulsión con dosis 0.25g ω -3/día (DA) ($p=0.006$) y 0.5g ω -3/día (DB) ($p= 0.002$).

No hay diferencias entre el grupo de ratas obesas (CO) y los grupos de ratas obesas con tratamiento de Atorvastatina (OAv) ($p= 0.33$) y Atorvastatina con dosis 0.5g ω -3/día (OAvDB) ($p= 0.20$).

Gráfica 5. Concentración de nitrato en el homogenizado de cerebro de ratas con diferentes tratamientos



Los datos se representan como media \pm DS. Se realizó el análisis estadístico de Kruskal Wallis.

*diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$.

5.3. Determinación de Citoquinas en inflamación

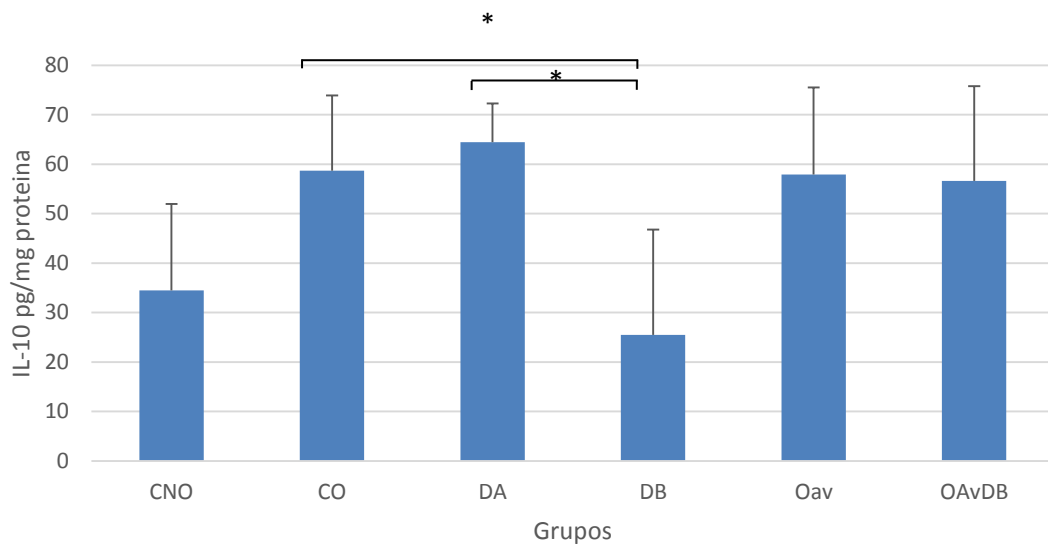
5.3.1 Medición de citoquina anti-inflamatoria IL-10

El grupo de ratas no obesas (CNO) no presenta diferencias significativas con el grupo de ratas obesas (CO).

Se observa diferencia significativa entre el grupo de ratas no obesas (CNO) y el grupo de ratas obesas con tratamiento de la emulsión 0.25g ω -3/día (ODA) ($p=0.023$).

Existen diferencias significativas entre el grupo de ratas obesas y el grupo de ratas obesas con tratamiento de la emulsión 0.5g ω -3/día (ODB) ($p=0.022$). También hay diferencias significativas entre los grupos de ratas obesas (CO) con tratamiento de la emulsión 0.25 g ω -3/día (D1) y 0.5 g ω -3/día (ODB) ($p=0.01$).

Gráfica 6. Efecto de la emulsión en la concentración de IL-10 en el cerebro de ratas inducidas a obesidad.



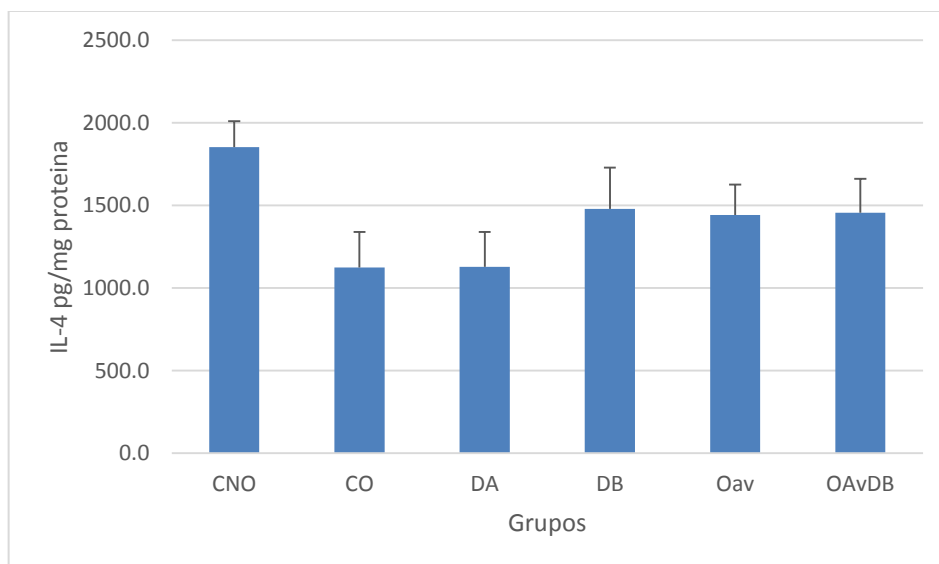
Los datos se representan como media \pm DS. Se realizó el análisis estadístico de Kruskal Wallis.

*diferencia estadísticamente significativa, $p<0.05$

5.3.2 Medición de citoquina anti-inflamatoria IL-4

No se observan diferencias estadísticamente significativas en la concentración de IL-4 entre los diferentes grupos.

Gráfica 7. Efecto de la emulsión en la concentración de IL-4 en el cerebro de ratas inducidas a obesidad.

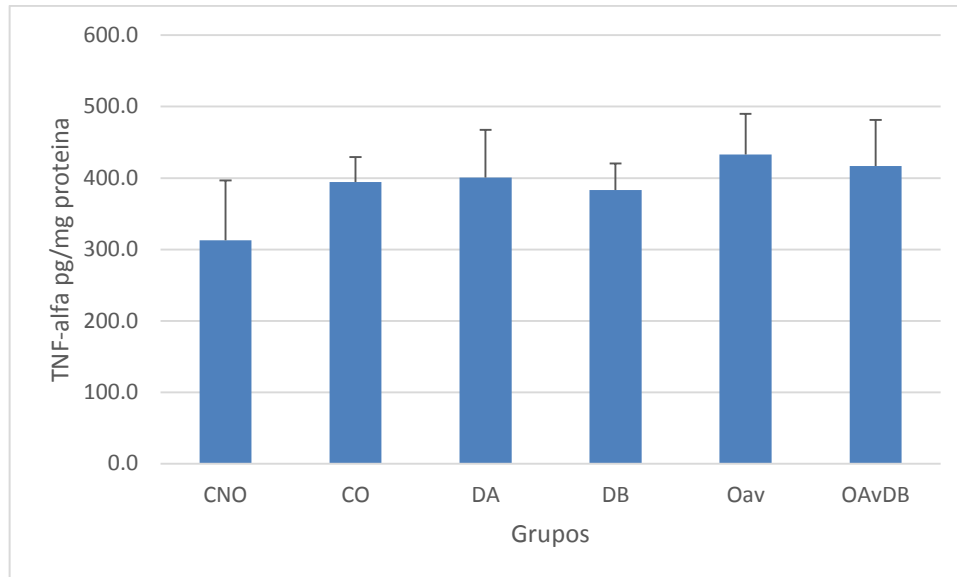


Los datos se representan como media \pm ES. Se realizó el análisis estadístico Bonferroni, no hubo diferencias significativas.

5.3.3 Medición de citoquina pro-inflamatoria TNF- α

No existen diferencias significativas entre los grupos de ratas sin tratamiento y con los diferentes tratamientos ($p=0.82$).

Gráfica 8. Efecto de la emulsión en la concentración de TNF- α en el cerebro de ratas inducidas a obesidad.



Los datos se representan como media \pm ES. Se realizó el análisis estadístico de Kruskal Wallis, no hubo diferencias significativas.

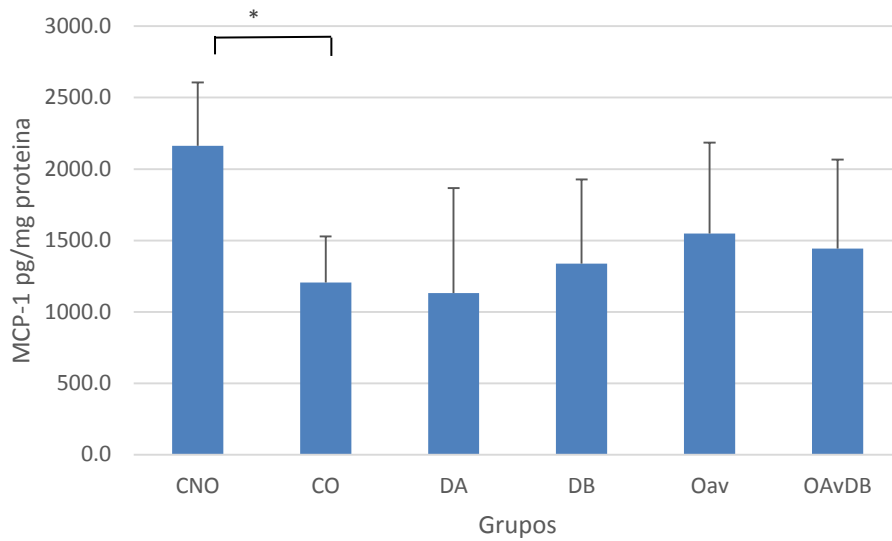
5.3.4 Medición de MCP-1

Se observa una mayor concentración significativa de MCP-1 (pg./mg de proteína) del grupo de ratas no obesas (CNO) (2162 ± 443.1) a diferencia del grupo de ratas obesas (CO) ($p=0.01$). No existen diferencias significativas entre el grupo de ratas obesas con los grupos de ratas obesas con los tratamientos de la emulsión y atorvastatina.

El grupo de ratas obesas con tratamiento de la emulsión $0.25g\omega-3/día$ (DA) (1130.6 ± 736.9) es el que presenta una menor concentración de MCP-1 pg./mg de proteína.

El grupo de ratas no obesas (CNO) tiene diferencias significativas con el grupo de ratas obesas con el tratamiento de la emulsión $0.5g\omega-3/día$ (DB) ($p=0.03$).

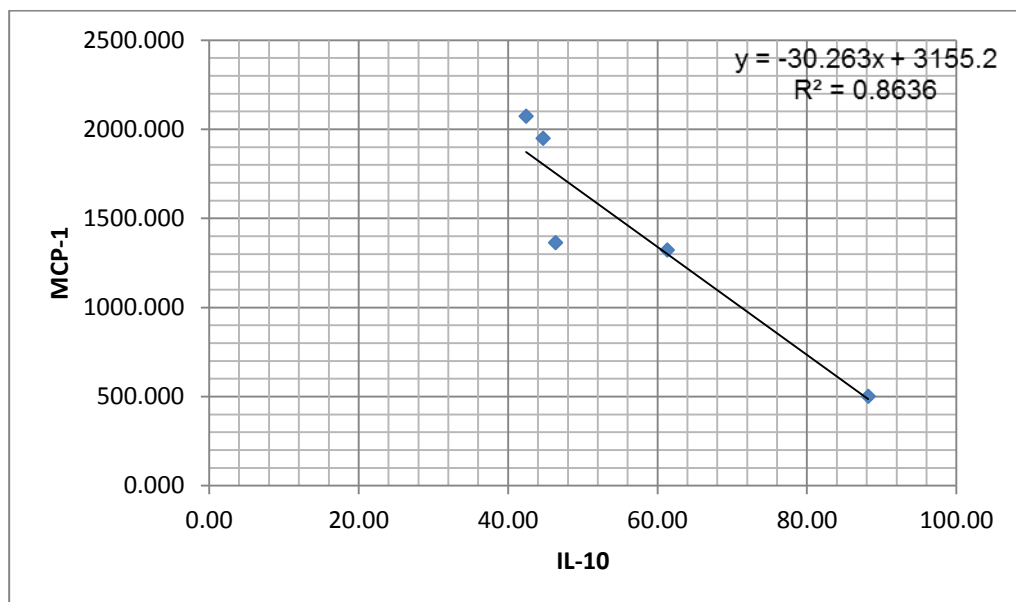
Gráfica 9. Efecto de la emulsión en la concentración de MCP-1 en el cerebro de ratas inducidas a obesidad.



Los datos se representan como media \pm DS. Se realizó el análisis estadístico de Kruskal Wallis.

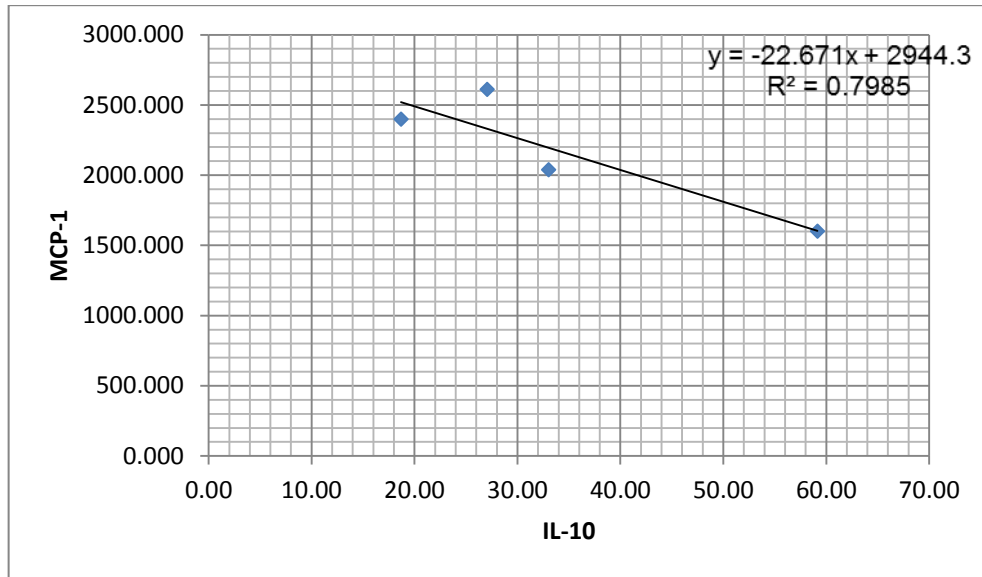
*diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$

Gráfica 10. Correlación lineal de las citoquinas IL-10 con MCP-1 en el cerebro de ratas inducidas a obesidad del grupo OAvDB.



Se observa una correlación lineal negativa significativa entre la citoquina IL-10 con MCP-1 en el cerebro de ratas inducidas a obesidad del grupo de tratamiento OAvDB ($R = -0.9293$, $p = 0.0223$).

Gráfica 11. Correlación lineal de las citoquinas IL-10 con MCP-1 en el cerebro de ratas control no obesas (CNO).



Se observa una correlación lineal negativa no significativa entre la citoquina IL-10 con MCP-1 en el cerebro de ratas control no obesas ($R = -0.8936$, $p = 0.1064$).

A continuación se presenta un cuadro resumen con los promedios de los niveles encontrados en las diferentes pruebas realizadas y los grupos ensayados.

Tabla6. Promedios de los grupos de ratas usadas en el estudio en las pruebas realizadas.

	CON (n=4)	CO (n=6)	DA (n=7)	DB (n=7)	OAv (n=6)	OAvDB (n=5)
FRAP	0.027 ± 0.001	0.21 ± 0.005	0.02 ± 0.002	0.034 ± 0.005	0.028 ± 0.004*	0.025 ± 0.004
ABTS	5.5 ± 2.7*	2.5 ± 1.6	3.7 ± 0.9	6.8 ± 5.3*	5.6 ± 1.8*	4.7 ± 1.7*
MDA	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3	2.0 ± 0.8	2.5 ± 0.4	1.7 ± 0.1
nitrito	248.4 ± 16.1	303.6 ± 58.2	291.6 ± 22.3	285.6 ± 61.8	293.3 ± 55.2	261.3 ± 17.14
nitrato	45.2 ± 11.1*	206.2 ± 60.0	103.3 ± 45.6*	57.9 ± 31.9*	235.7 ± 66.7	245.7 ± 57.5
IL-4	1853.3 ± 156.5	1124.1 ± 215.7	1129.5 ± 210.9	1479.3 ± 250.9	1441.8 ± 184.3	1456.1 ± 205.2
IL-10	34.5 ± 17.5	58.7 ± 15.2	64.4 ± 7.9 [#]	25.5 ± 21.3*	57.9 ± 17.6	56.6 ± 19.2
TNF- α	312.7 ± 83.9	394.4 ± 35.1	400.7 ± 66.7	383.4 ± 37.0	432.8 ± 57.2	416.9 ± 64.6
MCP-1	2162.7 ± 443.2*	1206.0 ± 322.1	1130.6 ± 736.9	1338.6 ± 587.6	1548.6 ± 636.5	1442.6 ± 624.6

* p<0.05 contra CO, [#] p<0.05 contra ODB

VI. DISCUSION

6.1 Estrés oxidativo

No se encontró diferencias significativas en la capacidad antioxidante medida por la prueba de FRAP en las ratas que recibieron diferentes dosis de ω -3 y el grupo control obeso (Gráfica 1), sin embargo, si hubo diferencias significativas con el grupo OAv y el grupo control obeso, mostrando una mayor capacidad antioxidante en el grupo OAv. Kesh *et al.* encontró una mayor capacidad antioxidante hepática por el método de FRAP, en ratones con una dieta alta en grasa y atorvastatina (10 mg/kg), en este estudio observaron que la atorvastatina tiene capacidad para captar radicales libres en el hígado de ratas con una dieta alta en grasa (54.9%), neutralizando el efecto de ROS y disminuyendo la expresión de NF- κ B y los niveles de TNF- α . Además, en otro estudio se encontró también una mayor capacidad antioxidante medida por el método de FRAP en suero del grupo de ratas con una dieta hipercolesterolémica y atorvastatina (10 mg/kg) a comparación del grupo control de ratas Sprague Dawley (Martinez L. 2015).

En el caso del marcador de antioxidante, ABTS, se observa una diferencia significativa entre el grupo obeso y control no obeso siendo mayor la concentración del grupo control no obeso ($p=0.03$, Gráfica 2). Los grupos con el tratamiento de Atorvastatina y Atorvastatina con la dosis más alta de la emulsión (OAvDB) presentan significativamente mayor capacidad antioxidante que el grupo obeso (Gráfica 2), indicando que la dieta con Atorvastatina tiene un efecto positivo. Según Kesh *et al.* la atorvastatina tiene un efecto antioxidante y antiinflamatorio por haber disminuido la peroxidación lipídica, los niveles de TNF- α y haber incrementado las enzimas antioxidantes del hígado y es posible que tenga un efecto en otros tejidos como el cerebro. Se observó también que el grupo DB medido por la prueba de ABTS presento una mayor concentración (6.832 ± 5.321) en relación al grupo control obeso (CO) siendo esta diferencia significativa lo que indica que la dosis DB de la emulsión LMH-E1410 estaría aumentando la capacidad antioxidante en el cerebro de ratas obesas (Gráfica 2).

Esto confirma que en el presente estudio si hay un efecto positivo de la emulsión LMHE-1410 en la capacidad antioxidante y que puede ser observado en las muestras del tejido cerebral de ratas mediante la prueba de ABTS (Gráfica 2).

En el estudio de Ambulay J. 2015 realizado con las mismas ratas utilizadas en este trabajo, se midió la capacidad antioxidante en el tejido hepático con el método de FRAP y ABTS, los niveles fueron mayores en el grupo con dosis alta de la emulsión (DB) a comparación del grupo obeso, además la capacidad antioxidante en el tejido adiposo medida por FRAP del grupo con dosis alta de la emulsión (DB) fue mayor significativamente que el grupo obeso, sin embargo la capacidad antioxidante del mismo tejido medida por ABTS no tuvo una diferencia significativa entre el grupo obeso y DB. En cuanto a los niveles de FRAP y ABTS en suero no hubo un efecto de la emulsión (Ambulay J, 2015).

La capacidad antioxidante de los cerebros de ratas de los diferentes grupos de tratamiento medida por las pruebas de FRAP y ABTS tiene una tendencia similar, sin embargo se observaron las diferencias más marcadas con la prueba ABTS, esto se debe a que este método usa el radical ABTS⁺ que es atrapado por antioxidantes y el método FRAP cuantifica los antioxidantes que transfieren electrones a los radicales libres (Agudo L. 2010), por lo que cada método cuantifica antioxidantes con diferentes mecanismos de acción, esto llevaría a que se puedan estar midiendo otros grupos de antioxidantes.

Los niveles de estrés oxidativo medido por MDA en el tejido de cerebro de ratas no presentó diferencias significativas entre los grupos obeso y control no obeso (Gráfica 3). El tejido cerebral podría no haber sido afectado aún por la peroxidación lipídica, pero en los demás tejidos de las ratas utilizadas en el estudio de Ambulay J., que provienen de los mismos grupos de experimentación, como es el caso de las muestras de suero y tejido hepático, mostraron una disminución en el grupo DB en comparación con el grupo obeso. Por el contrario, el tejido adiposo del grupo de ratas obesas con los tratamientos de dosis baja (DA) y alta (DB) de la emulsión, tuvo un aumento de los niveles de MDA, pero el grupo de ratas con tratamiento Atorvastatina (OAv) y la dosis alta de la emulsión (DB) fue menor que el grupo obeso (Ambulay J, 2015).

Amin K. y col. obtuvieron una mayor concentración de MDA en las ratas *Wistar* con dieta alta en grasa a comparación del grupo con una dieta normal, estas ratas llevaban 12 semanas con ese tipo de alimentación, a comparación de este estudio en el que fueron 16 semanas para la inducción a obesidad de las ratas, los resultados obtenidos se podrían deber a que las ratas de este estudio no llegaron a incrementar los niveles de MDA como marcador de estrés oxidativo en el cerebro de ratas por ser otra cepa de ratas, en este caso *Sprague Dawley*. No se observaron diferencias en la concentración de MDA entre los grupos probablemente debido a que hubo una desviación estándar alta en cada grupo. Esto se debe a una alta variabilidad entre los individuos y además a que el número de ratas que se usó fue pequeño.

En el presente estudio se puede observar un incremento del óxido nítrico en el tejido de cerebro de ratas obesas en comparación de las ratas no obesas (Gráfica 4), esto podría ser causado por que el óxido nítrico puede actuar de manera dañina y se ha visto que la formación de peroxinitrito lleva a un estrés oxidativo severo que puede causar daño en las neuronas (Zanzinger J, 2002). En otro estudio se encontró que en ratas diabéticas Zucker hay una mayor producción de óxido nítrico en el cerebro (Raza H. et al. 2015)

Además, en el presente estudio se observó una atenuación de los niveles de nitrato en los grupos de dosis baja (DA) y dosis alta (DB) en las muestras de cerebro (Gráfica 5), por lo cual se podría indicar un posible efecto mediador de la neurotoxicidad inducida por un estrés crónico en la obesidad. Estos resultados se asemejan a lo reportado por Moro MA, et al. (1988) en donde reportaron un incremento del óxido nítrico (en la medición de sus metabolitos nitrito y nitrato) en animales obesos en un modelo de estrés crónico en fase temprana, y una disminución de este mediador al utilizar L-Name, un inhibidor de óxido nítrico sintetasa (NOS).

La producción del ON derivado de macrófagos es inhibido por el ácido graso poliinsaturado ω -3 (DHA) según Fernández JC., otro factor por el que puede estar disminuyendo el ON es porque el ω -3 (EPA) inhibe la expresión proteica del NF- κ B y con ello el contenido de ON (Ren y Chung. 2007).

La emulsión LMH-E1410 contiene otros ácidos grasos de importancia que podrían estar aumentando la capacidad antioxidante como el ácido oleico, un ω -9 (Anexo 6). Se ha demostrado que los ácidos grasos ω -9 disminuyen el estrés oxidativo en un modelo de ratones con diabetes 2 (Vassiliou et al. 2009), en otro estudio se observó que el ácido oleico, puede prevenir el estrés oxidativo que produce TNF- α en cardiomiocitos de ratas adultas (Al-Shudiefat AA, Sharma AK, Bagchi Ak, Dhingra S, Singal PK. 2013).

Otro ácido graso importante que contiene la emulsión LMH.E1410 es el linoleico, un ω -6 (Anexo 6). Se ha observado que el ácido linoleico actúa de manera sinérgica con el ácido palmítico, aumentando la capacidad antioxidante en tejido hepático y eritrocitos; y disminuyendo MDA en plasma comparado con ratas hiperlipidémicas (Ahmad S, Beg Z. 2015). En el estudio de Kim S. et al. se evidenció que los ácidos grasos ω -6 y ω -3 disminuyen el estrés oxidativo en un cultivo de neuronas de ratones sin palmitoilproteín-tioesterasa que simula la enfermedad ceroid lipofuscinosis neuronal infantil (Kim SJ. et. al. 2010).

6.2 Inflamación

Estudios recientes muestran que en la obesidad, se genera una inflamación sistémica crónica de bajo grado y una serie de desórdenes metabólicos (Gotoh et al. 2012). Los efectos multisistema de la obesidad están relacionados con un desequilibrio en la respuesta inmune proinflamatoria y homeostática. La obesidad activa una serie de vías inflamatorias en el cerebro y en el tejido adiposo que desregulan las respuestas fisiológicas que mantienen la sensibilidad a la insulina y leptina. Una dieta alta en grasa (HFD), como la que se desarrolló en la presente tesis activa vías de señalización inflamatorias hipotalámicas, resultando en el incremento del consumo de alimento y el almacenamiento de nutrientes (Thaler JP, Schwartz MW. 2010).

En otros estudios se reportó un incremento de la citoquina IL-10 en la circulación de individuos obesos (Esposito K. *et al.* 2003), así como en el tejido del hipotálamo de ratones con una alimentación rica en grasas en comparación de

ratones con una alimentación normal (Cintra D. *et. al*, 2012). Esto corrobora que los grupos obesos tienen una mayor cantidad de la citoquina IL-10 como se ha encontrado también en el presente estudio (Gráfica 6). Por el contrario, en el estudio de Ambulay J. donde se usaron las mismas ratas de este estudio, los niveles de IL-10 en el tejido hepático fueron menores en el grupo CO a comparación del grupo CON; esto se podría deber a que la citoquina IL-10 actúa de una manera diferente en el cerebro a comparación del resto del organismo, como se ha observado en el estudio de Lavin DN. *et al*. 2011 donde los ratones con dieta alta en grasa tuvieron un incremento de citoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo pero no en el cerebro en comparación con ratones con una dieta baja en grasas. Además, debido a que las neuronas del sistema nervioso central no se regeneran (Stroncek JD, Reichert WM. 2008) éstas podrían estar activando mecanismos para contrarrestar la inflamación crónica de la obesidad, aumentando las citoquinas antiinflamatorias como por ejemplo IL-10.

En el estudio de Cintra (Cintra D. *et. al*, 2012), donde ratones que venían siendo alimentados con dieta alta en grasas durante 8 semanas se les administró aceites de oliva y linaza (fuente de ω -3), se encontró una disminución de la citoquina TNF- α y de iNOS, además de un aumento de la citoquina IL-10 en el hipotálamo siendo estas diferencias significativas con respecto al grupo control con la dieta alta en grasa. Los hallazgos en ese estudio concuerdan con los datos obtenidos, donde se encontró un aumento de IL-10 en el grupo obeso y el grupo obeso que recibió DA en comparación del grupo control (Gráfica 6). La administración de la dosis alta de la emulsión (DB) en los ratones obesos produjo una disminución significativa de la citoquina IL-10, alcanzando niveles comparables al grupo normal no obeso. Una explicación a éstas observaciones podría ser que la citoquina IL-10 al ser una citoquina antiinflamatoria estaría aumentada en los cerebros de las ratas obesas para contrarrestar la inflamación, esta explicación estaría apoyada en los estudios de Gotoh K. *et al*. quienes encontraron que la administración de citoquina IL-10, contrarresta los efectos inflamatorios vistos en la obesidad. También en nuestro estudio se observó que el efecto de los ácidos grasos ω -3 en la dosis alta (DB) tiende a disminuir los valores de IL-10 haciéndolos comparables al control normal no obeso.

No se observan diferencias significativas en la concentración de la citoquina IL-4, aunque se puede observar una mayor concentración de esta citoquina en el grupo control no obeso a comparación del grupo obeso (Gráfica 7).

Por otro lado, se ha visto que la citoquina TNF- α está involucrada en la neuroinflamación, su inhibición reduce la obesidad y pre-diabetes en ratones (Cai D, 2013). Además se ha visto en otro estudio que esta citoquina induce una inflamación de bajo grado en la obesidad (Fantuzzi G, 2005), (Trayhurn P, Wood I, 2004) y se ha encontrado elevada en un estudio en niños obesos (Gil M, 2008). Sin embargo, en los resultados obtenidos no se encontró diferencias significativas en la concentración de la citoquina TNF- α en cerebro de ratas de los diferentes grupos de tratamiento (Gráfica 8).

En el estudio de Bradley y col. 2008, se encontró que adipocitos tratados con ácido palmítico tuvieron un incremento de TNF- α y una disminución de IL-10, con el tratamiento de DHA no hubo efecto en la citoquina TNF- α pero si hubo un aumento de la citoquina IL-10, este podría ser el caso del presente estudio donde se observó que hubo un efecto de la emulsión LMH-E1410 sobre la concentración de la citoquina IL-10 y por el contrario no se observó ningún efecto en la citoquina TNF- α (Gráfica 6 y 8). Además, se ha visto en otros estudios que la citoquina IL-10 inhibe la expresión de la citoquina TNF- α (Smallie T. *et al.* 2010) y suprime la producción de TNF- α en macrófagos humanos (Denys A. *et al.* 2016) esta podría ser una explicación por la que hubo un efecto en la citoquina IL-10 que podría estar bloqueando el efecto de la citoquina TNF- α (Gráfica N° 6 y 8). También se sabe que los ácidos grasos ω -3 al metabolizarse forma neuroprotectinas y resolvinas que inhiben la citoquina TNF- α y la transcripción del gen inflamatorio NF- κ B ya que activan la vía PPAR (Figura 2), por lo que este podría ser un mecanismo que disminuye la inflamación en el cerebro (Farooqui A, Horrocks L, Farooqui T. 2007).

En este estudio se obtuvo una menor cantidad de la citoquina MCP-1 en el grupo obeso ($p < 0.05$), los niveles de MCP-1 no tuvieron diferencias significativas en los demás grupos de tratamiento con la emulsión (Gráfica 9). Además, se ha visto que IL-10 limita la producción de citoquinas como MCP-1 (Moore KW *et al.*

2001), al haber mayor concentración de la citoquina IL-10 en el grupo obeso, podría estar inhibiendo la producción de MCP-1 que llevaría a una menor concentración en el grupo obeso a diferencia del grupo no obeso.

Se observa una correlación lineal negativa significativa en el grupo OAvDB (Gráfica 10) entre IL-10 y MCP-1, lo que podría indicar una sinergia entre la dosis B de la emulsión LMH-E1410 y atorvastatina donde hay una mayor inhibición de MCP-1 por la citoquina IL-10, además se observa que hay una correlación lineal negativa en el grupo no obeso ($R=-0.89$) aunque no es significativa (Gráfica 11); esto podría explicarse como un mecanismo natural de inhibición de IL-10 a las citoquinas pro-inflamatorias como MCP-1, que estaría ocurriendo sin necesidad de que exista un estado de inflamación.

La emulsión LMH-E1410 contiene otros ácidos grasos de importancia que podrían estar disminuyendo la inflamación como el ácido oleico, un $\omega-9$ (Anexo 6). Se ha demostrado que este ácido graso tiene un efecto antiinflamatorio al disminuir la expresión de proteínas pro-inflamatorias en células endoteliales en un modelo de aterogénesis temprano (Massaro M, De Caterina R. 2002).

Otro ácido graso importante que contiene la emulsión LMH-E1410 es el ácido linolénico, un $\omega-6$ (Anexo 6), estos ácidos grasos son pro-inflamatorios (Johnson M, Bradford C. 2014). Se recomienda una baja cantidad de $\omega-6$ en relación a $\omega-3$ (1:1 o 5:1) para que pueda haber efectos benéficos como una disminución de la inflamación (Yang LG. et al. 2016.), ya que si no se mantiene esta relación estarían aumentando la producción de prostaglandinas y eicosanoides que son pro-inflamatorios y generan coágulos, constricción, entre otros (Johnson M, Bradford C. 2014). La relación $\omega-3$ a $\omega-6$ en la emulsión LMHE1410 es de aproximadamente 2:1 (Anexo 6).

VII. CONCLUSIONES

1. Las muestras de cerebros de ratas obesas presentan un mayor estrés oxidativo, al observarse una disminución de la capacidad antioxidante, medida por la prueba de ABTS con respecto a los cerebros de ratas del control no obeso y un incremento de la concentración de nitratos con respecto a las muestras de cerebros de ratas del control no obeso.
2. La dosis 0.5g ω -3/día (DB) de la emulsión LMH-E1410 y los tratamientos con Atorvastatina (OAv), Atorvastatina más dosis 0.5g ω -3/día (OAvDB) aumentaron la capacidad antioxidante total en muestras de cerebro de ratas obesas en comparación del grupo obeso (CO) medido por el método de ABTS.
3. Las dosis 0.25g ω -3/día (DA) y 0.5g ω -3/día (DB) de la emulsión LMH-E1410 disminuyen la concentración de nitrato en muestras de cerebro de ratas obesas.
4. La concentración de IL-10 se encuentra incrementada en las ratas obesas con respecto a las muestras de cerebro de ratas control no obesas.
5. El tratamiento con 0.5g ω -3/día (DB) de la emulsión LMH-E1410 disminuyó significativamente la concentración de la citoquina IL-10 en las muestras de cerebro de ratas obesas.
6. Se podría evidenciar un efecto neuroprotector en las muestras de cerebros de ratas obesas con el tratamiento de 0.5g ω -3/día (DB) de la emulsión LMH-E1410, pero se requieren más estudios en el futuro.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular. 7ma Ed.
2. Adan, A, Prat G. Funciones y potencial terapéutico del óxido nítrico en el sistema nervioso central. *Psichothema*. 17(2): 275-280.
3. Agudo L. 2010. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Autodidacta*.
4. Ahmad S, Beg ZH. 2016. Evaluation of therapeutic effect of ω -6 linoleic acid and thymoquinone enriched extracts from *Nigella sativa* oil in the mitigation of lipidemic oxidative stress in rats. *Nutrition*. 32(6): 649-655.
5. Al-Shudiefat AA, Sharma AK, Bagchi Ak, Dhingra S, Singal PK. 2013. Oleic acid mitigates TNF- α -induced oxidative stress in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. 372 (1-2): 75-82.
6. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. 2011. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 164(6): 899-904
7. Ambulay J. 2015. Efecto de la emulsión LMH-E1410 sobre el perfil lipídico, el estrés oxidativo, la inflamación y la expresión de los genes PPAR α , ACO, FAS, ACC Y NF-K β en ratas obesas. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
8. Amin K, Kamel H, Eltawab M. 2011. The relation of high fat diet, metabolic disturbances and brain oxidative dysfunction: modulation by hydroxy citric acid. *Lipids Health Dis*. 10: 74.
9. Asociación Internacional del estudio de la obesidad (IASO). 2011. About obesity.
10. Ayerza R Jr, Coates W. 2005. Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Ann Nutr Res*. 51(1): 27-34.

11. Barrera P. 2015. Estudio del efecto neuroprotector del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) en la neurotoxicidad inducida por metilmercurio durante la gestación y lactancia en ratas. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
12. Bastarrechea RA, López-Alvarenga JC, Bolado-García VE, Téllez-Mendoza J, Laviada-Molina H, Comuzzie AG. 2007. Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gac Med Mex.* 143 (6): 505-512.
13. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem,* 239(1): 70-76.
14. Bernabe J. 2014. Efecto de una bebida antioxidante sobre biomarcadores de estrés oxidativo y riesgo cardiovascular en pacientes con síndrome metabólico. Universidad Católica San Antonio, Murcia, España. Tesis. Disponible en:
<http://repositorio.ucam.edu/bitstream/handle/10952/752/Tesis.pdf?sequence=1>
15. Blancas G, Almanza JC, Lopez RI, Alarcon FJ, Garcia R, Cruz M. 2009. La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 67: 88-97.
16. Bouchard C. 2010. *Molecular Biology and translational science.* Elsevier. 94: 54-55.
17. Bodert R, Gele P, Duriez P, Fruchart JC. 2006. PPARs: a new target for neuroprotection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 77(3): 285-287.
18. Bradley RL, Fisher FM, Maratos-Flier E. 2008. Dietary Fatty acids differentially regulate production of tnf-alpha and il-10 by murine 3t3-L1 adipocytes. 16(5): 938-944
19. Bussmann RW, Téllez C, Glenn A. 2009. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. *Nordic Journal of Botany.* 27(4): 313-315.

20. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem.* 180 (1):136-139.
21. Cai D. 2013. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *trends Endocrinol Metab*, 24(1): 40-47.
22. Calder P. 2012. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr.* 142(3): 592S-599S
23. Campbell NA, Reece JB. *Biología*. 7ma Ed. 2007
24. Cintra D, Ropelle E, Moraes J, Pauli J, Morari J, De Souza C, Grimaldi R, Stahl M, Carvalheira J, Saad M, Velloso L. 2012. Unsaturated fatty acids reverts diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *Plos One*, 7 (1).
25. Cuenca-López MD, Brea D, Segura T, Galindo MF, Antón-Martínez D, Agulla J, Castillo J, Jordán J. 2010. La inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Rev Neurol.* 50: 349-359.
26. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, 52(4): 601-623.
27. Denys A, Udalova IA, Smith C, Williams LM, Ciesielski CJ, Campbell J, Andrews C, Kwaitkowski D, Foxwell MJ. 2016. Evidence for a dual mechanism for il-10 suppression of tnf-alpha production that does not involve inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase or nf-β in primary human macrophages. *J Immunol*, 168(10): 4837-4845.
28. Di Minno MN, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, Di Minno A, Tarantino G. 2012. Ω-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 18(41): 5839-5847.
29. Dorado C, Rugerio C, Rivas S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*, 46(6): 229-235.
30. Dourmashkin JT, Chang GQ, Hill JO, Gayles EC, Fried SK, Leibowitz SF. 2006. Model for predicting and phenotyping at normal weight the long-

- term propensity for obesity in Sprague Dawley rats. *Physiol Behav*, 87 (4): 666-678.
31. Enciso J. 2013. Evaluación de ácidos grasos y propiedades fisicoquímicas de los aceites crudos de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) de la selva central del Perú y determinación de su actividad antiinflamatoria. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
 32. Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Elsevier*, 37(4): 277-285.
 33. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D. 2003. Association of Low Interleukin-10 Levels with the Metabolic Syndrome in Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(3): 1055-1058.
 34. Estepa V, Rodenas S, Martín MC. 2001. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal Real Acad Farm*, 67(3).
 35. Fan C, Zirpoli H, Qi K. 2013. n-3 fatty acids modulate adipose tissue inflammation and oxidative stress. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16(2): 124-132.
 36. Fantuzzi G. 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *American Academy of Allergy, Asthma and Immunology*, 115(5): 911-919.
 37. Farley C, Cook JA, Spar BD, Austin TM, Kowalski TJ. 2003. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. *Obes Res*. 11(7): 845-851
 38. Farooqui A, Horrocks LL, Farooqui T. 2007. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *Journal of Neurochemistry*. 101: 577-599.
 39. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). 2012. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana.
 40. Fernández JC. 2010. Ácidos grasos ω -3 y prevención cardiovascular. *CENIC*. 41(1): 3-15.

41. Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim SO. 2012. Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radical Biology and Medicine*. 56: 226–233
42. Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. 2012. IL-4 in the brain: A cytokine to remember. *J Immunol*. 189(9): 4213-4219.
43. Gajda AM. 2009. High fat diets for diet-induced obesity models. Research diets Inc.
44. Garcia P. 2008. Inflamación. *Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat. (Esp)*. 102(1): 91-159.
45. Garcia-Bueno B, Leza J.C. 2008. Mecanismos inflamatorios/antiinflamatorios en el cerebro tras la exposición a estrés. *Rev Neurol*, 46(11): 675-683.
46. Gerbi A, Maixent JM, Ansaldi JL, Pierlovisi M, Coste T, Pelissier JF, Vaque P, Raccah D. 1999. Fish oil supplementation prevents diabetes-induced nerve conduction velocity and neuroanatomical changes in rats. *Diabetes*. 48(2): 207-213.
47. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, Van Heek M, Hwa JJ. 2002. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague Dawley rats. *Obes Res*. 10(9): 956-963.
48. Gil M. 2008. Obesidad, marcadores inflamatorios y síndrome metabólico en niños de la zona de Ubeda (Jaen). Universidad de Granada.
49. Gonzales GF, Gonzales C, Villegas L. 2014. Exposure of fatty acids after a single oral administration of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) and sunflower oil in human adult subjects. *Toxicol Mech Methods*. 24(1): 60-69.
50. Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shimasaki T, Ando H, Fujiwara K, Katsuragi I, Kakuma T, Seike M, Sakata T, Yoshimatsu H. 2012. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. *PLoS One*. 7(5): e35272.
51. Hariri N, Thibault L. 2010. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*, 23(2): 270-299.

52. Hogan S, Canning C, Sun X, Sun S, Zhou K. 2010. Effects of Grape Pomace Antioxidant Extract on Oxidative Stress and Inflammation in Diet Induced. 58(21): 11250-11256.
53. Johnson M, Bradford C. 2014. ω -3, ω -6 and ω -9 Fatty Acids: Implications for Cardiovascular and Other Diseases. J Glycomics Lipidomics. 4: 123.
54. Katalinic V, Modun, D, Music I, Boban M. 2005. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. 140(1): 47-52.
55. Kesh et al. 2013. Promising role of ferulic acid, atorvastatin and their combination in ameliorating high fat diet-induced stress in mice. Elsevier. 92(17-19): 938-949.
56. Kim HK, Choi H. 2005. Stimulation of acyl-CoA oxidase by alpha-linolenic acid-rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats. Life Sci. 77(12): 1293-1306.
57. Kim SJ, Zhang Z, Saha A, Sarkar C, Zhao Z, Xu Y, Mukherjee AB. 2010. Ω -3 and ω -6 fatty acids suppress ER- and oxidative stress in cultured neurons and neuronal progenitor cells from mice lacking PPT1. Neurosci Lett, 479(3): 292-296.
58. Kim-Tiu T, Chee-Yan C, Lin Faun C, Kalanithi N. 2014. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. Nutr J. 13: 12.
59. Lavin DN, Joesting JJ, Chiu GS, Moon ML, Meng J, Dilger RN, Freund GG. 2011. Fasting Induces an Anti-Inflammatory effect on the neuroimmune system which a high-fat diet prevents. 19(8): 1586-1594.
60. Yang LG, Song ZX, Yin H, Wang YY, Shu GF, Lu HX, Wang SK, Sun GJ. 2016. Low n-6/n-3 PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. Lipids. 51(1): 49-59.
61. Lima SC, Arrais RF, Almeida MG, Souza ZM, Pedrosa LF. 2004. Plasma lipid profile and lipid peroxidation in overweight or obese children and adolescents. J Pediatr (Rio J). 80(1): 23-8.

62. Lim P, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N, Frautschy S, Cole G. 2005. A Diet Enriched with the ω -3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid Burden in an Aged Alzheimer Mouse Model. *J Neurosci.* 25(12): 3032-40.
63. López C. Lozano S. Linares J. 2014. Puesta al día en estatinas. Nuevas recomendaciones. Elsevier. 67(4): 304-311.
64. Luchsinger JA, Mayeux R. 2007. Adiposity and Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research.* 4(2): 127-134
65. Ma W, Yuan L, Yu H, Xi Y, Xiao R. 2014. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats. Elsevier. 110(2): 53-60.
66. Marcano Y. Torcat J, Ayala L, Verdi B, Lairet C, Maldonado M, De Vegas J. 2006. Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Rev Venez Endocrinol Metab,* 4(1): 15-21.
67. Martinez L. 2015. Efecto hipocolesterolémico de extracto hidroalcohólico de *Capsicum baccatum* en un modelo experimental de hipercolesterolemia en ratas, en <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3982>.
68. Martinez E, Sanchez MA, Hafidi ME. 2005. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquimia.* 30(3): 82-89.
69. Massaro M, De Caterina R. 2002. Vasculoprotective effects of oleic acid: epidemiological background and direct vascular antiatherogenic properties. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 12 (1): 42-51.
70. Matsuda M, Shimomura L. 2013. Increased oxidative stress in obesity. implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dislipidemia, atherosclerosis and cáncer. Elsevier, 7(5): 330-341.
71. Maurer NE, Hatta-Sakoda B, Pascual-Chagman G, Rodriguez-Saona LE. 2012. Characterization and authentication of a novel vegetable source of ω -3 fatty acids, sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chem,* 134(2): 1173-1180.

72. Mazón P. 2015. Del concepto de estatinas de alta potencia a los efectos extralipídicos de las estatinas. *Rev Esp Cardiol Supl.* Vol. 15
73. Mennickent S, Bravo M, Carlo C, Avello M. 2008. Efectos pleiotropicos de las estatinas. *Rev Med Chile.* 136: 775-782
74. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 683–765
75. Moraes J, Coope A, Morari J, Cintra D, Roman E, Pauli J, Romanatto T, Carvalheira J, Oliveira A, Saad M, Velloso L. 2009. High fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *Plos One*, 4(4).
76. Moro MA, Leza JC, De Alba J, Lorenzo P, Fernández AP, Bentura ML, Boscá L, Rodrigo J, Lizasoain I. 1998. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci.* 10(2): 445-456.
77. Organización Mundial de la Salud. 2014. Obesidad y sobrepeso, en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
78. Pavon RL. Hernandez ME, Loria SF. Sandoval LG. 2004. Interacciones neuroendocrinoimmunológicas. *Salud mental*, 27(3): 19-25.
79. Perez-Neri I. 2015. Casi todo sobre el óxido nítrico. *Arch Neurocién (Mex).* 20 (4): 271-280.
80. Pistell P, Morrison CD, Gupta S, Kight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ. 2010. Cognitive Impairment Following High Fat Diet Consumption is Associated with Brain Inflammation. *J Neuroimmunol*, 219(1-2): 25-32.
81. Quintanar M, Calderon J. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB*, 28(3): 89-101
82. Ren J, Chung SH. 2007. Antiflamatory effect of alpha-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-kappa β and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Agric Food Chem.* 55(13): 5073-5080.

83. Reyes M. 2010. Inflammatory characteristics of obesity. *Rev. Chil Nutr*, 37(4): 498-504.
84. Romano M. 2011. Mecanismos inflamatorios involucrados en el daño cerebral isquémico agudo. Posibles blancos terapéuticos. Factores pronósticos. *Neurol Arg*. 3(3).
85. Ruiz C, Diaz C, Anaya J, Rojas R. 2013. Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). *Rev Soc Quím Perú*. 79(1).
86. Sansbury y Bradford. 2014. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 73: 383-399
87. Satoh- Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Hasegawa K, Ogawa Y. 2012. Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral bloodmonocytes in obese patients with dyslipidemia. *Diabetes Care*. 35(12): 2631-2639.
88. Savini I, Valeria M, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. 2013. Obesity-associated oxidative stress:Strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci*. 14(5): 10497-10538.
89. Sehar N, Agarwal NB, Vohora D, Raisuddin S. 2015. Atorvastatin prevents development of kindling by modulating hippocampal levels of dopamine, glutamate, and GABA in mice. *Epilepsy Behav*. 42: 48-53.
90. Shen KP, Lin HL, Hsieh SL, Kwan AL, Chen IL, Wu BN. 2009. Eugenosedin-A prevents hyperglycaemia, hyperlipidaemia and lipid peroxidation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Pharm Pharmacol*. 61(4): 517-25.
91. Shen C, Cao JJ, Dagda RY, Chanjaplammoatil S, Lu C, Chyu MC, Gao W, Wang JS, Yeh JK. 2012. Green tea polyphenols benefits body composition and improves bone quality in long-term high-fat diet–induced obese rats. *Nutr Res*, 32(6): 448-57.

92. Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. 2008. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. 46(4): 499-505.
93. Sierra S, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jimenez J, Boza J, Xaus J. 2004. La expresión de IL-10 interviene en la regulación de la respuesta inflamatoria por los ácidos grasos ω -3. Nutr. Hosp. 19(6): 376-382
94. Smallie T, Richetti G, Horwood NJ, Feldman M, Clark AR, Williams LM. 2010. IL-10 inhibits transcription elongation of the human TNF gene in primary macrophages. 207(10): 2081-8.
95. Soledad J. 2007. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. Universidad de Granada.
96. Spalvieri M, Oyola, E. 2011. Estatinas: incidencia de efectos adversos. Acta Bioquim Clin Latinoam. 45(4): 727-38.
97. Stroncek JD, Reichert WM. 2008. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. In: Reichert WM, editor. Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment. Cap. 1. CRC Press Taylor & Francis.
98. Suazzo J, Rigotti A. 2014. Riesgo de diabetes mellitus tipo 2 asociado al uso de estatinas: evidencias y posibles mecanismos. Rev Med Chile, 142(2): 222-228.
99. Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferreti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Bernedetti A, Casini A. 2006. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. Am J Pathol. 169(3): 846-860
100. Thaler JP, Schwartz MW. 2010. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. Endocrinology. 151(9): 4109–4115.

101. Terao S, Yilmaz G, Stokes K, Ishikawa M, Kawase T, Granger N. 2008. Inflammatory and Injury Responses to Ischemic Stroke in Obese Mice. *Stroke*, 39: 943-950.
102. Valenzuela R, Tapia G, Gonzales M, Valenzuela A. 2011. Ácidos grasos ω -3 y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Rev chil nutr*, 38(3): 356-367.
103. Valenzuela BR, Barrera RC, Gonzales-Astorga M, Sanhueza CJ, Valenzuela BA. 2014. Alpha linolenic acid (ALA) from Rosa canica, sacha inchi and chia oils may increase ALA accretion and its conversion into n-3 LCPUFA in diverse tissues of rat. *Food Funct*. 5(7): 1564-1572.
104. Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH. 2009. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis*. 8:25.
105. Vincent HK. Taylor AG. 2006. Biomarkers and potential mechanisms of obesity- induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. 30 (3): 400-418.
106. Von Bernhardt R. 2007. La neuroinflamación en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. *Pontificia Universidad Católica de Chile*. 32(1): 4-15.
107. Von Diemen V, Trindade E, Trindade, M. 2006. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 21(6): 425-429
108. Wang CX, Shuaib A. 2002. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol*; 67(2): 161-72.
109. Williams L. 2011. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proceedings of the nutrition society*, 1-13
110. Wu A, Ying Z, Gomez F. 2004. Dietary ω -3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*, 21(10): 1457-67.
111. Zanzinger J. 2002. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain steam:role of oxidative stress. *Auton Neurosci*, 98(1-2): 24-7.

112. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. 2006. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 79(11): 1100-7.

ANEXOS

Anexo 1. Fórmula de la dieta consumida por las ratas del grupo obesas (CO)

Open formula purified diets for lab animals




Product Data - D12451

Report ▶ Repeat ▶ Revise

Description
Rodent Diet with 45% kcal% fat.

Used in Research
Fatty Liver
Inflammation
Obesity
Diabetes

Packaging
Product is packed in 12.5 kg box.
Each box is identified with the product name, description, lot number and expiration date.

Lead Time
IN-STOCK
Ready for next day shipment.

Gamma-Irradiation
Yes. Add 10 days to delivery time.

Form
Pellet, Powder, Liquid

Shelf Life
Most diets require storage in a cool dry environment. Stored correctly they should last 6 months.

Control Diets
D12450B, D12450H, D12450K

Fomula

Product #D12451	gm%	kcal%
Protein	24	20
Carbohydrate	41	35
Fat	24	45
Total		100
	kcal/gm	4.73
Ingredient	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	72.8	291
Maltodextrin 10	100	400
Sucrose	172.8	691
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	177.5	1598
Mineral Mix S10026	10	0
D-Calcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Red Dye #40	0.05	0
Total	858.15	4057

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.72 mg/gram.
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 127.8
Cholesterol (mg)/kg = 148.9

RESEARCH DIETS INC.
www.ResearchDiets.com
Where NutriPhenomics Begins

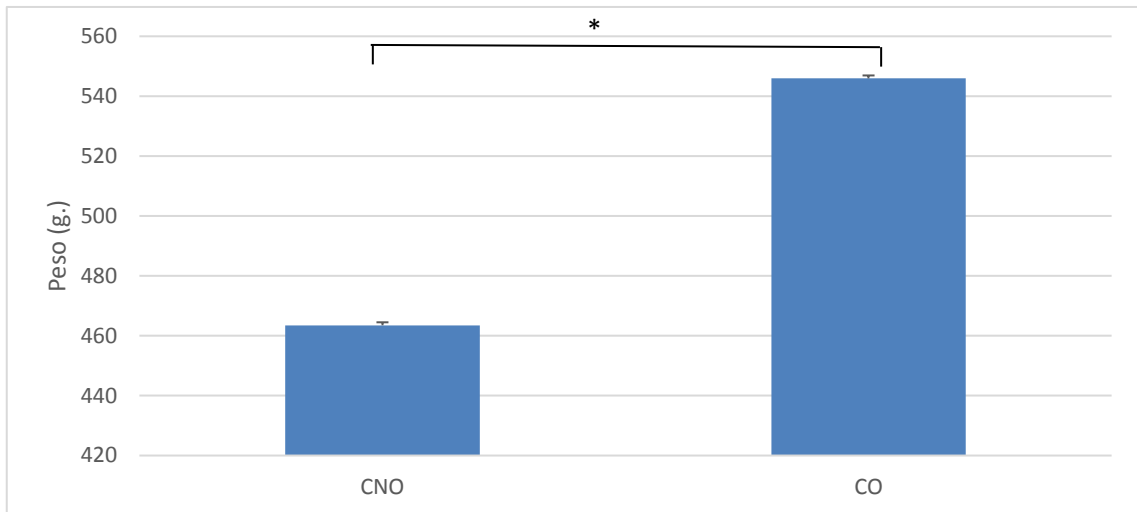
Research Diets, Inc.
20 Jules Lane
New Brunswick, NJ 08901 USA
Tel: 732.247.2300
Fax: 732.247.2340
info@researchdiets.com

© 2005 Research Diets, Inc. All rights reserved. D12451 - A12

Anexo 2. Ratas *Sprague Dawley* usadas en los grupos experimentales. CNO, ratas alimentadas con 10% de las Kcal provenientes de grasa; CO, ratas obesas alimentadas con 45% Kcal provenientes de grasa. (Ambulay J. 2015)

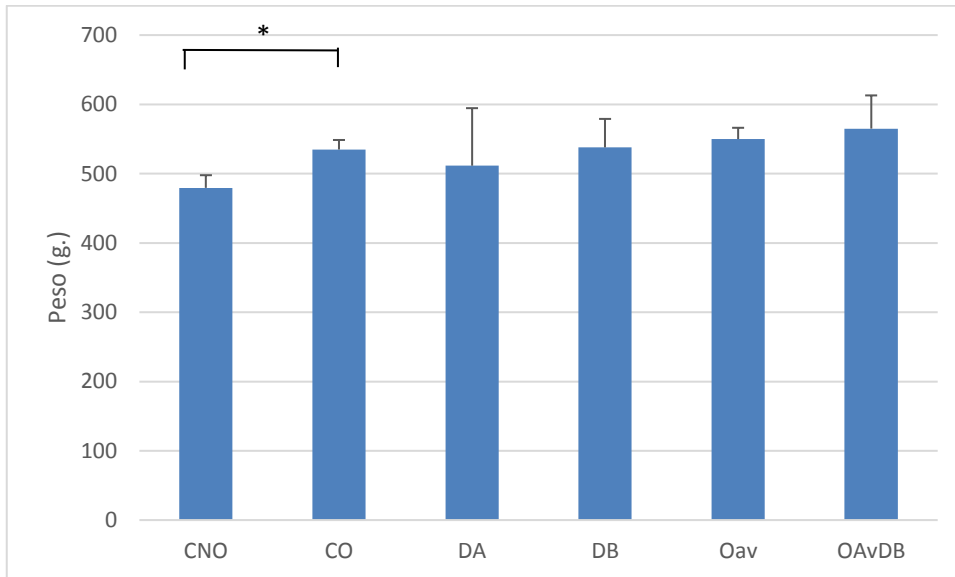


Anexo 3. Pesos iniciales del grupo de ratas no obesas (CNO) y con obesidad inducida (CO)



Valores promedio del peso corporal en los animales de experimentación luego de 16 semanas (peso inicial) de alimentación con una dieta estándar (control no obesas, CNO, n = 6) y con una dieta alta en grasa en el grupo de ratas propensas a la obesidad (Obesas, n = 31). (*p=0.02)



Anexo 4. Pesos finales del grupo de ratas inducidas a obesidad con diferentes tratamientos (DA, DB, Oav, OAvDB), control obeso (CO) y control no obesas (CNO)



Valores promedio del peso corporal en los animales de experimentación luego de 11 semanas (peso final) de alimentación con una dieta estándar (control no obesas, CNO, n = 6), ratas con obesidad inducida con una dieta alta en grasa (CO) y ratas con obesidad inducida con diferentes tratamientos (DA, DB, Oav, OAvDB) (*p=0.03)

Anexo 5. Fórmula de la dieta consumida por las ratas del grupo no obesas (CNO)

Open formula purified diets for lab animals

Product Data - D12450B

Report ▶ Repeat ▶ Revise

Description

Rodent Diet with 10% kcal% fat.

Used in Research

Obesity
Diabetes

Packaging

Product is packed in 12.5 kg box.
Each box is identified with the product name, description, lot number and expiration date.

Lead Time

IN-STOCK
Ready for next day shipment.

Gamma-Irradiation

Yes. Add 10 days to delivery time.

Form

Pellet, Powder, Liquid

Shelf Life

Most diets require storage in a cool dry environment. Stored correctly they should last 6 months.

Control Diets

Used as a control diet for D12451 and D12492

Sucrose Content

35% Sucrose
See D12450J, K, H for other options.

Fomula

Product #D12450B	gm%	kcal%
Protein	19.2	20
Carbohydrate	67.3	70
Fat	4.3	10
Total		100
	kcal/gm	3.85
Ingredient	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	315	1260
Maltodextrin 10	35	140
Sucrose	350	1400
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	20	180
Mineral Mix S10026	10	0
Dicalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0
Total	1055.05	4057

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.72 mg/gram.
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 54.4
Cholesterol (mg)/kg = 51.6

RESEARCH DIETS
www.ResearchDiets.com
Where NutriPhenomics Begins

Research Diets, Inc.
20 Jules Lane
New Brunswick, NJ 08901 USA
Tel: 732.247.2390
Fax: 732.247.2340
info@researchdiets.com

© 2006 Research Diets, Inc. All rights reserved. 200608A.2.10

Anexo 6. Composición de ácidos grasos de la emulsión LMH- E1410



Informe de Ensayo N° 48605

DATOS DEL CLIENTE

Solicitante	HERSIL S.A. LABORATORIOS INDUSTRIALES FARMACEUTICOS
Domicilio legal	Av. Los Frutales 220 Ate Vitarte
Contacto	Sr. Percy Rojas
Dirección de entrega	Av. Los Frutales 220 Ate Vitarte

DATOS DEL PRODUCTO

Producto	HIPOLIP OMEGA 3		
Ensayos realizados en	Av. La Marina 3035 San Miguel - Lima		
Fecha de recepción	2010.06.28	Fecha de inicio de análisis	2010.06.28
Referencia	Cot 26117	Fecha de término de análisis	2010.07.05
Procedencia	Muestra proporcionada por el Cliente		
Validez del documento	--	Custodia dirimencia	--

DATOS DE LA MUESTRA

Identificación	Cantidad	Descripción / Presentación	Precinto	FV	FP
E-03-10	250mL aprox.	01 frasco de vidrio ambar identificado	--	--	--

DATOS DEL SERVICIO

Identificación	Análisis	Unidad	Resultado
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Caproico C6:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Caprilico C8:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Caprico C10:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Undecanoico C11:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Laurico C12:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Tridecanoico C13:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Mirístico C14:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Miristoleico C14:1	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Pentadecanoico C15:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Pentadecenoico C15:1	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Palmítico C16:0	g/100g de grasa	5.23
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Palmitoleico C16:1	g/100g de grasa	0.09
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Heptadecanoico C17:0	g/100g de grasa	0.08
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Heptadecenoico C17:1	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Estearico C18:0	g/100g de grasa	1.91
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Oleico (Omega 9) C18:1	g/100g de grasa	9.71
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Linoleico (Omega 6) C:18:2	g/100g de grasa	26.69
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Gamma Linolenico (Omega 6) C18:3	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Linolenico (Omega 3) C18:3	g/100g de grasa	54.79
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Araquídico C20:0	g/100g de grasa	0.10
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Lignocérico C24:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Eicosenoico C20:1	g/100g de grasa	0.23
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Eicosadienoico C20:2	g/100g de grasa	0.04
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Eicosatrienoico (Omega 6) C20:3	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Eicosatrienoico (Omega 3) C20:3	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Eneicosanoico C21:0	g/100g de grasa	0

FOSFA
INTERNATIONAL
ANALYST MEMBER
SUPERINTENDENT MEMBER

Gaifa
ANALYST MEMBER
SUPERINTENDENT MEMBER

Informe de Ensayo N° 48605

Identificación	Análisis	Unidad	Resultado
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Behenico C22:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Eicosapentanoico (Omega 3) C20:5	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Erucico C22:1	g/100g de grasa	0.05
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Docosadienoico C22:2	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Tricosanoico C23:0	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Nervonico C24:1	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Acido Docosahexanoico (Omega 3) C22:6	g/100g de grasa	0
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Saturado	g/100g de grasa	7.32
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Monoinsaturado	g/100g de grasa	10.08
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) Poliinsaturado	g/100g de grasa	81.52
E-03-10	Acidos Grasos (Composición) No Identificados	g/100g de grasa	1.08

Para el análisis se ha considerado el dato de Grasa: 34.5 g/100g, proporcionado por el cliente

Métodos

Acidos Grasos (Composición): ISO 5508 (E)1990 Animal and Vegetable fats and oils-Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids
 ISO 5509-2000 Animal and vegetable fats and oils- Preparation of methyl esters of fatty acids.

 INTERNATIONAL ANALYTICAL SERVICES SAC
 

 Ing. Carmen Catter de Bueno
 Gerente General
 C.I.P. N° 6616

Lima, 6 de julio de 2010

Anexo 7. Formas líquidas y semisólidas de la dosis A



SP.06.05.00.05

NOMBRE Y PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO	Emulsión LMH-E1410 0.25g/2.5ml
N° DE LOTE (ENSAYO)	E-14-10
MOTIVO DEL ENSAYO	Producto Nuevo

PRUEBA	ESPECIFICACIONES			
	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO	NORMA
Granel				
Aspecto	Líquido denso color melon			Propia
pH	En estudio			Propia
Densidad	En estudio			Propia
Dosaje	0,243g	0.25g	0.258g	Propia
Dosaje (%)	97%	100%	103%	Propia
Envasado				
Aspecto	Líquido denso de color melon			Propia
Volumen/Peso	185,4ml	180ml	190.8 ml	Propia
Volumen/Peso (%)	103%	100%		Propia
Volumen/Peso de vaciado				Propia
Hermeticidad	Conforme			Propia
pH	En estudio			Propia
Densidad	1.12			Propia
Identidad	Positivo			Propia
Uniformidad de dosis	Conforme			Propia
Dosaje	0,243g	0.25g	0.258g	Propia
Dosaje (%)	97%	100%	103%	Propia
Otras especificaciones				
UNIDAD DE DOSIS:		2.5 ml	Cada unidad de dosis contiene:	Sobredosis:
DECLARADO :				
Omega 3			0.25g	0%
Excipientes Csp			2.5ml	

Dr. Jose Vera R.
Jefe de investigación y Desarrollo

Anexo 8. Formas líquidas y semisólidas de la dosis B




SP.06.05.00.05

NOMBRE Y PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO	Emulsión LMH-E1410 0.5g/2.5ml
N° DE LOTE (ENSAYO)	E-14-10
MOTIVO DEL ENSAYO	Producto Nuevo

PRUEBA	ESPECIFICACIONES			
	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO	NORMA
Granel				
Aspecto	Líquido denso color melon			Propia
pH	En estudio			Propia
Densidad	En estudio			Propia
Dosaje	0,485g	0.5g	0.515g	Propia
Dosaje (%)	97%	100%	103%	Propia
Envasado				
Aspecto	Líquido denso de color melon			Propia
Volumen/Peso	185,4ml	180ml	190.8 ml	Propia
Volumen/Peso (%)	103%	100%		Propia
Volumen/Peso de vaciado				Propia
Hermeticidad	Conforme			Propia
pH	En estudio			Propia
Densidad	1.12			Propia
Identidad	Positivo			Propia
Uniformidad de dosis	Conforme			Propia
Dosaje	0,485g	0.5g	0.515g	Propia
Dosaje (%)	97%	100%	103%	Propia
Otras especificaciones:				
UNIDAD DE DOSIS:		2.5 ml	Cada unidad de dosis contiene:	Sobredosis
DECLARADO :				
Omega 3				0%
Excipientes Csp				2.5ml

Dr- Jose Vera R.
Jefe de investigación y Desarrollo

Anexo 9. Aprobación del comité de ética para la realización de la tesis de pregrado

 UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

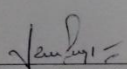
Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología - DUICT


**CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE INICIO DE EJECUCIÓN
DEL PROYECTO**

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales CIEA de la Universidad Peruana Cayetano Heredia certifica, que el Proyecto de Investigación, versión de fecha 18 de julio del 2014, titulado **"efecto neuroprotector de la emulsión LMH-E1410 en el cerebro de ratas obesas *Sprague Dawley*"** Código de inscripción 63234 presentado por la investigadora principal Srta. Carla Manrique Enciso; La aprobación en mención fue aprobada de manera expedita en fecha 02 de setiembre del 2014 y será ratificada en la próxima sesión del CIEA.

Esta aprobación tendrá **vigencia hasta el 01 de setiembre del 2015**. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 02 de setiembre del 2014


Dr. Roberto Valencia León
Presidente
Comité Institucional de Ética para
el uso de Animales - CIEA



CONS-CIEA-042-2014

/Tatiana

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31 / Apartado Postal 4314, Lima 100, Telefax: 482-4541
Teléfono: 319-0000 Anexo: 2271 / 2542
e-mail: duict@oficinas-upch.pe <http://www.upch.edu.pe/vrinve/duict/>

Anexo 10. Autorización de tesis por parte de Hersil



Lima, 26 de Mayo de 2014

Señorita
CARLA MANRIQUE ENCISO
UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

LIMA – PERÚ

Referencia : PROYECTO FINCYT "DESARROLLO DE UN PRODUCTO NATURAL DE UNA FUENTE VEGETAL NATIVA QUE CONTENGA ALTAS CONCENTRACIONES DE OMEGA 3 PARA EL TRATAMIENTO DE HIPERLIPIDEMIAS" RNR: N°046-FINCYT-PIEI"

Asunto : Compromiso de colaborar con el proyecto de tesis de pre-grado

De nuestra consideración:

Por intermedio del presente, en mi condición de Coordinador General del Proyecto en representación de Hersil S.A Laboratorios Industriales Farmacéuticos, expreso nuestra intención de apoyar y colaborar en la ejecución del proyecto de tesis de pre-grado de la Srta. Carla Manrique Enciso, cuyo financiamiento se logró a través del proyecto "Desarrollo de un producto natural de una fuente vegetal nativa que contenga altas concentraciones de omega 3 para el tratamiento de hiperlipidemias", presentado a la Unidad Coordinadora del Programa de Ciencia y Tecnología FINCYT por Hersil S.A

Atentamente,


HERSIL S.A.
LABORATORIOS INDUSTRIALES FARMACÉUTICOS
"PROYECTO OMEGA 3"
FINCYT
INVESTIGACIONES CUYANAS

HERSIL S.A. LABORATORIOS INDUSTRIALES FARMACÉUTICOS
DIRECCIÓN: AV. LOS FRUTALES N° 220 - ATE TELÉFONO: 713 3333 FAX 713 3366 FAX VENTAS: 435-8604
ATE, LIMA 3 - PERÚ E-MAIL: postmas@hersil.com.pe URL: <http://www.hersil.com.pe>

Anexo 11. Protocolo para el análisis de la citoquina IL-10



BD Biosciences

10975 Torreyana Road • San Diego, CA 92121-1111 • U.S.A.
Customer / Technical Services 877.232.8995

Instruction/ Analysis Certificate

BD OptEIA™ Set Rat IL-10

Former Catalog No. 2611KI

Lot Number: 08749

Catalog Number: 555134

1. **Capture Antibody: Anti-rat IL-10**

Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-26111E
Batch Number: 59139
Volume: 1.0 ml
Recommended Dilution: 1:250 dilution in Coating Buffer.

2. **Detection Antibody: Biotinylated Anti-rat IL-10**

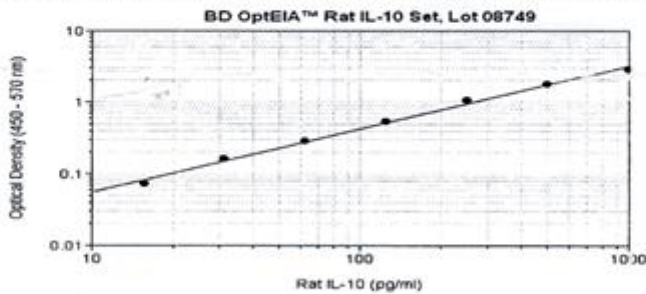
Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-26112E
Batch Number: 59140
Volume: 1.0 ml
Recommended Dilution: 1:250 dilution in Assay Diluent.


3. **Enzyme Reagent: Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate**

Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-9002813
Batch number: 59141
Volume: 1.0 ml
Recommended Dilution: 1:250 dilution in diluted Detection Antibody.

4. **Standards: Recombinant Rat IL-10**

Lyophilized, 1 vial
Catalog Number: 51-26116E
Batch Number: 60977
Quantity: 100 ng/vial
Reconstitute vial with 1.0 ml deionized water. See Technical Data Sheet for storage / handling instructions.




Rhodora E. Cueva
Quality Control Supervisor

March 14, 2011
Date

Recommended buffers, solutions

Note: Do not use sodium azide in these preparations. Sodium azide inactivates the horseradish peroxidase enzyme.

The BD OptEIA™ Reagent Set A (Cat. No. 550536) containing Coating Buffer, Assay Diluent, Substrate Reagents A and B, Stop Solution and 20X Wash Buffer Concentrate is recommended.

1. **Coating Buffer** - 0.2 M Sodium Phosphate, pH 6.5
11.8 g Na_2HPO_4 , 16.1 g NaH_2PO_4 q.s. to 1.0 L; pH to 6.5.
Freshly prepare or use within 7 days of preparation, stored at 2-8°C.
2. **Assay Diluent** - PBS* with 10% FBS*, pH 7.0. The BD Pharmingen™ Assay Diluent (Cat. No. 555213) is recommended.
*Phosphate-Buffered Saline: 80.0 g NaCl, 11.6 g Na_2HPO_4 , 2.0 g KH_2PO_4 , 2.0 g KCl, q.s. to 1.0 L; pH to 7.0.
*Fetal Bovine Serum: Hyclone Cat. No. SH30088 (heat-inactivated) recommended.
Freshly prepare or use within 3 days of preparation, with 2-8°C storage.
3. **Wash Buffer** - PBS* with 0.05% Tween-20. Freshly prepare or use within 3 days of preparation, stored at 2-8°C.
4. **Substrate Solution** - Tetramethylbenzidine (TMB) and Hydrogen Peroxide. The BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set (Cat. No. 555214) is recommended.
5. **Stop Solution** - 1 M H_3PO_4 or 2 N H_2SO_4

Additional Materials Required

1. 96-well BD Falcon™ ELISA plates (Cat. No. 353279) are recommended
2. Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm
3. Precision pipettes
4. Graduated cylinder, one liter
5. Deionized or distilled water
6. Wash bottle or automated washer
7. Log-log graph paper or automated data reduction
8. Tubes to prepare standard dilutions
9. Laboratory timer
10. Plate sealers or parafilm

Storage Information

1. Store unopened reagents at 2-8°C. Do not use reagents after expiration date, or if turbidity is evident.
2. Before use, bring all reagents to room temperature (18-25°C). Immediately after use, return to proper storage conditions.
3. Lyophilized standards are stable until expiration date. See below for reconstituted standard storage information.

Specimen Collection and Handling

Specimens should be clear, non-hemolyzed and non-lipemic.

Cell culture supernatants: Remove any particulate material by centrifugation and assay immediately or store samples at $\leq -20^\circ\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum: Use a serum separator tube and allow samples to clot for 30 minutes, then centrifuge for 10 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or store samples at $\leq -20^\circ\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma: Collect plasma using citrate, EDTA, or heparin as anticoagulant. Centrifuge for 10 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or store samples at $\leq -20^\circ\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Standards Preparation and Handling

1. **Reconstitution:** After warming lyophilized standard to room temperature, carefully open vial to avoid loss of material. Reconstitute lyophilized standard with 1.0 mL of deionized water to yield a stock standard. Allow the standard to equilibrate for at least 15 minutes before making dilutions. Vortex gently to mix.
2. **Storage/handling of reconstituted standard:** After reconstitution, immediately aliquot standard stock in polypropylene vials at 50 μl per vial and freeze at -80°C for up to 6 months. If necessary, store at 2-8°C for up to 8 hours prior to aliquotting/freezing. Do not leave reconstituted standard at room temperature.
3. **Standards Preparation for Assay:**
 - a. Prepare a 1000 pg/mL standard from the stock standard. Vortex to mix. (See dilution instructions on Instruction/Analysis Certificate.)
 - b. Add 300 μl Assay Diluent to 6 tubes. Label as 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.3 pg/mL, and 15.6 pg/mL.
 - c. Perform serial dilutions by adding 300 μl of each standard to the next tube and vortexing between each transfer. Assay Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).



Serial dilutions within the plate may also be performed by pipetting 100 μl of Assay Diluent into each standard well except the highest (1000 pg/mL), then adding 100 μl of the 1000 pg/mL standard to both that well and the 500 pg/mL well, mixing the well contents by rinsing the pipette tip, and adding 100 μl of the 500 pg/mL standard to the 250 pg/mL well. Continue these dilutions to the 15.6 pg/mL standard well, out of which the extra 100 μl should be discarded.

Working Detector Preparation

(Note: One-step incubation of Biotin/SAw reagents.) Add required volume of Detection Antibody to Assay Diluent. Within 15 minutes prior to use, add required quantity of Enzyme Reagent, vortex or mix well. For recommended dilutions, see lot-specific Instruction/Analysis Certificate. For a full 96-well plate, prepare 12 mL of Working Detector. Discard any remaining Working Detector after use.

Warnings and Precautions

1. Reagents which contain preservatives may be toxic if ingested, inhaled, or in contact with skin.
2. Handle all serum and plasma specimens in accordance with NCCLS guidelines for preventing transmission of blood-borne infections.
3. Capture Antibody contains $\leq 0.1\%$ sodium azide. Sodium azide yields highly toxic hydrazoic acid under acidic conditions. Dilute azide compounds in running water before discarding to avoid accumulation of potentially explosive deposits in plumbing.
4. Detection Antibody contains 1% BSA and ProClin™-150 as a preservative.
5. Enzyme Reagent contains 1% BSA and ProClin™-300 as preservative.
6. Source of all serum proteins is from USDA inspected abattoirs located in the United States.

Recommended Assay Procedure

1. Coat microwells with 100 μl per well of Capture Antibody diluted in Coating Buffer. For recommended antibody coating dilution, see lot-specific Instruction/Analysis Certificate. Seal plate and incubate overnight at 4°C.
2. Aspirate wells and wash 3 times with $\geq 300 \mu\text{l}$ /well Wash Buffer. Last wash, invert plate and blot on absorbent paper to remove any residual buffer.
3. Block plates with $\geq 200 \mu\text{l}$ /well Assay Diluent. Incubate at RT for 1 hour.
4. Aspirate/wash as in step 2.
5. Prepare standard and sample dilutions in Assay Diluent. See "Standards Preparation and Handling".
6. Pipette 100 μl of each standard, sample, and control into appropriate wells. Seal plate and incubate for 2 hours at RT.
7. Aspirate/wash as in step 2, but with 5 total washes.
8. Add 100 μl of Working Detector (Detection Antibody + SAw-HRP reagent) to each well. Seal plate and incubate for 1 hour at RT.
9. Aspirate/wash as in step 2, but with 7 total washes. NOTE: In the final wash step, soak wells in wash buffer for 30 seconds to 1 minute for each wash.
10. Add 100 μl of Substrate Solution to each well. Incubate plate (with our plate sealer) for 30 minutes at room temperature in the dark.
11. Add 50 μl of Stop Solution to each well.
12. Read absorbance at 450 nm within 30 minutes of stopping reaction. If wavelength correction is available, subtract absorbance at 570 nm from absorbance 450 nm.

Assay Procedure Summary

1. Add 100 μl diluted Capture Ab to each well. Incubate overnight at 4°C.
2. Aspirate and wash 3 times.
3. Block plates: 200 μl Assay Diluent to each well. Incubate 1 hr RT.
4. Aspirate and wash 3 times.
5. Add 100 μl standard or sample to each well. Incubate 2 hr RT.
6. Aspirate and wash 5 times.
7. Add 100 μl Working Detector (Detection Ab + SAw-HRP) to each well. Incubate 1 hr RT.
8. Aspirate and wash 7 times (with 30 sec to 1 min soaks)
9. Add 100 μl Substrate Solution to each well. Incubate 30 min RT in dark
10. Add 50 μl Stop Solution to each well. Read at 450 nm within 30 min with λ correction 570 nm.

Anexo 12. Protocolo para el análisis de la citoquina IL-4



BD Biosciences

10975 Torreyana Road • San Diego, CA 92121-1111 • U.S.A.
Customer / Technical Services 877.232.8995

Instruction/ Analysis Certificate

BD OptEIA™ Set Rat IL-4

Catalog Number: 555198

Former Catalog No. 2631KI

Lot Number: 75680

1. Capture Antibody: Anti-Rat IL-4

Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-26311E
Batch Number: 73293
Volume: 1.0 ml
Recommended Dilution: 1:250 dilution in Coating Buffer.

2. Detection Antibody: Biotinylated Anti-Rat IL-4

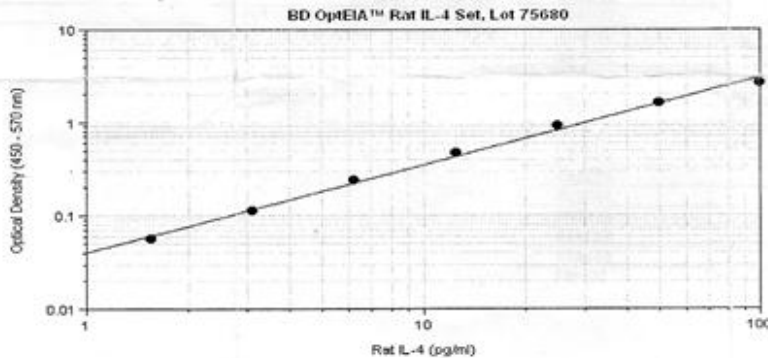
Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-26312E
Batch Number: 73294
Volume: 1.0 ml
Recommended Dilution: 1:250 dilution in Assay Diluent.


3. Enzyme Reagent: Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate

Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-9002813
Batch number: 73296
Volume: 1.0 ml
Recommended Dilution: 1:250 dilution in diluted Detection Antibody.

4. Standards: Recombinant Rat IL-4

Lyophilized, 1 vial
Catalog Number: 51-26316E
Batch Number: 73889
Quantity: 27 ng/vial
Reconstitute vial with 1.0 ml deionized water. See Technical Data Sheet for storage / handling instructions.




Rhodora E. Cueva
Quality Control Supervisor

May 28, 2010
Date

Recommended buffers, solutions

Note: Do not use sodium azide in these preparations. Sodium azide inactivates the horseradish peroxidase enzyme.

The BD OptEIA™ Reagent Set B (Cat. No. 550534) containing Coating Buffer, Assay Diluent, Substrate Reagents A and B, Stop Solution and 20X Wash Buffer Concentrate is recommended.

- Coating Buffer** - 0.1 M Sodium Carbonate, pH 9.5
7.13 g NaHCO₃, 1.59 g Na₂CO₃; q.s. to 1.0 L; pH to 9.5 with 10 N NaOH.
Freshly prepare or use within 7 days of preparation, stored at 2-8°C.
- Assay Diluent** - FBS* with 10% FBS†, pH 7.0. The BD Pharmingen™ Assay Diluent (Cat. No. 555213) is recommended. *Phosphate-Buffered Saline: 80.0 g NaCl, 11.6 g Na₂HPO₄, 2.0 g KH₂PO₄, 2.0 g KCl; q.s. to 10 L; pH to 7.0. †Fetal bovine serum: Hyclone Cat. No. SH30088 (heat-inactivated) recommended. Freshly prepare or use within 3 days of preparation, with 2-8°C storage.
- Wash Buffer** - PBS* with 0.05% Tween-20. Freshly prepare or use within 3 days of preparation, stored at 2-8°C.
- Substrate Solution** - Tetramethylbenzidine (TMB) and Hydrogen Peroxide. The BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set (Cat. No. 555214) is recommended.
- Stop Solution** - 1 M H₂SO₄ or 2 N H₂SO₄.

Additional Materials Required

- 96-well BD Falcon™ ELISA plates (Cat. No. 353279) are recommended.
- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm
- Precision pipettes
- Graduated cylinders, one liter
- Deionized or distilled water
- Wash bottle or automated washer
- Log-log graph paper or automated data reduction
- Tubes to prepare standard dilutions
- Laboratory timer
- Plate sealers or parafilm

Storage Information

- Store unopened reagents at 2-8°C. Do not use reagents after expiration date, or if turbidity is evident.
- Before use, bring all reagents to room temperature (18-25°C), immediately after use, return to proper storage conditions.
- Lysophilized standards are stable until expiration date. See below for reconstituted standard storage information.

Specimen Collection and Handling

Specimens should be clear, non-hemolyzed and non-lipemic.

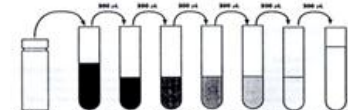
Cell culture supernatants: Remove any particulate material by centrifugation and assay immediately or store samples at 5 -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum: Use a serum separator tube and allow samples to clot for 30 minutes, then centrifuge for 10 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or store samples at 5 -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma: Collect plasma using citrate, EDTA, or heparin as anticoagulant. Centrifuge for 10 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or store samples at 5 -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Standards Preparation and Handling

- Reconstitution:** After warming lyophilized standard to room temperature, carefully open vial to avoid loss of material. Reconstitute lyophilized standard with 1.0 mL of deionized water to yield a stock standard. Allow the standard to equilibrate for at least 15 minutes before making dilutions. Vortex gently to mix.
- Storage/handling of reconstituted standard:** After reconstitution, immediately aliquot standard stock in polypropylene vials at 50 µL per vial and freeze at -80°C for up to 6 months. If necessary, store at 2-8°C for up to 8 hours prior to aliquotting/freezing. Do not leave reconstituted standard at room temperature.
- Standards Preparation for Assay:**
 - Prepare a 100 pg/mL standard from the stock standard. Vortex to mix. (See dilution instructions on Instruction/Analysis Certificate.)
 - Add 300 µL Assay Diluent to 6 tubes. Label as 50 pg/mL, 25 pg/mL, 12.5 pg/mL, 6.3 pg/mL, 3.1 pg/mL, and 1.6 pg/mL.
 - Perform serial dilutions by adding 300 µL of each standard to the next tube and vortexing between each transfer. Assay Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).



Serial dilutions within the plate may also be performed by pipetting 100 µL of Assay Diluent into each standard well except the highest (100 pg/mL), then adding 100 µL of the 100 pg/mL standard to both that well and the 50 pg/mL well, making the well contents by mixing the pipette tip, and adding 100 µL of the 50 pg/mL standard to the 25 pg/mL well. Continue these dilutions to the 1.6 pg/mL standard well, out of which the extra 100 µL should be discarded.

Working Detector Preparation

(Note: One-step incubation of Biotin/SAV reagents.) Add required volume of Detection Antibody to Assay Diluent. Within 15 minutes prior to use, add required quantity of Enzyme Reagent, vortex or mix well. For recommended dilutions, see lot-specific Instruction/Analysis Certificate. For a full 96-well plate, prepare 12 mL of Working Detector. Discard any remaining Working Detector after use.

Warnings and Precautions

- Reagents which contain preservatives may be toxic if ingested, inhaled, or in contact with skin.
- Handle all serum and plasma specimens in accordance with NCCLS guidelines for preventing transmission of blood-borne infections.
- Capture Antibody contains < 0.1% sodium azide. Sodium azide yields highly toxic hydrazic acid under acidic conditions. Dilute azide compounds in running water before discarding to avoid accumulation of potentially explosive deposits in plumbing.
- Detection Antibody contains 1% BSA and ProClin™-150 as a preservative.
- Enzyme Reagent contains 1% BSA and ProClin™-300 as preservative.
- Source of all serum proteins is from USDM inspected abattoirs located in the United States.

Recommended Assay Procedure

- Coat microwells with 100 µL per well of Capture Antibody diluted in Coating Buffer. For recommended antibody coating dilution, see lot-specific Instruction/Analysis Certificate. Seal plate and incubate overnight at 4°C.
- Aspirate wells and wash 3 times with ≥ 300 µL/well Wash Buffer. After last wash, invert plate and blot on absorbent paper to remove any residual buffer.
- Block plates with ≥ 200 µL/well Assay Diluent. Incubate at RT for 1 hour.
- Aspirate/wash as in step 2.
- Prepare standard and sample dilutions in Assay Diluent. See "Standards Preparation and Handling".
- Pipette 100 µL of each standard, sample, and control into appropriate wells. Seal plate and incubate for 2 hours at RT.
- Aspirate/wash as in step 2, but with 5 total washes.
- Add 100 µL of Working Detector (Detection Antibody + SAV-HRP reagent) to each well. Seal plate and incubate for 1 hour at RT.
- Aspirate/wash as in step 2, but with 5 total washes. NOTE: In this step wash step, soak wells in wash buffer for 30 seconds to 1 minute for each wash.
- Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Incubate plate (with-out plate sealer) for 30 minutes at room temperature in the dark.
- Add 50 µL of Stop Solution to each well.
- Read absorbance at 450 nm within 30 minutes of stopping reaction. If wavelength correction is available, subtract absorbance at 570 nm from absorbance 450 nm.

Assay Procedure Summary

- Add 100 µL diluted Capture Ab to each well. Incubate overnight at 4°C.
- Aspirate and wash 3 times.
- Block plates: 200 µL Assay Diluent to each well. Incubate 1 hr RT.
- Aspirate and wash 3 times.
- Add 100 µL standard or sample to each well. Incubate 2 hr RT.
- Aspirate and wash 5 times.
- Add 100 µL Working Detector (Detection Ab + SAV-HRP) to each well. Incubate 1 hr RT.
- Aspirate and wash 5 times (with 30 sec to 1 min soaks).
- Add 100 µL Substrate Solution to each well. Incubate 30 min RT in dark.
- Add 50 µL Stop Solution to each well. Read at 450 nm within 30 min with λ correction 570 nm.

Unless otherwise specified, all products are for Research Use Only. Not for use in diagnosis or therapeutic procedures. Not for resale.

For information about other BD OptEIA products, visit www.bdbiosciences.com/bd_opteia_aha

Anexo 13. Protocolo para el análisis de la citoquina TNF- α

BD OptEIA™

Technical Data Sheet Rat TNF ELISA Set

Product Information

Material Number:	558535
Size:	20 plates
Reactivity:	QC Testing: Rat
Component:	51-9004719
Description:	Capture Antibody Purified anti-Rat TNF
Storage Buffer:	Aqueous buffered solution containing $\leq 0.09\%$ sodium azide.
Component:	51-9004720
Description:	Detection Antibody Biotin anti-Rat TNF
Storage Buffer:	Aqueous buffered solution containing BSA and ProClin™ 150 as preservative.
Component:	51-26976E
Description:	Recombinant Rat TNF Lyophilized Standard
Storage Buffer:	Lyophilized in an aqueous buffered solution containing BSA and ProClin™ 150.
Component:	51-9004787
Description:	Enzyme Reagent Streptavidin-HRP (SAV-HRP) 250X
Storage Buffer:	Aqueous buffered solution containing BSA and ProClin™ 300 as preservative.

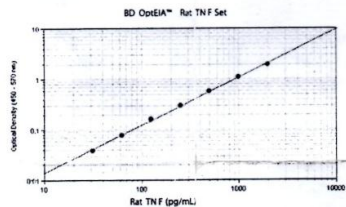
Description

The OptEIA™ Set for rat tumor necrosis factor (TNF) contains the components necessary to develop enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for natural or recombinant rat TNF in serum, plasma, and cell culture supernatants. Sufficient materials are provided to yield approximately 20 plates of 96-wells if the recommended storage, materials, buffer preparation, and assay procedure are followed as specified in this package.

Assay Optimization

BD OptEIA Sets allow flexible assay design to fit individual laboratory needs. To design an immunoassay with different sensitivity and dynamic range, the following parameters can be varied: Capture, Detection Antibody titers, Incubation time, Incubation temperature, Buffer pH, ionic strength, protein concentration, type of substrate, washing technique (i.e., number of wash repetitions and soak times).

Standardization: This immunoassay is calibrated against purified Baculovirus-expressed recombinant rat TNF during development of the product.



This standard curve is for demonstration only. A standard curve must be run with each assay. Typical Standard Curve and 20-plate yield were obtained in the BD Biosciences Pharmingen laboratory, using the recommended procedure and manual plate washing.

Preparation and Storage

Store unopened reagents at 2-8°C. Do not use reagents after expiration date, or if turbidity is evident. Before use, bring all reagents to room temperature (18-25°C). Immediately after use, return to proper storage conditions. Lyophilized standards are stable until expiration date. After reconstitution, immediately aliquot standard stock in polypropylene vials at 50 μ l per vial and freeze at -80°C for up to 6 months. If necessary, store at 2-8°C for up to 8 hours prior to aliquotting/freezing. Do not leave reconstituted standard at room temperature.

BD Biosciences

bdbiosciences.com
 United States 877.232.8995 Canada 888.259.0187 Europe 32.53.720.550 Japan 0120.8555.90 Asia Pacific 65.6861.0633 Latin America/Caribbean 55.11.5185.9995

For country-specific contact information, visit bdbiosciences.com/how_to_order/
 Conditions: The information disclosed herein is not to be construed as a recommendation to use the above product in violation of any patents. BD Biosciences will not be held responsible for patent infringement or other violations that may occur with the use of our products. Purchase does not include or carry any right to resell or transfer this product either as a stand-alone product or as a component of another product. Any use of this product other than the permitted use without the express written authorization of Becton Dickinson and Company is strictly prohibited.
 For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.
 BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. ©2008 BD



Standards Preparation and Handling

1. **Reconstitution:** After warming lyophilized standard to room temperature, carefully open vial to avoid loss of material. Reconstitute lyophilized standard with 1.0 mL of deionized water to yield a stock standard. Note the amount of protein indicated on the lyophilized standard vial and record the reconstituted standard concentration below for future use. Allow the standard to equilibrate for at least 15 minutes before making dilutions. Vortex gently to mix.
2. **Storage/handling of reconstituted standard:** After reconstitution, immediately aliquot standard stock in polypropylene vials labeled with the correct protein concentration at 50 μ L per vial and freeze at -80°C for up to 6 months. If necessary, store at -8°C for up to 8 hours prior to aliquoting/freezing. Do not leave reconstituted standard at room temperature.
3. **Standards Preparation for Assay:**
 - a. Prepare a 2000 pg/mL standard from the stock standard. Vortex to mix.
 - b. Add 300 μ L Assay Diluent to 6 tubes. Label as 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, and 31.3 pg/mL.
 - c. Perform serial dilutions by adding 300 μ L of each standard to the next tube and vortexing between each transfer. Assay Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).

Recommended Assay Procedure

1. Dilute the Capture Antibody 1:250 in Coating Buffer and coat micro-wells with 100 μ L of diluted Capture Antibody per well. Seal plate and incubate overnight at 4°C . Do not dilute more Capture Antibody than is needed for your experiment.
2. Aspirate wells and wash 5 times with ≥ 300 μ L/well Wash Buffer. After last wash, invert plate and blot on absorbent paper to remove any residual buffer.
3. Block plates with ≥ 200 μ L/well Assay Diluent. Incubate at RT for 1 hour.
4. Aspirate/wash as in step 2.
5. Prepare standard and sample dilutions in Assay Diluent. See "Standards Preparation and Handling". Be sure to record the reconstituted standard concentration for future use.
6. Pipette 100 μ L of each standard, sample, and control into appropriate wells. Seal plate and incubate for 2 hours at RT.
7. Aspirate/ wash as in step 2, but with 5 total washes.
8. Dilute the Detection Antibody 1:250 in Assay Diluent and add 100 μ L of diluted Detection Antibody to each well. Seal plate and incubate for 1 hour at RT. Do not dilute more Detection Antibody than is needed for your experiment.
9. Aspirate/ wash as in step 2, but with 5 total washes.
10. Dilute the Enzyme Reagent (SAV-HRP) 1:250 in Assay Diluent and add 100 μ L of diluted Enzyme Reagent to each well. Seal plate and incubate for 30 minutes at RT. Do not dilute more Enzyme Reagent than is needed for your experiment.
11. Aspirate/ wash as in step 2, but with 7 total washes. NOTE: In this final wash step, soak wells in wash buffer for 30 sec to 1 min for each wash.
12. Add 100 μ L of Substrate Solution to each well. Incubate plate (without plate sealer) for 30 minutes at room temperature in the dark.
13. Add 50 μ L of Stop Solution to each well.
14. Read absorbance at 450 nm within 30 minutes of stopping reaction. If wavelength correction is available, subtract absorbance at 570 nm from absorbance 450 nm.

Assay Procedure Summary

1. Add 100 μ L diluted Capture Ab to each well. Incubate overnight at 4°C .
2. Aspirate and wash 5 times.
3. Block plates: 200 μ L Assay Diluent to each well. incubate 1 hr RT
4. Aspirate and wash 5 times.
5. Add 100 μ L standard or sample to each well. Incubate 2 hr RT.
6. Aspirate and wash 5 times.
7. Add 100 μ L diluted Detection Ab to each well. Incubate 1 hr RT.
8. Aspirate and wash 5 times.
9. Add 100 μ L diluted SAV-HRP to each well. Incubate 30 min RT.
10. Aspirate and wash 7 times (with 30 sec to 1 min soaks).
11. Add 100 μ L TMB Substrate Solution to each well. Incubate 30 min RT in dark
12. Add 50 μ L Stop Solution to each well. Read at 450 nm within 30 min with λ correction 570 nm.

Calculation of Results

Calculate the mean absorbance for each set of duplicate standards, controls and samples. Subtract the mean zero standard absorbance from each. Plot the standard curve on log-log graph paper, with TNF concentration on the x-axis and absorbance on the y-axis. Draw the best fit curve through the standard points.

To determine the TNF concentration of the unknowns, find the unknown's mean absorbance value on the y-axis and draw a horizontal line to the standard curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the x-axis and read the TNF concentration. If samples were diluted, multiply the TNF concentration by the dilution factor.

Computer data reduction may also be employed, utilizing log-log regression analysis.

Specificity

Cross Reactivity: The following factors were tested in the BD OptEIA assay at ≥ 10 ng/mL and no cross-reactivity (value ≥ 15 pg/mL) was

Anexo 14. Protocolo para el análisis de la citoquina MCP-1



BD Biosciences

10975 Torreyana Road • San Diego, CA 92121-1111 • U.S.A.
Customer / Technical Services 877.232.8995

Instruction/ Analysis Certificate

BD OptEIA™ Set Rat MCP-1

Catalog Number: 555130

Former Catalog No. 2610KI

Lot Number: 89217

1. Capture Antibody: Anti-rat MCP-1

Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-26101E
Batch Number: 86149
Volume: 1.0 ml
Recommended Dilution: 1:250 dilution in Coating Buffer.

2. Detection Antibody: Biotinylated Anti-rat MCP-1

Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-26102E
Batch Number: 86150
Volume: 0.5 ml
Recommended Dilution: 1:500 dilution in Assay Diluent.

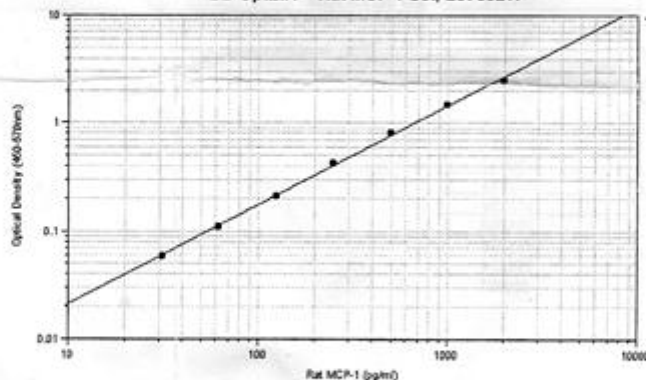
3. Enzyme Reagent: Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate


Liquid, 1 vial
Catalog Number: 51-9002813
Batch number: 86151
Volume: 1.0 ml
Recommended Dilution: 1:250 dilution in diluted Detection Antibody

4. Standards: Recombinant Rat MCP-1

Lyophilized, 1 vial
Catalog Number: 51-26106E
Batch Number: 87012
Quantity: 289 ng/vial
Reconstitute vial with 1.0 ml deionized water. See Technical Data Sheet for storage / handling instructions.

BD OptEIA™ Rat MCP-1 Set, Lot 89217




Rhodora E. Cueva
Quality Control Supervisor

November 3, 2010
Date

Recommended buffers, solutions

Note: Do not use sodium azide in these preparations. Sodium azide inactivates the horseradish peroxidase enzyme.

The BD OptEIA™ Reagent Set B (Cat. No. 550534) containing Coating Buffer, Assay Diluent, Substrate Reagents A and B, Stop Solution and 20X Wash Buffer Concentrate is recommended.

- Coating Buffer** - 0.1 M Sodium Carbonate, pH 9.5
7.13 g NaHCO₃, 1.59 g Na₂CO₃ q.s. to 1.0 L; pH to 9.5 with 10 N NaOH.
Freshly prepare or use within 7 days of preparation, stored at 2-8°C.
- Assay Diluent**- PBS* with 10% FBS†, pH 7.0. The BD Pharmingen™ Assay Diluent (Cat. No. 555213) is recommended. *Phosphate-buffered Saline: 80.0 g NaCl, 11.6 g Na₂HPO₄, 2.0 g KH₂PO₄, 2.0 g KCl, q.s. to 10 L; pH to 7.0. †Fetal Bovine Serum: Hyclone Cat. No. SH30088 (heat-inactivated) recommended. Freshly prepare or use within 3 days of preparation, with 2-8°C storage.
- Wash Buffer** - PBS* with 0.05% Tween-20. Freshly prepare or use within 3 days of preparation, stored at 2-8°C.
- Substrate Solution** - Tetramethylbenzidine (TMB) and Hydrogen Peroxide. The BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set (Cat. No. 555214) is recommended.
- Stop Solution** - 1 M H₃PO₄ or 2 N H₂SO₄.

Additional Materials Required

- 96-well BD Falcon™ ELISA plates (Cat. No. 353279) are recommended.
- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
- Precision pipettes.
- Graduated cylinder, one liter.
- Deionized or distilled water.
- Wash bottle or automated washer.
- Log-log graph paper or automated data reduction.
- Tubes to prepare standard dilutions.
- Laboratory timer.
- Plate sealers or parafilm.

Storage Information

- Store unopened reagents at 2-8°C. Do not use reagents after expiration date, or if turbidity is evident.
- Before use, bring all reagents to room temperature (18-25°C). Immediately after use, return to proper storage conditions.
- Lyophilized standards are stable until expiration date. See below for reconstituted standard storage information.

Specimen Collection and Handling

Specimens should be clear, non-hemolyzed and non-lipemic. Cell culture supernatants: Remove any particulate material by centrifugation and assay immediately or store samples at 5-20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

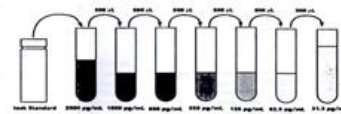
Serum: Use a serum separator tube and allow samples to clot for 30 minutes, then centrifuge for 10 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or store samples at 5-20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma: Collect plasma using citrate, EDTA, or heparin as anticoagulant. Centrifuge for 10 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or store samples at 5-20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Unless otherwise specified, all products are for Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.

Standards Preparation and Handling

- Reconstitution:** After warming lyophilized standard to room temperature, carefully open vial to avoid loss of material. Reconstitute lyophilized standard with 1.0 mL of deionized water to yield a stock standard. Allow the standard to equilibrate for at least 15 minutes before making dilutions. Vortex gently to mix.
- Storage/ handling of reconstituted standard:** After reconstitution, immediately aliquot standard stock in polypropylene vials at 50 µl per vial and freeze at -80°C for up to 6 months. If necessary, store at 2-8°C for up to 8 hours prior to aliquoting/freezing. Do not leave reconstituted standard at room temperature.
- Standards Preparation for Assay:**
 - Prepare a 2000 pg/mL standard from the stock standard. Vortex to mix. (See dilution instructions on Instruction/Analysis Certificate.)
 - Add 300 µl Assay Diluent to 6 tubes. Label as 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, and 31.3 pg/mL.
 - Perform serial dilutions by adding 300 µl of each standard to the next tube and vortexing between each transfer. Assay Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).



Serial dilutions within the plate may also be performed by pipetting 100 µl of Assay Diluent into each standard well except the highest (2000 pg/mL), then adding 100 µl of the 2000 pg/mL standard to both that well and the 1000 pg/mL well, mixing the well contents by raising the pipette tip, and adding 100 µl of the 1000 pg/mL standard to the 500 pg/mL well. Continue these dilutions to the 31.3 pg/mL standard well, out of which the extra 100 µl should be discarded.

Working Detector Preparation

(Note: One-step incubation of Biotin/SAv reagents.) Add required volume of Detection Antibody to Assay Diluent. Within 15 minutes prior to use, add required quantity of Enzyme Reagent, vortex or mix well. For recommended dilutions, see kit-specific Instruction/Analysis Certificate. For a full 96-well plate, prepare 12 mL of Working Detector. Discard any remaining Working Detector after use.

Warnings and Precautions

- Reagents which contain preservatives may be toxic if ingested, inhaled, or in contact with skin.
- Handle all serum and plasma specimens in accordance with NCCLS guidelines for preventing transmission of blood-borne infections.
- Capture Antibody contains < 0.1% sodium azide. Sodium azide yields highly toxic hydrazoic acid under acidic conditions. Dilute azide compounds in running water before discarding to avoid accumulation of potentially explosive deposits in plumbing.
- Detection Antibody contains 1% BSA and ProClin™-150 as a preservative.
- Enzyme Reagent contains 1% BSA and ProClin™-300 as preservative.
- Source of all serum proteins is from USDA inspected abattoirs located in the United States.

Recommended Assay Procedure

- Coat microwells with 100 µl per well of Capture Antibody diluted in Coating Buffer. For recommended antibody coating dilution, see kit-specific Instruction/Analysis Certificate. Seal plate and incubate overnight at 4°C.
- Aspirate wells and wash 3 times with ≥ 300 µl/well Wash Buffer. After last wash, invert plate and blot on absorbent paper to remove any residual buffer.
- Block plates with ≥ 200 µl/well Assay Diluent. Incubate at RT for 1 hour.
- Aspirate/wash as in step 2.
- Prepare standard and sample dilutions in Assay Diluent. See "Standards Preparation and Handling".
- Pipette 100 µl of each standard, sample, and control into appropriate wells. Seal plate and incubate for 2 hours at RT.
- Aspirate/wash as in step 2, but with 5 total washes.
- Add 100 µl of Working Detector (Detection Antibody + Streptavidin-HRP reagent) to each well. Seal plate and incubate for 1 hour at RT.
- Aspirate/wash as in step 2, but with 7 total washes. NOTE: In this final wash step, soak wells in wash buffer for 30 seconds to 1 minute for each wash.
- Add 100 µl of Substrate Solution to each well. Incubate plate (without plate sealer) for 30 minutes at room temperature in the dark.
- Add 50 µl of Stop Solution to each well.
- Read absorbance at 450 nm within 30 minutes of stopping reaction. If wavelength correction is available, subtract absorbance at 570 nm from absorbance 450 nm.

Assay Procedure Summary

- Add 100 µl diluted Capture Ab to each well. Incubate overnight at 4°C.
- Aspirate and wash 3 times.
- Block plates: 200 µl Assay Diluent to each well. Incubate 1 hr RT.
- Aspirate and wash 3 times.
- Add 100 µl standard or sample to each well. Incubate 2 hr RT.
- Aspirate and wash 5 times.
- Add 100 µl Working Detector (Detection Ab + Sav-HRP) to each well. Incubate 1 hr RT.
- Aspirate and wash 7 times (with 30 sec to 1 min soaks).
- Add 100 µl Substrate Solution to each well. Incubate 30 min RT in dark.
- Add 50 µl Stop Solution to each well. Read at 450 nm within 30 min with λ correction 570 nm.

For information about other BD OptEIA products, visit www.bdbiosciences.com/rd_opteia_plate

550535 Rev. 0