



**PROTECCIÓN FRENTE A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER
MEDIANTE LA ATENUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE MICROGLÍA
POR EL ACEITE DE ORUJO**

INFORME FINAL DE ACTIVIDADES

Dr. Javier Sánchez Perona

Dr. José María Castellano Orozco

Silvia García Rodríguez

Mirela Rada

Juan Manuel Espinosa



MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS





ANTECEDENTES

La microglía actúa como macrófagos residentes y desempeña un papel crucial en la mayoría de neuropatologías, incluida la Enfermedad de Alzheimer. Como resultado de la activación microglial, se produce la liberación de una gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios, mediados por alteraciones en el estado oxidativo del cerebro. Existe suficiente evidencia que indica que algunos de los componentes liposolubles del aceite de orujo podrían modular simultáneamente el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en la microglía a través de su transporte por el torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL). La modulación de esos fenómenos podría retrasar o ralentizar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer.

Hipótesis

Las TRL son capaces de activar la microglía y dar lugar a la liberación de sustancias proinflamatorias, pero dicha activación podría ser atenuada mediante la incorporación en esas partículas de componentes bioactivos del aceite de orujo: α -tocoferol, β -sitosterol y ácido oleanólico.

METODOS

Es estudio se llevó a cabo mediante experimentación *in vitro* en dos fases, empleando como modelo células de la microglía de ratón del tipo BV-2.

En una primera fase, dichas células fueron pre-incubadas durante 1h con los componentes bioactivos del aceite de orujo, α -tocoferol, β -sitosterol y ácido oleanólico, para evaluar su posible efecto protector frente a la activación por lipopolisacárido (LPS, 100 ng/mL). Las concentraciones a las que se realizaron los ensayos fueron las siguientes:

Acido oleanólico: 0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M.

α -Tocoferol: 0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M.



β -Sitosterol: 0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M.

Las dosis probadas se eligieron en base a diferentes estudios similares publicados anteriormente para esos mismos compuestos, aunque los tipos celulares fueran diferentes. Los compuestos se ensayaron de forma individual o bien constituyendo una mezcla a diferentes concentraciones.

Concentración A: Ácido oleanólico: 0,5 μ M, α -Tocoferol: 0,5 μ M y β -Sitosterol: 0,5 μ M.

Concentración B: Ácido oleanólico: 1 μ M, α -Tocoferol: 1 μ M y β -Sitosterol: 1 μ M.

Concentración C: Ácido oleanólico: 5 μ M, α -Tocoferol: 10 μ M y β -Sitosterol: 10 μ M.

Concentración D: Ácido oleanólico: 10 μ M, α -Tocoferol: 50 μ M y β -Sitosterol: 25 μ M.

Asimismo, se prepararon TRL libres o conteniendo α -tocoferol, β -sitosterol y ácido oleanólico a la concentración de 10 μ M, que es a la que se observó un mayor efecto protector. Las TRL así preparadas se incubaron con esas mismas células añadiéndolas en función de su concentración de triglicéridos (0.15 μ mol por mL de medio de cultivo).

Antes de probar la capacidad de atenuación de la actividad glial se determinó si los compuestos bioactivos del aceite de orujo ejercen algún tipo de toxicidad sobre las células a diferentes dosis. Para ello se empleó el método de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio), que mide la viabilidad celular. El método se aplicó a los tres compuestos por cuadruplicado.

Tanto en el caso de células estimuladas con LPS como con TRL, los tratamientos se mantuvieron durante 24h, al término de los cuales se tomaron muestras de las células y sus medios de cultivo para analizar la producción de citoquinas proinflamatorias mediante técnicas inmunológicas (ELISA).



RESULTADOS

1. Estudio de viabilidad celular

Como puede apreciarse en la Figura 1 (Anexo), **ninguno de los vehículos probados (DMSO y etanol), ejercían efecto citotóxico sobre las células BV-2**. En base a este resultado, se decidió emplear DMSO como vehículo. En todo caso, ambos vehículos incrementaban ligeramente la viabilidad celular, por encima del 100%, aunque de forma no significativa. En cuanto al ácido oleanólico, las tres concentraciones más bajas probadas (0,5 μM , 1 μM y 10 μM) ofrecieron una viabilidad celular por encima del 80%. Sin embargo, **a la concentración de 25 μM , la viabilidad era cercana al 50%**. Por este motivo, **esta dosis fue eliminada del ensayo y se incluyó una dosis intermedia de 5 μM** . El α -tocoferol no ejerció efecto citotóxico alguno a ninguna de las concentraciones probadas (Figura 2), quedando la viabilidad en todo caso por encima del 80%. De todos modos, a la concentración más elevada (50 μM) se encontró un determinado efecto protector, mostrando una viabilidad por encima del 100%. Finalmente, todas las concentraciones probadas de β -sitosterol dieron lugar a una viabilidad del 80% o superior (Figura 3). La concentración más baja (0,5 μM) produjo un efecto protector, aunque pensamos que no es significativo. En esta etapa no se ha realizado análisis estadístico, por no ser necesario. En cambio, las dos concentraciones más altas (10 μM y 25 μM), provocaron una muerte celular del 20%, quedando la viabilidad en el 80%, el mínimo aceptable.

2. Efecto protector tras estimulación con LPS

2.1. Producción de citoquinas



El pretratamiento de las células BV-2 con ácido oleanólico dio lugar a una reducción en la producción de las citoquinas proinflamatorias interleukina 1 β (IL-1 β) (Figura 4), interleukina-6 (IL-6) (Figura 8) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) derivada de la estimulación con LPS (Figura 12). La respuesta fue dosis dependiente en el caso de la IL-1 β y la IL-6, **mostrando un mayor efecto a la máxima concentración ensayada (10 μ M)**. En el caso del TNF- α , todas las concentraciones de ácido oleanólico redujeron la producción de esta citoquina de forma muy significativa.

La adición de α -tocoferol provocó un descenso en la producción de IL-1 β e IL-6, **también de forma dosis dependiente (Figuras 5 y 9)**. En este caso, se encontraron diferencias significativas a las concentraciones 1 μ M, 10 μ M y 50 μ M. Sin embargo, el α -tocoferol no consiguió reducir la liberación de TNF- α a ninguna de las concentraciones probadas (Figura 13). Por su parte, el β -sitosterol redujo los niveles de IL-1 β (Figura 6) y TNF- α (Figura 14), pero no los de IL-6, que se incrementó en la medida que se aumentaba la dosis en el cultivo (Figura 10), mostrando un efecto contrario al esperado.

Cuando estos compuestos fueron analizados de forma conjunta, se observó una **reducción significativa de IL-1 β a las concentraciones más altas y de IL-6 y TNF- α , a todas las concentraciones**. En todos los casos, las mezclas lograron una reducción de la menos el 50% de la producción de citoquinas, lo que muestra su capacidad aditiva, aunque probablemente no sinérgica.

2.2. Producción de especies reactivas de oxígeno

Las células BV-2 fueron estimuladas con LPS del mismo modo que en el experimento anterior, pero en este caso, además con peróxido de hidrógeno. La formación de ROS fue posteriormente determinada mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan como porcentaje respecto del control positivo (LPS). Los tratamientos con ácido oleanólico (Figura 13) y α -tocoferol (Figura 14) dieron lugar a una **reducción de la formación de ROS dosis dependiente**, que solo fue estadísticamente significativa a las concentraciones más altas: 10 μ M en el caso del ácido oleanólico y 50 μ M en el caso del α -tocoferol.



En cambio, **el β -sitosterol volvió a ejercer un efecto contrario**, ya que el efecto reductor de la liberación de ROS se perdía a medida que aumentaba la dosis en el cultivo (Figura 15). Al probar los compuestos bioactivos como parte de una mezcla, se encontró una **reducción significativa de las ROS solo a la concentración más elevada** y que no fue superior a la suma las reducciones provocadas por los compuestos individuales.

2.3. Glutation total

La adición de LPS al medio de cultivo de las células de microglía BV-2, dio lugar a una reducción del 100% del contenido intracelular de glutacion total, péptido de defensa antioxidante sistémico, respecto de las células no estimuladas (Figuras 20-23). En cambio, **el tratamiento de las células con los tres compuestos bioactivos estudiados consiguió restaurar los niveles de glutacion intracelular**. La concentración de 10 μ M de ácido oleanólico (Figura 20) y α -tocoferol (Figura 21) resultó ser la más efectiva. Esa misma concentración y la inmediatamente superior (25 μ M) fueron las que ejercieron un mayor efecto en las células tratadas con β -sitosterol (Figura 22). La mezcla de estos tres compuestos consiguió también restaurar los niveles intracelulares de ROS, incluso **por encima de los niveles de células no activadas con LPS** (Figura 23).

Dados los resultados observados, para los estudios con TRL se tomó la dosis de 10 μ M como la más efectiva para los tres compuestos bioactivos estudiados.

3. Efecto protector tras estimulación con TRL

3.1. Producción de citoquinas

La adición de TRL artificiales preparadas en el laboratorio al cultivo de células de microglía dio lugar a un **incremento en las concentraciones de citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α** (Figuras 24-26). El aumento fue inferior al observado tras la estimulación con LPS, pero significativo ($p < 0,05$) respecto del control negativo (solución salina) para las tres citoquinas, lo que **demuestra por primera vez que las**



TRL son capaces de activar la línea celular BV-2 de microglía murina, provocando un efecto proinflamatorio. Los compuestos probados provocaron una reducción de los niveles de IL-1 β en el cultivo, pero no fueron estadísticamente significativos, excepto para la mezcla de compuestos (Figura 24). La adición de α -tocoferol redujo significativamente la concentración de IL-6 en el medio de cultivo (Figura 25). En este último caso, no se encontró ningún efecto significativo de la mezcla de compuestos, probablemente debido a que de nuevo se observó un efecto contrario del β -sitosterol. Del mismo modo, la reducción provocada por el ácido oleanólico no fue significativa. Por el contrario, este compuesto redujo muy significativamente la liberación de TNF- α por las células, lo que redundó en un efecto muy importante en el mismo sentido de la mezcla de compuestos (Figura 27).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las pruebas de citotoxicidad permitieron conocer las dosis adecuadas a las que las células de la microglía BV-2 pueden ser tratadas con los compuestos bioactivos. Todas las dosis probadas resultaron no tóxicas o muy poco tóxicas para las células, excepto la concentración de 25 μ M del ácido oleanólico, por lo que esa dosis tuvo que ser sustituida por una inferior.

En los estudios de activación celular con LPS, se observó que los tres compuestos, **α -tocoferol, β -sitosterol y ácido oleanólico eran capaces de reducir la liberación de la citoquina proinflamatoria IL-1 β** por las células de forma dosis dependiente, siendo las concentraciones más altas (a partir de 10 μ M) las que ejercían un efecto más significativo. Del mismo modo, el tratamiento con **α -tocoferol y ácido oleanólico tuvo un efecto reductor de la producción de IL-6**, también de carácter inflamatorio. En cambio, el β -sitosterol tuvo un efecto distinto. A las concentraciones más bajas se observó una reducción en la liberación de IL-6, pero que se fue perdiendo en la medida que aumentaba la dosis de tratamiento. Este efecto podría deberse a un fenómeno de hormesis, aunque se requiere profundizar



más en su investigación para confirmarlo. El efecto de los compuestos sobre la TNF- α fue muy significativo cuando las células se trataron con ácido oleanólico, β -sitosterol y la mezcla de compuestos. **En definitiva, los datos obtenidos muestran que los compuestos minoritarios del aceite de orujo tienen una elevada capacidad atenuante de la respuesta inflamatoria en células de microglía de ratón cuando son activadas con LPS.**

La estimulación con LPS da lugar a un incremento en la producción de ROS. Se ha demostrado que estas especies reactivas pueden actuar como desencadenantes del proceso inflamatorio, ya que activan las rutas metabólicas asociadas. En nuestro estudio, comprobamos que todos compuestos bioactivos del aceite de orujo tenían la capacidad de reducir la liberación de ROS, y de ahí, la reducción en la producción de las citoquinas inflamatorias. Probablemente, dicho efecto reductor de ROS se debía a la capacidad de estos compuestos bioactivos de restaurar los niveles de los sistemas de defensa antioxidante. De hecho, todos los compuestos ensayados consiguieron en una u otra medida incrementar los niveles de glutathione, uno de los principales péptidos de neutralización de especies reactivas tóxicas, como las ROS, y de mantenimiento del balance redox celular.

Es importante señalar que, por vez primera, se ha observado que **la adición de TRL artificiales da lugar a un incremento en las concentraciones de citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α** en células microgliales, lo que apoyaría nuestra hipótesis de que las TRL postprandiales participarían en el desarrollo de inflamación en el cerebro mediado por las células de microglía, que se registra en la enfermedad de Alzheimer. En este caso, los efectos de los compuestos bioactivos del aceite de orujo no fueron tan llamativos. Se produjeron reducciones en la liberación de estas sustancias, que en algunos casos no alcanzó significación estadística. Aún así, **el α -tocoferol redujo de forma muy importante la liberación de IL-6 y el ácido oleanólico la de TNF- α . Los compuestos añadidos conjuntamente, disminuyeron la producción de IL-1 β y TNF- α .**



CONCLUSION

La neuroinflamación y la activación microglial son marcadores patológicos de varias enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer. Como consecuencia de la activación crónica de las células microgliales, se produce la liberación inducida de ROS y citoquinas pro-inflamatorias.

El presente estudio se planteó con dos objetivos. En primer lugar, estudiar si las TRL, partículas transportadoras de sustancias de tipo liposoluble en el torrente sanguíneo en el periodo postprandial, tenían la capacidad de producir la activación de las células de microglía e inducir la liberación de ROS y citoquinas, dando lugar a un proceso inflamatorio. En segundo lugar, demostrar que los compuestos minoritarios, pero con alta actividad biológica, que pueden estar presentes en el aceite de orujo, como son ácido oleanólico, α -tocoferol y β -sitosterol pueden atenuar la activación microglial, al reducir la producción de ROS y la liberación de citokinas.

Los resultados obtenidos han confirmado la doble hipótesis. Por un lado, las partículas de TRL activaron las celular microgliales BV-2 hasta un 100% por encima de las condiciones basales. Por otro lado, cuando las TRL contenían los compuestos bioactivos del aceite de orujo, y en especial α -tocoferol y ácido oleanólico, se produce una atenuación de la activación, que se manifestó por una reducción en la producción de citoquinas por las células. Esta reducción se asoció con la menor producción de ROS y los mayores niveles de glutathione.

Por tanto, nuestros resultados sugieren que los compuestos bioactivos del aceite de orujo podrían tener un efecto protector frente a la Enfermedad de Alzheimer mediante la atenuación de la activación de la microglía. En cualquier caso, es imprescindible llevar a cabo un estudio clínico para poder determinar si los efectos observados son replicables en humanos.

Sevilla, a 10 de septiembre de 2018



MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Fdo. Javier Sánchez Perona

Científico Titular del CSIC

ANEXO 1: FIGURAS

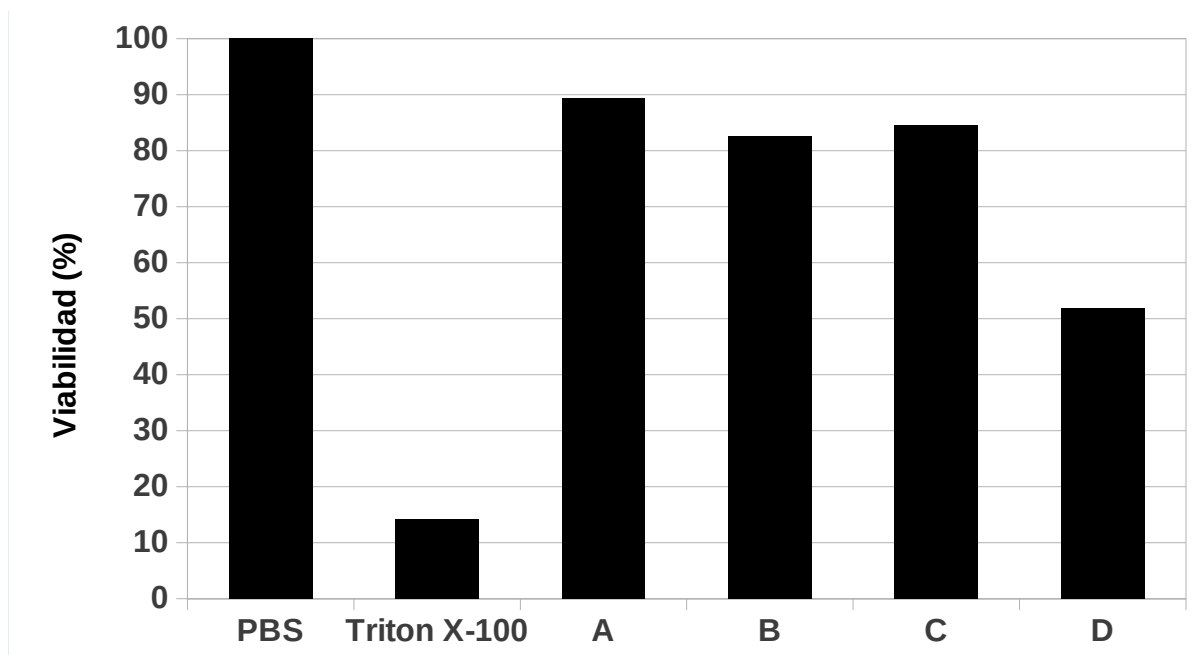


Figura 1. Viabilidad de células BV-2 tras ser tratadas con PBS (control), Triton X-100 (control negativo) y diversas concentraciones de ácido oleanólico. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M.

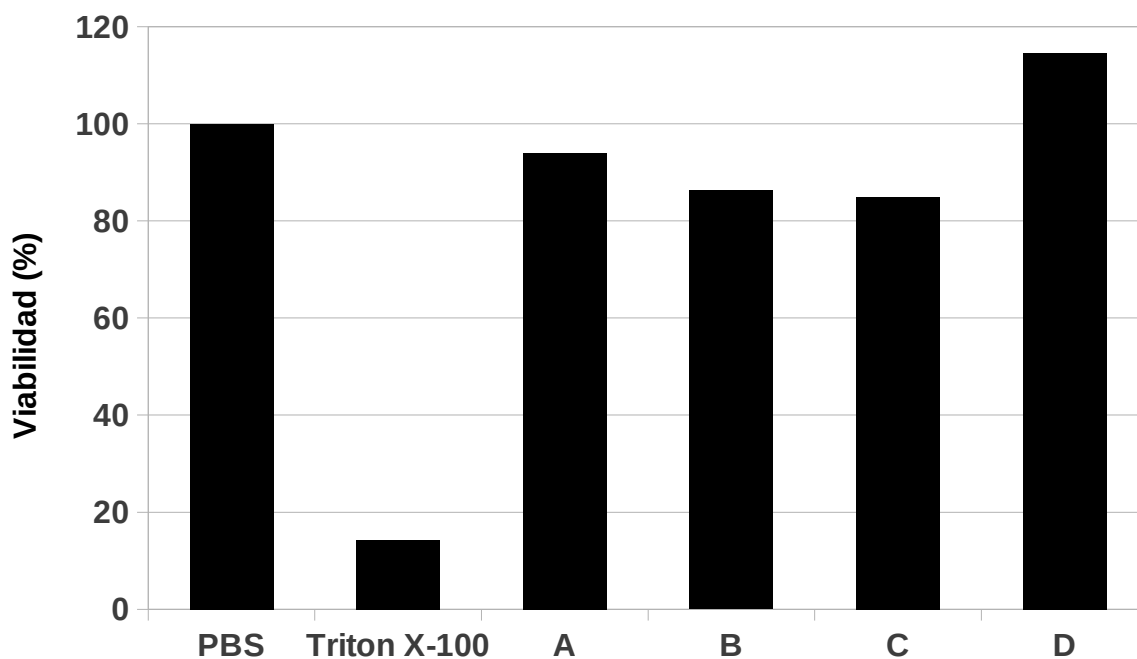


Figura 2. Viabilidad de células BV-2 tras ser tratadas con PBS (control), Triton X-100 (control negativo) y diversas concentraciones de α -tocoferol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 50 μ M.

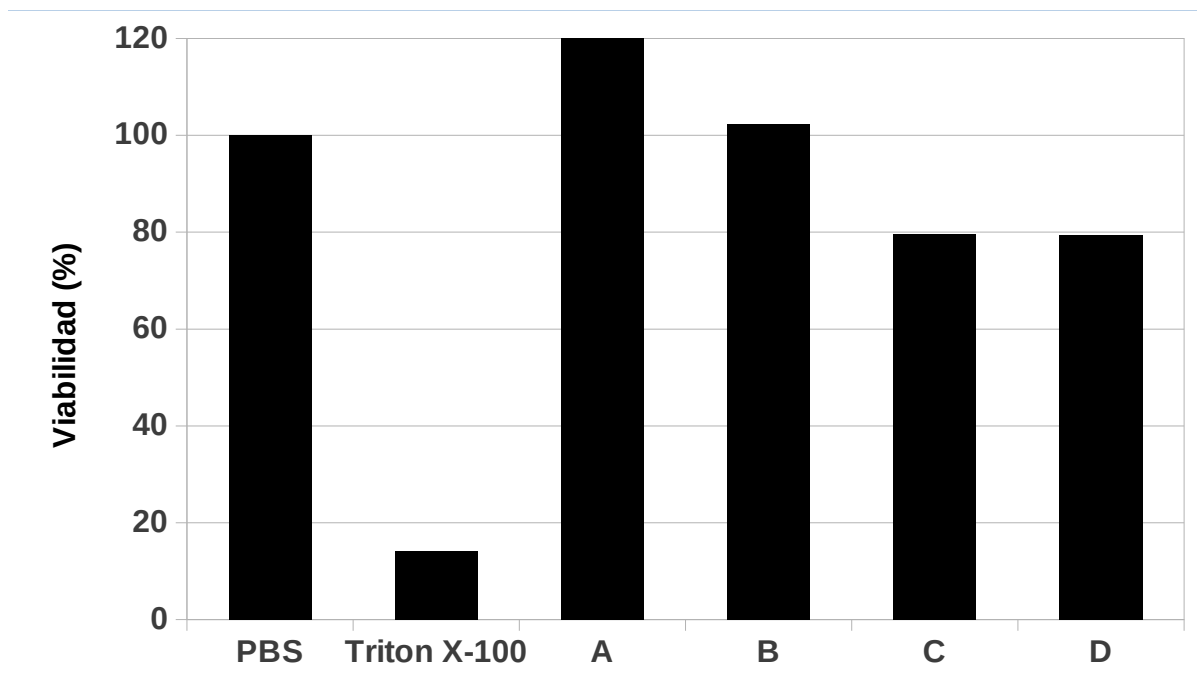


Figura 3. Viabilidad de células BV-2 tras ser tratadas con PBS (control), Triton X-100 (control negativo) y diversas concentraciones de β -sitosterol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M.

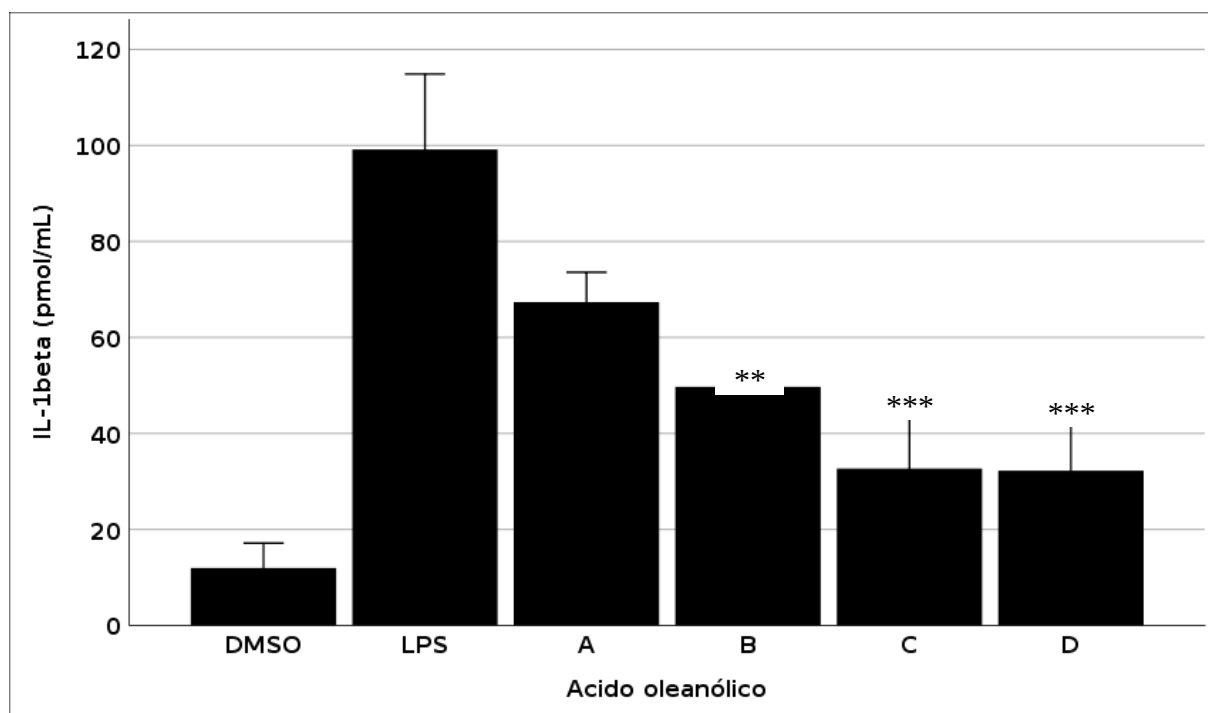


Figura 4. Concentración de IL-1 β en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de ácido oleanólico. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 5 μ M, D: 10 μ M. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

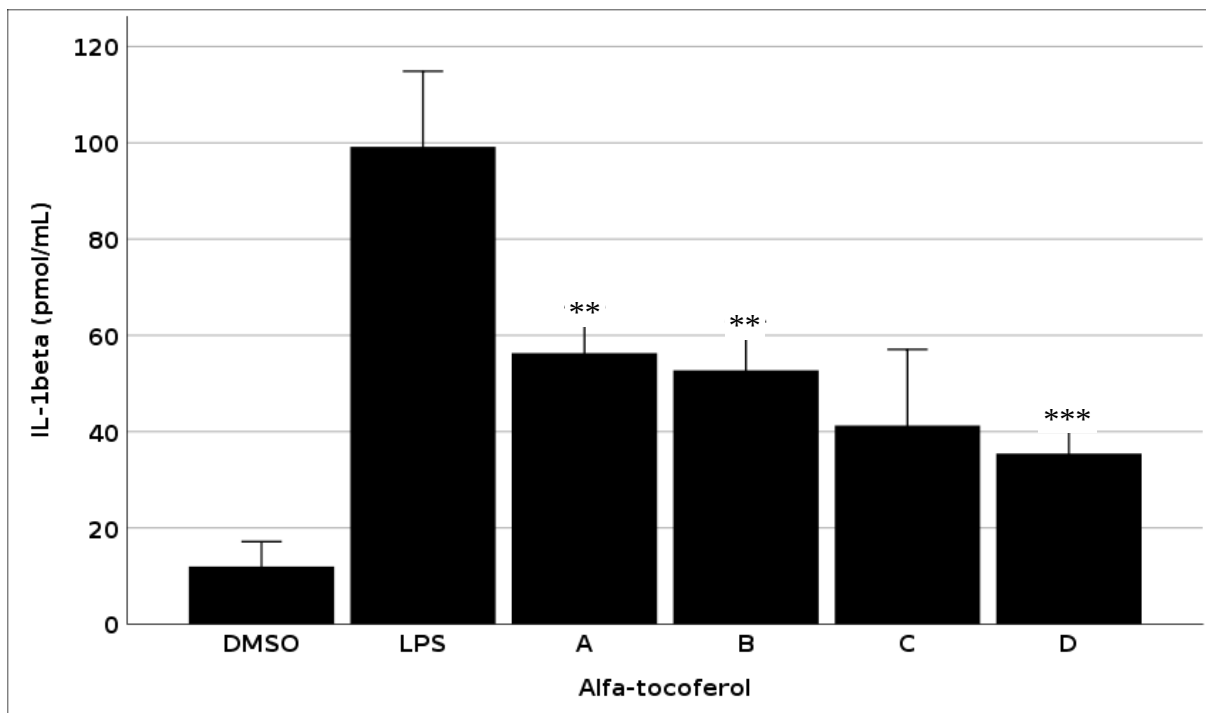


Figura 5. Concentración de IL-1 β en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de α -tocoferol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 50 μ M. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

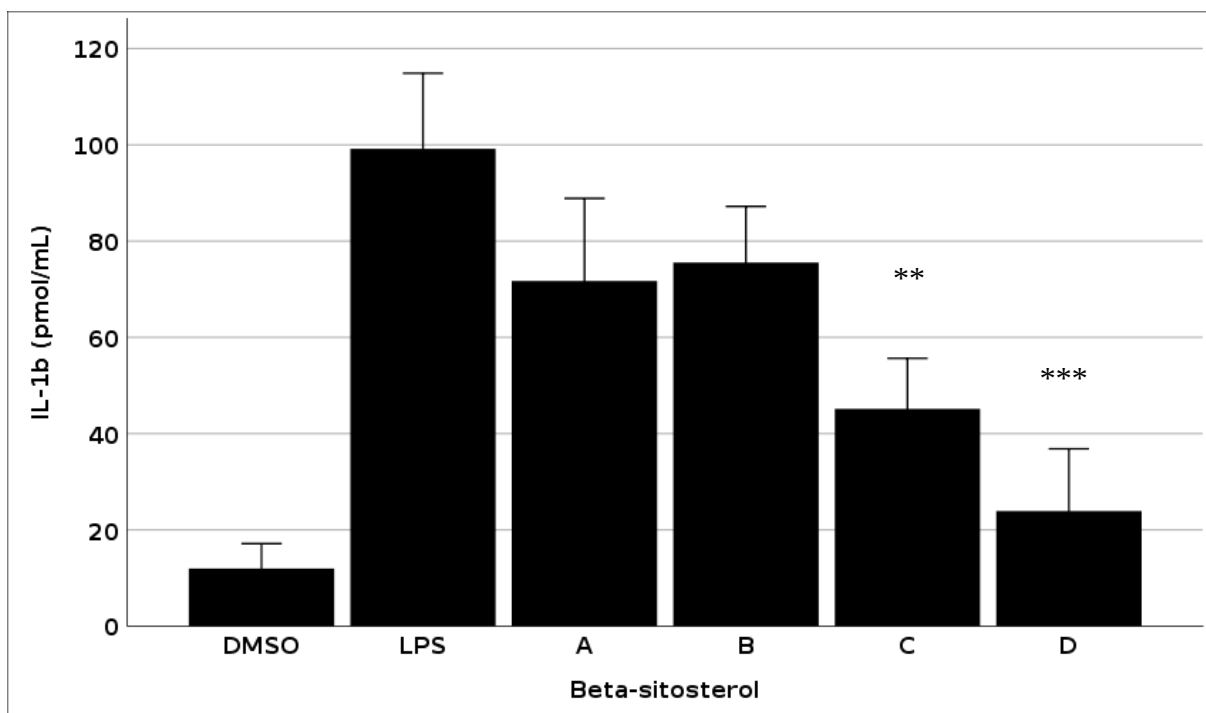


Figura 6. Concentración de IL-1 β en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de β -sitosterol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

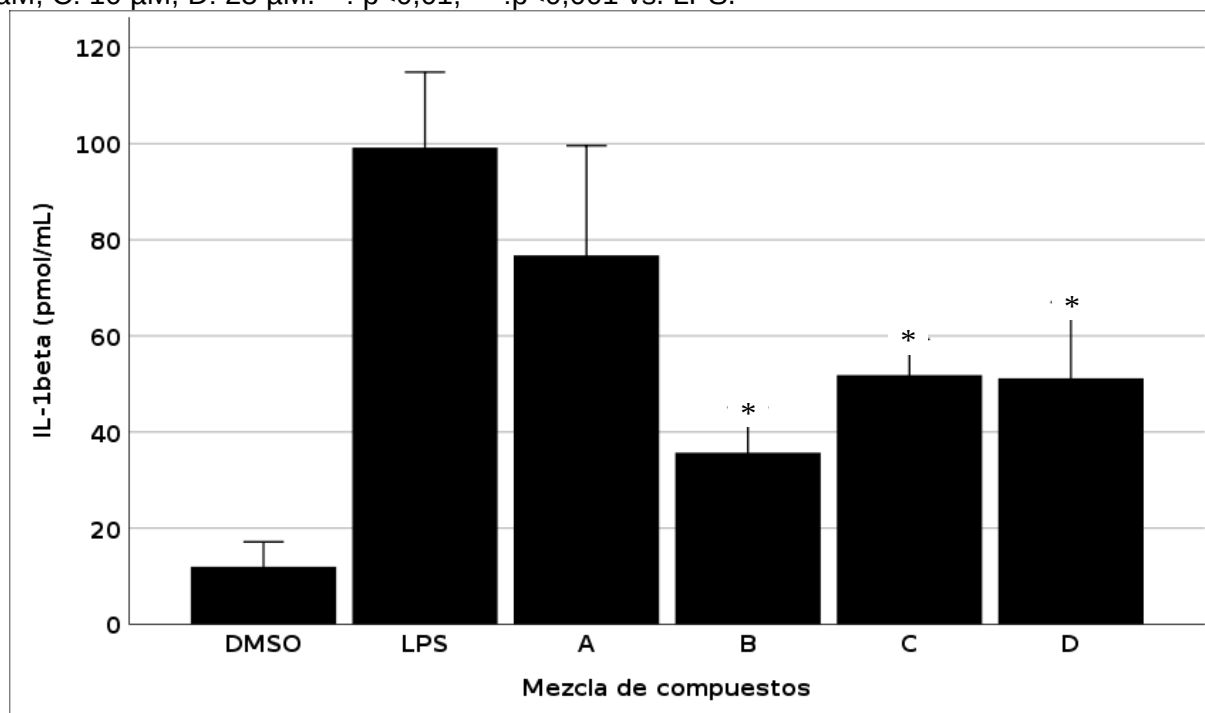


Figura 7. Concentración de IL-1 β en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones (ver métodos) de mezclas de ácido oleanólico, α -tocoferol y β -sitosterol. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

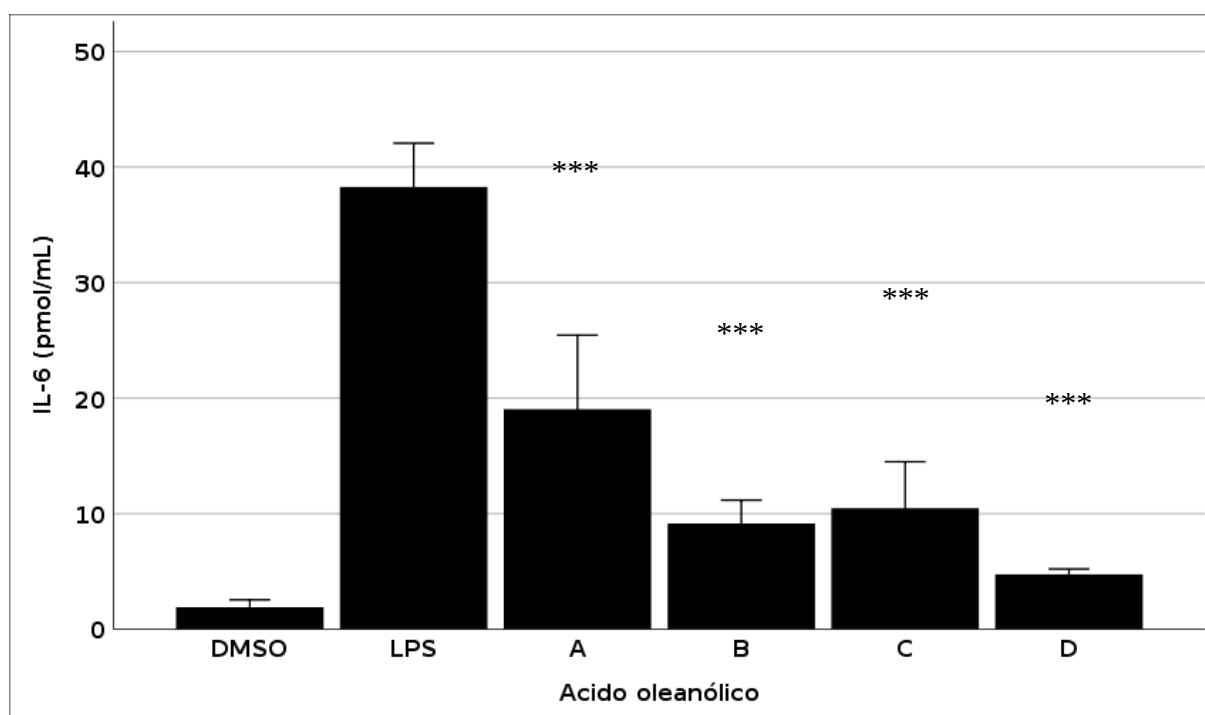


Figura 8. Concentración de IL-6 en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de ácido oleanólico. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 5 μ M, D: 10 μ M. ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

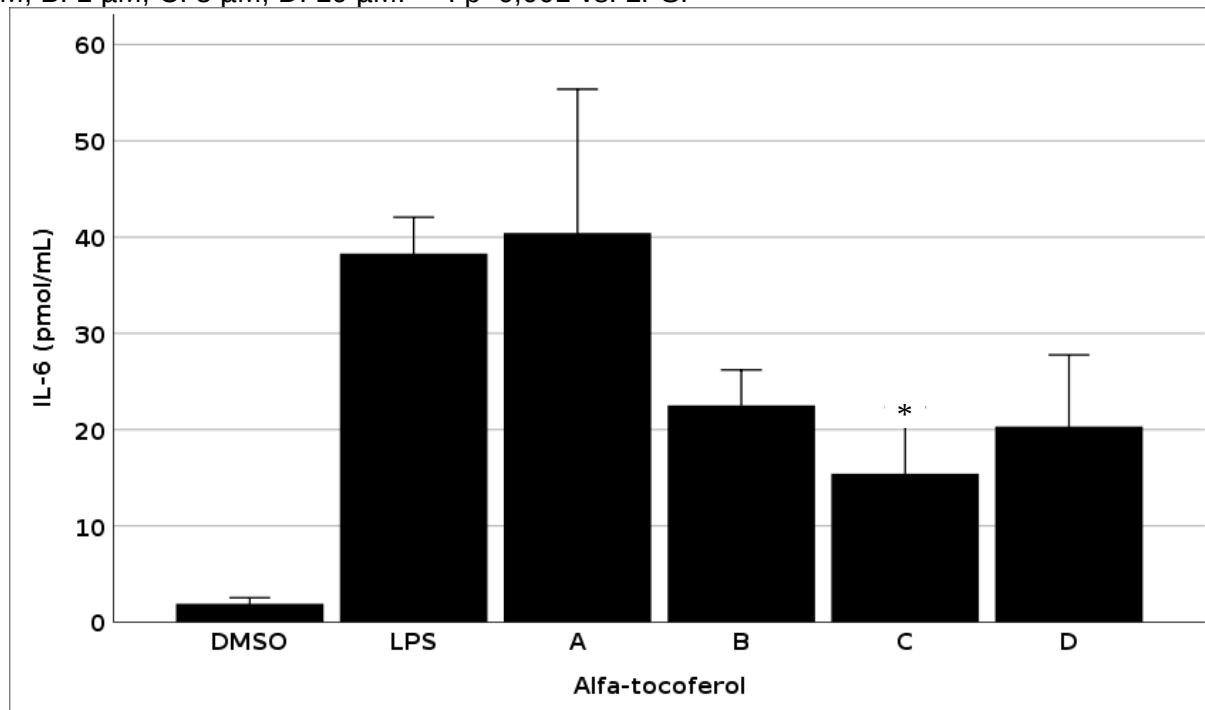


Figura 9. Concentración de IL-6 en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de α -tocoferol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 50 μ M. *: $p < 0,05$ vs. LPS.

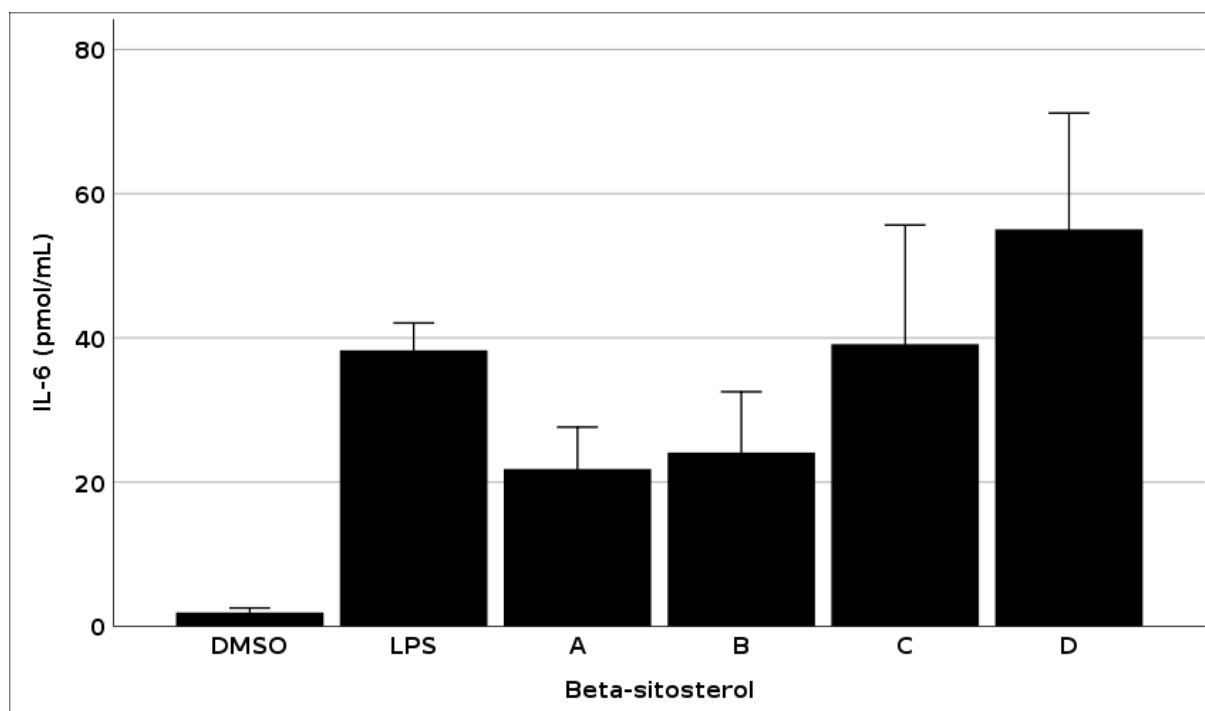


Figura 10. Concentración de IL-6 en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de β -sitosterol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M.

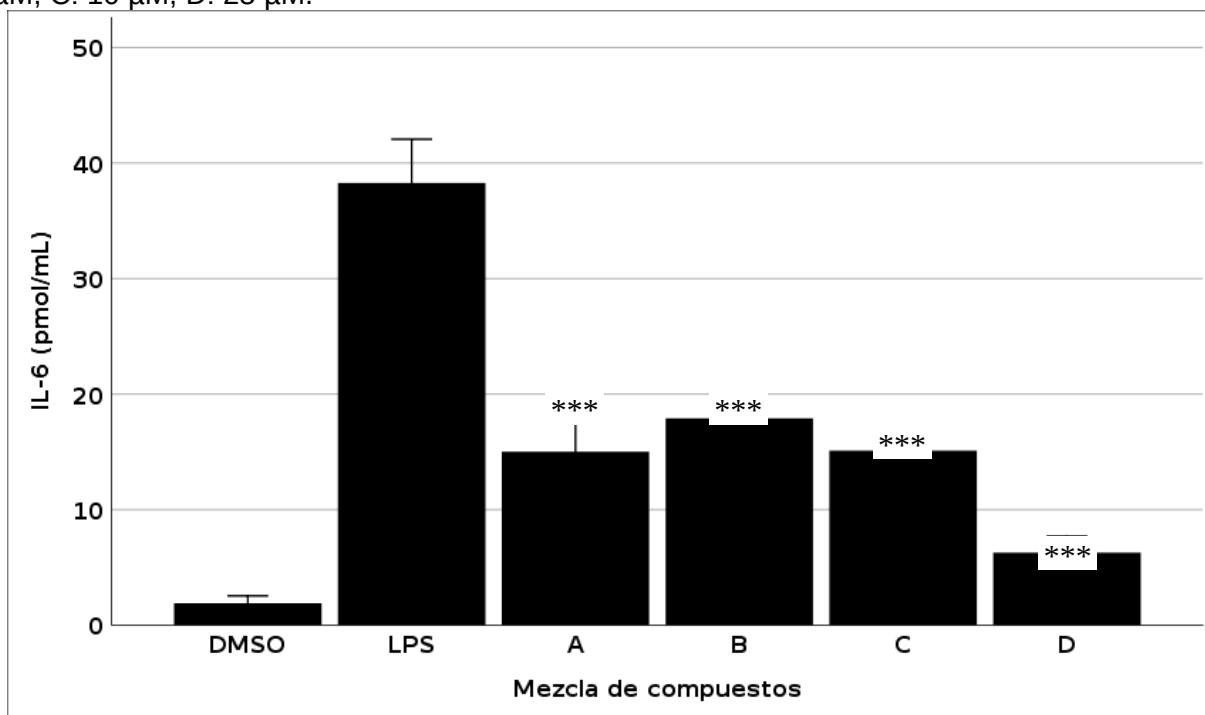


Figura 11. Concentración de IL-6 en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones (ver métodos) de mezclas de ácido oleanólico, α -tocoferol y β -sitosterol. ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

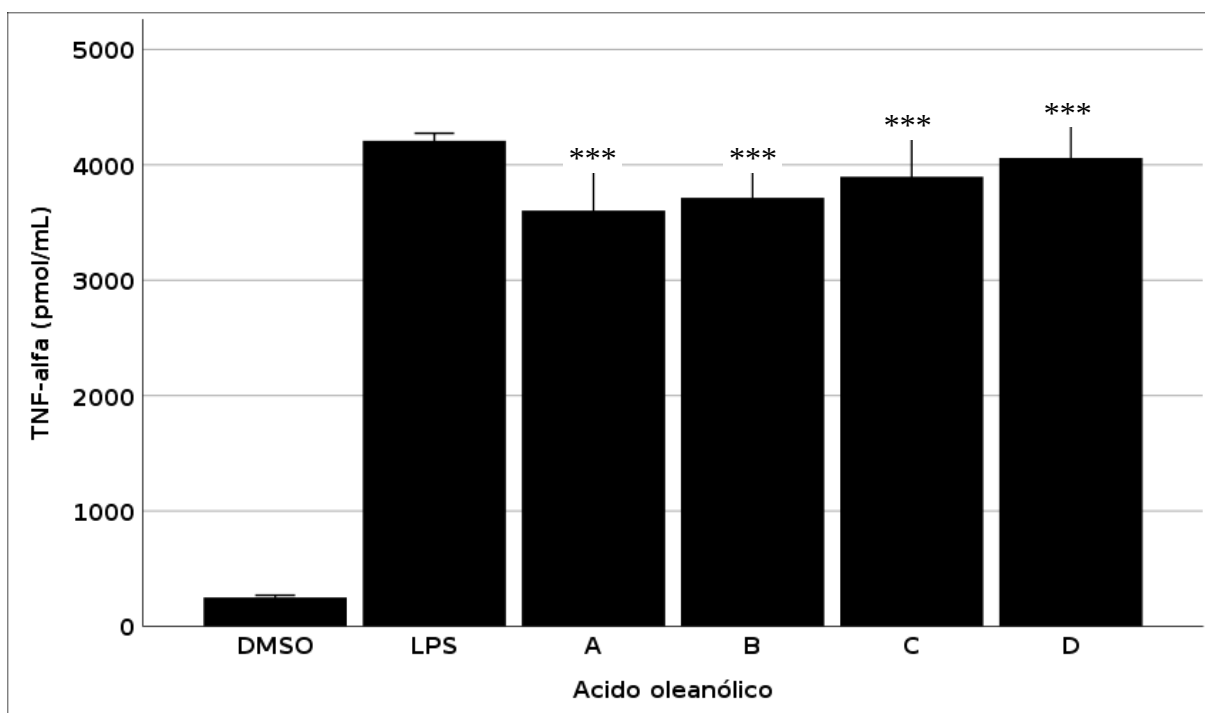


Figura 12. Concentración de TNF- α en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de ácido oleanólico. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 5 μ M, D: 10 μ M. ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

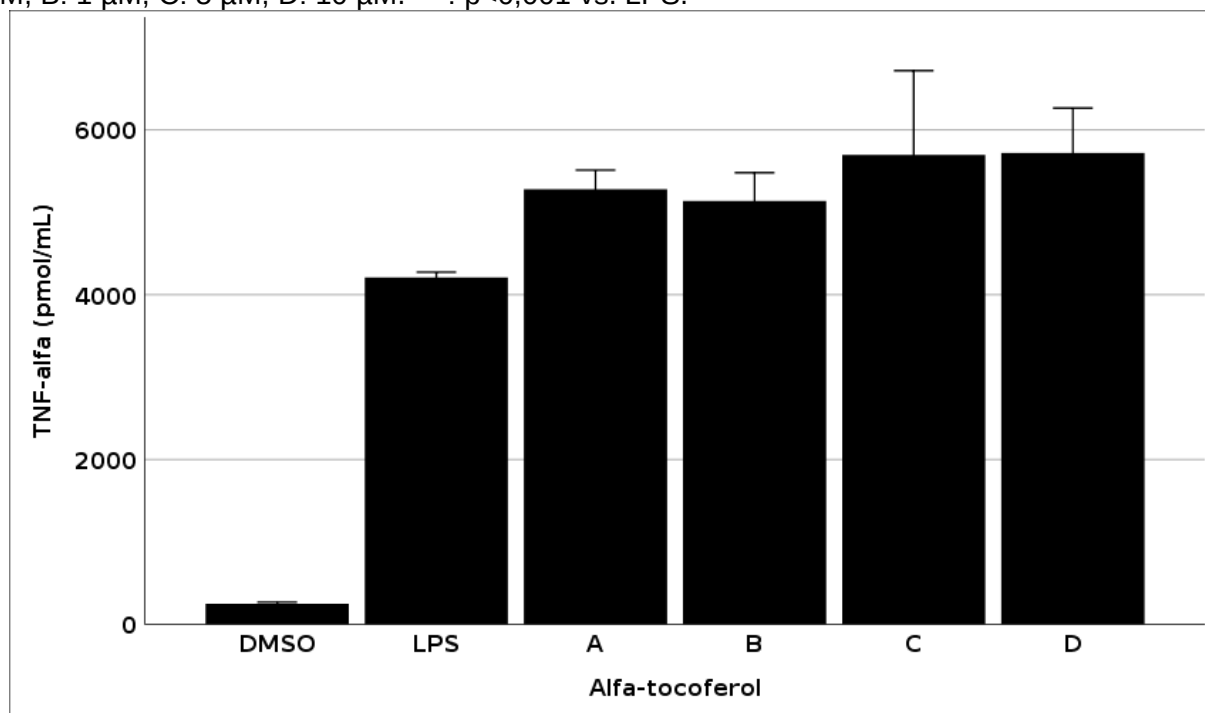


Figura 13. Concentración de TNF- α en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de α -tocoferol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 50 μ M. ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

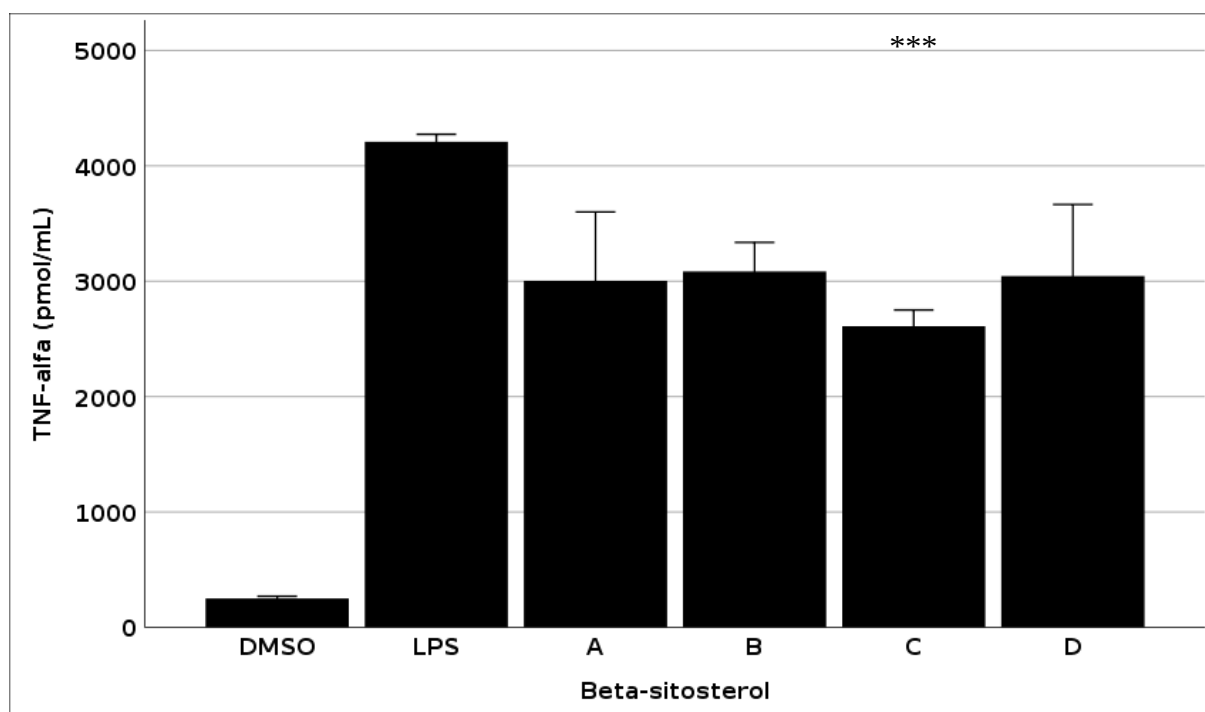


Figura 14. Concentración de TNF- α en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de β -sitosterol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M. ***: $p < 0,001$ vs. LPS.

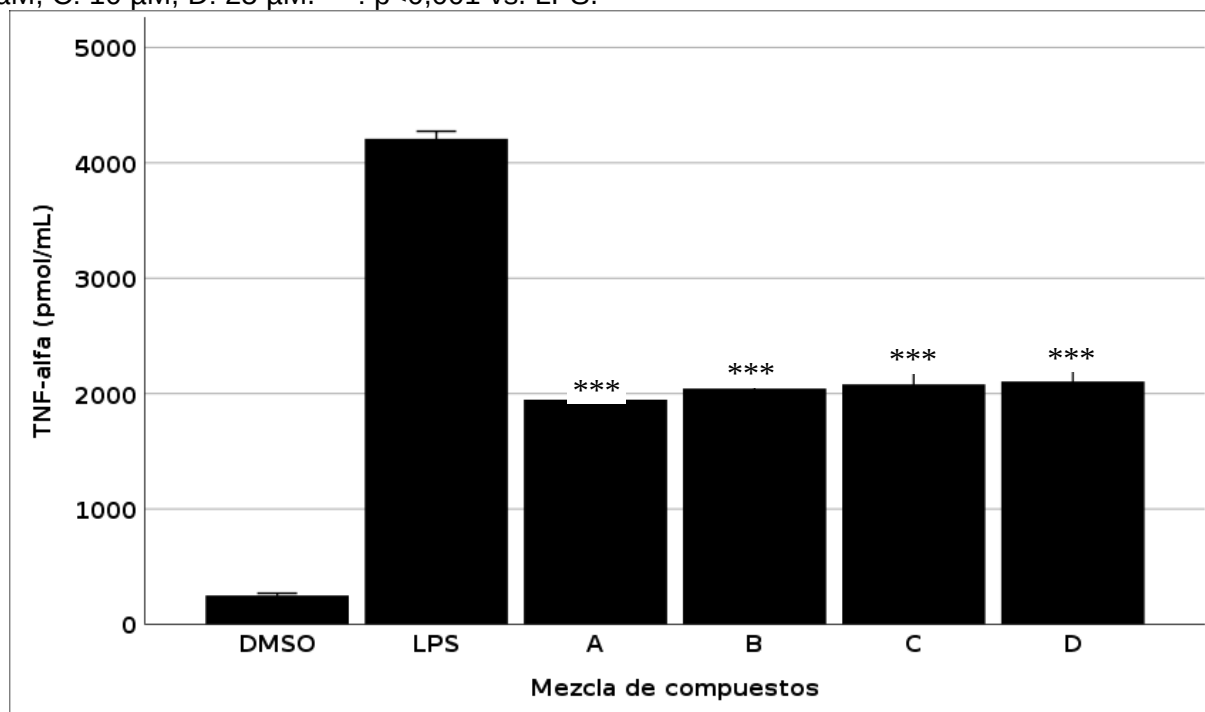
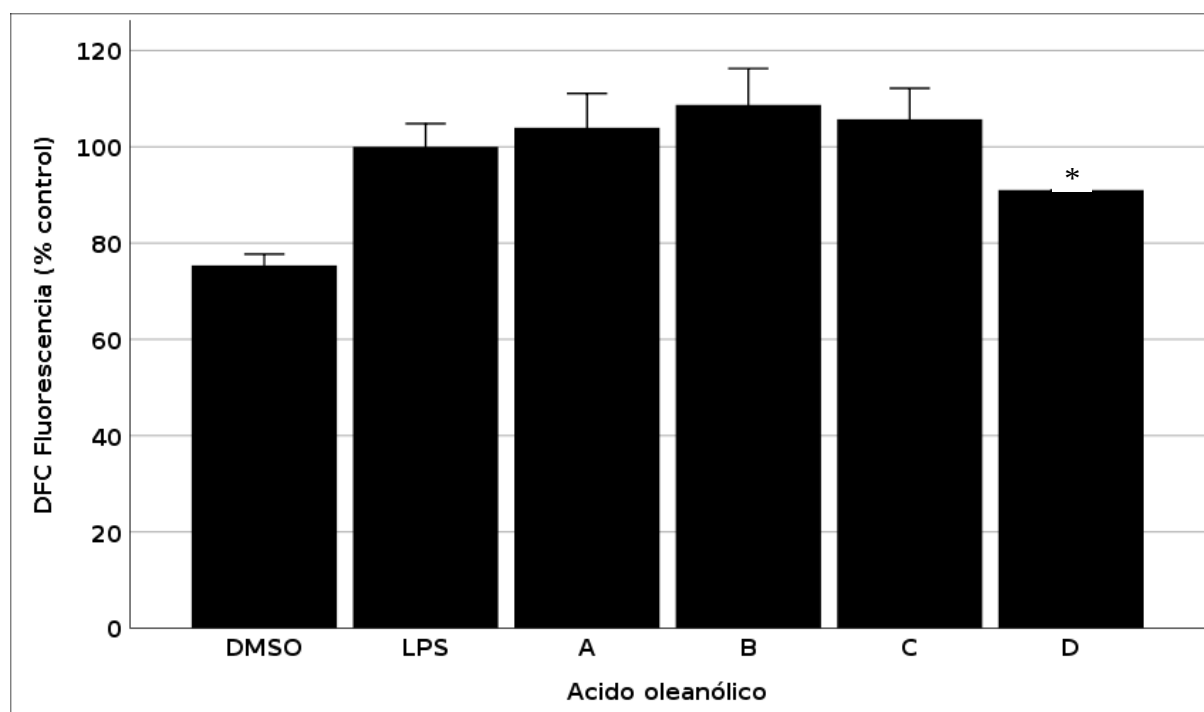


Figura 15. Concentración de TNF- α en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones (ver métodos) de mezclas de ácido oleanólico, α -tocoferol y β -sitosterol. ***: $p < 0,001$ vs. LPS.



Olvide



Figura 16. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de ácido oleanólico. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M. Datos expresados como porcentaje de fluorescencia emitida respecto del control positivo. *: $p < 0,05$ vs. LPS.

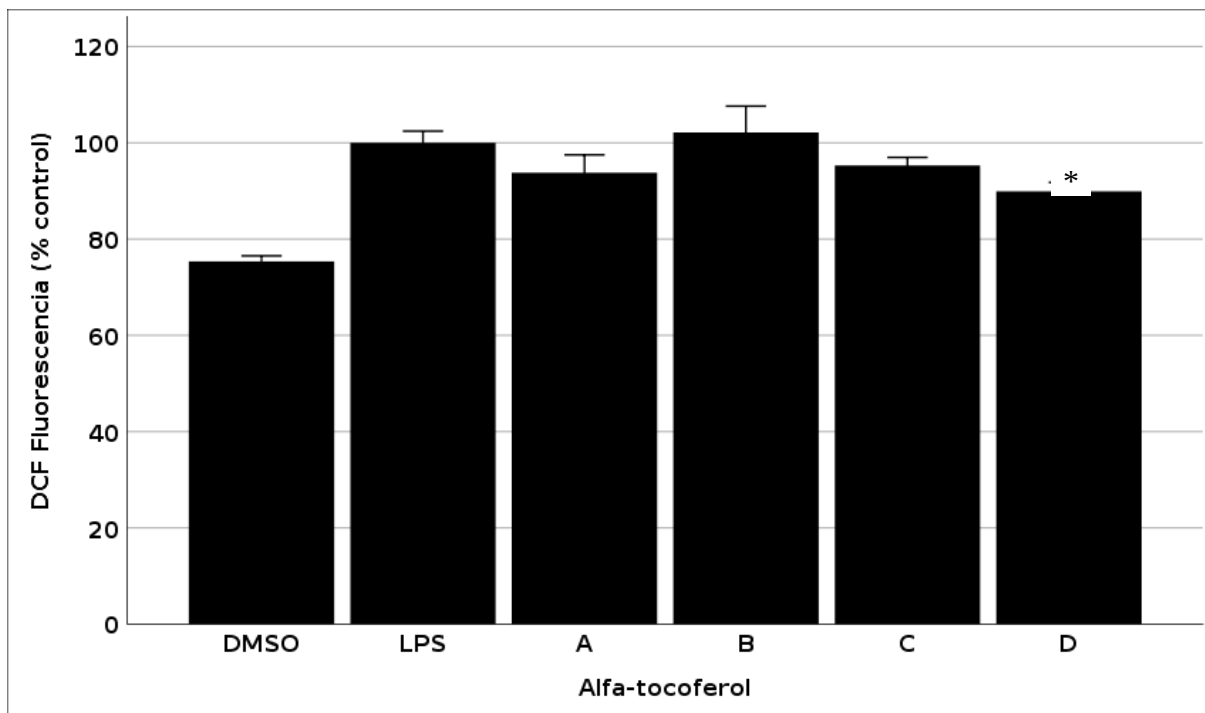


Figura 17. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de α -tocoferol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M. Datos expresados como porcentaje de fluorescencia emitida respecto del control positivo. *: $p < 0,05$ vs. LPS.

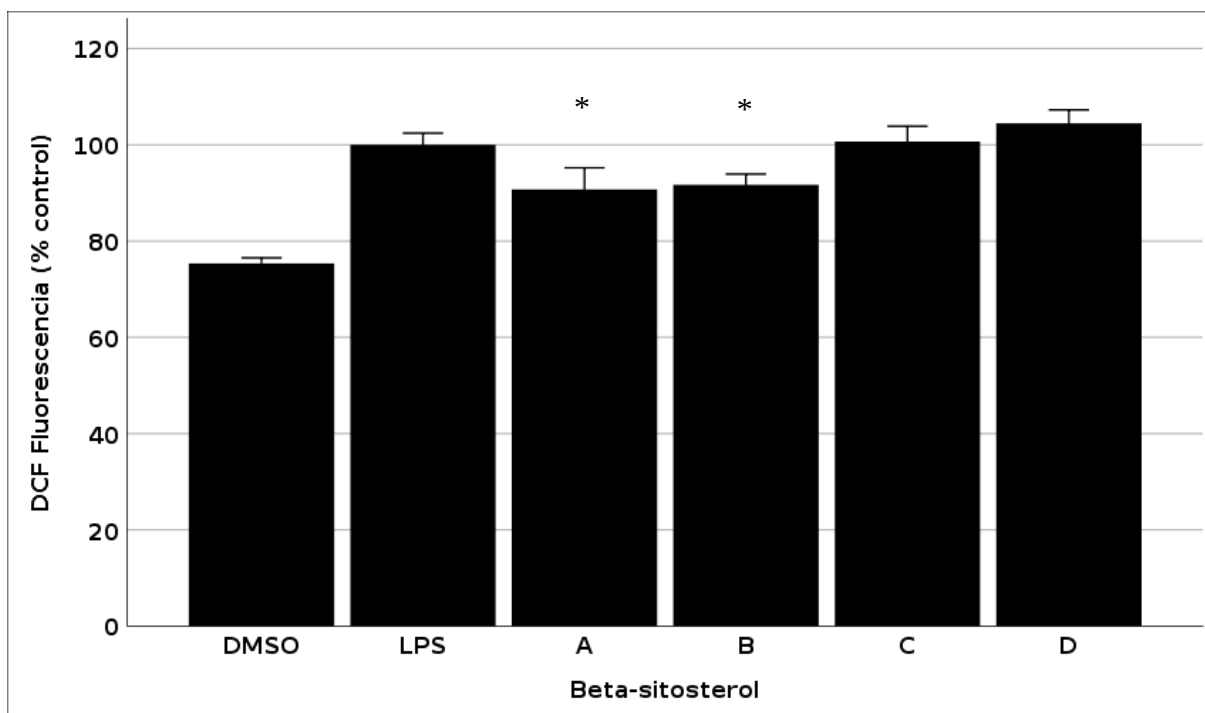


Figura 18. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de β -sitosterol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M. Datos expresados como porcentaje de fluorescencia emitida respecto del control positivo. *: $p < 0,05$ vs. LPS.

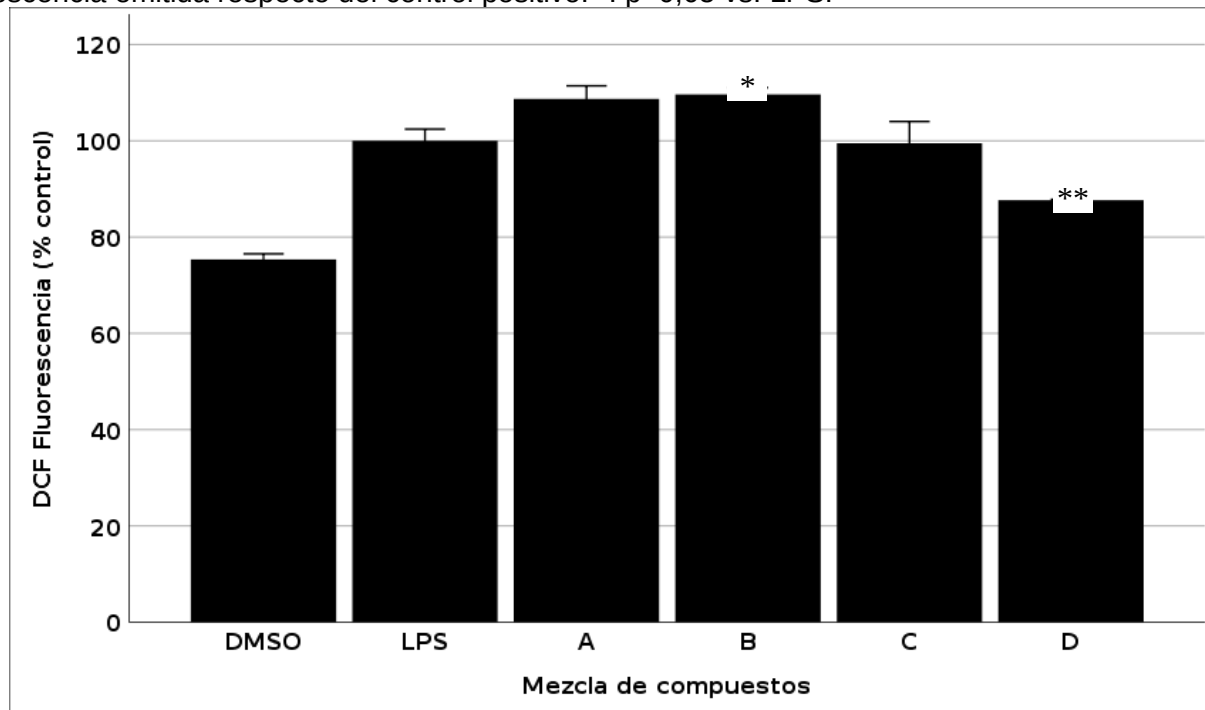


Figura 19. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones (ver métodos) de mezclas de ácido oleanólico, α -tocoferol y β -sitosterol. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ vs. LPS.

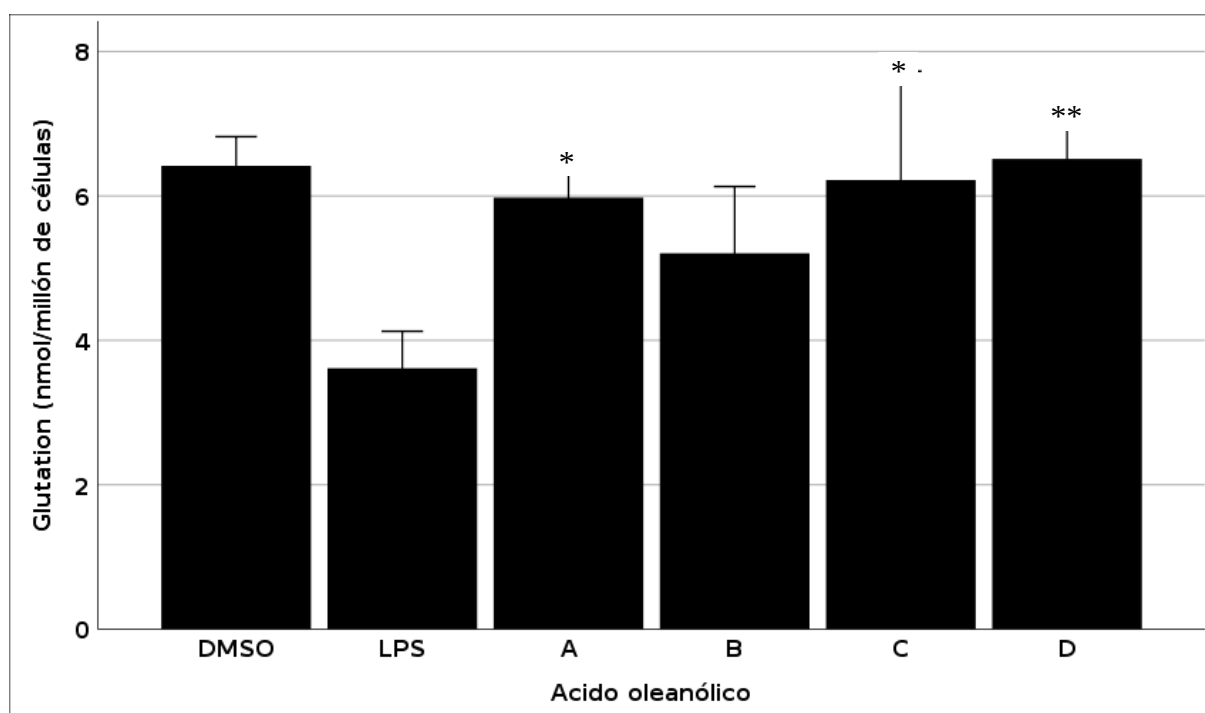


Figura 20. Concentración de glutatión total células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de ácido oleanólico. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 5 μ M, D: 10 μ M. *: $p < 0,05$, *: $p < 0,01$ vs. LPS.

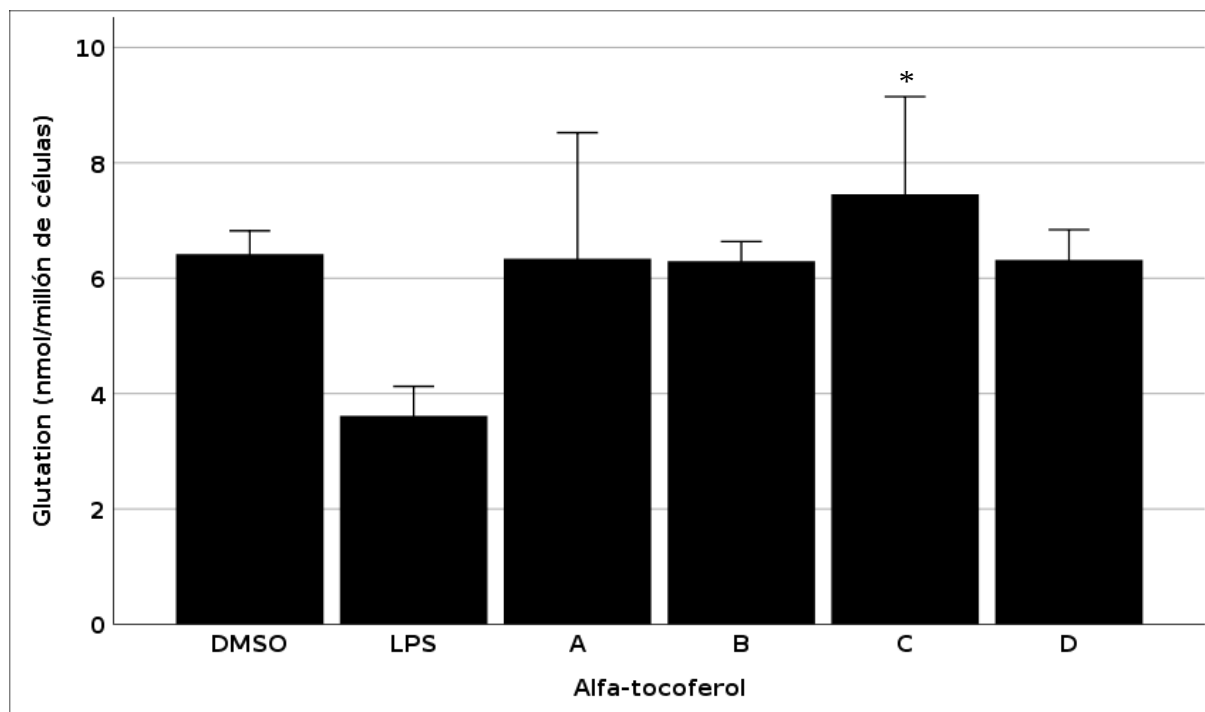


Figura 21. Concentración de glutatión total células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de α -tocoferol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 50 μ M. *: $p < 0,05$ vs. LPS.

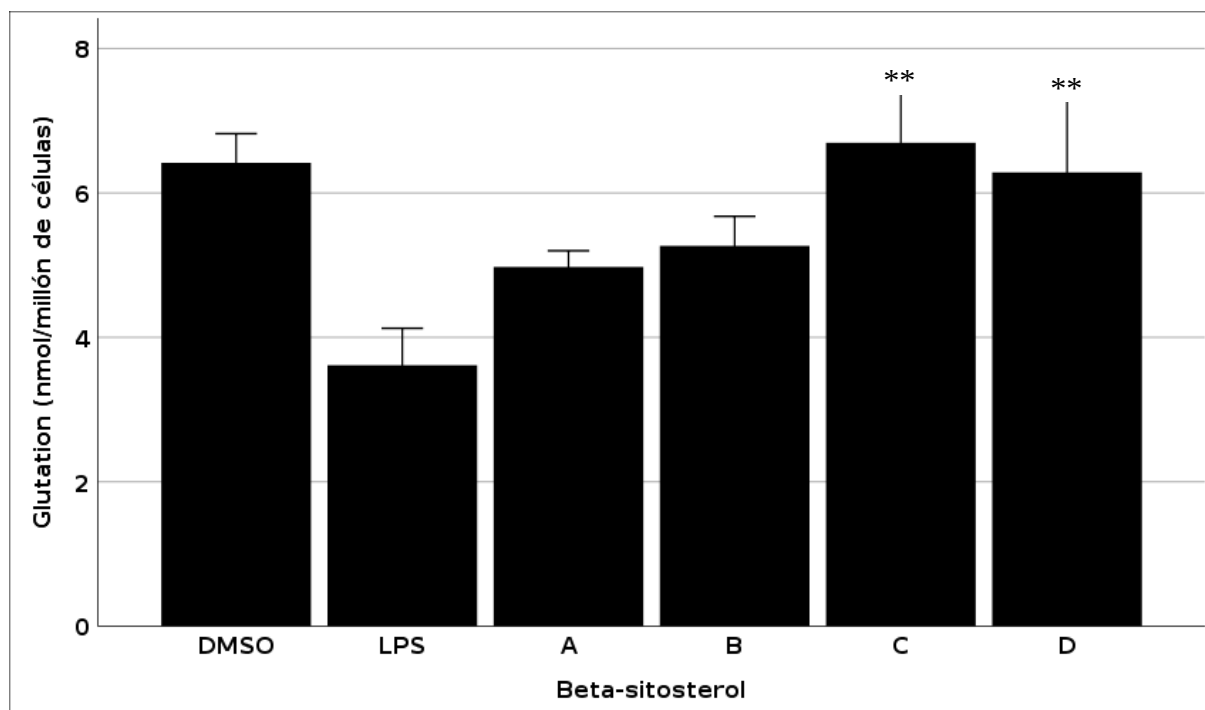


Figura 22. Concentración de glutatión total células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones de β -sitosterol. A: 0,5 μ M, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 25 μ M. **: $p < 0,01$ vs. LPS.

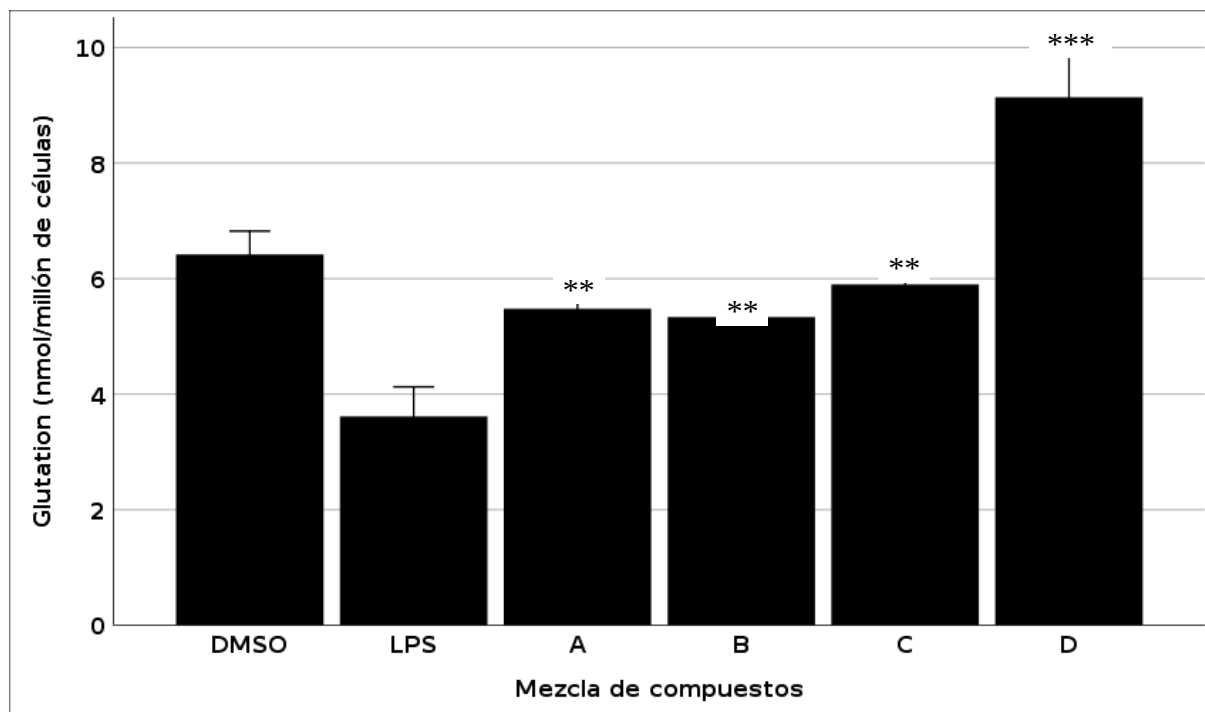


Figura 23. Concentración de glutatión total células BV-2 tras su tratamiento con DMSO (control negativo), LPS (control positivo) y LPS más diversas concentraciones (ver métodos) de mezclas de ácido oleanólico, α -tocoferol y β -sitosterol. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ vs. LPS.

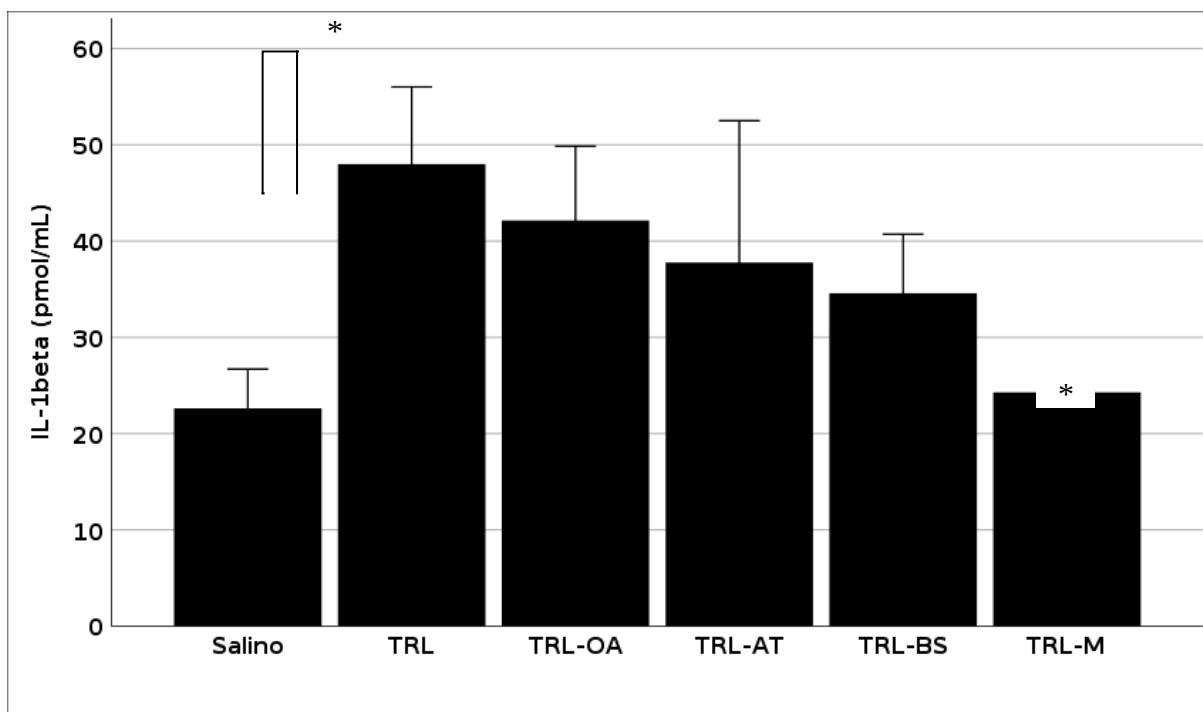


Figura 24. Concentración de IL-1 β en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con solución salina (control negativo), lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL, control positivo) y TRL conteniendo ácido oleanólico (TRL-OA, 10 μ M), α -tocoferol (TRL-AT, 10 μ M), β -sitosterol (TRL-BS, 10 μ M) o la mezcla de los tres compuestos (TRL-M, 10 μ M cada uno) *: $p < 0,05$ vs. TRL.

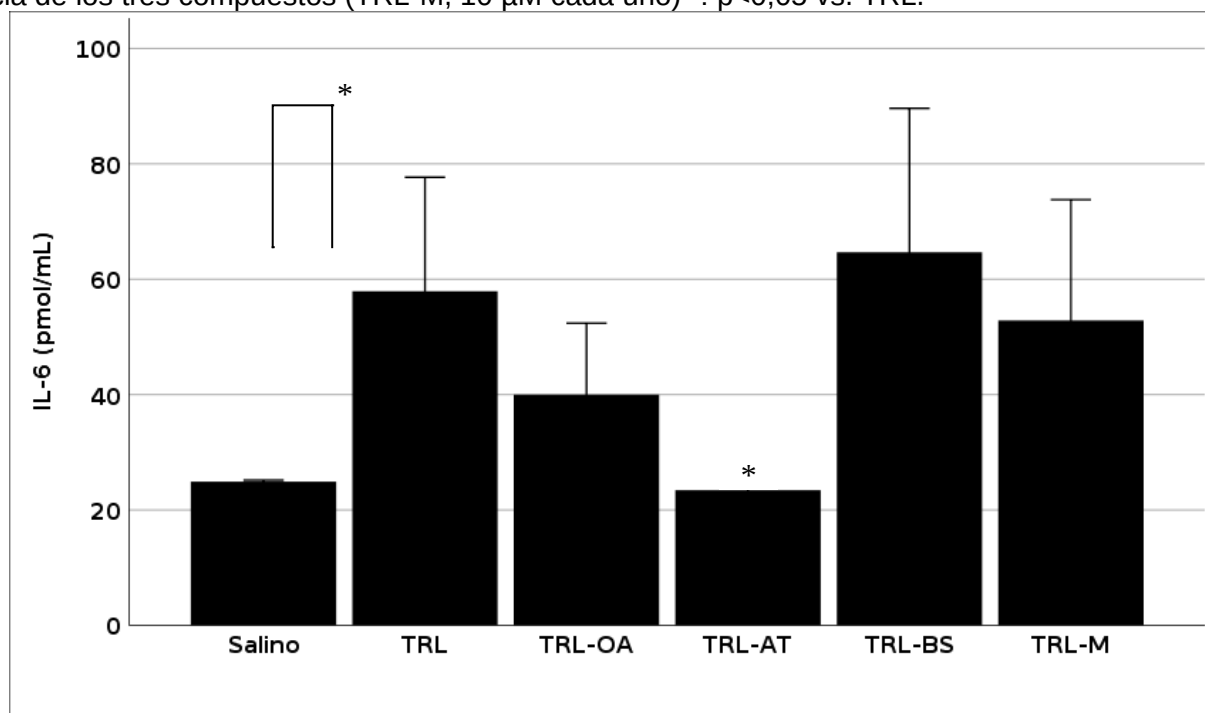


Figura 25. Concentración de IL-6 en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con solución salina (control negativo), lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL, control positivo) y TRL conteniendo ácido oleanólico (TRL-OA, 10 μ M), α -tocoferol (TRL-AT, 10 μ M), β -sitosterol (TRL-BS, 10 μ M) o la mezcla de los tres compuestos (TRL-M, 10 μ M cada uno) *: $p < 0,05$ vs. TRL.

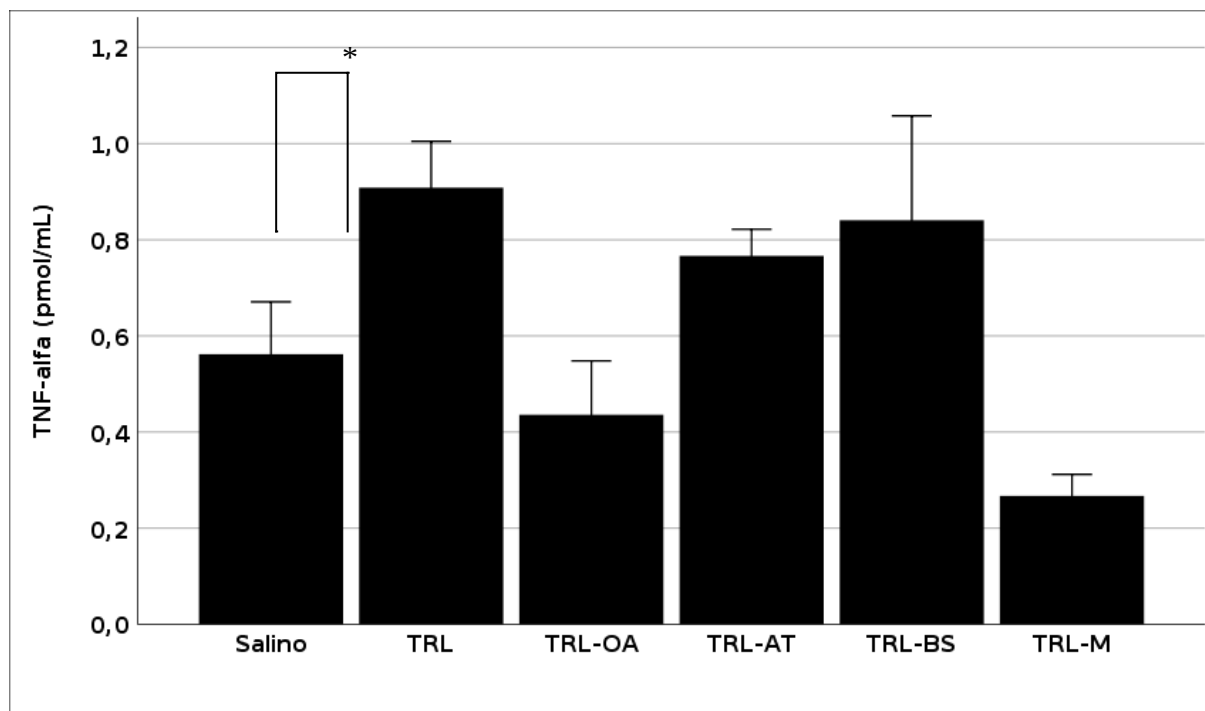


Figura 26. Concentración de TNF- α en medio de cultivo de células BV-2 tras su tratamiento con solución salina (control negativo), lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL, control positivo) y TRL conteniendo ácido oleanólico (TRL-OA, 10 μ M), α -tocoferol (TRL-AT, 10 μ M), β -sitosterol (TRL-BS, 10 μ M) o la mezcla de los tres compuestos (TRL-M, 10 μ M cada uno) **: p<0,01; ***:p<0,001 vs. TRL.