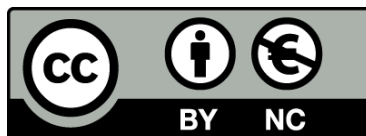




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Un model d'estrès oxidatiu en embrió
de peix zebra. Aplicació per a l'avaluació
de l'activitat protectora de
substàncies antioxidants.**

Núria Boix Sabrià



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Unitat de Toxicologia
Departament de Farmacologia i Química Terapèutica.
Facultat de Farmàcia

Un model d'estrès oxidatiu en embrió de peix zebra. Aplicació per a l'avaluació de l'activitat protectora de substàncies antioxidants.

Núria Boix Sabrià

Barcelona 2015



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat en Biomedicina

Un model d'estrès oxidatiu en embrió de peix zebra. Aplicació per a l'avaluació de l'activitat protectora de substàncies antioxidants.

Doctoranda:

Núria Boix Sabrià

Directors:

Dr. Joan M. Llobet Mallafrè

Dr. Jesús Gómez Catalán

Dra. Ester Piqué Benages

Barcelona 2015



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Unitat de Toxicologia

Departament de Farmacologia i Química
Terapèutica

Facultat de Farmàcia
Edifici A, Escala D 1a planta
Av Joan XXIII s/n
08028 Barcelona
Tel. 934 095816
Fax 934035816

JOAN MARIA LLOBET MALLAFRÉ, Catedràtic d'Universitat de la Unitat de Toxicologia de la Facultat de Farmàcia; JESÚS GÓMEZ CATALÁN, Professor Titular d'Universitat de la Unitat de Toxicologia de la Facultat de Farmàcia i ESTER PIQUÉ BENAGES, Professora Associada de la Unitat de Toxicologia de la Facultat de Farmàcia, tots ells membres del Departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona,

INFORMEN

Que el treball titulat "Un model d'estrès oxidatiu en embrió de peix zebra. Aplicació per a l'avaluació de l'activitat protectora de substàncies antioxidants", presentada per la NÚRIA BOIX SABRIÀ per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona ha estat realitzada sota la seva direcció a la Unitat de Toxicologia del Departament de Farmacologia i Química Terapèutica i, considerant-la finalitzada, n'autoritzen la presentació per ser jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè així consti, signen la present

Dr. Joan M. Llobet Mallafré

Dr. Jesús Gómez Catalán

Dra. Ester Piqué Benages

Barcelona, 23 de Setembre de 2015

Aquesta tesi doctoral s'ha portat a terme a la Unitat de Toxicologia del Departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Part d'aquesta tesi ha estat subvencionada per l'Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària de la Universitat de Barcelona (INSA-UB), amb l'ajut FRI2012. El Grup de Recerca en Toxicologia (GRET) ha gaudit d'un *Ajut de suport a les activitats dels grups de recerca* (SGR) del Departament D'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya (2009SGR414 i 2014SGR566).

Per a la realització d'aquesta tesi, a la doctoranda se li ha concedit un *Ajut predoctoral en Docència i Recerca* (ADR 2011/2012) de la Universitat de Barcelona; una *Beca per a la recerca a l'estranger* (2011BE1 00690) de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, AGAUR, per a l'estada de recerca a la Università degli studi di Milano, de 2 mesos i 15 dies de durada i una *Subvención para favorecer la movilidad de estudiantes en doctorados, Mención hacia la excelencia*, curso 2011-2012 (MHE2011-00062) del Ministerio de Educación, per a l'estada de recerca a l'IUF- Leibniz Institute for Environmental Medicine, Düsseldorf, de 3 mesos de durada.

“Un llibre (*en aquest cas, una Tesi*), és com un viatge,
comença amb inquietud i acaba amb malenconia.

(José Vasconcelos)

AGRAÏMENTS

Començar, realitzar i sobretot acabar aquesta tesi doctoral no hauria estat possible sense totes les persones que m'heu acompanyat durant aquesta experiència. Cadascuna de vosaltres ha posat el seu granet de sorra per a que tingueu aquest treball a les vostres mans. Per aquest motiu el primer agraïment és general a tots vosaltres, MOLTES GRÀCIES!!!

Als meus directors, el Dr. Joan M. Llobet, el Dr. Jesús Gómez i la Dra. Ester Piqué per donar-me la oportunitat de col·laborar a la Unitat de Toxicologia, pels diferents projectes en els que he pogut participar, les classes que he pogut fer i, especialment, per tal que pogués aconseguir realitzar aquesta tesi doctoral quan les coses no eren gens fàcils.

Voldria agrair de forma especial al Dr. Miquel Rodamilans el seu suport des de l'inici d'aquesta aventura. Moltes gràcies pel teu gran ajut en l'últim tram de la tesi, per ser el meu mentor a l'hora de preparar les classes teòriques i també les pràctiques i per animar-me a fer nous passos de cara al futur. Perquè el fet d'haver de "defensar" el pis de dalt ens ha fet compartir converses interessants, alegries, malestars i, sobretot, ens ha convertit en bons companys.

Moltes gràcies a la Dra. Marta Barenys per endinsar-me i acompanyar-me sempre en l'aventura que és la recerca. Perquè el que va començar amb un treball dirigit, va continuar com a companyes de laboratori i es va consolidar en les nostres aventures i desventures per Perú i Düsseldorf, s'ha acabat convertint en una gran amistat que espero que continuï durant molt temps.

També vull donar les gràcies a les companyes de laboratori que he tingut al llarg de la tesi, perquè la feina al laboratori ha estat molt més agradable i satisfactòria quan la he compartit amb vosaltres. A la Dra. Elisabet Teixidó, moltes gràcies per ajudar-me en tot el que vaig necessitar (i més!) a l'inici de la tesi i per ensenyar-me a apreciar els peixos zebra. Per totes les estones compartides a la feina, als congressos i cursos als que hem anat juntes i per les nostres converses a l'hora del cafè. A la Cristina Arteaga, hemos coincidido en el último tramo de esta tesis, quería agradecerle tu interés y los ánimos que siempre me has dado, el buen ambiente que hay en el laboratorio y el buen trabajo que hemos podido hacer juntas.

A la resta de companys i companyes de la Unitat de Toxicologia i del CERETOX. Als primers pels bons moments a les pràctiques de Toxicò, quan muntem i desmuntem el laboratori, quan planifiquem i comentem les pràctiques i per ser sempre uns molt bons companys. Als segons per ajudar-me sempre que he vingut al Parc a fer proves i assaigs i perquè hem tingut el millor comitè de *fiestas y guarroneo*, que ens ha fet passar uns bons moments fora de la feina. Moltes gràcies a tots!

Gràcies a tots els i les estudiants de treball dirigit, de final de màster o estudiants d'intercanvi que han passat per la Unitat de Toxicologia: la Núria Llarguès, el Pol Martínez, el Pau Saumell, la Sílvia Rodríguez i el Petar Lukic que, amb la seva feina m'han ajudat a tirar endavant aquesta tesi doctoral.

També vull donar les gràcies a la Dra. Glòria Lozano, per haver-me deixat consultar la seva pròpia tesi i per les converses que hem tingut durant l'últim any en les que ens hem pogut desfogar de tesi i de recerca. Ajuda molt compartir com et sents amb algú que t'entén perfectament.

Voldria agrair a la Dra. Lluïsa Miró per ajudar-me amb el microscopi de fluorescència i al personal del servei de microscòpia òptica avançada dels Centres Científics i Tecnològics de la UB, el Dr. Manel Bosch i la Melody, pel temps, amabilitat i disposició dedicades a ensenyar-me el microscopi confocal i per ajudar-me i donar-me idees per a obtenir les millors imatges de les neurones dopaminèrgiques.

I would like to thank Dr. Ellen Fritsche for accepting me as a stage student in the IUF. Thanks to all the members of the Modern Risk Assessment and Sphere Biology research group: Ellen, Katha, Martin, Marta, Jenny, Susi, Janette, Julia, Ulrike, Denisse and Ariana, for teaching me the technique with human neurospheres and for making me feel as part of team from the very beginning. It was a very good professional and personal experience for me to come to Düsseldorf.

Vorrei ringraziare a Prof. Elena Menegola, Dra. Francesca Di Renzo e Dr. Erminio Giavini di accettarmi come studentessa nel suo gruppo di ricerca. Per le lezioni di Biologia dello sviluppo e soprattutto per il vostro aiuto quando sono arrivata a Milano e per farmi vedere che si possono fare tante cose quando le persone lavorano bene insieme. A Maria e Elena, perché lavorare con voi è stato veramente un piacere e perché ho imparato molto l'italiano!

A les nenes, per la vostra amistat. Les estones compartides amb vosaltres sempre són un punt i a part i donen energia per a tirar endavant, espero que continuem així durant molt i molt de temps. Moltes gràcies!

Voldria donar un gràcies molt especial als meus pares per estar sempre, SEMPRE al meu costat i demostrar-me el que significa realment el suport incondicional. A la resta de la meua família, els que teniu aquesta tesi a les mans i els que no, però que n'hauríeu estat molt orgullosos, moltíssimes gràcies per seguir-me sempre de ben a prop i fer-me costat en els bons moments i també en els no tant bons.

I al Cristian, gràcies per TOT! El camí no ha estat fàcil, però fer-lo al teu costat m'ha ajudat a arribar fins aquí i em dóna empenta i il·lusió per a les noves etapes que vindran i que espero, seguim fent junts.

Moltíssimes gràcies a totes i a tots!!

ÍNDEXS

ÍNDEX

ÍNDEX DE FIGURES.....	1
ÍNDEX DE TAULES	7
ACRÒNIMS.....	11
RESUMS	15
1. INTRODUCCIÓ.....	23
1.1. Estrès oxidatiu	23
1.2. Antioxidants.....	25
1.3. Antioxidants naturals	27
1.4. Malalties neurodegeneratives.....	29
1.5. Polifenols del raïm i del vi negre, neuroprotecció	31
1.6. Tècniques d'avaluació de la capacitat antioxidant.....	33
1.7. Peix zebra	35
1.8. Mètodes alternatius, model de neuroesferes humanes.....	38
2. OBJECTIUS	43
3. MATERIAL I MÈTODES	47
3.1. Dissenys experimentals	47
3.1.1. Model d'estrès oxidatiu amb embrions de peix zebra.....	47
3.1.1.1. Caracterització dels efectes en el desenvolupament embrionari de peix zebra.	47
3.1.1.2. Modulació de la resposta a estrès oxidatiu.....	47
3.1.1.3. Efectes antioxidants dels compostos	48
3.1.2. Model de neuroesferes humanes	49
3.1.2.1. Caracterització dels efectes en el model de neuroesferes humanes.....	49
3.1.2.2. Efectes antioxidants dels compostos	50
3.2. Assaig amb embrions de peix zebra	51
3.2.1. Manteniment de la colònia d'adults i obtenció dels embrions.....	51
3.2.2. Exposició dels embrions als diferents compostos.....	52
3.2.3. Avaluació de la letalitat i els efectes morfològics en els embrions.....	56
3.2.4. Avaluació de l'activitat acetilcolinesterasa	57
3.2.5. Avaluació de l'expressió gènica.....	58
3.2.6. Avaluació de la distància total recorreguda	60
3.2.7. Tinció anti-tirosina hidroxilasa	60
3.3. Caracterització dels polifenols del vi negre.....	62

3.3.1. Estàndards i mostra d'estudi.....	62
3.3.2. Exposició dels embrions a la mostra de vi negre	62
3.3.3. Identificació dels compostos presents en la mostra de vi negre i d'homogenat d'embrions .	62
3.4. Assaig amb neuroesferes humanes.....	64
3.4.1. Cultiu cel·lular.....	64
3.4.2. Exposició als compostos d'estudi	64
3.4.3. Assaig de migració	65
3.4.4. Assaig de viabilitat.....	65
3.4.5. Anàlisi de diferenciació a neurones	66
3.5. Anàlisi estadística	67
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	71
4.1. Model d'estrès oxidatiu in vivo	71
4.1.1. Caracterització dels efectes dels diferents compostos en el creixement i desenvolupament embrionari del peix zebra	71
4.1.1.1. Inductors d'estrès oxidatiu.....	71
4.1.1.2. Moduladors de l'estatus antioxidant	77
4.1.1.3. Antioxidants	82
4.1.2. Modulació de la resposta a estrès oxidatiu.....	85
4.1.3. Aplicació del model: avaluació dels efectes antioxidants in vivo de compostos coneguts	92
4.2. Caracterització dels polifenols del vi negre.....	95
4.2.1. Avaluació dels efectes de la mostra de vi negre en embrions de peix zebra.....	95
4.2.2. Identificació dels compostos presents en la mostra de vi negre i en l'homogenat d'embrions de peix zebra	96
4.2.3. Avaluació de l'efecte antioxidant in vivo dels polifenols del vi negre.....	100
4.3. Efecte neuroprotector dels polifenols del vi negre.....	104
4.3.1. Efectes dels polifenols del vi negre en el moviment.....	104
4.3.2. Efectes dels polifenols del vi negre en les neurones dopaminèrgiques	106
4.4. Assaig amb neuroesferes humanes.....	112
4.4.1. Caracterització dels efectes de l'exposició a compostos inductors d'estrès oxidatiu i antioxidants en neuroesferes humanes.....	112
4.4.1.1. TCHQ.....	112
4.4.1.2. Antioxidants	115
4.4.2. Estudis d'exposició combinada de compostos inductors d'estrès oxidatiu i antioxidants en neuroesferes humanes.....	117

4.4.3. Reproducció dels estudis de doble exposició a TCHQ en neuroesferes al model d'embrió de peix zebra	121
5. CONCLUSIONS	127
6. BIBLIOGRAFIA	131
7. ANNEX	149

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1: Desequilibri entre les espècies reactives, d'oxigen i de nitrogen, i les defenses antioxidants que condueix a la producció d'estrès oxidatiu.....	23
Figura 2: Esquema dels diferents tipus de defenses antioxidants enfront a l'atac dels radicals lliures. ...	26
Figura 3: Estructures químiques d'alguns polifenols.	27
Figura 4: Cervell humà on es representa l'àrea corresponent a la <i>substantia nigra</i> i les projeccions neuronals que s'envien al nucli estriat.....	29
Figura 5: Raïm negre, <i>Vitis vinifera</i> ; estructura química general de les antocianines; copa de vi negre...	31
Figura 6: Esquema del desenvolupament del peix zebra: fase embrionària, larvària, juvenil i adulta. embrions de peix zebra dins de la membrana coriònica a les 6, 24 i 48 hores post-fecundació; larva de peix zebra a les 72 hores post-fecundació i peix zebra adult.....	36
Figura 7: Representació esquemàtica de l'assaig amb neuroesferes humanes; representació gràfica de l'assaig d'avaluació de la proliferació, migració i diferenciació de les neuroesferes.....	39
Figura 8: Disseny experimental de la caracterització dels efectes de compostos en el desenvolupament embrionari de peix zebra.	47
Figura 9: Disseny experimental dels assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu. Pre-exposició dels embrions de peix zebra als moduladors de l'estatus antioxidant i posterior exposició als inductors d'estrès oxidatiu.....	48
Figura 10: Disseny experimental de l'avaluació dels efectes antioxidants dels compostos mitjançant el model d'embrió de peix zebra. Pre-exposició dels embrions de peix zebra als compostos antioxidants i posterior exposició als inductors d'estrès oxidatiu.....	49
Figura 11: Disseny experimental de la caracterització dels efectes de compostos en el model de neuroesferes humanes.....	49
Figura 12: Disseny experimental de l'avaluació dels efectes antioxidants dels compostos mitjançant el model de neuroesferes humanes. Pre-exposició de les neuroesferes als compostos antioxidants i posterior exposició als inductors d'estrès oxidatiu.....	50
Figura 13: Peixos zebra adults. A la part superior, la femella. La fletxa blanca indica la protuberància a la zona abdominal; a la part inferior, el mascle.	51
Figura 14: Imatges representatives d'embrions de peix zebra. A l'esquerra, un embrió de peix zebra fecundat en el que es poden apreciar les divisions cel·lulars; al mig, un embrió no fecundat; a la dreta, un embrió coagulat.	52
Figura 15: Esquema de l'exposició dels embrions als diferents compostos. En gris s'observa la finestra d'exposició als moduladors de l'estatus antioxidant, als antioxidants i als inductors d'estrès oxidatiu; en blanc es representa la incubació amb solució de Danieau.	53

Figura 16: Embrió de peix zebra de 50 hpf. A l'esquerra l'embrió està dins de la membrana coriònica i a la dreta s'ha alliberat de la membrana i s'observa la larva vista des del costat dret.	56
Figura 17: Reaccions químiques per a la determinació de l'activitat ACE.	58
Figura 18: Trajectòria obtinguda mitjançant el programa ImageJ d'una larva de peix zebra control en la que es visualitza la distància total recorreguda en resposta a l'estímul mecanosensorial de contacte. ...	60
Figura 19: Fotografies d'una larva de peix zebra control realitzades amb el microscopi confocal. A l'esquerra una fotografia realitzada amb l'augment de 10x i zoom de 2 per tal de localitzar la zona d'unió de l'anticòs anti-tirosina hidroxilasa. A la dreta una fotografia en la que s'han combinat les imatges preses cada 4 µm amb l'augment de 20x per tal de comptar el número de neurones que presenten tirosina hidroxilasa.	61
Figura 20: Esquema de les finestres d'exposició de les neuroesferes als diferents compostos. A la part superior, els estudis d'exposició única i a la part inferior els estudis d'exposició combinada.	64
Figura 21: Imatge d'una neuroesfera amb l'àrea de migració de les cèl·lules que la formen. Les mesures realitzades en les quatre posicions establertes estan indicades amb una línia.....	65
Figura 22: Esquema de la reacció química que es produeix en les cèl·lules viables, en la que es basa l'assaig de viabilitat cel·lular CellTiter-Blue®.....	66
Figura 23: Imatge de la diferenciació a neurones en les cèl·lules d'una neuroesfera control. En blau s'observen els nuclis tenyits amb Hoechst 33258 i en vermell, les neurones tenyides amb l'anticòs anti-β(III)-tubulina.....	66
Figura 24: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al tBOOH.....	72
Figura 25: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a la TCHQ.	73
Figura 26: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al LPS.....	74
Figura 27: Representació gràfica de les anormalitats en el moviment (A) i de la distància total recorreguda (B) pels embrions de peix zebra exposats a la 6-OHDA.....	76
Figura 28: Representació gràfica de l'activitat acetilcolinesterasa en embrions exposats a TCHQ (A), LPS (B), 6-OHDA (C) i tBOOH (D).	77
Figura 29: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a la NAC.	78
Figura 30: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al L-NAME.	79
Figura 31: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al DEM.	80
Figura 32: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al BSO.	81

Figura 33: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a la quercetina.....	83
Figura 34: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a l'àcid lipoic.....	84
Figura 35: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a la vitamina E.....	85
Figura 36: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques per als assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats al tBOOH.....	86
Figura 37: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques per als assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats a la TCHQ.....	87
Figura 38: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques per als assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats al LPS.....	89
Figura 39: Corbes concentració-resposta per a la distància total recorreguda pels embrions de peix zebra en els assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu en l'exposició a la 6-OHDA.....	90
Figura 40: Resultats de l'avaluació de l'expressió del gen <i>gstp1</i>	91
Figura 41: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques per a l'estudi de la capacitat del model d'estrès oxidatiu per a detectar l'activitat antioxidant de la vitamina E, l'àcid lipoic i la quercetina.....	93
Figura 42: Resultats per a letalitat i presència d'anormalitats morfològiques en l'exposició dels embrions de peix zebra a diferents dilucions de la mostra de vi negre en solució de Danieau.....	95
Figura 43: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a la quercetina 3- β -D-glucòsid.....	100
Figura 44: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al kaempferol 3-glucòsid.....	101
Figura 45: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques en l'avaluació de l'efecte antioxidant in vivo dels polifenols identificats amb més intensitat en la mostra de vi negre: quercetina 3- β -d-glucòsid, malvidina 3-glucòsid, peonidina 3-glucòsid i kaempferol 3-glucòsid.....	103
Figura 46: Corbes concentració-resposta per a la distància total recorreguda pels embrions en els assaigs de pre-exposició als polifenols i a la 6-OHDA.....	105
Figura 47: Representació gràfica del nombre de neurones dopaminèrgiques quantificades a partir de la immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en l'assaig d'exposició dels embrions de peix zebra a la 6-OHDA.....	106
Figura 48: Immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en embrions de peix zebra. A l'esquerra, imatge d'un embrió de peix zebra obtinguda amb llum transmesa; al centre, immunotinció en un embrió control; a la dreta immunotinció en un embrió exposat a 6-OHDA. El cercle blanc indica l'àrea on es localitzen les neurones dopaminèrgiques.....	107

Figura 49: Representació gràfica del nombre de neurones dopaminèrgiques, quantificades a partir de la immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en l'assaig d'exposició dels embrions de peix zebra als polifenols.	107
Figura 50: Immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en embrions de peix zebra. Imatges representatives dels embrions control (A) i dels embrions exposats als polifenols malvidina 3-glucòsid (B), peonidina 3-glucòsid (C), kaempferol 3-glucòsid (D), quercetina (E) i quercetina 3- β -d- glucòsid (F). El cercle blanc indica l'àrea on es localitzen les neurones dopaminèrgiques.....	108
Figura 51: Representació gràfica del nombre de neurones dopaminèrgiques, quantificades a partir de la immunotinció anti-TH en l'assaig de pre-exposició dels embrions de ZF als polifenols i la següent exposició a 6-OHDA.	109
Figura 52: Immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en embrions de peix zebra pre-exposats als polifenols i posteriorment exposats a 6-OHDA. Imatges representatives dels embrions control (A) i dels embrions pre-exposats als polifenols quercetina 3- β -d-glucòsid (B), malvidina 3-glucòsid (C), peonidina 3-glucòsid (D), quercetina (E), kaempferol 3-glucòsid (F) i d'embrions exposats únicament a 6-OHDA (G). el cercle blanc indica l'àrea on es localitzen les neurones dopaminèrgiques.	110
Figura 53: Representació gràfica de la viabilitat i del percentatge de neurones en les neuroesferes de menys de 3 mesos d'edat (A i C), i de les neuroesferes majors de 3 mesos d'edat (B i D), en l'exposició a TCHQ durant 8 hores.	113
Figura 54: Representació gràfica de la viabilitat i del percentatge de neurones en les neuroesferes de menys de 3 mesos d'edat (A i C), i de les neuroesferes majors de 3 mesos d'edat (B i D), en l'exposició a TCHQ durant 8 hores.	114
Figura 55: Representació gràfica del percentatge de neurones respecte el grup control, obtingut en les neuroesferes exposades a TCHQ durant 48 hores.	114
Figura 56: Representació gràfica de la migració de les cèl·lules progenitores neurals que formen la neuroesfera en l'exposició a hesperetina durant 5 dies.	115
Figura 57: Representació gràfica de la viabilitat de les neuroesferes exposades a hesperetina durant 5 dies.	115
Figura 58: Representació gràfica del percentatge de neurones respecte el grup control, obtingut en les neuroesferes exposades a hesperetina durant 5 dies.	116
Figura 59: Representació gràfica de la migració de les cèl·lules progenitores neurals que formen la neuroesfera en l'exposició a kaempferol durant 5 dies.	116
Figura 60: Representació gràfica de la viabilitat de les neuroesferes exposades a kaempferol durant 5 dies.	117
Figura 61: Representació gràfica del percentatge de neurones respecte el grup control, obtingut en les neuroesferes exposades a kaempferol durant 5 dies.	117
Figura 62: Corbes concentració-resposta per a la viabilitat de les neuroesferes en l'assaig de pre-exposició a hesperetina, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i de l'exposició única a TCHQ.	118

Figura 63: Corbes concentració-resposta per a la viabilitat de les neuroesferes de menys de tres mesos d'edat (A) i de les neuroesferes de més de 3 mesos d'edat (B), en l'assaig de pre-exposició a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i de l'exposició única a TCHQ. 119

Figura 64: Corbes concentració-resposta per al percentatge de neurones de les neuroesferes de menys de tres mesos d'edat (A) i de les neuroesferes de més de 3 mesos d'edat (B), en l'assaig de pre-exposició a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i de l'exposició única a TCHQ. 120

Figura 65: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a TCHQ de les 2 a les 26 hpf. 122

Figura 66: Corbes concentració-resposta per a letalitat en la pre-exposició dels embrions de peix zebra a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i en l'exposició única a TCHQ. 123

Figura 67: Corbes concentració-resposta per a anormalitats morfològiques en la pre-exposició dels embrions de peix zebra a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i en l'exposició única a TCHQ. 123

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1: Descripció dels compostos utilitzats en el model d'estrès oxidatiu, el seu número CAS, la seva estructura química i el seu mecanisme d'acció relacionat amb l'estrès oxidatiu.....	54
Taula 2: Criteris per a l'avaluació morfològica i funcional dels embrions de peix zebra.	56
Taula 3: Informació de les seqüències dels encebadors utilitzats en les reaccions de PCR a temps real..	59
Taula 4: Resultats de l'exposició dels embrions al tBOOH.....	72
Taula 5: Resultats de l'exposició dels embrions a la TCHQ.....	73
Taula 6: Resultats de l'exposició dels embrions al LPS.....	74
Taula 7: Resultats de l'exposició dels embrions a la 6-OHDA.	76
Taula 8: Resultats de l'exposició dels embrions a la NAC.	78
Taula 9: Resultats de l'exposició dels embrions al L-NAME.....	79
Taula 10: Resultats de l'exposició dels embrions al DEM.	80
Taula 11: Resultats de l'exposició dels embrions al BSO.	81
Taula 12: Resultats de l'exposició dels embrions a la quercetina.....	82
Taula 13: Resultats de l'exposició dels embrions a l'àcid lipoic.....	83
Taula 14: Resultats de l'exposició dels embrions a la vitamina E.	84
Taula 15: Modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats al tBOOH.....	86
Taula 16: Modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats a la TCHQ.....	87
Taula 17: Modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats al LPS.	88
Taula 18: Modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats a la 6-OHDA.....	90
Taula 19: Efectes dels compostos antioxidants en la letalitat i les anormalitats morfològiques en embrions de peix zebra exposats a tBOOH.....	93
Taula 20: Compostos identificats en la mostra de vi negre.	98
Taula 21: Compostos identificats en la mostra d'homogenat d'embrions de peix zebra prèviament exposats a la mostra de vi negre.....	99
Taula 22: Resultats de l'exposició dels embrions a la quercetina 3-β-D-glucòsid.	100
Taula 23: Resultats de l'exposició dels embrions al kaempferol 3-glucòsid.	101

Taula 24: Efectes dels polifenols en la letalitat i les anormalitats morfològiques en embrions de peix zebra exposats al tBOOH.....	102
Taula 25: Avaluació de la distància total recorreguda pels embrions en la pre-exposició a polifenols i la posterior exposició a la 6-OHDA.	105
Taula 26: Resultats de l'exposició dels embrions a TCHQ de les 2 a les 26 hpf.	121

ACRÒNIMS

ACRÒNIMS

ROS	Espècies reactives d'oxigen
RNS	Espècies reactives de nitrogen
NO	Òxid Nítric
NOS	Sintasa d'òxid nítric
EO	Estrès oxidatiu
HAT	Transferència d'àtoms d'hidrogen
SET	Transferència d'electrons
ORAC	Assaig de capacitat d'absorbància de radicals d'oxigen (<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>)
TRAP	Assaig del paràmetre dels antioxidants de captació total de radicals (<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i>)
FRAP	Assaig del poder antioxidant reductor de ferro (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
F-C	Folin-Ciocalteu
CAA	Assaig d'activitat antioxidant cel·lular
ZF	Peix zebra
hpf	Hores post-fecundació
dpf	Dies post-fecundació
FET	Assaig amb embrions de peix (<i>Fish embryo test</i>)
OECD	Organització per a la cooperació econòmica i el desenvolupament
ARE	Factor de transcripció, element de resposta antioxidant
NRF2	Factor nuclear (erythroid-derived 2)-like 2
KEAP1	Proteïna Kelch-like ECH-associated protein 1
ECVAM	Centre europeu per a la validació de mètodes alternatius
EST	Test amb cèl·lules mares embrionàries
MM	Test <i>Micromass</i>
WEC	Cultiu d'embrions sencers de rata <i>in vitro</i>
ISO	Organització internacional per a l'estandardització
TCHQ	Tetraclorohidroquinona
LPS	Lipopolisacàrid l' <i>Escherichia coli</i> O111:B4
6-OHDA	Hidrocloreur de 6-hidroxidopamina
L-NAME	Hidrocloreur de N ω -Nitro L-arginina metil èster
BSO	DL-butionina sulfoximina
Vit. E	(\pm)- α -tocoferol
Àcid lipoic	(\pm)- α -àcid lipoic
Quercetina	Hidrat de quercetina
tBOOH	<i>tert</i> - butil hidropèroxid

NAC	N-acetil-L-cisteïna
DEM	Dietil maleat
DMSO	Dimetil sulfòxid
LC ₅₀	Concentració letal 50
EC ₅₀	Concentració efectiva 50
ACE	Acetilcolinesterasa
DTNB	Àcid 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic)
TNB	2-nitro-5-tiobenzoat
ADNc	ADN complementari
gapdh	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
gpx1a	Glutatió peroxidasa 1 α
cat	Catalasa
gclc	γ -glutamil cisteïna sintetasa
gstp1	Glutatió-S-transferasa pi 1
PCRq	PCR quantitativa
Cq	Cicle de quantificació
TH	Tirosina hidroxilasa
CMT	Concentració Màxima Tolerable
HPLC-LTQ-Orbitrap-MS	Cromatografia líquida d'alta resolució associada a una trampa linear d'ions i a un espectròmetre de masses Orbitrap
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
PDA	Detector fotodiode-array
LTQ	Trampa linear d'ions
ESI	Font d'ionització en electroesprai
m/z	Massa/càrrega
AGC	Control automàtic del guany
MS	Anàlisi en una fase
MSn	Anàlisi en múltiples fases
MS/MS	Anàlisi en dues fases
DMEM	Medi Dulbecco modificat Eagle
EGF	Factor de creixement epidermal
FGF	Factor de creixement de fibroblasts humans recombinant
PDL	Poli-D-lisina
CTB	Cell Titer Blue
HRMS	Tècnica d'espectrometria de masses d'alta resolució
Nsf < 3 mesos	Neuroesferes de menys de tres mesos
Nsf > 3 mesos	Neuroesferes de més de tres mesos

RESUMS

RESUMS

L'estrès oxidatiu és el resultat del desequilibri entre la producció d'espècies reactives i l'activitat dels sistemes de defensa antioxidant i ha estat relacionat amb diferents patologies. Les defenses antioxidants endògenes i exògenes protegeixen les cèl·lules enfront el dany oxidatiu causat pels productes radicalaris. En els darrers anys ha augmentat l'interès per l'estudi dels efectes protectors dels antioxidants naturals presents en els aliments, essent els polifenols els més abundants en una dieta saludable. Fins el moment, no es disposa d'un assaig específic per a l'avaluació de la capacitat antioxidant dels compostos presents en els aliments, ja que les estratègies químiques i cultius cel·lulars utilitzats habitualment per a l'avaluació de l'activitat antioxidant, generalment no tenen la capacitat de predir la seva eficàcia *in vivo*, ni tampoc de determinar els mecanismes d'acció pels quals actuen. En aquest sentit, l'embrió de peix zebra és un model animal que ha estat utilitzat per a l'estudi d'alteracions i malalties relacionades amb processos oxidatius, ja que presenta gens i enzims antioxidants anàlegs als sistemes dels mamífers.

Per aquests motius els objectius de la present tesi doctoral han inclòs el desenvolupament d'un model d'estrès oxidatiu basat en l'embrió de peix zebra per a l'avaluació de l'activitat antioxidant de diferents compostos, així com l'avaluació de l'efecte antioxidant *in vivo* i l'efecte neuroprotector de compostos polifenòlics presents en el vi negre, mitjançant el model d'estrès oxidatiu establert. Així mateix, s'han estudiat els efectes de l'estrès oxidatiu i d'alguns antioxidants en el model de neuroesferes humanes.

- **Model d'estrès oxidatiu en embrió de peix zebra**

Per a establir el model d'estrès oxidatiu en embrió de peix zebra, primerament s'han caracteritzat els efectes de diferents compostos inductors d'estrès oxidatiu (*tert*-butil hidroperòxid, tBOOH; tetraclorohidroquinona, TCHQ; lipopolisacàrid d'*Escherichia coli*, LPS i 6-hidroxidopamina, 6-OHDA) en el creixement i el desenvolupament embrionari del peix zebra i s'han calculat les corbes concentració-resposta per letalitat i per anormalitats morfològiques de cada inductor.

Per tal de comprovar el mecanisme oxidatiu dels efectes observats en l'exposició dels embrions als inductors d'estrès oxidatiu, s'ha portat a terme una estratègia de modulació de la resposta a estrès oxidatiu. Els embrions s'han pre-exposat a compostos que poden augmentar l'estatus antioxidant (N-acetil-L-cisteïna, NAC i N_{ω} -Nitro L-arginina metil èster, L-NAME), o bé disminuir les reserves antioxidants (dielil maleat, DEM i DL-butionina sulfoximina, BSO), seguidament s'han exposat als inductors d'estrès oxidatiu i s'han comparat les corbes concentració-resposta de letalitat i d'anormalitats morfològiques amb les corbes obtingudes en l'exposició única als inductors d'estrès oxidatiu. Si el compost estudiat actua per un mecanisme d'estrès oxidatiu, s'observen diferències estadísticament significatives en la comparació de les corbes concentració-resposta. Els efectes produïts en l'exposició dels embrions a tBOOH, TCHQ i 6-OHDA han estat deguts a un mecanisme d'estrès oxidatiu. El tBOOH s'ha establert com l'inductor d'estrès oxidatiu a utilitzar per a l'avaluació dels efectes antioxidants *in vivo* i la 6-OHDA per a l'estudi dels efectes neuroprotectors d'antioxidants naturals.

La verificació de la capacitat del model d'estrès oxidatiu per a detectar efectes antioxidants s'ha portat a terme amb diferents compostos amb activitat antioxidant ben establerta (quercetina, àcid lipoic i vitamina E). S'han pre-exposat els embrions a aquests compostos, seguidament s'han exposat a tBOOH i s'han comparat les corbes concentració-resposta de letalitat i d'anormalitats morfològiques obtingudes amb les de l'exposició única a tBOOH. L'observació de diferències estadísticament significatives en la comparació de les corbes concentració-resposta en tots els casos, confirmen l'efecte antioxidant dels compostos estudiats i la capacitat del model d'estrès oxidatiu establert per a identificar efectes antioxidants *in vivo*.

- **Efectes neuroprotectors dels polifenols del vi negre**

La identificació dels compostos polifenòlics presents en una mostra de vi negre a la que prèviament se li ha eliminat l'alcohol i en una mostra d'homogenat d'embrions de peix zebra que havien estat exposats a la mostra de vi negre s'ha realitzat mitjançant la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució associada a una trampa linear d'ions i a un espectròmetre de masses Orbitrap (HPLC-LTQ-Orbitrap-MS). Els compostos polifenòlics identificats amb més intensitat en la mostra de vi negre han estat: quercetina, quercetina 3- β -D-glucòsid, kaempferol 3-glucòsid, peonidina 3-glucòsid i malvidina 3-glucòsid. La identificació de compostos polifenòlics en la mostra d'homogenat d'embrions de peix zebra, ha confirmat que aquests poden ser absorbits pels embrions i realitzar funcions antioxidants.

El model d'estrès oxidatiu amb tBOOH s'ha aplicat a cadascun dels compostos polifenòlics identificats amb major intensitat en la mostra de vi negre per a l'avaluació *in vivo* dels seus efectes antioxidants. En tots els casos estudiats, la pre-exposició dels embrions als compostos polifenòlics, seguida de l'exposició a tBOOH ha produït una disminució significativa de la letalitat i de la producció d'anormalitats morfològiques, al comparar-ho amb l'exposició única a tBOOH, indicant un efecte antioxidant *in vivo* d'aquests compostos.

L'avaluació dels efectes neuroprotectors dels compostos polifenòlics del vi negre s'ha portat a terme amb el model d'estrès oxidatiu amb 6-OHDA. S'han pre-exposat els embrions de peix zebra als compostos polifenòlics, seguidament s'han exposat a la 6-OHDA i s'ha realitzat l'avaluació de la distància total recorreguda i l'anàlisi de les neurones dopaminèrgiques. En tots els casos estudiats, la pre-exposició dels embrions als compostos polifenòlics ha produït un augment significatiu de la distància total recorreguda i un augment significatiu del nombre de neurones dopaminèrgiques, al comparar-los amb els embrions únicament exposats a 6-OHDA. Aquests resultats indiquen un efecte neuroprotector dels compostos polifenòlics identificats amb major intensitat en una mostra de vi negre enfront dels efectes de la 6-OHDA en embrions de peix zebra.

- **Model de neuroesferes humanes**

Els efectes de la TCHQ com a inductor d'estrès oxidatiu s'han estudiat en neuroesferes humanes i s'ha observat una disminució significativa de la viabilitat i de la diferenciació a neurones. Així mateix s'han avaluat els efectes dels antioxidants hesperetina i kaempferol i únicament s'han observat efectes significatius en les neuroesferes a les concentracions més altes. La teoria de l'hormesi s'ha aplicat en les neuroesferes i s'ha observat que la pre-exposició d'aquestes a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a un rang de concentracions més elevades de TCHQ, protegeix enfront als efectes oxidants d'aquesta en la viabilitat i la diferenciació a neurones.

Aquesta teoria s'ha aplicat en el model d'embrió de peix zebra. S'han pre-exposat els embrions a una concentració baixa de TCHQ, seguidament s'han exposat a les concentracions de treball de TCHQ i s'han calculat les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques. Al comparar les corbes obtingudes amb les corresponents a l'exposició única a TCHQ s'observa un desplaçament significatiu d'aquestes cap a concentracions majors de TCHQ. Els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen un efecte protector hormètic antioxidant d'una concentració baixa de TCHQ enfront als efectes oxidants d'aquest compost en els embrions de peix zebra.

En resum, mitjançant la integració i combinació de diferents procediments experimentals, s'ha establert un model d'estrès oxidatiu en embrió de peix zebra que permet l'avaluació *in vivo* dels efectes antioxidants dels compostos i d'altres estratègies antioxidants. El model establert s'ha aplicat a l'avaluació dels efectes antioxidants i neuroprotectors de compostos polifenòlics del vi negre.

RESUMEN

El estrés oxidativo es el resultado del desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la actividad de los sistemas de defensa antioxidantes y se ha relacionado con diferentes patologías. Las defensas antioxidantes endógenas y exógenas protegen a las células del daño oxidativo causado por los productos radicalarios. En los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de los efectos protectores de los antioxidantes naturales presentes en los alimentos, siendo los polifenoles los más abundantes en una dieta saludable. Hasta el momento no se dispone de un ensayo específico para la evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos presentes en los alimentos, ya que las estrategias químicas y cultivos celulares utilizadas habitualmente para la evaluación de la actividad antioxidante, generalmente no tienen la capacidad de predecir su eficacia *in vivo*, ni tampoco de determinar los mecanismos de acción por los que actúan. En este sentido, el embrión de pez cebra es un modelo animal que ha sido utilizado para el estudio de alteraciones y enfermedades relacionadas con los procesos oxidativos, ya que presenta genes y enzimas antioxidantes análogos a los sistemas de mamíferos.

Por estos motivos los objetivos de la presente tesis doctoral han incluido el desarrollo de un modelo de estrés oxidativo basado en el embrión de pez cebra para la evaluación de la actividad antioxidante de diferentes compuestos, así como la evaluación del efecto antioxidante *in vivo* y el efecto neuroprotector de compuestos polifenólicos presentes en el vino tinto, mediante el modelo de estrés oxidativo establecido. Así mismo, se han estudiado los efectos del estrés oxidativo y de algunos antioxidantes en el modelo de neuroesferas humanas.

- **Modelo de estrés oxidativo en embrión de pez cebra**

Para establecer el modelo de estrés oxidativo en embrión de pez cebra, primeramente se han caracterizado los efectos de diferentes compuestos inductores de estrés oxidativo (*tert*-butil hidropéroxido, tBOOH; tetraclorohidroquinona, TCHQ; lipopolisacárido de *Escherichia coli*, LPS y 6-hidroxidopamina, 6-OHDA) en el crecimiento y el desarrollo embrionario del pez cebra y se han calculado las curvas concentración-respuesta para letalidad y para anomalías morfológicas de cada inductor.

Para comprobar el mecanismo oxidativo de los efectos observados en la exposición de los embriones a los inductores de estrés oxidativo, se ha llevado a cabo una estrategia de modulación de la respuesta a estrés oxidativo. Los embriones se han pre-expuesto a compuestos que pueden aumentar el estatus antioxidante (N-acetil-L-cisteína, NAC y *N*_ω-Nitro L-arginina metil éster, L-NAME), o bien disminuir las reservas antioxidantes (dietil maleato, DEM y DL-butionina sulfoximina, BSO), seguidamente se han expuesto a los inductores de estrés oxidativo y se han comparado las curvas concentración-respuesta de letalidad y anomalías morfológicas con las curvas obtenidas en la exposición única a los inductores de estrés oxidativo. Si el compuesto estudiado actúa por un mecanismo oxidativo, se observan diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las curvas concentración-respuesta. Los efectos producidos en la exposición de los embriones a tBOOH, TCHQ y 6-OHDA han sido debidos a un mecanismo de estrés oxidativo. El tBOOH se ha establecido como el inductor de estrés oxidativo a utilizar para la evaluación de los efectos antioxidantes *in vivo* y la 6-OHDA para el estudio de los efectos neuroprotectores de los antioxidantes naturales.

La verificación de la capacidad del modelo de estrés oxidativo para detectar efectos antioxidantes se ha llevado a cabo con diferentes compuestos con actividad antioxidante bien establecida (quercetina, ácido lipoico y vitamina E). Se han pre-expuesto los embriones a estos compuestos, seguidamente se han expuesto a tBOOH y se han comparado las curvas concentración-respuesta de letalidad y de anomalías morfológicas obtenidas con las de la exposición única a tBOOH. La observación de diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las curvas concentración-respuesta en todos los casos, confirman el efecto antioxidante de los compuestos estudiados y la capacidad del modelo de estrés oxidativo establecido para identificar efectos antioxidantes *in vivo*.

- **Efectos neuroprotectores de los polifenoles del vino tinto**

La identificación de los compuestos polifenólicos presentes en una muestra de vino tinto a la que previamente se le ha eliminado el alcohol y en una muestra de homogenado de embriones de pez cebra que habían sido expuestos a la muestra de vino tinto se ha realizado mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución asociada a una trampa linear de iones y a un espectrómetro de masas Orbitrap (HPLC-LTQ-Orbitrap-MS). Los compuestos polifenólicos identificados con más intensidad en la muestra de vino tinto han sido: quercetina, quercetina 3- β -D-glucósido, kaempferol 3-glucósido, peonidina 3-glucósido y malvidina 3-glucósido. La identificación de compuestos polifenólicos en la muestra de homogenado de embriones de pez cebra, ha confirmado que éstos pueden ser absorbidos por los embriones y realizar funciones antioxidantes.

El modelo de estrés oxidativo con tBOOH se ha aplicado a los compuestos polifenólicos identificados con mayor intensidad en la muestra de vino tinto para la evaluación *in vivo* de sus efectos antioxidantes. En todos los casos estudiados, la pre-exposición de los embriones a los compuestos polifenólicos seguida de la exposición a tBOOH ha producido una disminución significativa de la letalidad y de la producción de anomalías morfológicas respecto la exposición única a tBOOH, indicando un efecto antioxidante *in vivo* de estos compuestos.

La evaluación de los efectos neuroprotectores de los compuestos polifenólicos del vino tinto se ha llevado a cabo con el modelo de estrés oxidativo con 6-OHDA. Se han pre-expuesto los embriones de pez cebra a los compuestos polifenólicos, seguidamente se han expuesto a la 6-OHDA y se ha realizado la evaluación de la distancia total recorrida y el análisis de las neuronas dopaminérgicas. En todos los casos estudiados, la pre-exposición de los embriones a los compuestos polifenólicos ha producido un aumento significativo de la distancia total recorrida y de las neuronas dopaminérgicas, con respecto a la exposición única a 6-OHDA. Estos resultados indican un efecto neuroprotector de los compuestos polifenólicos identificados con mayor intensidad en una muestra de vino tinto frente a los efectos de la 6-OHDA en embriones de pez cebra.

- **Modelo de neuroesferas humanas**

Los efectos de la TCHQ como inductor de estrés oxidativo se han estudiado en neuroesferas humanas y se ha observado una disminución significativa de la viabilidad y de la diferenciación a neuronas. Así mismo se han evaluado los efectos de los antioxidantes hesperetina y kaempferol y únicamente se han observado efectos significativos en las neuroesferas a las concentraciones más altas. La teoría de la hormesis se ha aplicado en las neuroesferas y se ha observado que la pre-exposición de éstas a una concentración baja de TCHQ, seguida de la exposición a un rango de concentraciones más elevadas de TCHQ, protege frente a los efectos antioxidantes de este compuesto en la viabilidad y la diferenciación a neuronas.

Esta teoría se ha aplicado en el modelo de embrión de pez cebra. Se han pre-expuesto los embriones a una concentración baja de TCHQ, seguidamente se han expuesto a las concentraciones de trabajo de TCHQ y se han calculado las curvas concentración-respuesta para la letalidad y para las anomalías morfológicas. Al comparar las curvas obtenidas con las correspondientes a la exposición única a TCHQ se observa un desplazamiento significativo de éstas hacia concentraciones mayores de TCHQ. Los resultados obtenidos en este estudio indican un efecto protector hormético antioxidante de una concentración baja de TCHQ frente a los efectos oxidantes de ésta en los embriones de pez cebra.

En resumen, mediante la integración y la combinación de diferentes procedimientos experimentales, se ha establecido un modelo de estrés oxidativo en embrión de pez cebra que permite la evaluación *in vivo* de los efectos antioxidantes de los compuestos y de otras estrategias antioxidantes. El modelo establecido se ha aplicado a la evaluación de los efectos antioxidantes y neuroprotectores de compuestos polifenólicos del vino tinto.

SUMMARY

Oxidative stress is the result of an imbalance between the production of reactive species and the activity of antioxidant defence systems and it has been related to different pathologies. Antioxidant defences can be endogenous or exogenous and they protect cells against oxidative damage caused by radical products. During the last years, an increasing interest for the study of protective effects of natural antioxidants present in food, being polyphenols the most abundant, has been observed.

Until the moment, there is not a specific assay for the evaluation of the antioxidant capacity of compounds present in food., because the chemical and *in vitro* cell culture assays usually used for the evaluation of the antioxidant capacity, are not adequate to predict the protective effects of antioxidants *in vivo* and they have little predictive power. In this sense, the zebrafish embryo is an animal model which has been used for the study of alterations and diseases related to oxidative processes, because zebrafish embryos present genes and enzymes which are analogous to the systems in mammals.

For these reasons the objectives of the present work have included the development of an oxidative stress model based on the zebrafish embryo for the evaluation of the antioxidant activity of different compounds, and the evaluation of the *in vivo* antioxidant and neuroprotective effects of polyphenolic compounds present in red wine., using the established oxidative stress model. In addition, using the human neurospheres model, the effects of oxidative stress and of some antioxidants have been studied.

- **Oxidative stress model using the zebrafish embryo**

In order to establish the oxidative stress model using the zebrafish embryo, firstly, the effects of different oxidative stress inducers (*tert*-butyl hydroperoxide, tBOOH; tetrachlorohydroquinone, TCHQ; lipopolysaccharides from *Escherichia coli*, LPS and 6-hydroxydopamine, 6-OHDA) on the zebrafish embryonic growth and development were characterized and the concentration-response curves for lethality and dysmorphogenesis were calculated for each of the inducers.

To confirm the oxidative mechanism of the observed effects in the embryos' exposure to oxidative stress inducers, a strategy of modulation of the oxidative stress response was performed. The embryos were pre-exposed to compounds which can increase antioxidant status (N-acetyl-L-cysteine, NAC and *N*_ω-Nitro L-arginine methyl ester, L-NAME) or can decrease antioxidant defences (diethyl maleate, DEM and DL-buthionine sulfoximine, BSO), immediately later they were exposed to oxidative stress inducers and the comparison between the obtained concentration-response curves of lethality and of dysmorphogenesis and the curves obtained in the single exposure to oxidative stress inducers was performed. If the studied compound acted by an oxidative stress mechanism, we would observe statistically significant differences in the comparison of the concentration-response curves. The effects produced in the embryos after the exposure to tBOOH, TCHQ and 6-OHDA were due to an oxidative stress mechanism. tBOOH was established as the oxidative stress inducer to be used in the evaluation of *in vivo* antioxidant effects and 6-OHDA for the study of neuroprotective effects of natural antioxidants.

Verification of the capacity of the oxidative stress model to detect antioxidant effects was performed with different compounds which have a well-established antioxidant activity (quercetin, lipoic acid and vitamin E). Zebrafish embryos were pre-exposed to these compounds and then exposed to tBOOH. The obtained concentration-response curves were compared with the curves of the single exposure to tBOOH. The observation of statistically significant differences in the concentration-response curves in all the studied cases, confirmed the antioxidant effect of the studied compounds and the capacity of the established oxidative stress model to identify *in vivo* antioxidant effects.

- **Neuroprotective effects of polyphenols from red wine**

Identification of polyphenolic compounds present in a red wine sample which was previously dealcoholized and in an homogenate of zebrafish embryos exposed to the red wine sample was performed by high performance liquid chromatography associated to a linear ion trap and to an Orbitrap mass spectrometer (HPLC-LTQ-Orbitrap-MS). Polyphenolic compounds identified with the

highest intensity were: quercetina, quercetin 3- β -D-glucoside, kaempferol 3-glucoside, peonidin 3-glucoside and malvidin 3-glucoside. The identification of polyphenolic compounds in the zebrafish embryo homogenate sample, has confirmed that polyphenols can be absorbed by the zebrafish embryos and they can perform antioxidant functions.

The oxidative stress model with tBOOH was applied to each of the polyphenolic compounds that were identified with higher intensity in the red wine sample for the *in vivo* evaluation of their antioxidant effects. In all the studied cases, pre-exposure of the embryos to polyphenolic compounds, followed by the exposure to tBOOH, produced a significant decrease in lethality and in dysmorphogenesis, when they were compared to the single exposure to tBOOH, indicating an *in vivo* antioxidant effect of these compounds.

Evaluation of neuroprotective effects of red wine polyphenolic compounds was performed with the oxidative stress model with 6-OHDA. Zebrafish embryos were pre-exposed to polyphenolic compounds and then exposed to 6-OHDA. The evaluation of the total distance moved and the analysis of dopaminergic neurons were performed. In all the studied cases, pre-exposure of the embryos to polyphenolic compounds produced a significant increase in the total distance moved and a significant increase of the dopaminergic neurons, respect to the single exposure to 6-OHDA. These results indicated a neuroprotective effect of the polyphenolic compounds which were identified with the highest intensity in a red wine sample, against 6-OHDA effects in zebrafish embryos.

- **Human neurospheres model**

TCHQ effects as an oxidative stress inducer was studied in human neurospheres, and a significant decrease in viability and in neurons' differentiation was observed. In addition, the effects of the antioxidants hesperetina and kaempferol were also studied and the only observed effects were at the highest studied concentration. The hormesis theory was applied to the neurospheres model and it was observed that the pre-exposure of these cells to a low concentration of TCHQ, followed by the exposure to a range of higher concentrations of TCHQ protected against the effects of this compound in viability and neurons' differentiation.

This theory was applied to the zebrafish embryo model. Embryos were pre-exposed to a low concentration of TCHQ and then they were exposed to the working concentrations of TCHQ. The concentration-response curves for lethality and for dysmorphogenesis were calculated and compared with the curves of the single exposure to TCHQ. A significant drift of the pre-exposure concentration-response curves to higher concentrations of TCHQ indicate a hormetic antioxidant protective effect of a low concentration of TCHQ against the oxidant effects of this compound in zebrafish embryos.

In summary, with the integration and combination of different experimental procedures, an oxidative stress model using the zebrafish embryo has been established. This model allows the *in vivo* evaluation of antioxidant effects of compounds and other antioxidant strategies. The established model has been applied to the evaluation of antioxidant and neuroprotective effects of red wine polyphenolic compounds.

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ESTRÈS OXIDATIU

Els radicals lliures són espècies químiques que es formen contínuament com a conseqüència del metabolisme oxidatiu cel·lular. Es caracteritzen perquè presenten un o més electrons desaparellats. Aquest fet els hi proporciona un alt grau de reactivitat, produint una cascada de reaccions que generen més espècies radicalàries. Els radicals poden ser derivats tòxics, ja que són altament reactius enfront de molècules presents en els sistemes biològics (Halliwell i Gutteridge, 1988).

L'oxigen és un element essencial per a la vida de les cèl·lules i participa en les reaccions de metabolisme, fonamentalment en la cadena de transport d'electrons del mitocondri. Els radicals derivats d'aquestes reaccions representen les espècies radicalàries més importants en els éssers vius i es designen com espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquestes poden danyar orgànuls cel·lulars, produir la mort d'aquestes cèl·lules i, per aquest motiu, han estat implicades en la fisiopatologia d'una gran varietat de malalties (Annunziato et al., 2003; Gupta et al., 2007; Kovacic i Somanathan, 2006; Kowaltowski i Vercesi, 1999). Paral·lelament, els productes reactius derivats de les reaccions en les que intervé el nitrogen es denominen espècies reactives de nitrogen (RNS), i l'òxid nítric (NO) n'és el principal exponent. El NO es genera en els teixits biològics a partir de l'enzim sintasa de NO (NOS) i actua en la senyalització biològica de diferents processos fisiològics (Valko et al., 2007).

Les ROS i les RNS presenten un paper dual en els éssers vius, ja que poden produir efectes beneficiosos o perjudicials depenent dels nivells en els que es presenten i les dianes en les que actuen. Generalment, a concentracions baixes, formen part de sistemes de senyalització cel·lular i també estan relacionats amb respostes cel·lulars de defensa enfront a agents infecciosos. Mentre que a concentracions altes, poden produir dany oxidatiu en l'ADN, les proteïnes i els lípids, que pot ser el desencadenant de diferents malalties com són el càncer, l'arteriosclerosi, l'artritis i les patologies neurodegeneratives, entre altres (Valko et al., 2006).

Les cèl·lules tenen diferents sistemes antioxidants enzimàtics (enzims antioxidants) i no enzimàtics (compostos antioxidants) com a estratègia defensora enfront als efectes que poden produir les espècies reactives d'oxigen i de nitrogen (Gülçin, 2012). En condicions fisiològiques, existeix un equilibri entre la producció d'espècies reactives i l'activitat de les defenses antioxidants, que manté l'homeòstasi cel·lular. Quan es produeix un desequilibri, degut a un augment de la producció d'espècies reactives, o bé a una disminució dels sistemes de defensa antioxidants, es produeix l'estat denominat estrès oxidatiu (EO) (Figura 1), que pot provocar danys o disfunció cel·lular (Gupta et al., 2007).

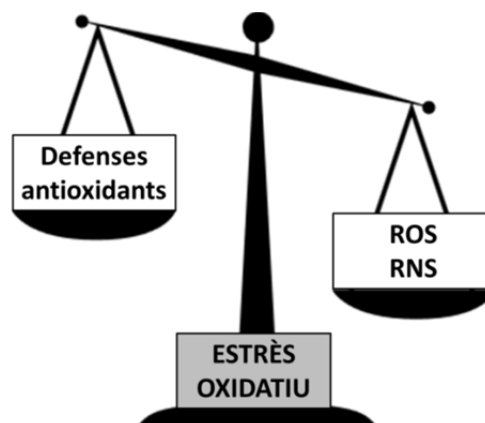


Figura 1: Desequilibri entre les espècies reactives, d'oxigen i de nitrogen, i les defenses antioxidants que condueix a la producció d'estrès oxidatiu.

(Elaboració pròpia)

L'EO és un fenomen complex i les seves conseqüències poden ser molt variades depenent de les espècies reactives implicades, l'estructura subcel·lular on s'han generat, els òrgans o teixits implicats en l'efecte i les característiques genètiques de l'organisme, entre altres factors (Valko et al., 2006).

Els processos fisiològics regulats per reaccions redox, són sensibles als efectes dels ROS. Per aquest motiu, l'EO està implicat en diferents situacions patològiques a nivell cardiovascular, neurològic, en la diabetis, el càncer i altres malalties, així com en l'envelliment i en malalties relacionades amb l'edat, com són les malalties neurodegeneratives (Dröge, 2002).

La teoria del paper dels radicals lliures en el procés d'envelliment va ser formulada per primera vegada en l'estudi de Harman (1956). L'envelliment és un procés caracteritzat per una disminució progressiva de les funcions fisiològiques i un augment de la mortalitat cel·lular. Degut a la capacitat de deteriorament oxidatiu de l'ADN, les proteïnes i els lípids, els ROS han estat implicats com una de les causes de l'envelliment. Els ROS estan associats als danys típics de l'edat en les macromolècules i poden causar trastorns en la senyalització cel·lular produint EO i diverses malalties (Bouzid et al., 2015).

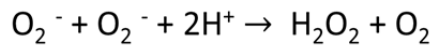
1.2. ANTIOXIDANTS

Un antioxidant es pot definir com aquella substància que a concentracions baixes, comparades amb les concentracions del substrat oxidable en el que actua, retarda o inhibeix l'oxidació d'aquell substrat. Degut a que els radicals lliures tenen la capacitat de reaccionar de forma indiscriminada sobre qualsevol component cel·lular, existeixen una gran quantitat de defenses antioxidants endògenes i exògenes, presents en els diferents òrgans cel·lulars, així com en la membrana, per tal de protegir les cèl·lules del dany oxidatiu. (Pisoschi i Pop, 2015; Young i Woodside, 2001).

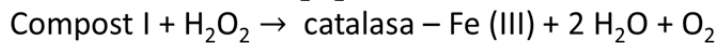
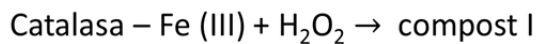
Les defenses antioxidants es poden dividir en tres grans grups (Figura 2):

- Enzims antioxidants, catalitzen la degradació de ROS, RNS i prevenen la formació d'altres radicals. Els principals enzims antioxidants són:

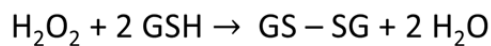
- *Superòxid dismutases*: transformen l'anió superòxid a peròxid d'hidrogen.



- *Catalasa*: catalitza la conversió de peròxid d'hidrogen a aigua i oxigen, en dos etapes.



- *Glutatió peroxidasa*: catalitza l'oxidació del glutatió reduït.



- Antioxidants que prevenen reaccions en cadena. Quan un radical lliure interacciona amb una altra molècula, es poden generar radicals secundaris que, a la vegada poden reaccionar amb altres dianes, de manera que s'iniciïn reaccions en cadena amb altres dianes que produeixen encara més espècies radicalàries. Els antioxidants que trenquen cadenes són compostos que poden rebre o donar electrons a un radical i formar compostos intermediaris estables. Com a conseqüència de la reacció, l'antioxidant s'oxida i ha de ser regenerat o substituït per tal de tornar a ser actiu.

Aquests antioxidants es distribueixen en dos compartiments, de fase lipídica i de fase aquosa:

- Fase lipídica: segresten radicals en membranes cel·lulars i en partícules de lipoproteïnes. Són antioxidants exògens que s'aporten a través de la dieta. Els principals exponents són els *tocoferols*, principalment la vitamina E, que actuen sobre la peroxidació lipídica; els *carotenoids*, que inclouen el β -carotè i el licopè, i tenen un paper important en la captació de ROS, com l'oxigen singlet; els *flavonoids*, entre el que es troben la quercetina, la rutina, l'apigenina i el kaempferol, que actuen sobre la peroxidació lipídica i també segresten radicals superòxid i finalment l'*ubiquinol*, que és la forma reduïda del coenzim Q10 i actua principalment en la peroxidació lipídica.
- Fase aquosa: aquests antioxidants capten radicals lliures del compartiment aquós de les cèl·lules i poden ser exògens o endògens. Els principals antioxidants que formen part d'aquest grup són l'*ascorbat*, o vitamina C, que actua com a cofactor d'un gran nombre de reaccions cel·lulars i té la capacitat de segrestar radicals hidroxil, alcòxil i superòxid; *e*/

glutatió o *altres grups tiol*, com l'albumina o l'acetilcisteïna, que són donadors d'electrons i poden contrarestar els radicals lliures; l'*urat*, ja que presenta propietats protectores enfront a agents oxidants com l'ozó.

- Proteïnes d'unió a metalls de transició, segresten ions ferro i coure, de manera que no estiguin disponibles per a reaccionar amb radicals com el superòxid i el peròxid d'hidrogen. D'aquesta manera, s'evita la formació del radical hidroxil, que és altament reactiu.

Aquestes proteïnes són:

- *Transferrina*, proteïna transportadora de ferro cap a l'espai intracel·lular.
- *Ferritina*, proteïna encarregada d'emmagatzemar i alliberar ferro a l'organisme.
- *Lactoferrina*, proteïna transportadora de ferro cap a l'espai intracel·lular.
- *Ceruloplasmina*, proteïna transportadora de coure sanguini.

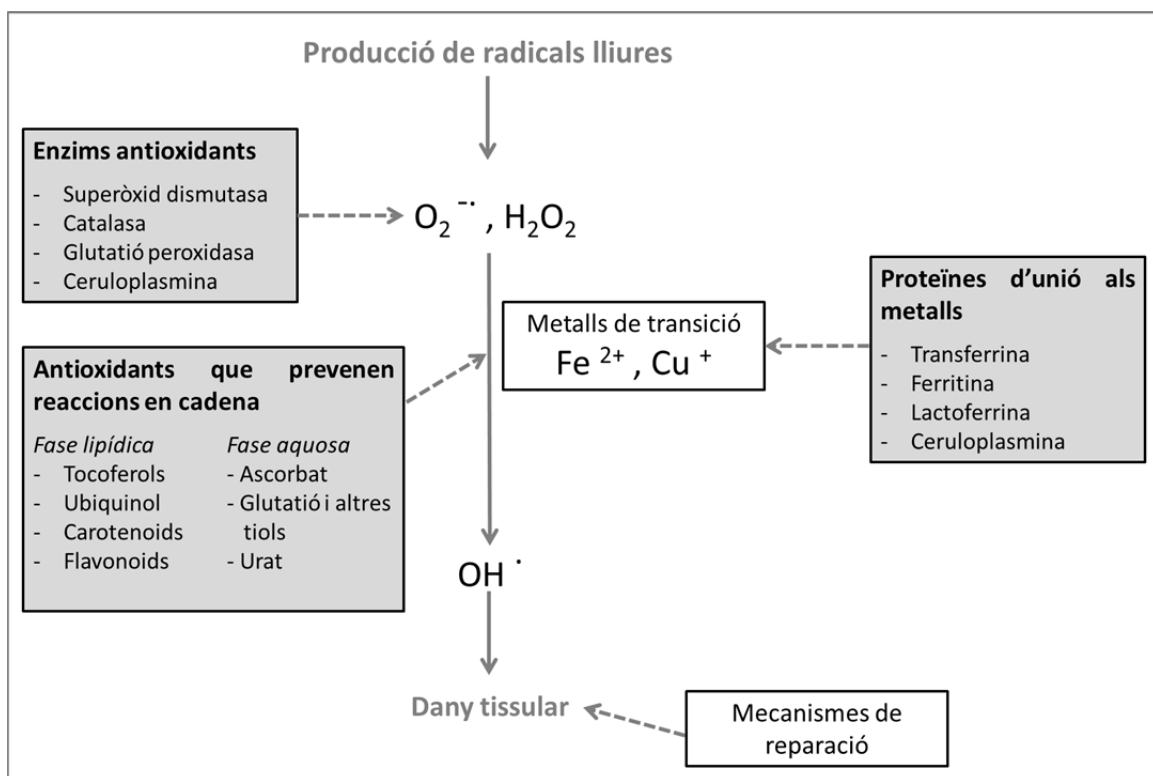


Figura 2: Esquema dels diferents tipus de defenses antioxidants enfront a l'atac dels radicals lliures. (Adaptada de Young i Woodside 2001)

1.3. ANTIOXIDANTS NATURALS

La dieta Mediterrània es caracteritza per una elevada ingesta d'oli d'oliva, fruites, nous, verdures i cereals; una ingesta moderada de carn i peix; i una ingesta baixa de productes làctics, carn vermella i dolços. Així mateix, també es presenta un consum moderat de vi juntament amb els àpats. Respecte els seus nutrients, la dieta Mediterrània és molt rica en àcids grassos mono i poliinsaturats i també en polifenols (Estruch et al., 2013).

Els polifenols són els compostos antioxidants més abundants presents en una dieta saludable, com és la dieta Mediterrània (Tresserra-Rimbau et al., 2013). Són compostos bioactius que formen part de fruites, verdures, cereals, llegums, xocolata i begudes derivades de plantes com el te, el cafè i el vi negre (Scalbert et al., 2005; Vallverdú-Queralt et al., 2014). Aquests compostos es distribueixen en plantes alimentàries on realitzen funcions relacionades amb el creixement, la reproducció, la senyalització i l'atac contra radicals lliures, així com la defensa contra patògens i atacs parasitaris (De Nisco et al., 2013). Els polifenols es divideixen en diferents classes en funció de la seva estructura química: àcids hidroxibenzoics, àcids hidroxicinnàmics, antocianines, proantocianidines, flavanols, flavones, flavanols, flavanones, isoflavones, estilbens i lignans. Les seves propietats, així com la seva biodisponibilitat i cinètica plasmàtica és diferent en funció del tipus de polifenol, de l'aliment del que prové i de les diferents formes polifenòliques que conté l'aliment (Manach et al., 2005) (Figura 3).

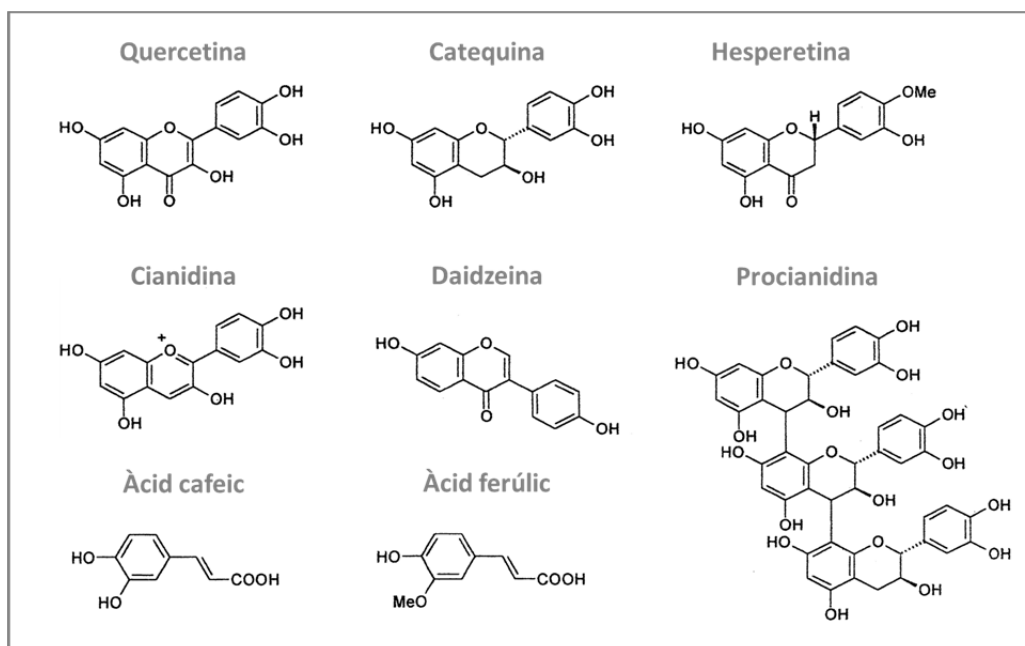


Figura 3: Estructures químiques d'alguns polifenols.
(Adaptada de Scalbert et al., 2005)

En els darrers anys, ha augmentat considerablement l'interès per l'estudi dels efectes protectors dels antioxidants naturals presents en els aliments. Aliments i begudes riques en polifenols han demostrat els seus efectes preventius en alteracions com la hipertensió, les malalties cardiovasculars, l'ictus i la demència, i s'ha plantejat l'opció que es puguin desenvolupar productes rics en polifenols per al manteniment de la funció vascular al llarg de la vida (Estruch et al., 2013; Ghosh i Scheepens, 2009; Medina-Remón et al., 2015). Els polifenols també poden actuar en el procés carcinogènic mitjançant diferents mecanismes, entre els que es trobarien la prevenció del dany oxidatiu a l'ADN i la inhibició de factors de transcripció, que tenen un paper essencial en el càncer (Scalbert et al., 2005; Ahmad et al., 2000).

A l'envellir, disminueixen les defenses antioxidants de l'organisme i, per tant, augmenta la possibilitat de dany oxidatiu. L'activació de vies antioxidants és especialment important en teixits que presenten poques defenses antioxidants, com és el cervell (Scapagnini et al., 2011). Per aquest motiu, les molècules antioxidants naturals s'han proposat com una alternativa farmacològica per a la prevenció de malalties neurològiques relacionades amb l'edat, com per exemple la malaltia d'Alzheimer i la malaltia de Parkinson (Albarracin et al., 2012).

1.4. MALALTIES NEURODEGENERATIVES

El terme “malalties neurodegeneratives” descriu un rang d'alteracions espontànies i hereditàries que es caracteritzen per una disfunció progressiva del sistema nerviós que, en funció de la malaltia, resulta en una degeneració selectiva de neurones en el cervell o en la medul·la espinal. A mesura que aquestes neurones moren, els símptomes de la malaltia s'agregen progressivament. Per aquest motiu, la majoria de les malalties neurodegeneratives, amb el temps, acaben produint la mort del pacient afectat (Coppedè i Migliore, 2014).

El cervell és un òrgan especialment vulnerable als efectes de l'EO degut al seu elevat consum d'oxigen, l'alt contingut d'àcids grassos poliinsaturats, l'escassetat de defenses antioxidants i la presència de components que intervenen en les reaccions redox, com són els ions coure i ferro. Un efecte de l'EO sobre les cèl·lules del sistema nerviós podria desencadenar una sèrie de reaccions, especialment a nivell mitocondrial, que acabessin contribuint a l'aparició de malalties neurodegeneratives (Annunziato et al., 2003). Degut a les pròpies característiques del cervell i al fet que l'EO augmenta amb l'envelliment, el dany oxidatiu es considera una causa important de malalties relacionades amb l'edat com són el Parkinson i l'Alzheimer (Scapagnini et al., 2011; Valko et al., 2007).

La malaltia d'Alzheimer és una patologia neurodegenerativa caracteritzada per una pèrdua progressiva de la memòria i una alteració de la cognició. Les principals característiques fisiopatològiques d'aquesta malaltia es basen en la deposició de plaques del pèptid β -amiloide en les sinapsis neuronals, així com la hiperfosforilació de la proteïna tau (Serrano-Pozo et al., 2011). S'ha vist que la toxicitat induïda pel pèptid β -amiloide pot estar relacionada amb la disrupció de la transmissió sinàptica, l'acumulació de cabdells neurofibrilars i l'activació de vies apoptòtiques mitocondrials que conduirien a la mort cel·lular de les neurones. Així mateix, s'ha observat un efecte de l'augment de la producció de radicals lliures com a conseqüència de l'agregació de pèptid β -amiloide que produiria EO i apoptosi (Selvatici et al., 2013). Per aquests motius, s'han proposat els compostos antioxidants com a productes per a la millora de la toxicitat produïda pel pèptid β -amiloide (Badshah et al., 2015).

La malaltia de Parkinson es caracteritza per una pèrdua de neurones que és selectiva de l'àrea cerebral denominada substantia nigra pars compacta (Figura 4). Les neurones d'aquesta àrea estan relacionades amb el control motor i de la coordinació, envien projeccions neuronals a través de la via nigroestriatal cap al nucli estriat on alliberen dopamina. La pèrdua de neurones en aquesta àrea porta com a conseqüència una disminució dels nivells de dopamina en el nucli estriat, i aquesta és una de les causes de la simptomatologia típica en el moviment de les persones afectades per aquesta malaltia (Halliday et al., 2014).

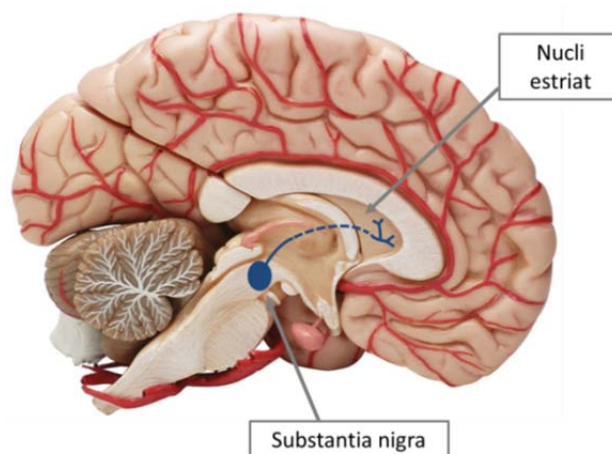


Figura 4: Cervell humà on es representa l'àrea corresponent a la *substantia nigra* i les projeccions neuronals que s'envien al nucli estriat (adaptada de www.batanga.com/ciencia-y-tech).

La causa d'aquesta malaltia, així com els mecanismes responsables de la pèrdua de neurones dopaminèrgiques, són desconeguts. Tot i així, s'han relacionat anormalitats en la funció mitocondrial que condueixen a la presència d'EO a nivell cerebral, amb el mecanisme patològic de la malaltia de Parkinson, ja que la integritat mitocondrial és essencial per al manteniment de les funcions neuronals i dels mecanismes antioxidants. Així doncs, el dany oxidatiu és tòxic per a les neurones (Abdullah et al., 2015; Jenner, 2003).

S'ha postulat que els efectes de l'envelliment causarien una cascada d'esdeveniments que portarien com a conseqüència la degeneració de les neurones dopaminèrgiques de la substantia nigra, així com la seva capacitat de resposta als atacs que formen part del procés de la malaltia de Parkinson. A més a més la disfunció mitocondrial, així com alteracions en les vies de degradació de les proteïnes, serien més perjudicials per a les neurones de la substantia nigra que per les neurones d'altres àrees cerebrals (Garcia-Garcia et al., 2012; Reeve et al., 2014; Tretter et al., 2004).

1.5. POLIFENOLS DEL RAÏM I DEL VI NEGRE, NEUROPROTECCIÓ

El raïm negre, *Vitis vinifera*, es consumeix com a fruita, fruita seca (panses), suc o vi negre. La fruita del raïm conté diferents elements nutritius com vitamines, minerals, carbohidrats, fibra i compostos bioactius. Els polifenols són els principals compostos bioactius presents en el raïm i en el vi negre. Inclouen els flavonols, la catequina, l'epicatequina, les proantocianidines, les antocianines, els àcids fenòlics i el resveratrol, entre altres (Brown et al., 2009; De Nisco et al., 2013).

Les antocianines són els principals compostos polifenòlics presents en el raïm negre (Xia et al., 2013). Són un grup de compostos que pertanyen a la família dels flavonoides i són els pigments responsables de proporcionar el color violeta característic de la pell i les llavors del raïm negre i, en conseqüència, del vi negre (Figura 5). Aquests compostos, de forma general, presenten unions glicosídiques o èsters amb diferents àcids fenòlics i orgànics (Mortensen, 2006).

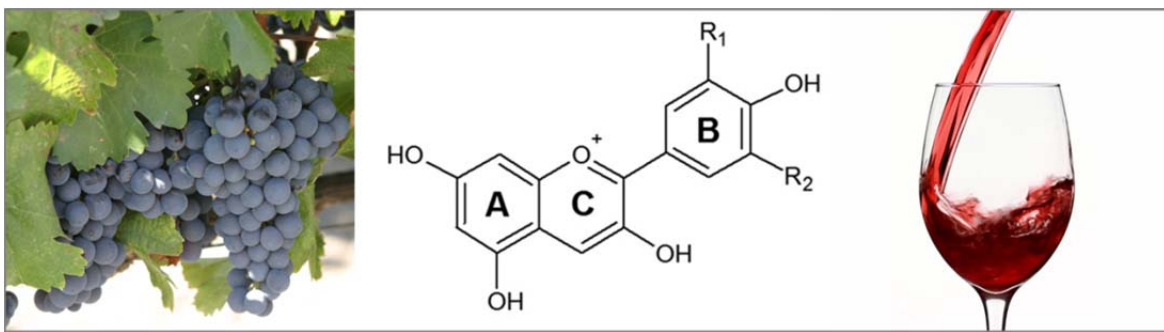


Figura 5: Raïm negre, *Vitis vinifera*; estructura química general de les antocianines; copa de vi negre. (Elaboració pròpia)

Després de la seva administració oral, les antocianines poden ser absorbides a nivell gàstric o intestinal. Algunes poden fer la seva acció en forma glicosilada, sense ser modificades químicament (Cao et al., 2001) i altres són metabolitzades a nivell presistèmic, de manera que són els seus metabòlits qui realitzen l'acció protectora (Fang, 2014).

La denominada "Paradoxa francesa" es pot definir com la protecció enfront a malalties cardiovasculars que s'aconsegueix a partir del consum moderat de begudes alcohòliques, especialment vi. Aquest fenomen va ser descrit per primera vegada per Renaud i De Lorgeril (1992) i fa referència a l'estudi de la composició química i les propietats dels polifenols del raïm i del vi negre en la salut humana. Els polifenols presents en el raïm negre han mostrat efectes beneficiosos en malalties cardiovasculars, alteracions metabòliques i cancerígenes. Aquests efectes protectors s'han relacionat directament amb la seva capacitat antioxidant (Badshah et al., 2015; Kelsey et al., 2011).

Els efectes neuroprotectors dels polifenols han estat estudiats i demostrats *in vitro* en cèl·lules neuronals, on han disminuït la formació de ROS i han augmentat l'activitat antioxidant cel·lular (Guan et al., 2011; Tarozzi et al., 2007). En estudis realitzats en models animals *in vivo*, als que es suplementava la dieta amb polifenols, s'han observat efectes de millora en la cognició i en la memòria (Andres-Lacueva et al., 2005; Obrenovich et al., 2010; Richetti et al., 2011). Els polifenols també han mostrat un efecte protector enfront dels efectes de compostos neurotòxics relacionats amb l'EO (Scalbert et al., 2005; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2012; Yuan et al., 2013).

Degut a que l'EO és una de les principals característiques de les malalties neurodegeneratives, l'estudi dels compostos amb capacitat neuroprotectora, com els polifenols, que puguin ser diana farmacològica per aquestes malalties, esdevé especialment important (Albarracin et al., 2012). Un dels inconvenients de l'ús de compostos antioxidants presents en la dieta com una forma de tractament de malalties neurodegeneratives és la dificultat que presenten aquests compostos per assolir una concentració

efectiva en el cervell (Scapagnini et al., 2011). Tot i així, s'han realitzat estudis *in vivo* de determinació de polifenols en el cervell d'animals tractats amb aquests compostos, així com estudis amb models de barrera hematoencefàlica humana, que han demostrat la capacitat dels antioxidants estudiats per a travessar la barrera hematoencefàlica i arribar al sistema nerviós central, on podrien realitzar l'acció neuroprotectora (Andres-Lacueva et al., 2005; Faria et al., 2014; Kalt et al., 2008; Pasinetti et al., 2011).

1.6. TÈCNiques D'avaluació de la capacitat antioxidant

En les últimes dècades, l'interès per l'estudi dels efectes antioxidants dels compostos naturals presents en els aliments, ha augmentat considerablement. Per aquest motiu, s'han desenvolupat diferents mètodes *in vitro*, així com determinacions *in vivo* per a l'avaluació de la capacitat antioxidant d'aquests productes (Gülçin, 2012).

Fins el moment, no es disposa d'un assaig específic per a l'avaluació de la capacitat antioxidant dels compostos presents en els aliments. Els mètodes d'avaluació de la capacitat antioxidant disponibles actualment es poden classificar en tres tipus en funció del procediment que utilitzen: assaigs químics, cultius cel·lulars i mètodes *in vivo* (Tsoi et al., 2015).

Els assaigs químics d'avaluació de la capacitat antioxidant es basen en dos mecanismes pels quals els antioxidants poden desactivar els radicals, la transferència d'àtoms d'hidrogen (HAT) i la transferència d'electrons (SET) (Prior et al., 2005).

Els principals mètodes que es basen en el mecanisme HAT són:

- Assaig ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*): mesura la capacitat de l'antioxidant d'inhibir les reaccions d'oxidació induïdes pel radical peroxil (Cao et al., 1993).
- Assaig TRAP (*Total radical-trapping antioxidant parameter*): mesura el consum d'oxigen durant una reacció controlada de peroxidació lipídica induïda per la descomposició tèrmica d'un compost azo (Wayner et al., 1985).

El mètode més utilitzat que es basa en el mecanisme SET és:

- Assaig FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*), que mesura l'habilitat dels antioxidants de reduir el compost fèrric 2,4,6-tripiridyl-s-triazina $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^3$, al complex ferrós de color blau intens $[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, en medi àcid (Benzie i Strain, 1996).

Així mateix, hi ha mètodes que utilitzen alhora mecanismes de HAT i SET com són:

- Assaig DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil): El DPPH és un radical orgànic de nitrogen que és estable. L'assaig es basa en la mesura de la capacitat dels antioxidants per a reduir el DPPH (Brand-Williams et al., 1995).
- Assaig Folin-Ciocalteu (F-C) o assaig dels polifenols totals: Es basa en la reacció de transferència d'electrons dels components fenòlics cap al reactiu de F-C, format per una mescla de fosfomolibdat i fosfotungstè, en medi alcalí (Singleton et al., 1999).

A pesar de que els mètodes químics són àmpliament utilitzats, la seva habilitat per predir els mecanismes d'acció i l'activitat *in vivo* dels antioxidants és qüestionable. Aquests mètodes no utilitzen substrats biològics, de manera que les característiques físiques de les reaccions es donen en condicions de pH i temperatura no fisiològiques, i no es tenen en compte característiques farmacocinètiques com la biodisponibilitat, recaptació i metabolisme dels compostos. Degut a que els antioxidants poden actuar per diferents mecanismes, s'han desenvolupat mètodes d'avaluació de la capacitat antioxidant que utilitzen diferents sistemes biològics, per tal d'obtenir major informació en els assaigs realitzats (Frankel i Finley, 2008; Liu i Finley, 2005).

Els mètodes basats en cultius de diferents línies cel·lulars (Caco-2, HepG2, MCF-7, etc.) permeten estudiar la influència de les característiques intracel·lulars en l'activitat dels antioxidants i poden ser estratègies útils per a l'estudi inicial i el cribatge de la capacitat antioxidant dels compostos (Becker et al., 2014).

- L'assaig d'activitat antioxidant cel·lular (CAA) utilitza la capacitat dels radicals peroxil i dels productes reactius derivats de la peroxidació lipídica per a la formació d'un indicador

fluorescent d'EO a partir d'una reacció d'oxidació en un cultiu cel·lular. Mesura la prevenció de l'oxidació per part dels compostos antioxidants (Wolfe i Liu, 2007).

Els mètodes d'avaluació de la capacitat antioxidant *in vivo* generalment es basen en l'avaluació de paràmetres relacionats amb l'EO o l'activitat antioxidant en mostres humanes o obtingudes a partir de models animals. S'analitza l'expressió de gens que codifiquen els enzims antioxidants com la catalasa, la superòxid dismutasa, la glutatí peroxidasa, etc. (Timme-Laragy et al., 2009), així com la seva activitat (Chagas et al., 2015), o bé s'apliquen mètodes químics d'avaluació de la capacitat antioxidant *in vitro* a les mostres obtingudes *in vivo* (Prior i Guohua, 1999).

En l'avaluació *in vivo* de la capacitat antioxidant s'han utilitzat models animals clàssics com el ratolí (Chagas et al., 2015) i la rata (Aly et al., 2012; Speroni et al., 1998). També s'han utilitzat altres models animals com el *Caenorhabditis elegans* (Phulara et al., 2015) i el peix zebra (Zhang et al., 2011).

L'estudi portat a terme per Prior et al., (2005), va determinar que un mètode estàndard per a la determinació de l'activitat antioxidant d'un component alimentari hauria de complir els següents requeriments:

- Utilitzar una font rellevant de radicals lliures.
- Simple.
- Avaluar paràmetres o mecanismes químics concrets.
- Reproduïble.
- Adaptable a l'estudi d'antioxidants de caràcter lipídic i aquós, així com a diferents fonts de radicals.
- Adaptació a estratègies d'alta resolució.

L'activitat i el mecanisme d'acció dels compostos antioxidants naturals depèn de diferents factors entre els que es troben les característiques del sistema utilitzat, les condicions d'oxidació, la cinètica de la reacció i el substrat utilitzat, entre altres. Aquest fet dificulta el desenvolupament d'un mètode estàndard per a l'avaluació dels múltiples efectes dels antioxidants naturals (Frankel i Finley, 2008). Tot i així, es creu que per tal d'avaluar el potencial antioxidant d'un compost, un mètode que inclogui una tècnica *in vivo*, que permeti l'anàlisi en diferents temps i integri diferents respostes fisiològiques i patològiques, produiria millors resultats, ja que l'EO implica mecanismes que depenen de molt diverses variables (Prieto i Murado, 2014).

1.7. PEIX ZEBRA

El peix zebra (*Danio rerio*, ZF) és un peix tropical de la família *Cyprinidae*, originari dels rius de la Índia i el sud d'Àsia. És un dels models vertebrats més utilitzats en ciència, concretament en genètica, biologia del desenvolupament, neurofisiologia i biomedicina (Grunwald i Eisen, 2002; Rubinstein, 2003).

El model d'embrió de ZF ha estat àmpliament utilitzat, ja que presenta una sèrie de característiques que el fan útil per a l'estudi dels efectes dels compostos químics:

- Desenvolupament embrionari ràpid: Els embrions de ZF es desenvolupen fora de la mare. La seva estructura corporal està formada a les 24 hores post-fecundació (hpf), els embrions surten de la membrana coriònica que els envolta a les 48-72 hpf. Als 5 dies post-fecundació (dpf) es completa l'organogènesi i al cap de 3 mesos són sexualment madurs i són considerats adults (Kimmel et al., 1995) (Figura 6).
- Membrana coriònica transparent: Permet l'observació directa dels embrions i el seu desenvolupament sense necessitat de tincions o altres manipulacions.
- Fàcil manteniment al laboratori: El ZF és un peix petit i robust que en la seva forma adulta, pot arribar a mesurar uns 4 - 5 cm, de manera que es poden mantenir un gran nombre d'exemplars en un espai limitat. No necessiten condicions especials per al seu manteniment, que és econòmic. Els embrions presenten una mida petita, d'uns 0,7 mm de diàmetre, de manera que comparativament, es requereix menys espai i material per a treballar que en altres models animals (Spence et al., 2008).
- Elevat nombre d'embrions: Una femella pot posar aproximadament 100 ous al dia, que seran fecundats a l'aigua per l'esperma alliberat pels mascles. En les condicions de laboratori, es poden obtenir diàriament milers d'embrions per a ser utilitzats experimentalment (Scholz et al., 2008).
- El genoma del ZF està seqüenciat: El projecte de seqüenciació del ZF va començar l'any 2001 com una iniciativa del Wellcome Trust Sanger Institute (www.sanger.ac.uk/resources/zebrafish/genomeproject.html). S'ha vist que aproximadament un 70% dels gens humans tenen un ortòleg en ZF. A més a més, aproximadament un 80% dels gens associats a malalties en humans, tenen el seu homòleg en ZF (Howe et al., 2013).
- Els ZF presenten moltes similituds amb altres vertebrats: El model de l'embrió de ZF ha estat utilitzat per l'estudi de diferents alteracions i malalties humanes, com són la inflamació (Park i Cho, 2011), l'envelliment (Kishi et al., 2008), la teratogènia (Reimers et al., 2006), les malalties neurodegeneratives (Xi et al., 2011), el càncer (Tobia et al., 2011) i les malalties cardiovasculars (Bakkers, 2011), entre altres.
- Els ZF ofereixen la possibilitat de combinar assaigs a nivell bioquímic, cel·lular i molecular, amb observacions generals a nivell morfològic i funcional (De Esch et al., 2012).
- Avantatges experimentals: Comparats amb altres models animals, es pot utilitzar un nombre significatiu de ZF en cada tractament d'estudi. Degut a la seva mida petita, es requereixen mínimes quantitats de la substància a testar (aproximadament 1 µg) per cada grup de tractament (Parng et al., 2006).
- Cribatge ràpid de substàncies *in vivo*: Els assaigs amb embrions de ZF permeten un anàlisi ràpid del fenotip dels embrions tractats, els experiments són de durada curta i poden ser aplicats a tecnologies *high-throughput* (Rubinstein, 2003).

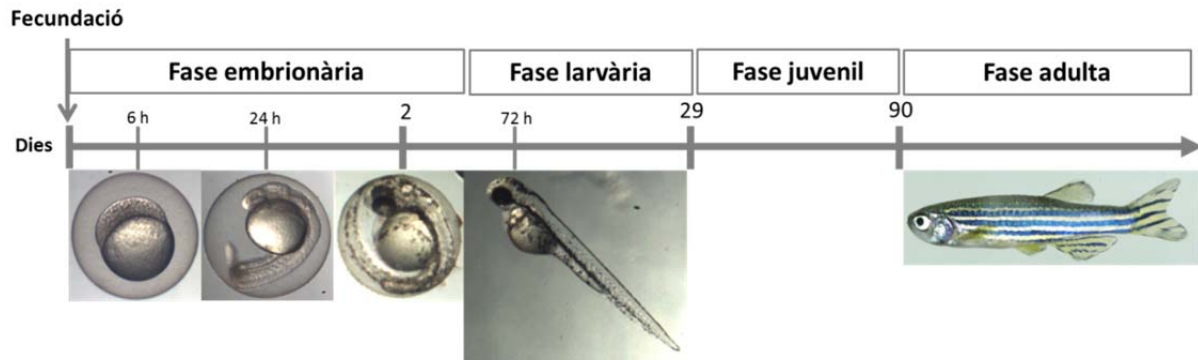


Figura 6: Esquema del desenvolupament del peix zebra: fase embrionària, larvària, juvenil i adulta. embrions de peix zebra dins de la membrana coriònica a les 6, 24 i 48 hores post-fecundació; larva de peix zebra a les 72 hores post-fecundació i peix zebra adult.
(Elaboració pròpia)

L'assaig amb embrions de peix (FET – *Fish embryo test*), ha estat aprovat a nivell internacional per la Organització per a la Cooperació Econòmica i el Desenvolupament (OECD) (OECD, 2013). Aquest assaig està dissenyat per a la determinació de la toxicitat aguda de compostos químics en els estadis embrionaris del ZF. Ha estat aplicat satisfactòriament a l'avaluació dels efectes de substàncies amb diferents mecanismes d'acció i característiques físiques i químiques (Belanger et al., 2013; Braunbeck et al., 2005; Gustafson et al., 2012; Lammer et al., 2009).

A la Unitat de Toxicologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona s'ha realitzat una adaptació del FET amb embrions de ZF, per a l'avaluació de la teratogènia, basada en el treball de Nagel (2002), al qual s'ha afegit l'avaluació dels embrions exposats mitjançant un sistema de puntuació morfològica total (Teixidó et al., 2013). Aquest sistema ha estat utilitzat per a l'avaluació dels efectes de diferents compostos sobre el creixement i el desenvolupament embrionari (Boix et al., 2015; Teixidó et al., 2013; Teixidó et al., 2015).

Moltes de les defenses antioxidants en humans responen al factor de transcripció ARE (element de resposta antioxidant) i al factor NRF2 (Factor nuclear (erythroid-derived 2)-like 2). En condicions en que no es presenta EO, el factor NRF2 està unit a la proteïna KEAP1 (Kelch-like associated protein ECH-1) en el citoplasma, on acabarà essent degradat. Quan la proteïna KEAP1 detecta ROS, el factor NRF2 es transloca al nucli de la cèl·lula, s'uneix a les regions promotores de l'ARE i activa una sèrie de gens que codifiquen per a proteïnes antioxidants i enzims per a la síntesi de glutatió, entre altres (Kobayashi et al., 2006).

Els embrions de ZF presenten gens i enzims antioxidants de la via NRF2 anàlegs als sistemes antioxidants en mamífers (Timme-Laragy et al., 2012, 2009) i suposen un bon sistema per a l'estudi de l'expressió i la inducció de diferents gens en circumstàncies d'EO (Nakajima et al., 2011). A més a més, tenen la capacitat de respondre de forma robusta a factors patològics relacionats amb l'EO (Chen et al., 2012) i s'han establert com un organisme model per a l'estudi dels mecanismes oxidatius dels compostos (Fang i Miller, 2012). Per aquest motiu, s'han estudiat els efectes protectors i el mecanisme d'acció d'alguns antioxidants en embrions de ZF exposats a diferents compostos que produeixen toxicitat per via de l'EO (Cordero et al., 2009; Na et al., 2009; Reimers et al., 2006).

L'EO ha estat implicat en diverses condicions patològiques entre les que s'inclouen malalties cardiovasculars, càncer, diabetis, isquèmia i alteracions neurològiques entre altres (Valko et al., 2007). Els efectes de l'EO a nivell neurològic interessen especialment en aquesta tesi doctoral. La neurotoxicitat es defineix com qualsevol efecte advers produït per una substància en el sistema nerviós, les seves estructures o funcions (Crofton et al., 2012). Per altra banda la neuroprotecció es defineix com l'efecte que resulta del rescat, recuperació o regeneració del sistema nerviós, les seves cèl·lules, estructura i funció en resposta o prevenció d'una lesió o alteració (Scapagnini et al., 2011).

El sistema nerviós central del ZF es desenvolupa ràpidament, podent realitzar els primers tests funcionals a partir de les 48 hpf i assaigs més avançats de comportament a partir dels 3-4 dpf. Algunes zones del sistema nerviós dels ZF com l'hipotàlem, el tracte òptic, el sistema olfatori, la medulla espinal i els nervis cranials, així com el sistema de neurotransmissors presenten una homologia clara amb les mateixes àrees rellevants en el cervell humà (De Esch et al., 2012). Aquestes característiques, juntament amb el fet que el sistema nerviós dels ZF és accessible a molècules petites fan que els ZF siguin organismes potencials per a l'avaluació de l'impacte dels compostos en el desenvolupament i la funció neuronal (Guo, 2009).

Els embrions de ZF han estat utilitzats com a model per a l'estudi de neuropaties causades per l'exposició a compostos químics neurotòxics, donat que són transparents i fàcilment accessibles, es poden realitzar anàlisis morfològics, bioquímics o moleculars per a la quantificació d'alteracions que es poden produir en el cervell intacte. La rellevància de les dades obtingudes en ZF en aquests estudis, en referència a la predicció de la neurotoxicitat en mamífers, fan que sigui un model animal alternatiu per a l'estudi de la neurotoxicitat i la neurodegeneració *in vivo* (Parng et al., 2007; Xi et al., 2011).

Pels motius citats anteriorment, els embrions de ZF també poden ser utilitzats per a l'estudi de diferents estratègies neuroprotectores. S'ha vist que en aquest model animal es pot reproduir un patró d'apoptosi cerebral que pot ser avaluat fàcilment; pot ser un bon model de cribatge *in vivo* de substàncies neuroprotectores, ja que permet l'anàlisi quantitatiu d'imatges cerebrals (Parng et al., 2006).

Les avantatges del model d'embrió de ZF descrites en aquest apartat de la tesi doctoral no es presenten en cultius cel·lulars *in vitro*, ni en altres models animals de vertebrats. Aquest model ha emergit com una eina útil per a l'estudi de compostos que tenen efecte en múltiples processos biològics que estan relacionats amb la salut humana (Bugel et al., 2014).

1.8. MÈTODES ALTERNATIUS, MODEL DE NEUROESFERES HUMANES

L'avaluació de la toxicitat en el neurodesenvolupament en els darrers anys ha estat basada en la utilització de models animals *in vivo* i la posterior extrapolació dels resultats als possibles efectes en humans. Els experiments *in vivo* requereixen un gran nombre de vides animals, són complexos i costosos en quant a temps i inversió econòmica (Lee et al., 2012).

El principi de les 3Rs va ser introduït per primera vegada per Russell i Burch (1959) i es basa en la reducció, refinament i reemplaçament de la utilització d'animals en experimentació.

L'any 2001, el centre europeu per a la validació de mètodes alternatius (ECVAM) va aprovar tres mètodes alternatius a l'experimentació animal per a l'avaluació de l'embriotoxicitat, que havien estat validats científicament (Genschow et al., 2001):

- Test de cèl·lules mare embrionàries (EST - *Embryonic Stem-cell Test*); utilitza línies cel·lulars de ratolí i es basa en l'avaluació dels efectes embriotòxics mitjançant dos paràmetres: el diferencial de citotoxicitat entre fibroblasts adults 3T3 i cèl·lules mare embrionàries D3, i el potencial del compost d'estudi per a inhibir la diferenciació de les cèl·lules mares embrionàries D3 (ECVAM DB-ALM, 2010a).
- Test micromass (MM – *Micromass Test*); basat en el cultiu primari de cèl·lules obtingudes dels esbossos de les extremitats anteriors d'embrions de rata de 13 dies. L'avaluació del potencial embriotòxic del compost d'estudi es realitza mitjançant la valoració de la citotoxicitat i la diferenciació a condrocits en els cultius cel·lulars primaris (ECVAM DB-ALM, 2009).
- Cultiu d'embrions sencers de rata *in vitro* (WEC – *Whole Embryo Culture*); comprèn la major part de l'etapa de l'organogènesi i recrea les condicions en què es desenvolupen els embrions a l'úter de la mare. Es basa en el cultiu d'embrions de rata postimplantació de 9,5 dies durant 48 hores. S'avaluen una sèrie de paràmetres relacionats amb el creixement i el desenvolupament dels embrions (ECVAM DB-ALM, 2010b).

El Consell nacional de recerca dels Estats Units, va desenvolupar un informe sobre els assaigs toxicològics en el segle XXI, en el que s'estimula la utilització de recursos més eficients per a l'avaluació de l'exposició i els perills per a la salut humana dels compostos contaminants ambientals (NRC- National Research Council, 2007). En aquest informe es recomana el desenvolupament de nous mètodes que permetin una adquisició ràpida de dades per a ser utilitzades en l'avaluació del risc, incloent el desenvolupament d'eines que permetin reduir el cost i el temps destinats a l'experimentació, com és el cas dels models *in silico* i *in vitro* basats en la biologia humana.

Per aquests motius, s'estan desenvolupant tècniques que proporcionin la possibilitat de testar els compostos de forma ràpida i eficient en sistemes basats en cultius cel·lulars, que puguin ser utilitzats de forma integrada, proporcionar dades per a l'avaluació de la toxicitat de forma dirigida al problema d'estudi i que siguin cost-eficients (Crofton et al., 2012).

Els sistemes cel·lulars humans han estat recomanats per la NRC- National Research Council (2007) com els més rellevants en el context de l'avaluació de la toxicitat en el segle XXI. Aquests poden proporcionar una bona predicció dels efectes tòxics en humans ja que utilitzen material humà *in vitro*.

En aquest sentit, el model de neuroesferes humanes es presenta com una eina útil per a l'estudi dels efectes dels compostos en el desenvolupament del sistema nerviós i les seves funcions. Aquest model és un sistema *in vitro* que consisteix en el cultiu cel·lular primari de cèl·lules progenitores neurals, on creixen en tres dimensions en forma de neuroesferes (Fritsche et al., 2011). El fet que sigui un model en tres dimensions fa que la morfologia i la senyalització cel·lular en les neuroesferes sigui més semblant a la fisiològica, al contrari que en un model en dos dimensions. A més a més, permet la realització de

manipulacions experimentals ràpides, així com l'obtenció de millors imatges, ja siguin fixes o a temps real, que en models animals (Gassmann et al., 2012).

El model de neuroesferes humanes permet mimetitzar i quantificar els processos bàsics del desenvolupament cerebral: proliferació, migració, diferenciació i apoptosi. Així mateix s'han reproduït *in vitro*, efectes neurotòxics observats *in vivo* i és possible adaptar el model a tecnologies de *high throughput* (Fritsche et al., 2005; Gassmann et al., 2012; Moors et al., 2009).

Les neuroesferes poden exposar-se a diferents compostos a través del medi de cultiu. Mitjançant l'avaluació de diferents paràmetres en la proliferació, migració i diferenciació, pot determinar-se la capacitat neurotòxica del compost estudiat (Fritsche et al., 2011) (Figura 7). Mitjançant el model de neuroesferes humanes s'han estudiat els efectes de neurotoxines a nivell funcional i a nivell molecular (Baumann et al., 2015; Breier et al., 2010; Fritsche et al., 2005; Gassmann et al., 2010; Moors et al., 2009). Així mateix, ha estat utilitzat per a l'estudi dels efectes de l'EO sobre la neurogènesi (Gassmann et al., 2012).

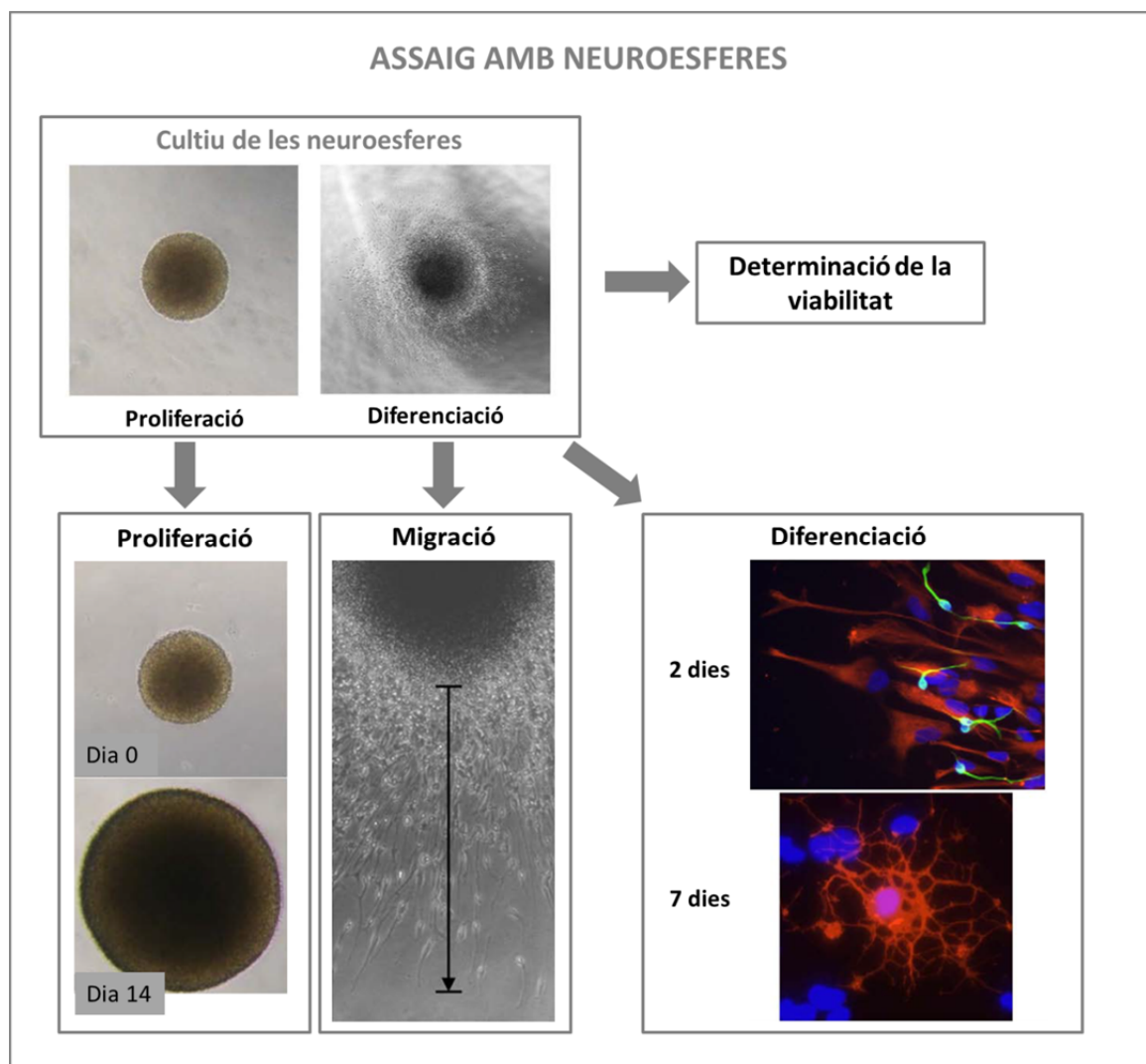


Figura 7: Representació esquemàtica de l'assaig amb neuroesferes humanes; representació gràfica de l'assaig d'avaluació de la proliferació, migració i diferenciació de les neuroesferes.

(Adaptada de Breier et al., 2010)

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

En aquesta tesi doctoral, es proposa un model experimental basat en els efectes dels processos oxidatius sobre els embrions de peix zebra, que podria ser la base per a una metodologia adequada per a l'avaluació *in vivo* de l'activitat protectora de compostos antioxidants naturals.

L'avaluació de l'efecte antioxidant general dels compostos, tradicionalment s'ha portat a terme mitjançant assaigs químics, ja que no es disposa d'un mètode específic per a l'avaluació de la capacitat antioxidant, que a més a més sigui ràpid i proporcioni informació integrada (Prior et al., 2005).

Un assaig *in vivo*, que permeti l'anàlisi de l'efecte antioxidant de diferents compostos de forma ràpida, en diferents finestres d'exposició i que integri respostes fisiològiques i patològiques, podria produir millors resultats en la identificació de nous compostos amb activitat antioxidant, ja que l'estrès oxidatiu implica mecanismes que depenen de condicions diverses (Prieto i Murado, 2014).

El model d'embrió de peix zebra és un model animal *in vivo* amb les principals característiques dels models experimentals *in vitro* (Scholz et al., 2008). A més a més, presenta defenses antioxidants anàlogues als sistemes antioxidants en mamífers i s'ha establert com un model per a l'estudi dels mecanismes oxidatius (Fang i Miller, 2012). Aquest model animal ha estat àmpliament utilitzat en diferents estudis realitzats a la Unitat de Toxicologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Els compostos antioxidants, a part del seu efecte protector enfront de l'atac dels radicals lliures, han demostrat la seva activitat en la prevenció de diferents alteracions i malalties humanes (Estruch et al., 2013; Scalbert et al., 2005); especialment han mostrat un efecte protector enfront a les malalties neurològiques relacionades amb l'edat com el Parkinson i l'Alzheimer (Albarracín et al., 2012).

Degut a l'homologia d'algunes de les zones del sistema nerviós dels peixos zebra amb les mateixes àrees en el cervell humà (De Esch et al., 2012), així com a la capacitat per identificar compostos químics neuro tòxics i per predir els efectes de substàncies neuroprotectores (Parng et al., 2007, 2006), el model de peix zebra ha estat utilitzat per a l'estudi de mecanismes en malalties neurodegeneratives (Xi et al., 2011) i també per a l'avaluació de noves estratègies preventives i farmacològiques relacionades amb aquestes alteracions (Lepessant, 2015; Zhang et al., 2015).

En l'informe sobre l'avaluació de la toxicitat en el segle XXI (NRC- National Research Council, 2007), es recomana la utilització de models *in vitro* basats en sistemes cel·lulars humans com metodologies rellevants per a l'avaluació dels efectes dels compostos.

El model de neuroesferes humanes es presenta com una eina útil per a l'estudi dels efectes dels compostos en un cultiu de cèl·lules progenitores neurals humanes (Fritsche et al., 2011). L'assaig amb neuroesferes ha estat utilitzat per a l'estudi dels efectes de l'estrès oxidatiu i podria ser una metodologia útil per a l'avaluació dels efectes protectors dels antioxidants en el sistema nerviós. Aquest model ha estat establert en el grup de recerca de *Modern Risk Assessment and Sphere Biology* de l'IUF-Leibniz Research Institute for Environmental Medicine de Düsseldorf, Alemanya, on la doctorand d'aquesta tesi doctoral va realitzar una estada de recerca.

En la present tesi doctoral s'avalua l'establiment del model d'embrió de peix zebra com un model animal útil per a l'estudi dels efectes protectors dels compostos vers a mecanismes relacionats amb l'estrès oxidatiu, i també enfront de processos a nivell del sistema nerviós. S'estudiaran diferents estratègies antioxidants mitjançant el model animal de l'embrió de peix zebra i el model cel·lular de neuroesferes humanes per a valorar l'aplicació d'aquestes metodologies en l'avaluació dels efectes de l'estrès oxidatiu de forma estandarditzada i poder establir una tècnica per a ser validada com una eina útil en un futur.

Els objectius específics d'aquesta tesi doctoral han estat:

1. Establir un model d'estrès oxidatiu per a l'avaluació de l'efecte antioxidant de diferents compostos mitjançant l'assaig amb embrions de peix zebra.
 - Estudiar els efectes de diferents compostos relacionats amb l'estrès oxidatiu sobre el creixement i desenvolupament embrionari del peix zebra.
 - Confirmar el mecanisme oxidatiu dels efectes observats mitjançant estratègies de modulació de la resposta a estrès oxidatiu.
 - Comprovar la capacitat del model d'estrès oxidatiu establert per a identificar l'activitat antioxidant de compostos coneguts.

2. Avaluar l'efecte antioxidant *in vivo* de compostos naturals presents en una mostra de vi negre.
 - Identificar els compostos fenòlics presents en una mostra de vi negre i en una mostra d'homogenat d'embrions de peix zebra prèviament exposats al vi negre.
 - Caracteritzar l'efecte antioxidant dels compostos fenòlics identificats majoritàriament en la mostra de vi negre, mitjançant el model d'estrès oxidatiu en embrions de peix zebra.

3. Estudiar els efectes neuroprotectors dels polifenols del vi negre en embrions de peix zebra

4. Estudiar els efectes de l'estrès oxidatiu i els antioxidants en el model de neuroesferes humanes.
 - Reproduir el paradigma de l'hormesi estudiat mitjançant el model de neuroesferes humanes en el model d'estrès oxidatiu amb embrions de peix zebra.

MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. DISSENYS EXPERIMENTALS

En aquest apartat es descriuen els principals dissenys experimentals utilitzats en les diferents parts de la present tesi doctoral.

3.1.1. MODEL D'ESTRÈS OXIDATIU AMB EMBRIONS DE PEIX ZEBRA

3.1.1.1. CARACTERITZACIÓ DELS EFECTES EN EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DE PEIX ZEBRA.

Exposició dels embrions de peix zebra als diferents tipus de compostos: inductors d'estrès oxidatiu, moduladors de l'estatus antioxidant i antioxidants. Avaluació dels efectes dels compostos en la mortalitat, morfologia i funcionalitat dels embrions i establiment de la corresponent corba concentració-resposta per a cadascun dels efectes observats (Figura 8).

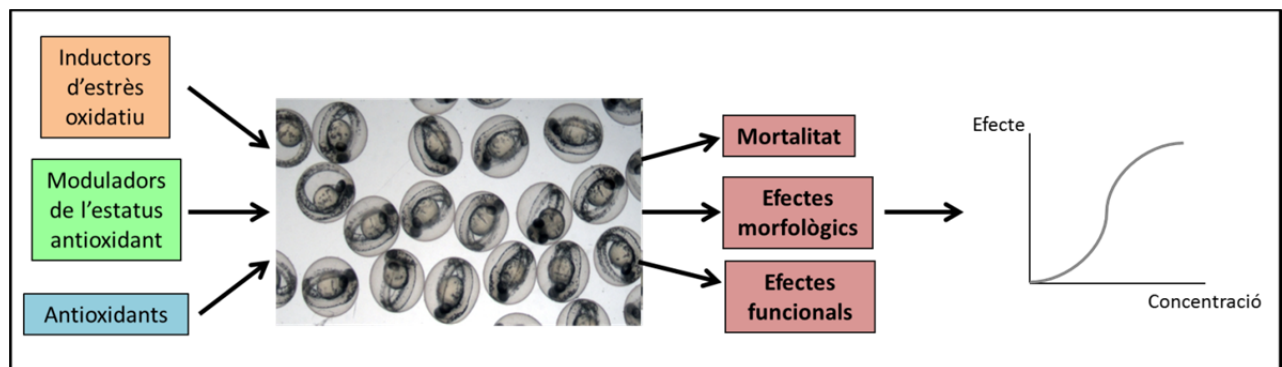


Figura 8: Disseny experimental de la caracterització dels efectes de compostos en el desenvolupament embrionari de peix zebra. (Elaboració pròpia)

3.1.1.2. MODULACIÓ DE LA RESPOSTA A ESTRÈS OXIDATIU

Avaluació dels efectes en el desenvolupament embrionari del peix zebra de la pre-exposició dels embrions a moduladors de l'estatus antioxidant, seguida de l'exposició a inductors d'estrès oxidatiu. Establiment de la corba concentració-resposta corresponent a cadascun dels efectes observats.

Comparació de les corbes concentració-resposta de la pre-exposició als moduladors de l'estatus antioxidant seguida de l'exposició a l'inductor d'estrès oxidatiu amb la corba de l'exposició única a l'inductor d'estrès oxidatiu.

El desplaçament cap a la dreta de la corba concentració-resposta de la pre-exposició al modulador que augmenta l'estatus antioxidant dels embrions, seguida de l'exposició a l'inductor d'estrès oxidatiu, indica un efecte protector del modulador enfront als efectes de l'estrès oxidatiu, ja que són necessàries concentracions majors de l'inductor d'estrès oxidatiu per a obtenir els mateixos efectes que en l'exposició única a aquest.

El desplaçament cap a l'esquerra de la corba concentració-resposta de la pre-exposició al modulador que disminueix l'estatus antioxidant indica un augment de l'estrès oxidatiu en els embrions, ja que

amb concentracions menors de l'inductor d'estrès oxidatiu ja s'obtenen els mateixos efectes que en l'exposició única a aquest (Figura 9).

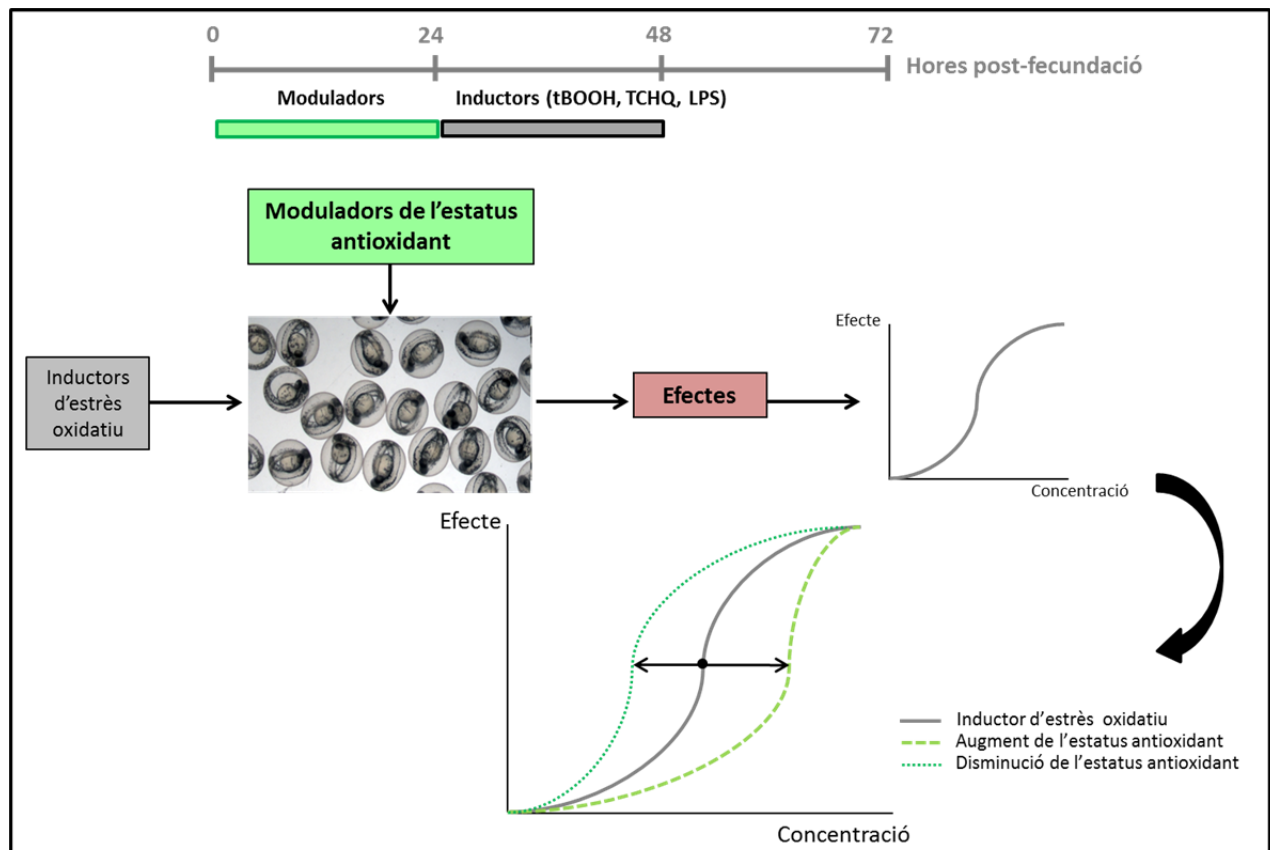


Figura 9: Disseny experimental dels assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu. Pre-exposició dels embrió de peix zebra als moduladors de l'estatus antioxidant i posterior exposició als inductors d'estrès oxidatiu. (Elaboració pròpia)

3.1.1.3. EFECTES ANTIOXIDANTS DELS COMPOSTOS

Avaluació dels efectes antioxidants dels compostos en el model d'embrió de peix zebra i establiment de la corba concentració-resposta corresponent a cadascun dels efectes observats.

Comparació de les corbes concentració-resposta de la pre-exposició als compostos antioxidants seguida de l'exposició a l'inductor d'estrès oxidatiu amb la corba de l'exposició única a l'inductor d'estrès oxidatiu.

Si els compostos estudiats presenten un efecte antioxidant en els embrió de peix zebra, es produirà un desplaçament cap a la dreta de la corba concentració-resposta de la pre-exposició als compostos, seguida de l'exposició a l'inductor d'estrès oxidatiu. Aquest fet indica que, en presència del compost antioxidant, seran necessàries concentracions majors de l'inductor d'estrès oxidatiu per tal d'obtenir els mateixos efectes que en l'exposició única a aquest (Figura 10).

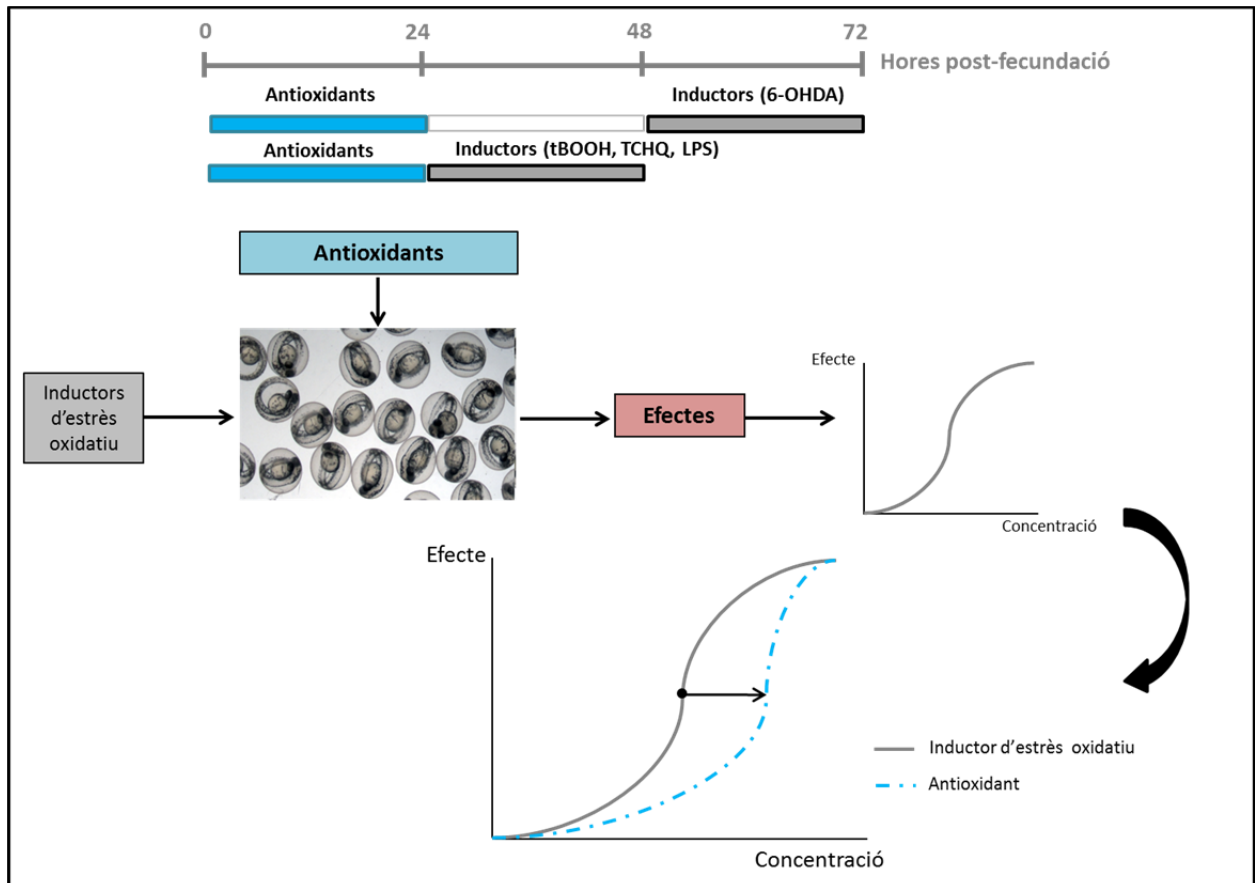


Figura 10: Disseny experimental de l'avaluació dels efectes antioxidants dels compostos mitjançant el model d'embrió de peix zebra. Pre-exposició dels embrions de peix zebra als compostos antioxidants i posterior exposició als inductors d'estrès oxidatiu. (Elaboració pròpia)

3.1.2. MODEL DE NEUROESFERES HUMANES

3.1.2.1. CARACTERITZACIÓ DELS EFECTES EN EL MODEL DE NEUROESFERES HUMANES.

Exposició de les neuroesferes als diferents tipus de compostos: inductors d'estrès oxidatiu i antioxidants. Avaluació dels efectes dels compostos sobre la viabilitat, la migració i la diferenciació a neurones, i representació gràfica dels resultats obtinguts en cadascuna de les avaluacions. (Figura 11).

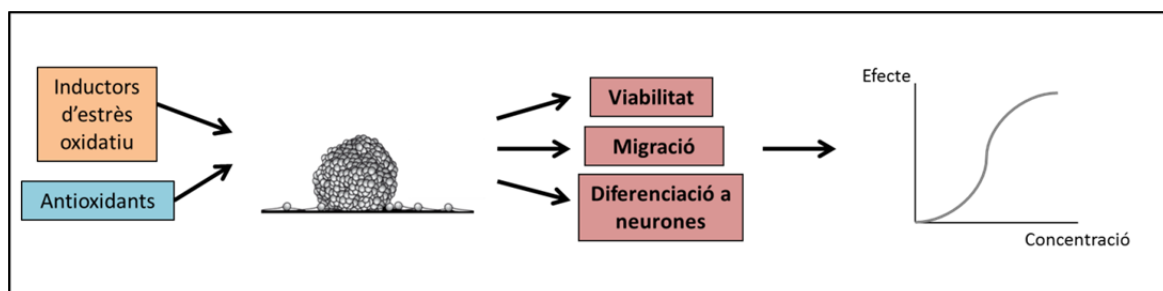


Figura 11: Disseny experimental de la caracterització dels efectes de compostos en el model de neuroesferes humanes. (Elaboració pròpia)

3.1.2.2. EFECTES ANTIOXIDANTS DELS COMPOSTOS

Avaluació dels efectes antioxidants dels compostos en el model de neuroesferes humanes i establiment de la corba concentració-resposta corresponent a cadascun dels efectes observats.

Comparació de les corbes concentració-resposta de la pre-exposició als compostos o estratègies antioxidants seguida de l'exposició a l'inductor d'estrès oxidatiu amb la corba de l'exposició única a l'inductor d'estrès oxidatiu.

Si els compostos estudiats presenten un efecte antioxidant en les neuroesferes humanes, es produirà un desplaçament cap a la dreta de la corba concentració-resposta de la pre-exposició als compostos, seguida de l'exposició a l'inductor d'estrès oxidatiu. Aquest fet indica que, en presència del compost antioxidant, seran necessàries concentracions majors de l'inductor d'estrès oxidatiu per tal d'obtenir els mateixos efectes que en l'exposició única a aquest (Figura 12).

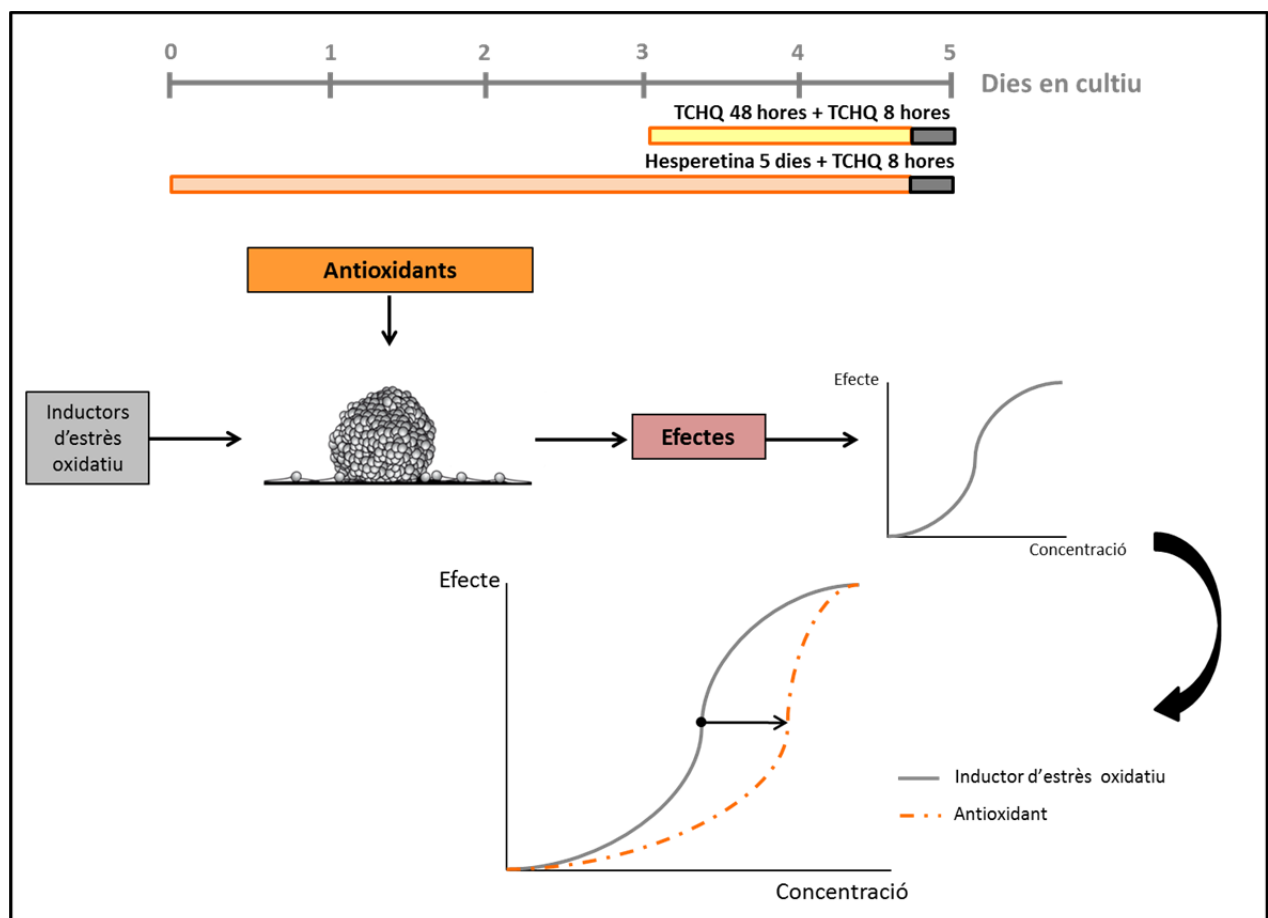


Figura 12: Disseny experimental de l'avaluació dels efectes antioxidants dels compostos mitjançant el model de neuroesferes humanes. Pre-exposició de les neuroesferes als compostos antioxidants i posterior exposició als inductors d'estrès oxidatiu. (Elaboració pròpia).

3.2. ASSAIG AMB EMBRIONS DE PEIX ZEBRA

3.2.1. MANTENIMENT DE LA COLÒNIA D'ADULTS I OBTENCIÓ DELS EMBRIONS

Els peixos zebra (ZF) adults s'obtenen d'un proveïdor comercial (Bcn Piscicultura Iberica S.L.). Els mascles i femelles es mantenen separats en aquaris amb un sistema de filtració constant en aigua estandarditzada, tal com s'indica en la normativa ISO (*International Organization for Standardization*) 7346-1 i 7346-2 (ISO, 1996; 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,75 mM NaHCO_3 ; 0,07 mM KCl). Les femelles adultes poden diferenciar-se fàcilment dels mascles, ja que presenten una protuberància en la zona abdominal on s'emmagatzemen els ous (Figura 13). Els animals es mantenen en condicions ambientals controlades: temperatura, 26 ± 1 °C i cicle de llum constant de 14 hores de llum i 10 hores de fosc. Els peixos s'alimenten dues vegades al dia, al matí amb flocs de menjar comercial i a la tarda amb *Artemia nauplii* recent eclosionada per tal d'estimular la posta d'ous.



Figura 13: Peixos zebra adults. A la part superior, la femella. La fletxa blanca indica la protuberància a la zona abdominalal; a la part inferior, el mascle.
(Adaptada de Braunbeck et al., 2005)

El dia previ als assaigs amb embrions de ZF, els mascles i les femelles es transfereixen a un tanc de cria de 20 L, en una proporció de 10 femelles i 8 mascles. Al fons del tanc es col·loca una reixeta per tal d'evitar la predació dels ous per part dels adults. També s'incorporen bales de vidre i plantes artificials per tal d'estimular la posta d'ous.

La posta i fecundació dels ous té lloc el dia següent durant els primers 30 minuts després que s'encenguin les llums al matí. En aquestes condicions, aproximadament s'obtenen entre 300 i 400 ous que es recullen i es netegen amb aigua estandarditzada diluïda 1:5 amb aigua desionitzada per tal d'evitar la brutícia i prevenir el creixement de bacteris i protozous. Es fa la selecció dels ous fecundats respecte dels no fecundats amb un microscopi estereoscòpic (Motic SMZ168, Motic® LTD). Els ous no fecundats i els que presenten anomalies com asimetries, formació de vesícules o membranes danyades es descarten, ja que per a posteriors experiments només s'utilitzen els ous fecundats i sans (Figura 14). Aquests, es classifiquen en funció del seu grau de desenvolupament embrionari seguint les directrius de Kimmel et al., (1995).

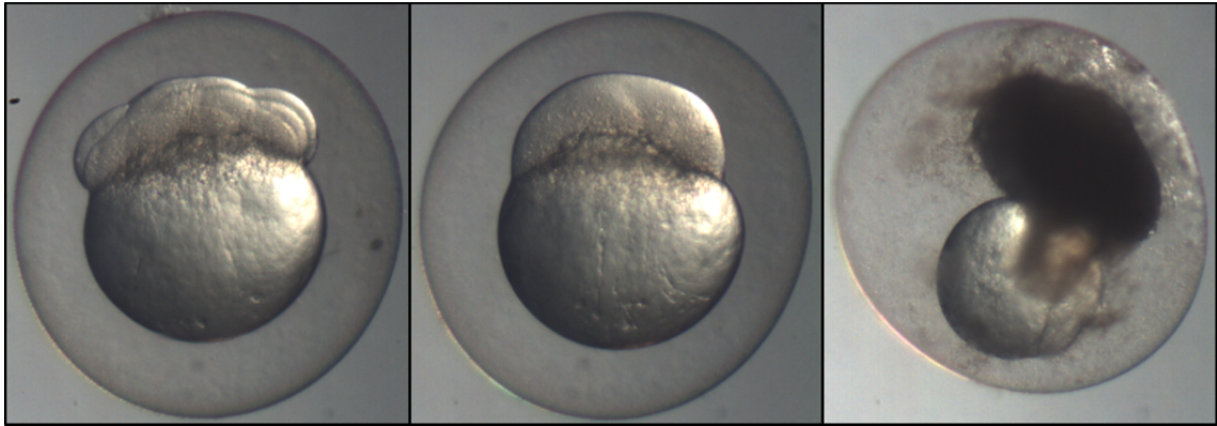


Figura 14: Imatges representatives d'embrions de peix zebra. A l'esquerra, un embrió de peix zebra fecundat en el que es poden apreciar les divisions cel·lulars; al mig, un embrió no fecundat; a la dreta, un embrió coagulat.
(Elaboració pròpia)

El procediment amb els ZF adults i els embrions ha estat autoritzat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona i pel Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya amb el codi DAAM 7971. Així mateix, compleix el Decret 214/1997 de 30 de Juliol de la Generalitat de Catalunya que regula la utilització d'animals per a experimentació i altres finalitats científiques.

3.2.2. EXPOSICIÓ DELS EMBRIONS ALS DIFERENTS COMPOSTOS

La tetraclorohidroquinona (TCHQ), el lipopolisacàrid d'*Escherichia coli* O111:B4 (LPS), l'hidroclorur de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), l'hidroclorur de N ω -Nitro L-arginina metil èster (L-NAME), la DL-butionina sulfoximina (BSO), el (\pm)- α -tocoferol (vit E), el (\pm)- α -àcid lipoic (àcid lipoic), l'hidrat de quercetina (quercetina), la quercetina 3- β -D-glucòsid i el kaempferol 3-glucòsid es van obtenir de Sigma-Aldrich Química S.L. El *tert*-butil hidropèroxid (tBOOH) es va adquirir a TCI Europe, la N-acetil-L-cisteïna (NAC) i el dietil maleat (DEM) es van obtenir de Cymit Química S.L. La peonidina 3-glucòsid i la malvidina 3-glucòsid es van adquirir a Extrasynthese.

Les solucions de tBOOH, LPS, 6-OHDA, NAC i DEM es preparen directament per dissolució dels compostos en solució de Danieau 0,3X (17,4 mM NaCl; 0,23 mM KCl; 0,12 mM MgSO₄·7 H₂O; 0,18 mM Ca(NO₃)₂; 1,5 mM HEPES; pH 6,5). La TCHQ, vit E, quercetina i àcid lipoic inicialment es dissolen en 100 % dimetil sulfòxid (DMSO, Sigma-Aldrich Química S.L.) i la solució es dilueix posteriorment amb solució de Danieau fins a una concentració final de DMSO de 0,05% (v/v).

Els diferents compostos als que s'exposen els embrions estan indicats a la Taula 1. En tots els casos es realitzen assaigs de *range finding* per tal de seleccionar les concentracions de treball més adequades.

Les característiques de l'exposició dels embrions són:

- Plaques de cultiu de plàstic de 6 pous (Greiner Bio-one), excepte en el cas de l'exposició a tBOOH, que degut a la seva volatilitat, es realitza en vials de vidre tancats hermèticament.
- Cinc grups de concentració creixent i un grup control.
- Diferents finestres d'exposició depenent del compost a estudiar: Moduladors de l'estatus antioxidant i antioxidants de les 2 a les 26 hores post fecundació (hpf); inductors d'estrès oxidatiu de les 26 a les 50 hpf, excepte l'exposició a 6-OHDA. Aquesta es realitza de les 50 a les 74 hpf, ja que el sistema dopaminèrgic en els embrions de ZF es comença a formar a les 20-24 hpf i està completament format a les 72 hpf (Kastenhuber et al., 2010) (Figura 15).
- Temperatura de 27 ± 1 °C.
- Renovació del medi cada 24 hores.

Per cada compost estudiat, es porten a terme almenys tres experiments independents, utilitzant embrions de diferents postes.

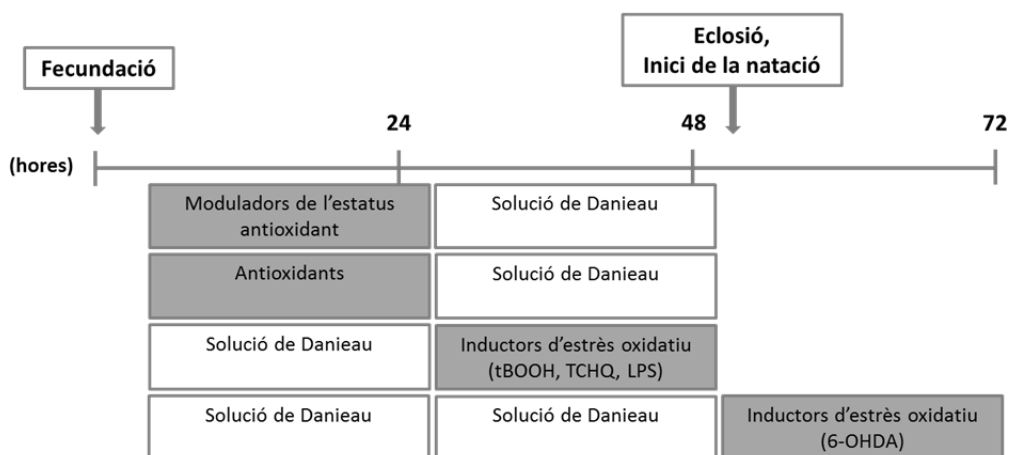
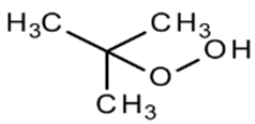
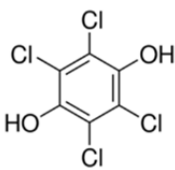
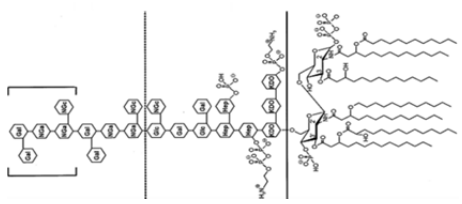
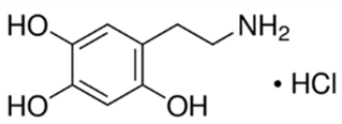
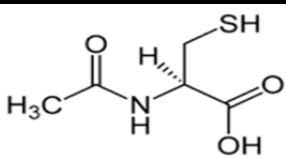
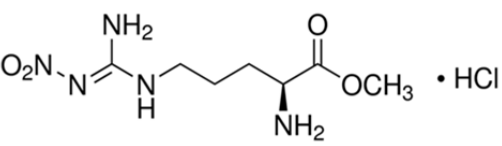
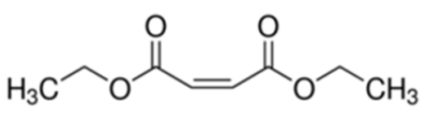
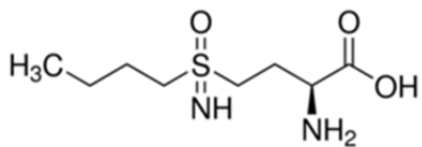


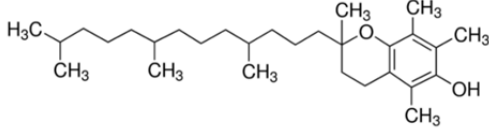
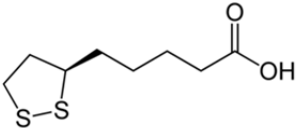
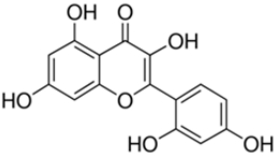
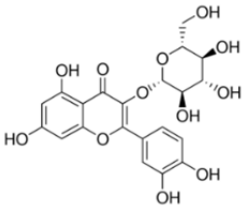
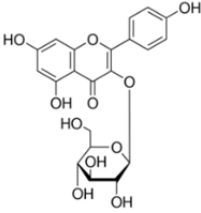
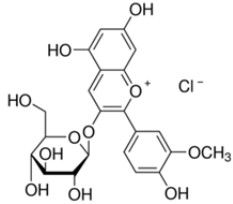
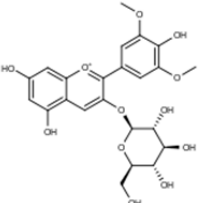
Figura 15: Esquema de l'exposició dels embrions als diferents compostos. En gris s'observa la finestra d'exposició als moduladors de l'estatus antioxidant, als antioxidants i als inductors d'estrès oxidatiu; en blanc es representa la incubació amb solució de Danieau.

(Elaboració pròpia)

Taula 1: Descripció dels compostos utilitzats en el model d'estrès oxidatiu, el seu número CAS, la seva estructura química i el seu mecanisme d'acció relacionat amb l'estrès oxidatiu.

Compostos químics	Número CAS	Estructura química	Mecanisme d'acció
Inductors d'estrès oxidatiu			
tBOOH	75-91-2		<ul style="list-style-type: none"> - Producció de radicals butoxil - Depleció de sistemes antioxidants
TCHQ	87-87-6		<ul style="list-style-type: none"> - Producció de radicals superòxid - Depleció de glutatió - Activació de la via Keap1-Nrf2
LPS	297-473-0		<ul style="list-style-type: none"> - Estimulació de la resposta inflamatòria. - Producció d'espècies reactives d'oxigen
6-OHDA	28094-15-7		<ul style="list-style-type: none"> - Productor d'espècies reactives d'oxigen en neurones dopaminèrgiques - Disminució d'enzims antioxidants
Moduladors de l'estatus antioxidant			
NAC	616-91-1		<ul style="list-style-type: none"> - Substrat limitant en la síntesi de glutatió - Segrestador d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen
L-NAME	51298-62-5		<ul style="list-style-type: none"> - Inhibidor de la sintasa d'òxid nítric.
DEM	141-05-9		<ul style="list-style-type: none"> - Depleció de glutatió - Activa la via Nrf2
BSO	5072-26-4		<ul style="list-style-type: none"> - Inhibidor de la γ-glutamil cisteïna sintetasa.

Taula 1, continuació: Descripció dels compostos utilitzats en el model d'estrès oxidatiu, el seu número CAS, la seva estructura química i el seu mecanisme d'acció relacionat amb l'estrès oxidatiu.

Compostos químics	Número CAS	Estructura química	Mecanisme d'acció
Antioxidants			
Vit. E	10191-41-0		- Segrestador d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen
Àcid lipoic	1077-28-7		- Cofactor de diferents sistemes enzimàtics
Quercetina	849061-97-8		- Segrestador d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen
Antioxidants naturals			
Quercetina 3-β-D-glucòsid	482-35-9		- Segrestador d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen
Kaempferol 3-glucòsid	480-10-4		- Segrestador d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen
Peonidina 3-glucòsid	6906-39-4		- Segrestador d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen
Malvidina 3-glucòsid	7228-78-6		- Segrestador d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen

3.2.3. AVALUACIÓ DE LA LETALITAT I ELS EFECTES MORFOLÒGICS EN ELS EMBRIONS

La presència d'efectes letals en els embrions s'avalua i es registra cada 24 hores per observació en el microscopi estereoscòpic. Es segueixen els criteris de letalitat establerts per Nagel (2002) que indiquen que els embrions que han mort són aquells que a les 8 hpf estan coagulats, a les 26 hpf els somites no s'han desenvolupat o la cua no s'ha desenganxat del sac vitel·lí i a les 50 hpf no presenten batec cardíac. Aquests embrions es retiren de la placa de cultiu.

L'avaluació dels efectes morfològics en els embrions es realitza i registra a les 50 hpf per a tots els compostos estudiats, excepte per a la 6-OHDA en què els embrions s'avaluen a les 74 hpf. Primerament, s'alliberen els embrions de la membrana coriònica que els envolta (Figura 16). A continuació, s'avaluen les anormalitats morfològiques i funcionals en els embrions exposats als compostos mitjançant una adaptació del sistema de puntuació morfològica total establert per Teixidó et al., (2013). Aquest sistema proporciona una puntuació a diferents paràmetres morfològics ens els embrions en funció del seu grau de desenvolupament. A més a més, aquest sistema també permet avaluar les anormalitats morfològiques (Taula 2).



Figura 16: Embrió de peix zebra de 50 hpf. A l'esquerra l'embrió està dins de la membrana coriònica i a la dreta s'ha alliberat de la membrana i s'observa la larva vista des del costat dret. (Elaboració pròpia).

Taula 2: Criteris per a l'avaluació morfològica i funcional dels embrions de peix zebra. (Adaptada de Teixidó et al., 2013)

Paràmetre avaluat	Anormalitats morfològiques	Desenvolupament normal
Flexió	No té cua Malformació de la notocorda Malformació de la medul·la espinal	Sac vitel·lí comença a disminuir de tamany i al final adopta una forma cònica
Sistema òptic	Pigmentació anormal Asimetria dels ulls	Ulls pigmentats
Sistema òtic	Anormalitats en els otòlits: No estan formats Només en presenta un En presenta més de dos	Vesícula òtica propera a l'ull
Cervell	Necrosi cerebral Hemorràgia cerebral	Formació destacada del cervell
Cor	Edema pericardial Hiperplàsia Anormalitats en les cambres cardíacques	Cor en forma de S
Cua	Hemorràgia a la cua Necrosi a la cua Cua torta	Circulació de sang a la zona de la cua
Pigmentació	Anormalitat pigmentació Absència de pigmentació	Pigmentació
Moviment	Espasmes Moviments circulars i curts Absència de moviment	Resposta vigorosa enfront a un estímul de contacte

Seguidament, es calcula el percentatge d'embrions del grup control i de cadascun dels grups de tractament que estan morts i els que presenten almenys un tipus d'anormalitat en el desenvolupament embrionari. Amb aquestes dades, s'ajusten les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques mitjançant el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). A partir de les corbes concentració-resposta es calculen els valors de concentració letal 50 (LC₅₀) i de concentració efectiva 50 per a anormalitats (EC₅₀). Aquestes són les concentracions a les quals s'estima que la mortalitat i la presència de malformacions en els embrions exposats als compostos és del 50 %.

Per tal d'evitar un biaix en l'estimació de la LC₅₀ i la EC₅₀, es corregeixen les dades segons el percentatge de letalitat i de les anormalitats en el grup control, amb la fórmula d'Abbott (Abbott, 1987):

$$P_c = \frac{(P - P_i)}{(100 - P_i)} \times 100$$

On:

P_c és el percentatge corregit; P és el percentatge en el grup de tractament i P_i és el percentatge en el grup control.

Les condicions per tal de considerar el test com a vàlid són:

1. Supervivència dels ous fecundats ≥ 90 %.
2. Proporció d'embrions morts o amb anormalitats en el grup control ≤ 10 %.

3.2.4. AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT ACETILCOLINESTERASA

Avaluació de l'activitat acetilcolinesterasa (ACE) en embrions de ZF a les 50 hpf seguint el protocol descrit per (Teixidó et al., 2013). S'utilitzen mostres formades per grups de 10 embrions que s'homogeneïtzen 3 x 10 segons en 0,5 mL de tampó fosfat sòdic a pH 7,4 (0,1 M + 0,1 % Triton-X v/v) amb un llevapellets (Pestle® Kontes). L'homogenat resultant es centrifuga durant 15 minuts a 12600 rpm i a 4 °C. Es separa el sobrenedant i es manté a -20 °C fins a la realització de l'anàlisi.

La determinació es realitza a una temperatura de 22 °C en plaques de 96 pous, seguint la reacció del iodur d'acetiltiocolina, catalitzada per l'ACE dels embrions per formar tiocolina i àcid acètic. La tiocolina es determina pel mètode d'Ellman (Ellman et al., 1961), que es basa en la reacció amb el reactiu cromògen àcid 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic) (DTNB), per formar el compost 2-nitro-5-tiobenzoat (TNB), que presenta un màxim d'absorbància a una longitud d'ona de 405 nm (Figura 17).

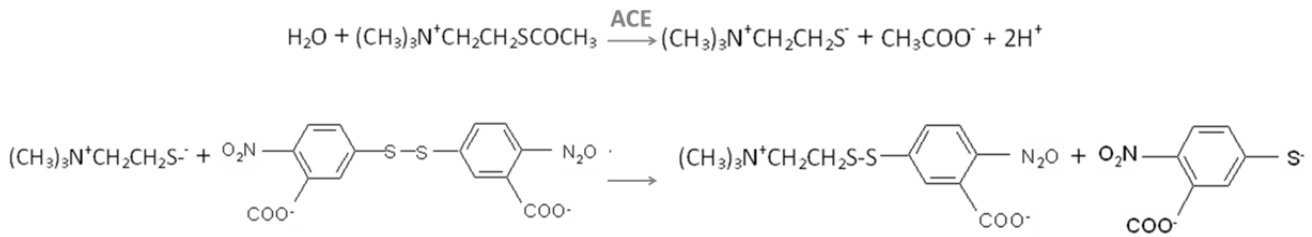


Figura 17: Reaccions químiques per a la determinació de l'activitat ACE.
(Adaptada d'Ellman et al., 1961)

L'activitat acetilcolinesterasa s'avalua mitjançant la mesura cinètica de l'increment d'absorbància de les mostres respecte el temps, durant 5 minuts a una longitud d'ona de 405 nm.

Un increment gran en l'absorbància indica una alta activitat de l'enzim, que està relacionada amb un correcte creixement dels embrions. Per altra banda, un baix increment de l'absorbància correspon a una menor activitat acetilcolinesterasa, que està relacionada amb un retràs en el creixement embrionari.

Les concentracions dels reactius utilitzats en la reacció són 0,3 mM de DTNB i 0,45 mM de iodur d'acetiltiocolina. L'activitat específica de l'enzim s'expressa en nmols de substrat hidrolitzat per minut i per mg de proteïna.

La concentració de proteïna de les mostres d'homogenat d'embrions de ZF es determina per triplicat utilitzant el mètode de Bradford (Bradford, 1976), mitjançant el kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

3.2.5. AVALUACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

A les 50 hpf, al finalitzar la incubació dels embrions de ZF amb els compostos d'estudi, s'extreu l'ARN total de grups de 15 embrions per mostra. Els embrions s'homogeneïtzen amb el reactiu TRIZOL® (Life Technologies S.A), seguint les instruccions del fabricant. S'analitza la qualitat i la quantitat d'ARN extret mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop ND100 (NanoDrop Technologies) i les mostres es conserven a -80 °C.

S'elimina la contaminació per ADN genòmic de les mostres d'ARN mitjançant el tractament de 2 µg d'aquestes amb ADNasa I (Roche Applied Science) durant 15 minuts a 25 °C i 10 minuts a 75 °C en un volum total de la reacció de 10 µL. A continuació es sintetitza l'ADN complementari (ADNc) a partir de l'ARN tractat amb la ADNasa. S'utilitzen oligodesoxiribonucleòtids de seqüència aleatòria (*random hexamers*), un inhibidor de la ribonucleasa i la transcriptasa reversa RevertAid™ (MBI Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Inc.), seguint les instruccions del fabricant. Per tal de comprovar que la transcripció inversa s'ha portat a terme correctament es realitza una PCR amb l'ADNc obtingut utilitzant els encebadors del gen de referència (*gapdh*) i la polimerasa TAQ (GoTaq®FlexiDNA polymerase, Promega). Es comprova l'amplificació mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa.

Les seqüències dels encebadors que s'utilitzen estan indicades en la Taula 3 i es van obtenir de la bibliografia (Klüver et al., 2011), en el cas de la *gapdh*, o bé mitjançant el programa Primer3 de disseny d'encebadors (Rozen i Skaletsky, 2000). Per tal d'assegurar que el gen de referència i els gens d'estudi amplifiquen en la mateixa mesura (100 % ± 10 %), s'assagen les eficiències dels encebadors.

Es genera una corba estàndard a partir de l'ADNc obtingut de ZF adults aplicant un factor de dilució de 10. L'eficiència es calcula amb la fórmula:

$$\text{Eficiència} = 10^{\left(\frac{-1}{\text{pendent}}\right)} - 1$$

Els encebadors que obtenen un pendent entre -3,1 i -3,6 es consideren acceptables.

Taula 3: Informació de les seqüències dels encebadors utilitzats en les reaccions de PCR a temps real.

Nom del gen	Identificació del Genebank	Seqüència de l'encebador: Directe i invers (5' – 3')	Parells de bases
Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (gapdh)	NM_001115114	AGGCAGAAGGCGGCAAAC AAGACACCAGTAGACTCCACAAC	124
Glutatió peroxidasa 1 α (gpx1 α)	NM_001007281	ACCTGTCCGCGAAACTATTG TGACTGTTGTGCCTCAAAGC	105
Catalasa (cat)	NM_130912	GGAGCTCAACTCTTCATCCA GCTCCACCACGTGAATAAAC	145
γ -glutamil cisteïna sintetasa (gclc)	NM_199277	AAGTGGATGAGGGAGTTTGTGGCC CTTGTGGAGCAGGTCGTAGTTGAT	90
Glutatió-S-transferasa pi 1 (gstp1)	NM_131734.3	TCATTGACGTGATGAACGAC ATCTGATCACCAACCAGGAA	175

La reacció de PCR quantitativa (PCRq) es porta a terme en un volum total de reacció de 20 μ L que conté 3 μ L de l'ADNc. S'utilitza el kit SensiMix SYBR Hi-Rox One-Step (Bioline Reagents LTD) i es segueixen les instruccions del fabricant. L'amplificació es porta a terme en plaques de 96 pous en un aparell de PCRq (Bio-Rad CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System), seguint el cicle de temperatures:

- Desnaturalització inicial, 10 minuts a 95 °C
- 40 cicles de desnaturalització, 10 segons a 95°C
- Hibridació (alineament), 20 segons a 55 °C
- Elongació, 20 segons a 72 °C
- Desnaturalització final, 30 segons a 95 °C

L'assaig de PCRq de cadascuna de les mostres es realitza per triplicat (triplicat analític) i, per tal de poder analitzar estadísticament els resultats, les mostres d'homogenats d'embrions analitzades provenen de tres experiments independents (triplicat biològic).

Per tal d'avaluar i analitzar estadísticament els resultats s'utilitza el software (Bio-Rad CFX Manager 3.1.). Els resultats de l'expressió dels gens s'analitzen mitjançant el mètode de comparació del cicle de quantificació (Cq) (Livak i Schmittgen, 2001), que permet l'avaluació del canvi en la expressió de l'ARNm del gen d'elecció respecte del gen de referència (gapdh). En els triplicats biològics, es calcula la mitjana del canvi d'expressió gènica observat en cadascun dels replicats.

3.2.6. AVALUACIÓ DE LA DISTÀNCIA TOTAL RECORREGUDA

L'avaluació de la distància total recorreguda es basa en l'assaig de resposta al contacte en larves de ZF (Smith et al., 2013), amb algunes modificacions. Les larves de ZF de 74 hpf s'avaluen individualment en plaques de Petri de vidre amb 2 mL de solució de Danieau. Primerament es deixa un període d'adaptació de la larva al medi de 60 segons de durada. Passat aquest temps comença l'assaig, que es grava en tot moment amb una càmera de vídeo (Casio Exilim HS EX.ZR100). La durada total de l'assaig és de 40 segons i cada 10 segons s'aplica un estímul mecanosensorial a la zona de la cua de la larva amb unes pinces fines. La distància total recorreguda per cada larva després de cadascun dels estímuls s'avalua mitjançant el programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA), que permet visualitzar i mesurar la trajectòria recorreguda en un període de temps determinat (Figura 18). Per al posterior anàlisi estadístic, es calcula la mitjana de la distància total recorreguda per cada larva en els 40 segons que dura l'assaig i per totes les larves de cada grup de tractament.

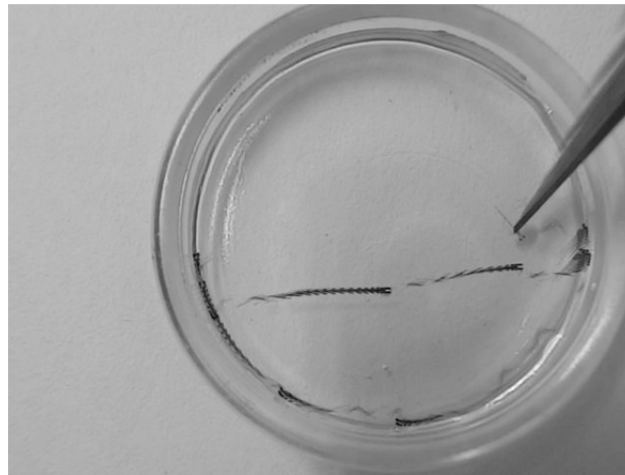


Figura 18: Trajectòria obtinguda mitjançant el programa ImageJ d'una larva de peix zebra control en la que es visualitza la distància total recorreguda en resposta a l'estímul mecanosensorial de contacte. (Elaboració pròpia)

3.2.7. TINCIÓ ANTI-TIROSINA HIDROXILASA

Per avaluar la presència de neurones dopaminèrgiques es realitza la immunotinció anti-tirosina hidroxilasa (TH) amb larves de ZF de 74 hpf, seguint el protocol basat en el treball de Zhang et al., (2011), amb algunes modificacions. Tots els reactius utilitzats en aquest protocol s'obtenen de Sigma-Aldrich Química S.L. Les larves es fixen amb una solució de paraformaldehid (4 % en PBS) durant 2 hores. Es realitzen rentats amb PBS (3 x 5 minuts) i amb PBS-Tx (PBS + 0,2 % Triton-X) (2 x 5

minuts) i es despigmenten les larves amb una solució de KOH al 2 % durant 15 minuts, a la que s'afegeix H_2O_2 al 30 % durant els últims 5 minuts. A continuació s'incuben les larves en una solució de col·lagenasa (0,2 mg/mL en PBSTx) durant 20 minuts i en una solució de glicina (50 mM en PBSTx) durant 10 minuts. Seguidament s'incuben les larves en la solució de bloqueig: 1 % DMSO, 1 % sèrum de corder, 1 % BSA i 0,7 % Triton-X en PBS, durant 3 hores. Passat aquest temps s'incuben les mostres amb un anticòs monoclonal anti-TH de ratolí (MAB 318; Millipore), diluït 1:1000 en solució de bloqueig, a una temperatura de 4 °C, en agitació constant, durant tota la nit. Al dia següent es realitzen rentats amb PBSTx (3 x 15 minuts) i s'incuben les mostres amb l'anticòs secundari CyTM3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch), que s'unirà a l'anticòs primari. La incubació es realitza durant 24 hores, a una dilució 1:100 en solució de bloqueig, a 4 °C, en agitació constant i protegides de la llum. L'anticòs secundari s'unirà a l'anticòs primari i passat el temps d'incubació es fan rentats amb PBSTx (2 x 15 minuts) i amb PBS (1 x 15 minuts). Es separa el sac vitel·lí de les larves per tal de facilitar-ne el muntatge. Les larves es munten en un portaobjectes amb glicerol 100 % i es cobreixen amb un cobreobjectes.

La tinció s'avalua en un microscopi confocal (Leica TCS SP2) amb un làser DPSS de 561 nm. De cada grup de tractament a estudiar es realitza la tinció en almenys 3 larves per tal de realitzar el posterior anàlisi estadístic. S'obtenen fotografies de la zona on es tenyeixen les neurones dopaminèrgiques amb l'objectiu de glicerol de 10 X i un zoom de 2. A continuació, s'obtenen fotografies en segments de 4 µm de la zona ampliada amb un zoom de 4 i amb l'objectiu de glicerol de 20 X per tal de fer el recompte del número de neurones dopaminèrgiques tenyides (Figura 19). El recompte del número de neurones es realitza mitjançant el software Fiji (*Fiji is Just ImageJ*, EUA) i posteriorment es calcula la mitjana del nombre de neurones que presenten les larves en cada grup de tractament.

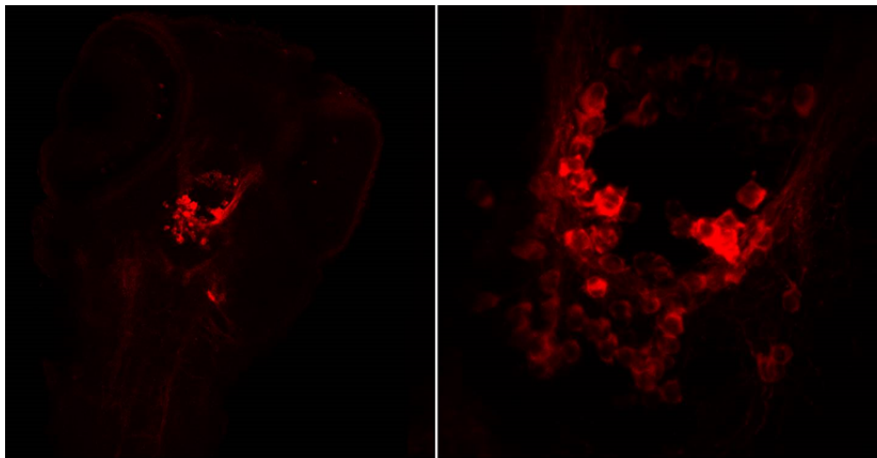


Figura 19: Fotografies d'una larva de peix zebra control realitzades amb el microscopi confocal. A l'esquerra una fotografia realitzada amb l'augment de 10x i zoom de 2 per tal de localitzar la zona d'unió de l'anticòs anti-tirosina hidroxilasa. A la dreta una fotografia en la que s'han combinat les imatges preses cada 4 µm amb l'augment de 20x per tal de comptar el número de neurones que presenten tirosina hidroxilasa.

(Elaboració pròpia)

3.3. CARACTERITZACIÓ DELS POLIFENOLS DEL VI NEGRE

3.3.1. ESTÀNDARDS I MOSTRA D'ESTUDI

Per tal d'obtenir la mostra de vi negre, s'obté una alíquota de 300 mL d'una mostra de vi (Bodegues Torres) protegida de la llum i es concentra al buit fins a un volum de 250 mL, a una temperatura inferior a 30 °C, per tal d'eliminar-ne l'etanol.

Els estàndards per a la identificació de l'àcid cafeic, ferúlic, p-cumàric, protocatèquic i gàl·lic, així com la quercetina, el kaempferol-3-O-glucòsid, el kaempferol-3-O-rutinòsid, la catequina, l'epicatequina, la peonidina, la malvidina-3-O-glucòsid; l'acetonitril, l'etanol i el metanol, els tres de grau HPLC, així com l'àcid fòrmic ($\geq 98\%$) es van adquirir a Scharlau. L'aigua ultrapura s'obté en un sistema de purificació d'aigua de gradient Milli-Q (Millipore). Totes les mostres i els estàndards es conserven a 4 °C i es manipulen protegits de la llum.

3.3.2. EXPOSICIÓ DELS EMBRIONS A LA MOSTRA DE VI NEGRE

Els embrions de ZF s'obtenen tal com s'ha indicat en el punt 3.1.1. Es realitzen diferents dilucions de la mostra de vi negre amb solució de Danieau a pH 6,5, es filtren a través d'un filtre de membrana PTFE de 0,22 μm i es porten a terme experiments de *range finding* de les 26 a les 50 hpf, per tal de seleccionar la concentració màxima tolerable (CMT). Aquesta és la concentració més alta a la qual els embrions exposats a la mostra de vi negre no mostren cap tipus d'efecte en el desenvolupament embrionari.

Es distribueixen els embrions de ZF en grups de 60 en plaques de Petri de vidre. Fins el moment de l'exposició, els embrions es mantenen en 25 mL de solució de Danieau, a 27 ± 1 °C i protegits de la llum. A les 26 hpf els embrions s'exposen a la CMT de la mostra de vi negre i es mantenen en les condicions indicades prèviament. Passades 24 hores d'exposició, s'alliberen els embrions de la membrana coriònica i es transfereixen a una nova placa de Petri, on es realitzen rentats amb solució de Danieau (3 x 5 minuts). Els 60 embrions s'homogeneïtzen 3 x 10 segons en 250 μL d'una solució aquosa al 0,1 % d'àcid fòrmic mitjançant un llevapellots. Els homogenats obtinguts es conserven a -20 °C fins el moment de l'anàlisi.

3.3.3. IDENTIFICACIÓ DELS COMPOSTOS PRESENTS EN LA MOSTRA DE VI NEGRE I D'HOMOGENAT D'EMBRIONS

La identificació dels compostos en les mostres de vi negre i de l'homogenat d'embrions de ZF prèviament exposats a la mostra, s'ha portat a terme per part del grup de recerca de Polifenols Naturals del departament de Nutrició i Bromatologia de la Universitat de Barcelona.

La identificació es realitza mitjançant la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució associada a una trampa linear d'ions i a un espectròmetre de masses Orbitrap (HPLC-LTQ-Orbitrap-MS). Es centrifuguen les mostres a 3000 g durant 10 minuts a 4 °C. Els sobrenedants obtinguts es filtren a través d'un filtre de membrana PTFE de 0,22 μm i s'injecten directament a l'aparell de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

S'utilitza un cromatògraf líquid Accela (Thermo Scientific) equipat amb una bomba quaternària, un detector fotodiode-array (PDA) i un carregador de mostres amb termòstat. S'utilitza una columna Luna C18 (50 x 2,0 mm i.d., 5 µm; Phenomenex). El gradient d'elució es porta a terme amb el solvent A, 0,1 % d'àcid fòrmic en aigua i el solvent B, 0,1 % d'àcid fòrmic en acetonitril amb un flux constant de 0,4 mL/minut i un volum d'injecció de 5 µL. S'utilitza un gradient lineal creixent del solvent B. La separació es porta a terme en 15 minuts seguint les condicions: 0 minuts, 5 % B; 10 minuts, 18 % B; 12 minuts, 100 % B; 13 minuts, 100 % B; 15 minuts, 5% B. La columna s'equilibra durant 5 minuts abans de cada anàlisi. Aquestes condicions són adaptades d'un estudi previ amb algunes modificacions (Vallverdú-Queralt et al., 2012). L'espectròmetre de masses que s'utilitza consisteix en una trampa lineal d'ions (LTQ), associada a un Orbitrap Velos (Thermo Scientific), equipat amb una font d'ionització en electroesprai (ESI) en mode negatiu, que permet adquirir el perfil d'espectres de masses amb una resolució de 30000 a massa/càrrega (m/z) 400. Els paràmetres d'aquesta operació són: font de voltatge, 4 kV; gas d'impulsió, 20 (unitats arbitràries); gas auxiliar, 10 (unitats arbitràries); gas d'escombrat, 2 (unitats arbitràries) i temperatura capil·lar, 275 °C. Per a la resta de paràmetres d'adquisició s'utilitzen valors per defecte: control automàtic del guany (AGC) va ser 5×10^5 per a l'anàlisi en una fase (MS) i 5×10^4 per a l'anàlisi en múltiples fases (MSn).

L'aparell LTQ permet l'anàlisi de la massa en una sola fase, que pot proporcionar informació de la massa molecular, també anàlisi en dues fases (MS/MS) i en múltiples fases (MSn), les quals permeten obtenir informació estructural. LTQ-Orbitrap també permet l'adquisició de la massa exacta. Primerament s'analitzen les mostres de vi negre i d'homogenat de ZF en *full scan* MS amb la resolució establerta a 30000 a m/z 400. Els anàlisis successius es realitzen en el mode MSn amb una resolució de 15000 a m/z 400. Els compostos es fragmenten mitjançant dissociació C-trap d'alta energia amb una energia de col·lisió normalitzada del 2-5 i un temps d'activació de 10 milisegons. El temps màxim d'injecció s'estableix a 100 ms amb dos micro escanejos pel mode MS i a 1000 milisegons amb un micro escaneig pel mode MSn i el rang de masses va des de m/z 100 a 1000. Les dades obtingudes s'analitzen amb el software XCalibur.

La composició elemental de cada polifenol es determina tenint en compte les masses acurades i el patró isotòpic obtingut a través de l'aplicació Formula Finder en el programa Analyst QS 2.0, que posteriorment es busquen en el Diccionari de Productes Naturals (Chapman i Hall/CRC), la base de dades MOTO (<http://appliedbioinformatics.wur.nl/moto>) i la xarxa Plant Metabolic. Així mateix, per a la identificació dels polifenols es compara l'espectre MS/MS obtingut amb altres espectres de masses de polifenols presents en la literatura.

3.4. ASSAIG AMB NEUROESFERES HUMANES

3.4.1. CULTIU CEL·LULAR

L'assaig amb neuroesferes humanes es basa en el cultiu primari de cèl·lules progenitores neurals (Moors et al., 2009). Les cèl·lules progenitores neurals de 16 a 18 setmanes de gestació, s'obtenen de Lonza Verviers SPRL i es mantenen en un cultiu en suspensió en medi de proliferació, on formen neuroesferes de manera espontània: Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) i Hams F12 en proporció 3:1, que es suplementa amb B27 (Invitrogen GmbH), factor de creixement epidermal (EGF, Biosource), 20 ng/mL; factor de creixement de fibroblasts humans recombinant (FGF, R&D Systems), 20 ng/mL; penicil·lina, 100 U/mL i estreptomicina, 100 µg/mL. El cultiu es realitza en un incubador amb un percentatge d'humiditat del 92,5 %, un 7,5 % de CO₂ i la temperatura a 37 °C.

El dia anterior a l'assaig es tallen les neuroesferes en parts de 0,25 x 0,25 mm amb una fulla d'afaitar i els fragments es mantenen durant 24 hores en el medi de proliferació on formen de nou les neuroesferes.

La diferenciació de les cèl·lules progenitores neurals s'inicia el dia de l'assaig amb la incorporació d'un substrat adequat per a l'adhesió de les cèl·lules i la retirada dels factors de creixement del medi de cultiu. Es seleccionen les neuroesferes que tenen un diàmetre aproximat de 0,3 mm i es cultiven en portaobjectes de 8 pous recoberts amb poli-D-lisina (PDL) i laminina. Es cultiven 5 neuroesferes per pou en medi de diferenciació: DMEM i Hams F12 en proporció 3:1, que es suplementa amb N2 (Invitrogen); penicil·lina, 100 U/mL i estreptomicina, 100 µg/mL. La substància a testar s'incorpora en el medi de diferenciació. Durant els 5 dies que dura el cultiu, les cèl·lules progenitores neurals que formen la neuroesfera migren i es diferencien.

3.4.2. EXPOSICIÓ ALS COMPOSTOS D'ESTUDI

Les neuroesferes s'exposen als compostos d'estudi en diferents finestres d'exposició en funció dels objectius de l'assaig a realitzar (Figura 20).

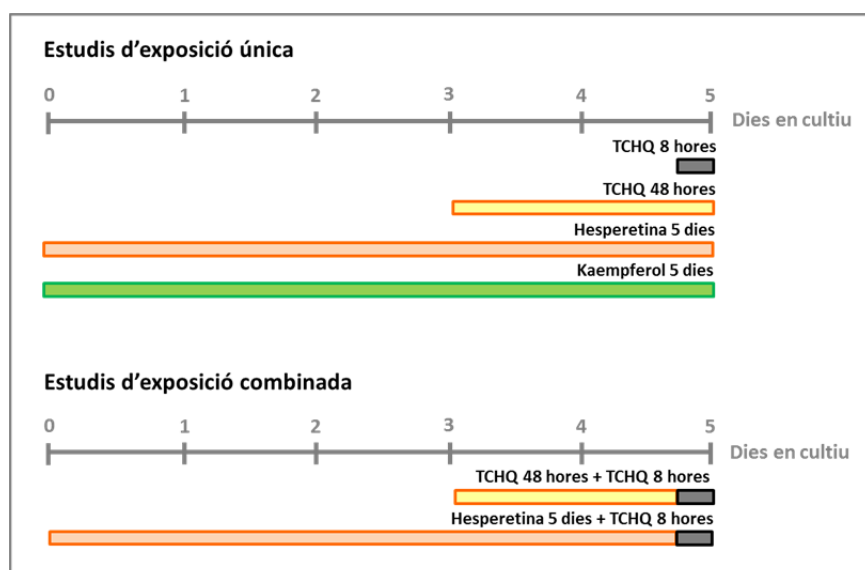


Figura 20: Esquema de les finestres d'exposició de les neuroesferes als diferents compostos. A la part superior, els estudis d'exposició única i a la part inferior els estudis d'exposició combinada. (Elaboració pròpia)

3.4.3. ASSAIG DE MIGRACIÓ

L'assaig de migració es realitza passades 72 hores de cultiu de les neuroesferes, seguint el protocol descrit prèviament (Moors et al., 2009). S'analitzen les neuroesferes en un microscopi òptic (Olympus CKX41) i s'obtenen fotografies de l'àrea de migració de cadascuna de les neuroesferes exposades amb la càmera (Visitron Systems 18.2 Color Mosaic). Per analitzar les fotografies, es mesura la distància de migració des del marge de la neuroesfera fins a l'extrem més allunyat de l'àrea de migració en quatre posicions diferents separades per angles de 90° i se'n fa la mitjana (Figura 21). El resultat experimental consisteix en la mitjana del valor de migració de les 5 neuroesferes de cada grup de tractament.

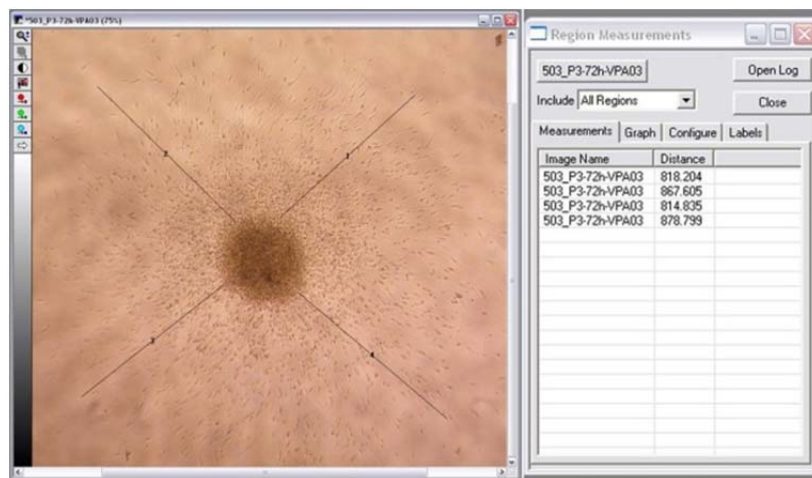


Figura 21: Imatge d'una neuroesfera amb l'àrea de migració de les cèl·lules que la formen. Les mesures realitzades en les quatre posicions establertes estan indicades amb una línia.
(Elaboració pròpia)

3.4.4. ASSAIG DE VIABILITAT

La viabilitat de les neuroesferes s'avalua al final del cultiu (dia 5) mitjançant l'assaig CellTiter-Blue® (CTB, CellTiter-Blue® cell viability assay, Promega), com s'ha descrit prèviament (Gassmann et al., 2012). L'assaig es basa en mesures de l'activitat reductasa mitocondrial i relaciona la capacitat metabòlica de les cèl·lules amb la seva viabilitat, ja que l'enzim que s'utilitza catalitza la reacció de conversió del substrat resazurin a un producte fluorescent resorufin en les cèl·lules vives (Figura 22). Una alta emissió de fluorescència està relacionada amb una major quantitat de cèl·lules vives, mentre que una disminució de fluorescència indica una disminució de la viabilitat cel·lular i per tant, un increment de la mortalitat.

Les neuroesferes s'exposen a la solució de CTB durant 2 hores i, posteriorment s'analitza l'absorbància en un fluorímetre (Tecan, Infinite M200 Pro) en una longitud d'ona d'excitació, 540 nm i longitud d'ona d'emissió, 590 nm.

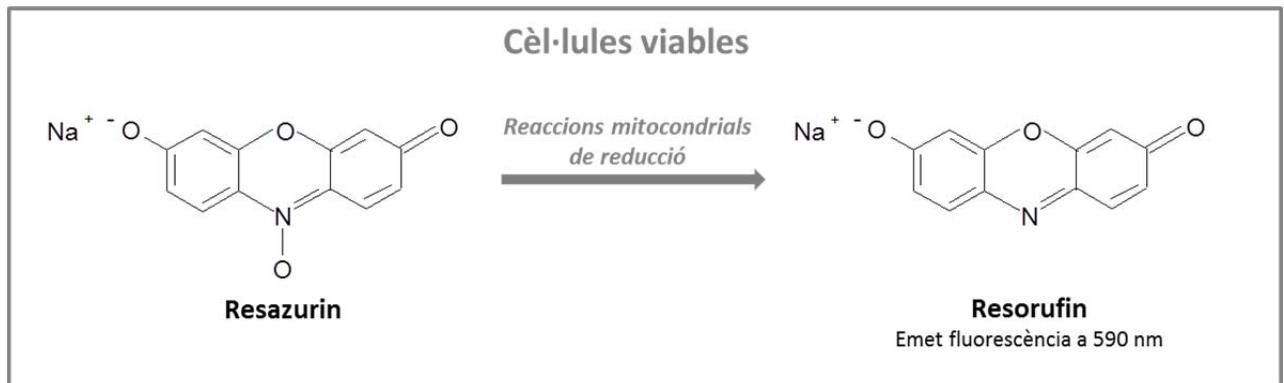


Figura 22: Esquema de la reacció química que es produeix en les cèl·lules viables, en la que es basa l'assaig de viabilitat cel·lular CellTiter-Blue®.

(Adaptada de www.promega.es).

3.4.5. ANÀLISI DE DIFERENCIACIÓ A NEURONES

La diferenciació de les cèl·lules progenitores neurals a neurones en l'àrea de migració s'avalua al final del cultiu (dia 5). Es fixen les neuroesferes en paraformaldehid al 4 % durant 30 minuts a 37 °C. Les neurones s'identifiquen mitjançant una tinció immunocitoquímica amb un anticòs primari anti-β(III)tubulina (Sigma-Aldrich Química), diluït 1:100 en PBS que conté un 10% de sèrum de cabra. Aquest anticòs és un marcador de les proteïnes del citoesquelet de les neurones. Així mateix, els nuclis cel·lulars es tenyeixen amb el colorant Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Química), que és un marcador d'ADN. A continuació s'incuben amb l'anticòs secundari Alexa S46 Red antirabbi, diluït 1:250 en PBS i s'analitzen en el microscopi de fluorescència (Carl Zeiss). Per a la quantificació de les neurones tenyides s'utilitza el software ImageJ. Primerament s'utilitza una macro en el software per tal de comptar automàticament el nombre de nuclis tenyits positivament amb Hoechst 33258. A continuació es compta manualment el nombre de neurones amb el mateix programa informàtic. Posteriorment es calcula la mitjana del nombre de neurones que presenten les cèl·lules de les neuroesferes en cada grup de tractament (Figura 23).

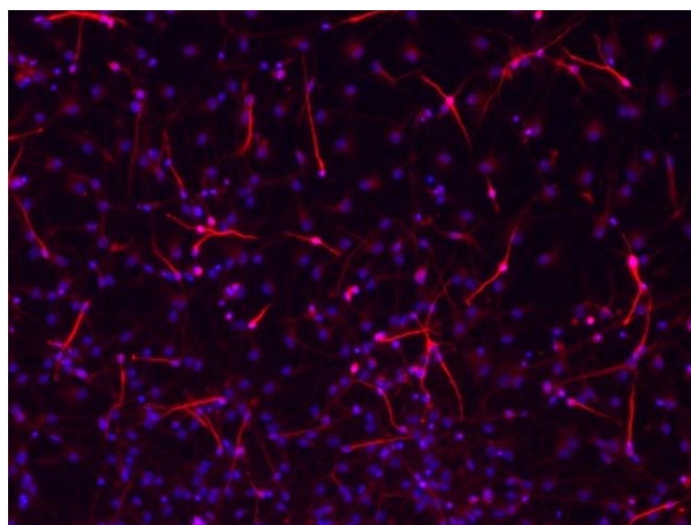


Figura 23: Imatge de la diferenciació a neurones en les cèl·lules d'una neuroesfera control. En blau s'observen els nuclis tenyits amb Hoechst 33258 i en vermell, les neurones tenyides amb l'anticòs anti-β(III)-tubulina.

(Elaboració pròpia)

3.5. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística de la letalitat i de les anormalitats morfològiques es realitza mitjançant el test exacte de Fisher, amb el programa SPSS 17.0.

Les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques es calculen i es comparen amb el programa GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software), mitjançant el test F d'extra suma de quadrats, que compara l'ajust dels paràmetres de cadascun dels grups de dades a la corba. L'interval de confiança s'ajusta a 95 %.

Les diferències entre grups, s'han avaluat mitjançant la prova *t* d'Student o l'ANOVA d'un factor, seguit pel test de Bonferroni, amb el programa SPSS 17.0.

En tots els casos es consideren diferències estadísticament significatives en tres nivells de significació, $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. MODEL D'ESTRÈS OXIDATIU IN VIVO

Les defenses antioxidants de l'organisme poden ser enzimàtiques o no enzimàtiques. Generalment, les defenses no enzimàtiques provenen de la ingesta d'antioxidants alimentaris i poden ser un factor important per a la prevenció dels efectes de l'estrès oxidatiu (EO) (Albarracín et al., 2012). Per aquest motiu, en els últims anys, ha augmentat l'interès per l'estudi de la capacitat antioxidant dels compostos presents en la dieta. Els mètodes d'avaluació de la capacitat antioxidant dels que es disposa actualment es poden dividir en tres grups en funció del procediment que utilitzen: assaigs químics, cultius cel·lulars i models animals (Tsoi et al., 2015). Fins el moment, no es disposa d'un assaig específic per a l'avaluació de la capacitat antioxidant dels compostos presents en els aliments. Tot i així, es creu que per tal d'avaluar el potencial antioxidant d'un compost, un mètode que inclogui una tècnica in vivo, que permeti l'anàlisi en diferents temps i integri diferents respostes fisiològiques i patològiques, produiria millors resultats, ja que l'EO implica mecanismes que depenen de molts factors (Prieto i Murado, 2014).

Per aquest motiu, el primer objectiu que s'ha plantejat en aquesta tesi doctoral ha estat establir un model in vivo d'EO general per a l'avaluació de l'efecte antioxidant de diferents compostos mitjançant l'assaig amb embrions de peix zebra (ZF).

4.1.1. CARACTERITZACIÓ DELS EFECTES DELS DIFERENTS COMPOSTOS EN EL CREIXEMENT I DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DEL PEIX ZEBRA

4.1.1.1. INDUCTORS D'ESTRÈS OXIDATIU

Primerament s'han caracteritzat els efectes en el creixement i desenvolupament embrionari dels ZF, produïts per compostos que tenen la capacitat d'induir EO per diversos mecanismes d'acció. Els inductors d'EO seleccionats han estat el *tert*-butil hidroperòxid (tBOOH), la tetraclorohidroquinona (TCHQ), el lipopolisacàrid d'*Escherichia coli* (LPS) i la 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

Els embrions de ZF s'han exposat a tBOOH, TCHQ i LPS de les 26 a les 50 hpf. L'exposició a la 6-OHDA s'ha realitzat de les 50 a les 74 hpf ja que el sistema dopaminèrgic en els embrions de ZF es comença a formar a les 20-24 hpf i està completament format a les 72 hpf (Kastenhuber et al., 2010). Al finalitzar l'exposició, s'han avaluat els seus efectes sobre el creixement i el desenvolupament embrionari, s'ha calculat el percentatge de letalitat i d'anormalitats morfològiques en cada grup de tractament i s'ha ajustat la corba concentració-resposta per a cadascun d'aquests paràmetres.

La inducció d'EO per part del tBOOH està relacionada amb la seva capacitat de generar radicals butoxil a través de la reacció de Fenton (Fenton, 1894). Els radicals formats afavoreixen la depleció intracel·lular de grups tiol i de les reserves de glutatió i, com a conseqüència produeixen mort cel·lular (Kanupriya et al., 2007; Timme-Laragy et al., 2009).

Els resultats de l'exposició dels embrions a tBOOH estan representats a la Taula 4. El rang de concentracions al que s'han exposat els embrions és de 1 a 4 mM. S'ha observat un increment significatiu de la mortalitat a partir de la concentració de 2 mM i un augment significatiu de la presència d'anormalitats morfològiques a partir de la concentració de 1,5 mM. Les principals anormalitats observades han estat a nivell general: necrosi cerebral, edema cardíac i retràs en el creixement. A partir de la freqüència de letalitat i d'anormalitats morfològiques en l'exposició a tBOOH, s'ha ajustat la corba concentració-resposta per a cadascun d'aquests paràmetres (Figura 24) i s'ha obtingut un valor de LC₅₀ de 2,4 mM i un valor d'EC₅₀ per anormalitats morfològiques de 1,6 mM.

Taula 4: Resultats de l'exposició dels embrions al tBOOH.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (mM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	---	7	0,0 ± 3,8	0,0 ± 6,9
1	0,0	6	0,2 ± 4,1	13,3 ± 23,4
1,5	0,2	6	3,6 ± 5,5	43,7 ± 30,3***
2	0,3	6	20,5 ± 18,4***	57,8 ± 30,1***
2,5	0,4	4	56,9 ± 9,6***	100,0 ± 0,0***
3	0,5	6	89,9 ± 16,7***	100,0 ± 0,0***
4	0,6	3	100,0 ± 0,0***	---

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: *** p < 0,001

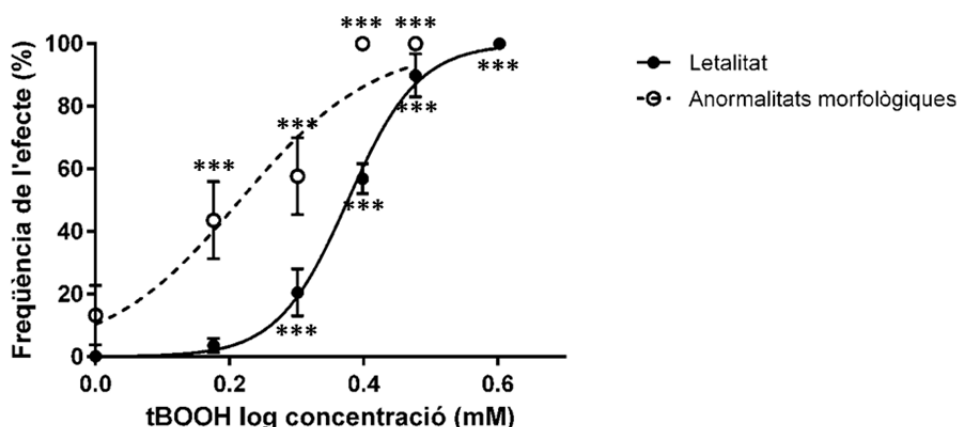


Figura 24: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al tBOOH.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: *** p < 0,001

La TCHQ presenta un cicle d'autooxidació i reducció juntament amb el seu radical semiquinona. En presència d'oxigen, i com a conseqüència d'aquesta autooxidació, la TCHQ produeix la formació de radicals superòxid. A més a més, pot conjuguar-se amb el glutatió, afavorint-ne la seva depleció i, a nivell cel·lular, pot produir el trencament de la cadena de l'ADN (Wang et al., 2001, 1997).

Els embrions s'han exposat a un rang de concentracions de TCHQ de 2,5 a 20 µM i els resultats s'han presentat a la Taula 5. S'ha observat un augment significatiu de la letalitat a partir de la concentració de 15 µM i un increment significatiu de les anormalitats morfològiques a partir de la concentració de 5 µM. Els embrions exposats han presentat principalment edema cardíac, necrosi cerebral i disminució en la pigmentació dels embrions. S'ha ajustat la corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques en l'exposició a TCHQ (Figura 25) i s'han obtingut valors de LC₅₀ de 16,0 µM i d'EC₅₀ per anormalitats morfològiques de 3,9 µM.

La disminució de la pigmentació era una anormalitat específica d'aquest compost i era concentració-depenent. L'efecte despigmentant de la TCHQ observat en els embrions està relacionat amb el seu derivat hidroquinona. La hidroquinona s'utilitza farmacològicament per al tractament de la hiperpigmentació de la pell, ja que el seu mecanisme d'acció es basa en la incorporació del compost a l'interior dels melanòcits, on s'oxida i produeix el compost tòxic quinona, que destrueix aquestes cèl·lules i, com a conseqüència, disminueix la pigmentació de la pell (Kasraee et al., 2003; Kim et al., 2012).

Taula 5: Resultats de l'exposició dels embrions a la TCHQ.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (µM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	----	9	0,0 ± 3,3	0,0 ± 3,3
2,5	0,4	5	2,9 ± 8,9	22,1 ± 31,5
5	0,7	6	2,3 ± 5,2	71,4 ± 34,9***
10	1,0	8	16,6 ± 27,1	81,6 ± 28,6***
15	1,1	7	40,8 ± 38,9***	81,5 ± 28,6***
17,5	1,2	6	44,4 ± 32,1***	100,0 ± 0,0***
20	1,3	5	100,0 ± 0,0***	----

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: *** p < 0,001

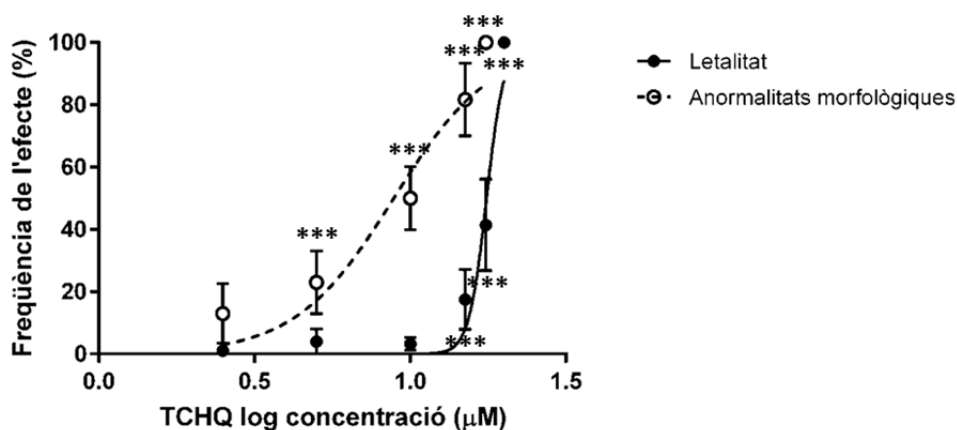


Figura 25: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a la TCHQ.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

*** p < 0,001

El LPS forma part de la membrana bacteriana i provoca la producció d'EO en embrions de ZF, degut a la seva capacitat de produir espècies reactives d'oxigen (ROS) i de disminuir l'activitat de l'enzim glutatió-S-transferasa, encarregat de la detoxificació cel·lular (Best et al., 2002; Wijesinghe et al., 2014).

Els resultats de l'exposició dels embrions de ZF a LPS es mostren a la Taula 6. El rang de concentracions d'exposició ha estat de 5 a 60 µg/mL. S'ha observat un increment de la mortalitat dels embrions a partir de la concentració de 50 µg/mL i en el cas de les anormalitats morfològiques, s'ha observat un augment significatiu d'aquestes a partir de la concentració de 25 µg/mL. Les principals anormalitats morfològiques observades han estat necrosi cerebral i anormalitats en el cor. A partir de les corbes concentració-resposta per a letalitat i anormalitats morfològiques en els embrions de ZF exposats a LPS (Figura 26), s'ha calculat el valor de LC₅₀ i d'EC₅₀ per anormalitats morfològiques, que han estat 50,1 µg/mL i 36,0 µg/mL, respectivament.

Taula 6: Resultats de l'exposició dels embrions al LPS.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (µg/mL)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	---	5	0,0 ± 5,5	0,0 ± 5,2
5	0,7	4	0,0 ± 10,0	18,1 ± 36,1
25	1,4	5	0,0 ± 0,0	20,9 ± 16,7*
45	1,6	5	12,5 ± 20,7	58,4 ± 40,0***
50	1,7	7	47,9 ± 34,6***	89,4 ± 20,0***
60	1,8	5	100,0 ± 0,0***	---

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: * p < 0,05; *** p < 0,001

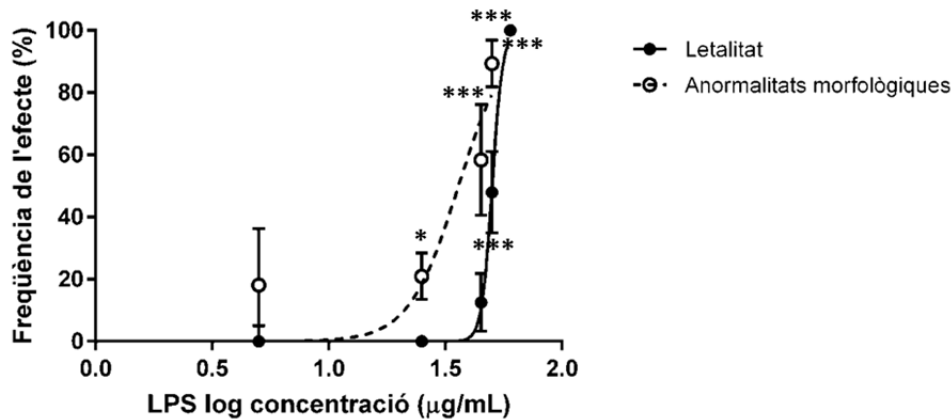


Figura 26: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al LPS.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

* p < 0,05; *** p < 0,001

En resum, els inductors d'EO tBOOH, TCHQ i LPS han produït un augment significatiu de la letalitat en els embrions exposats, que ha estat concentració-depenent. Aquests compostos, també han produït un increment concentració-depenent del percentatge d'anormalitats morfològiques. Les principals anormalitats morfològiques observades en els embrions exposats als inductors d'EO han estat a nivell

general: retràs en el creixement, edema cardíac i necrosi cerebral, excepte en el cas dels embrions exposats a TCHQ que presentaven un efecte específic en la pigmentació. Aquests resultats concorden amb altres estudis en què s'ha realitzat l'exposició dels embrions de ZF a tBOOH (Timme-Laragy et al., 2009) i a LPS (Wijesinghe et al., 2014), obtenint un augment de la mortalitat i retràs en el creixement dels embrions exposats.

La 6-OHDA és un anàleg hidroxilat de la dopamina. Indueix EO específicament a nivell de les neurones dopaminèrgiques, degut a la seva capacitat de generar ROS, i com a conseqüència, apoptosi (Elkon et al., 2004). Degut al seu efecte neurotòxic sobre les neurones dopaminèrgiques, ha estat utilitzada en animals com a model de malaltia de Parkinson (Parng et al., 2007).

Els resultats de l'exposició a 6-OHDA s'han representat a la Taula 7. Els embrions s'han exposat a la 6-OHDA en un rang de concentracions de 100 a 1000 μM . No s'han observat efectes letals o anormalitats morfològiques en cap de les concentracions estudiades. S'ha observat un efecte a nivell funcional, que consisteix en una alteració del moviment dels embrions, que presenten espasmes, es mouen de forma circular, realitzen moviments curts o inclús s'observava una paràlisi total del moviment a les concentracions més elevades. Aquests efectes eren dependents de la concentració (Figura 27A). Per tal de fer una valoració objectiva de les alteracions en el moviment, s'ha realitzat un assaig d'avaluació de la resposta al contacte (Smith et al., 2013) en els embrions de ZF exposats a les diferents concentracions de 6-OHDA i, posteriorment s'ha analitzat la distància total recorreguda per aquests. S'ha observat una disminució significativa de la distància total recorreguda pels embrions a partir de la concentració de 250 μM (Figura 27B). A partir dels resultats obtinguts, s'han ajustat les corbes concentració-resposta per ambdós paràmetres i s'ha obtingut un valor d' EC_{50} per a anormalitats en el moviment de 245,9 μM i un valor d' EC_{50} per a la distància total recorreguda de 386,9 μM .

Els resultats obtinguts coincideixen amb els de l'estudi realitzat per Feng et al., (2014), en el qual s'observa una disminució de la distància total recorreguda per les larves de ZF després de l'exposició a diferents concentracions de 6-OHDA.

La 6-OHDA és una neurotoxina que utilitza el mateix sistema transportador de catecolamines que la dopamina, de manera que pot penetrar a les neurones dopaminèrgiques, on s'acumula en el citosol i induïx neurotoxicitat selectiva (Rodríguez-Pallares et al., 2007). Els moviments voluntaris en els organismes vertebrats estan regulats principalment per la neurotransmissió dopaminèrgica en el sistema nerviós central. La pèrdua d'aquestes neurones està directament relacionada amb l'aparició de discinèsies, típiques de la simptomatologia dels pacients amb malaltia de Parkinson (Kulisevsky et al., 2013), i que coincideix amb els efectes en el moviment observats en els embrions de ZF exposats a la 6-OHDA.

Taula 7: Resultats de l'exposició dels embrions a la 6-OHDA.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats (n), freqüència d'anormalitats en el moviment i distància total recorreguda.

Concentració (µM)	Log concentració	n	Freqüència d'anormalitats en el moviment (%)	Distància total recorreguda (%)
			Mitjana ± SD	Mitjana ± SD
0	---	12	0,0 ± 0,0	100 ± 0,0
100	2,0	8	13,8 ± 22,6***	86,7 ± 11,7
250	2,4	12	52,8 ± 24,9***	56,7 ± 20,4**
500	2,7	8	77,1 ± 31,6***	42,3 ± 8,6***
750	2,9	6	84,6 ± 29,8***	30,6 ± 14,6***
1000	3,0	8	93,8 ± 17,7***	31,5 ± 12,4***

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

** p < 0,01; *** p < 0,001

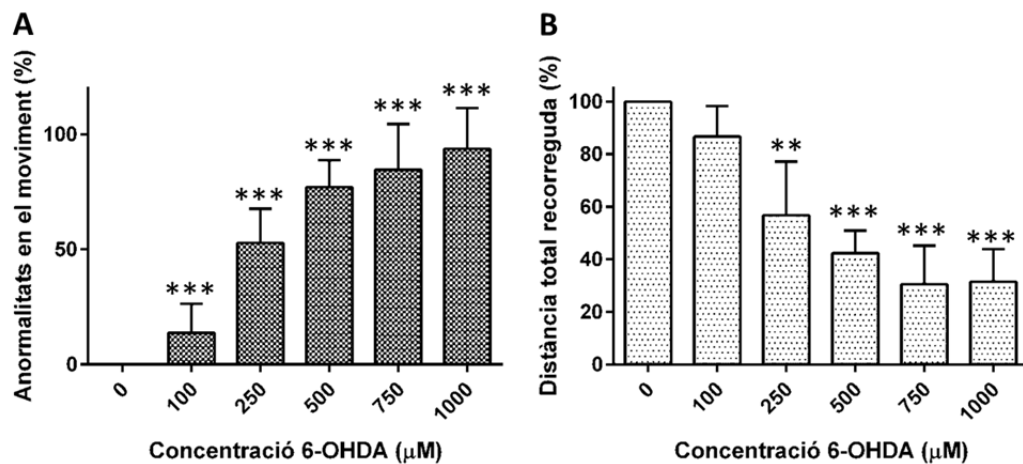


Figura 27: Representació gràfica de les anormalitats en el moviment (A) i de la distància total recorreguda (B) pels embrions de peix zebra exposats a la 6-OHDA.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte del grup control:

** p < 0,01, *** p < 0,001

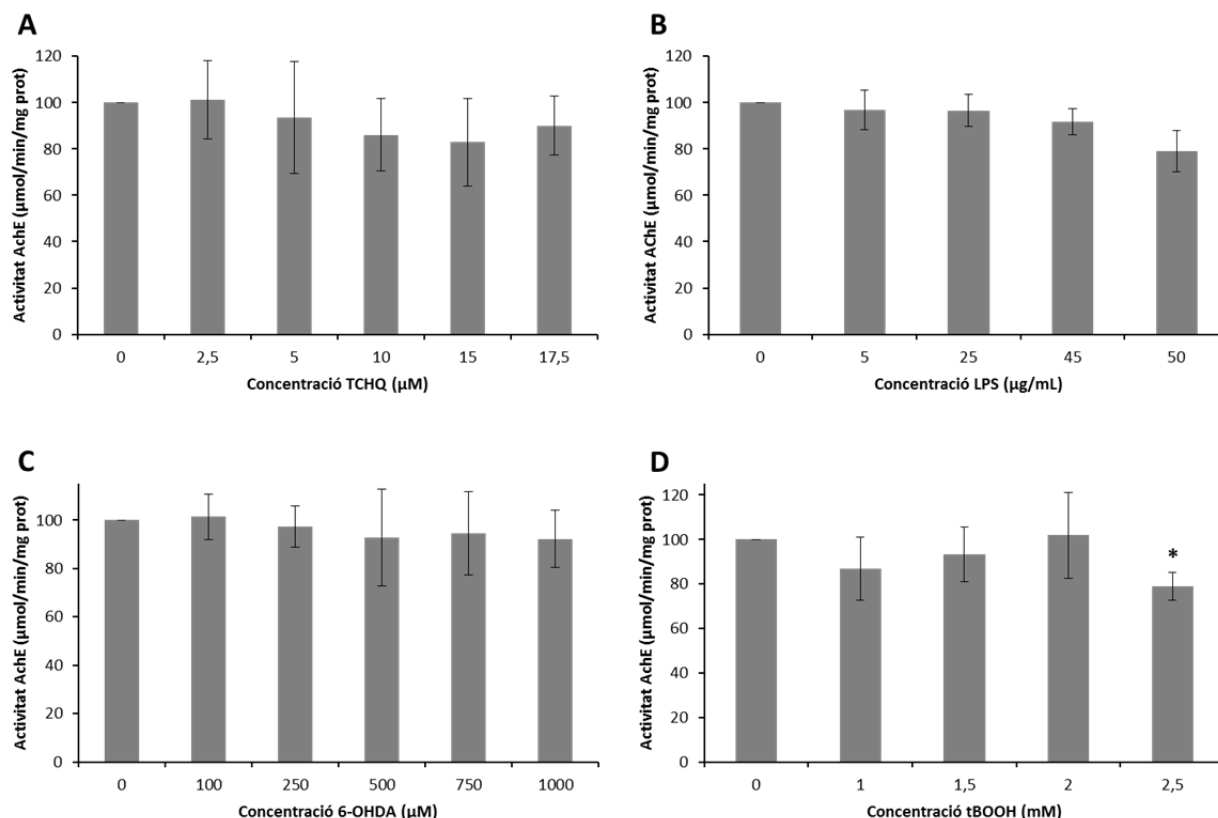


Figura 28: Representació gràfica de l'activitat acetilcolinesterasa en embrions exposats a TCHQ (A), LPS (B), 6-OHDA (C) i tBOOH (D).

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte del grup control: * $p < 0,05$

Per tal de determinar si els embrions presentaven un retard en el creixement, s'ha avaluat l'activitat acetilcolinesterasa (ACE) en els embrions exposats a tBOOH, TCHQ, LPS i 6-OHDA. En l'estudi de Teixidó et al., (2013), s'ha demostrat que una disminució de l'activitat de l'enzim ACE dels embrions de ZF, està relacionada amb un retràs en el creixement embrionari.

De forma general, no s'ha observat una disminució significativa de l'activitat ACE en cap dels grups de tractament amb TCHQ (Figura 28A), LPS (Figura 28B) i 6-OHDA (Figura 28C). Només s'ha observat una disminució significativa de l'activitat ACE en el grup de concentració de 2,5 mM de tBOOH (Figura 28D), de manera que s'ha confirmat l'efecte del tBOOH en el creixement a les concentracions assajades més elevades.

4.1.1.2. MODULADORS DE L'ESTATUS ANTIOXIDANT

Els embrions de ZF s'han exposat als moduladors de l'estatus antioxidant: N-acetil-L-cisteïna (NAC), N ω -Nitro L-arginina metil èster (L-NAME), dietil maleat (DEM) i DL-butionina sulfoximina (BSO) de les 2 a les 26 hpf. Passat aquest temps s'han incubat amb solució de Danieau, a les 50 hpf s'han avaluat els seus efectes sobre el creixement i el desenvolupament embrionari i s'ha calculat el percentatge de letalitat i d'anormalitats morfològiques en cada grup de tractament. També s'ha ajustat la corba concentració-

resposta per a cadascun d'aquests paràmetres i s'ha determinat la concentració màxima tolerable (CMT) de cada modulador.

La NAC és el factor limitant en la síntesi de glutatió i actua com antioxidant degut a la seva activitat segrestadora de radicals lliures (Kerksick i Willoughby, 2005).

L'exposició a NAC s'ha realitzat en un rang de concentracions de 50 a 2500 µM. En l'avaluació de la letalitat s'ha observat un augment significatiu d'aquesta a partir de la concentració de 1500 µM. En el cas de les anormalitats morfològiques, s'ha vist un increment significatiu a partir de la concentració de 500 µM (Taula 8). La CMT per a la NAC s'ha establert en 250 µM. Les corbes concentració-resposta de NAC per a letalitat i per a anormalitats morfològiques s'han ajustat (Figura 29), i s'han obtingut uns valors de LC₅₀ i d'EC₅₀ per anormalitats morfològiques de 1988 µM i 891,8 µM, respectivament.

Taula 8: Resultats de l'exposició dels embrions a la NAC.

Rang de concentracions estudiades, número d'assajos realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (µM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	----	8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
50	1,7	5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
100	2,0	5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
250	2,4	7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
500	2,7	8	0,0 ± 0,0	25,0 ± 23,3***
1000	3,0	7	1,4 ± 3,8	51,4 ± 25,6***
2000	3,3	4	62,5 ± 23,5***	100 ± 0,0***
2500	3,4	3	100 ± 0,0***	----

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: *** p < 0,001

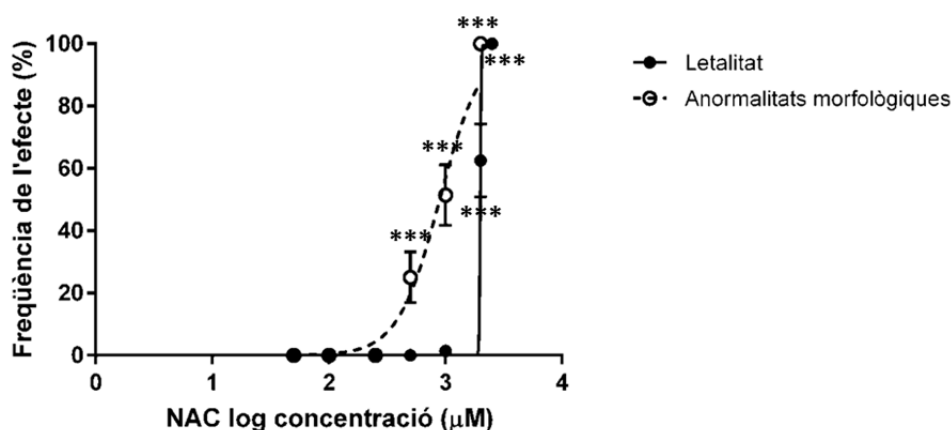


Figura 29: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a la NAC.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

*** p < 0,001

La **L-NAME**, és un inhibidor de l'enzim responsable de la síntesi d'òxid nítric. Com a conseqüència d'aquesta inhibició, es redueix la producció d'òxid nítric, que és un compost que produeix espècies reactives de nitrogen (RNS) i EO (Holmberg et al., 2006).

Els embrions de ZF s'han exposat a L-NAME en un rang de concentracions de 0,1 a 100 µM. S'ha observat un augment significatiu del percentatge de letalitat i també del percentatge d'anormalitats morfològiques a partir de la concentració de 25 µM (Taula 9). S'ha determinat la concentració de 5 µM com la CMT per a L-NAME. No s'ha pogut calcular el valor de LC₅₀ per a L-NAME ja que el percentatge màxim de mortalitat ha estat de 26,7 %. Per altra banda, el valor d'EC₅₀ per anormalitats morfològiques s'ha calculat en 44,36 µM (Figura 30).

Taula 9: Resultats de l'exposició dels embrions al L-NAME.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (µM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	---	4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,1	-1,0	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,5	-0,3	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,67	-0,2	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,0	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
5	0,7	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10	1,0	3	0,0 ± 0,0	16,7 ± 5,8
25	1,4	3	20,0 ± 0,0**	25,0 ± 0,0**
50	1,7	3	23,3 ± 5,8**	48,2 ± 9,9***
100	2,0	3	26,7 ± 11,5**	91,7 ± 14,4***

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: ** < 0,01; *** p < 0,001

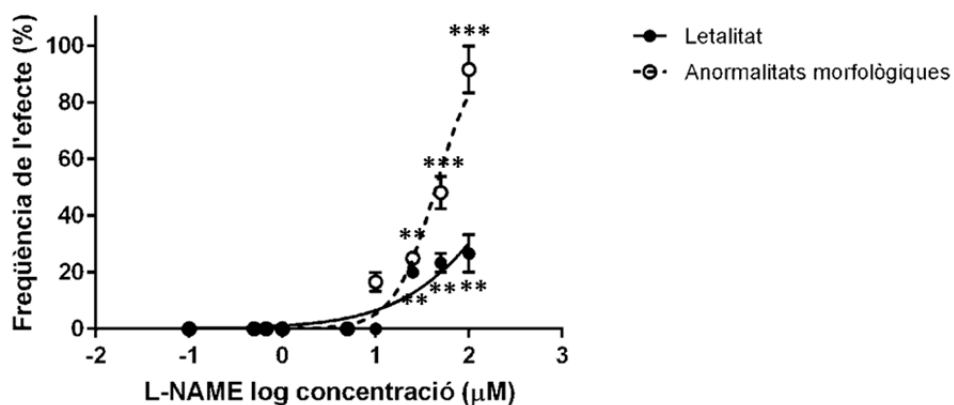


Figura 30: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al L-NAME.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: ** p < 0,01; *** p < 0,001

El DEM, és un agent alquilant que produeix la conjugació i la depleció de glutatió (Priya et al., 2014), així com l'activació de la via Nrf2 (Nakajima et al., 2011)

L'exposició al DEM s'ha portat a terme en un rang de concentracions de 0,1 a 100 µM. S'ha observat un augment significatiu del percentatge d'anormalitats morfològiques a partir de la concentració de 1 µM. Pel que fa a la letalitat s'ha observat un 100 % de mortalitat en el grup d'exposició de 100 µM (Taula 10). S'ha establert la CMT per a l'exposició a DEM en 0,5 µM. S'han ajustat les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques (Figura 31) i s'ha calculat el valor d'EC₅₀ per anormalitats morfològiques que ha estat 1,49 µM. No s'ha pogut calcular el valor de LC₅₀ ja que només s'ha observat letalitat en els embrions exposats a la concentració més alta, on el percentatge ha estat del 100 %.

Taula 10: Resultats de l'exposició dels embrions al DEM.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (µM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	----	6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,1	-1,0	4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,5	-0,3	5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,0	6	0,0 ± 0,0	25,0 ± 20,7***
2,5	0,4	3	0,0 ± 0,0	80,0 ± 20,0***
5	0,7	3	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0***
10	1,0	3	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0***
100	2,0	3	100,0 ± 0,0***	----

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: *** p < 0,001

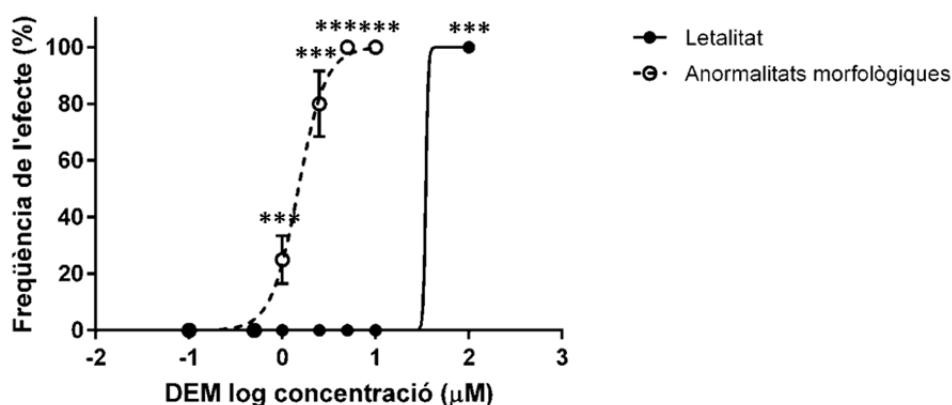


Figura 31: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al DEM.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: *** p < 0,001

El BSO és un compost que inhibeix de forma específica l'enzim γ -glutamyl cisteïna sintetasa, que és el responsable de la síntesi de glutatió, de manera que produeix la depleció dels nivells de glutatió (Griffith, 1982).

Els embrions de ZF s'han exposat al BSO en un rang de concentracions de 1 a 5000 μM . No s'han observat canvis significatius en la letalitat dels embrions exposats. S'ha observat un increment significatiu del percentatge d'anormalitats morfològiques a partir de la concentració de BSO de 250 μM (Taula 11). La CMT per al BSO s'ha establert a 50 μM .

Per tal de calcular els valors de LC_{50} i d' EC_{50} per anormalitats morfològiques en els embrions exposats a BSO, s'han ajustat les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques (Figura 32). No s'ha pogut calcular el valor de LC_{50} ja que no s'han observat canvis significatius en la letalitat en cap dels grups de tractament. S'ha calculat el valor d' EC_{50} per anormalitats morfològiques, que ha estat 2722 μM .

Taula 11: Resultats de l'exposició dels embrions al BSO.

Rang de concentracions estudiades, número d'assajos realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (μM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana \pm SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana \pm SD
0	---	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
1	0,0	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
50	1,7	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
100	2,0	3	0,0 \pm 0,0	9,4 \pm 9,4
250	2,4	3	0,0 \pm 0,0	19,6 \pm 10,3**
500	2,7	3	0,0 \pm 0,0	23,3 \pm 15,2**
1000	3,0	3	0,0 \pm 0,0	38,4 \pm 12,1***
2500	3,4	3	0,0 \pm 0,0	39,5 \pm 9,7***
4000	3,6	3	6,4 \pm 3,4	58,4 \pm 17,0***
5000	3,7	3	3,2 \pm 3,2	65,1 \pm 12,1***

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

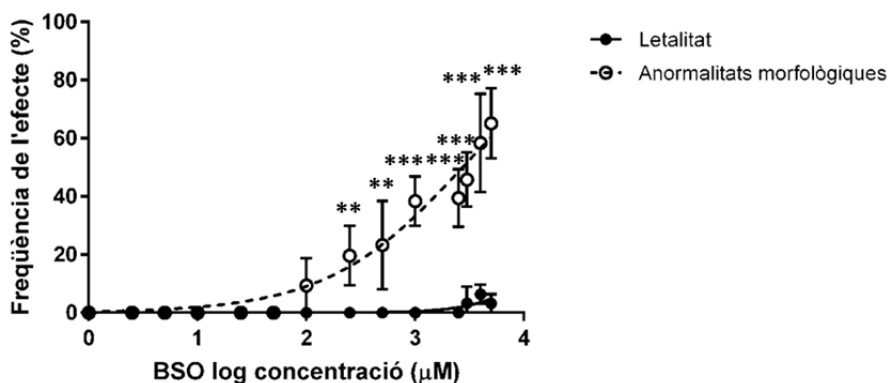


Figura 32: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al BSO.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

S'han avaluat els efectes dels compostos moduladors de l'estatus antioxidant en el creixement i el desenvolupament embrionari del ZF i s'ha establert la CMT de cadascun d'ells per a posteriors assaigs de modulació de la resposta a EO.

4.1.1.3. ANTIOXIDANTS

Els embrions de ZF s'han exposat als compostos antioxidants: quercetina, àcid lipoic i vit E, en una finestra d'exposició de les 2 a les 26 hpf, s'han avaluat els seus efectes en el creixement i el desenvolupament embrionari a les 50 hpf i se n'ha determinat la seva CMT.

La quercetina és un flavonol que es troba en diferents aliments com les pomes, el te i les cebes. Actua enfront a diferents radicals com l'hidroxil, peroxil i superòxid, així com el seu efecte sobre l'òxid nítric i sobre l'oxidació lipídica (Albarracin et al., 2012).

L'exposició dels embrions de ZF a quercetina s'ha realitzat en un rang de concentracions de 1 a 25 μM . No s'han pogut assajar concentracions més elevades ja que a partir de la concentració de 30 μM la quercetina precipitava. En el rang de concentracions estudiades, no s'han observat canvis significatius en la letalitat. S'ha observat un lleuger augment de la presència d'anormalitats morfològiques en els embrions exposats a la concentració de 25 μM (Taula 12). La CMT per la quercetina s'ha establert a 20 μM . Les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques s'han representat gràficament (Figura 33), però no s'han pogut calcular els valors de LC_{50} i d' EC_{50} per anormalitats morfològiques, ja que no s'han observat canvis significatius en aquests paràmetres.

Taula 12: Resultats de l'exposició dels embrions a la quercetina.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (μM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana \pm SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana \pm SD
0	----	4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
1	0,0	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
2,5	0,4	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
5	0,7	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
10	1,0	5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
20	1,3	4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
25	1,4	3	7,7 \pm 14,1	0,0 \pm 0,0

No s'han observat diferències estadísticament significatives en cap dels grups estudiats respecte el grup control

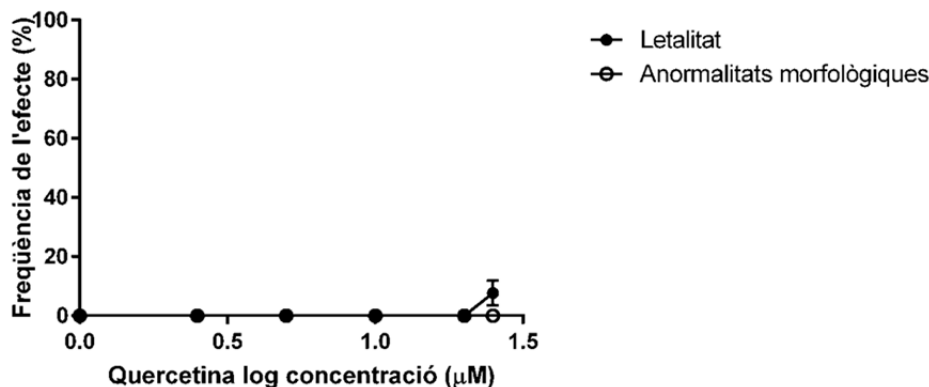


Figura 33: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrió de peix zebra a la quercetina.

No s'han observat diferències estadísticament significatives en cap dels grups estudiats respecte el grup control

L'àcid lipoic és un compost que augmenta els nivells de glutatió i inhibeix la formació de peròxid d'hidrogen i de radicals hidroxil, degut a la seva activitat quelant de metalls de transició amb activitat redox (Maczurek et al., 2008).

Els embrió s'han exposat a àcid lipoic en un rang de concentracions de 0,5 a 1000 µM. S'ha observat un increment significatiu de la letalitat i un increment significatiu de la presència d'anormalitats morfològiques en els embrió a partir de la concentració de 100 µM (Taula 13). La CMT per a àcid lipoic s'ha establert en la concentració de 25 µM.

S'han representat gràficament les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques resultants de l'exposició dels embrió de ZF a àcid lipoic (Figura 34). S'ha calculat el valor de LC₅₀, que ha estat de 114,5 µM. Per altra banda, no s'ha pogut calcular el valor d'EC₅₀ per anormalitats morfològiques ja que el màxim increment en el percentatge d'anormalitats morfològiques en els embrió exposats a àcid lipoic ha estat de 28,8 % a la concentració de 100 µM.

Taula 13: Resultats de l'exposició dels embrió a l'àcid lipoic.

Rang de concentracions estudiades, número d'assajos realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (µM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	---	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,5	-0,3	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,0	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10	1,0	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
25	1,4	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
50	1,7	3	10,0 ± 14,1	17,5 ± 10,6
100	2,0	3	35 ± 21,2***	28,8 ± 12,4*
250	2,4	3	100,0 ± 0,0***	---
500	2,7	3	100,0 ± 0,0***	---
1000	3,0	3	100,0 ± 0,0***	---

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: * p < 0,05; *** p < 0,001

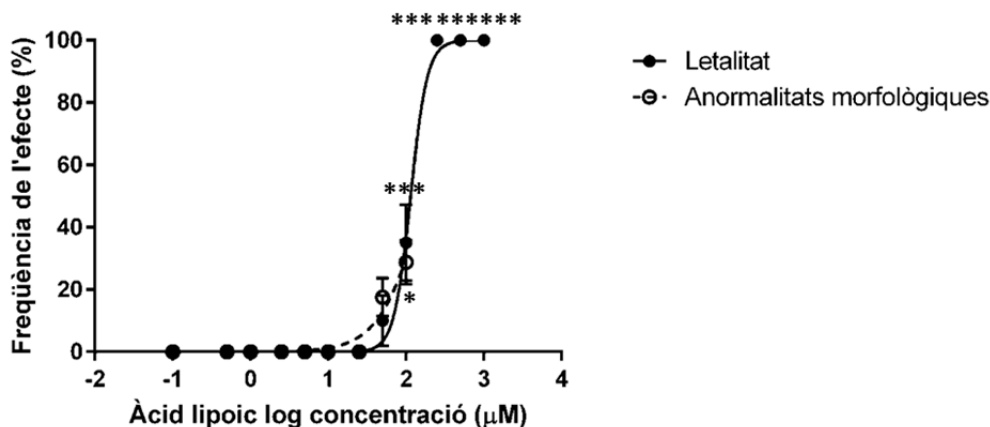


Figura 34: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrió de peix zebra a l'àcid lipoic.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

* p < 0,05; *** p < 0,001

La vit E és un tocoferol que es troba en olis vegetals, nous, llavors i cereals, entre altres aliments. És un compost amb activitat segrestadora de radicals lliures, que comporta una activitat antioxidant important (Davis et al., 2015).

L'exposició a vit E s'ha realitzat en un rang de concentracions de 1 a 500 µM. S'ha observat un lleuger increment del percentatge de letalitat i d'anormalitats morfològiques en les concentracions més altes, però els canvis en aquests paràmetres ni han estat significatius (Taula 14). S'ha establert la CMT de la vit E a 100 µM.

A partir dels resultats de l'exposició dels embrió a vit E s'han ajustat les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques (Figura 35). Tot i així, no s'han pogut calcular els valors de LC₅₀ i d'EC₅₀ per anormalitats morfològiques de la vit E, degut a que no s'han produït canvis estadísticament significatius en aquests paràmetres.

Taula 14: Resultats de l'exposició dels embrió a la vitamina E.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats (n), freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (µM)	Log concentració	n	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	----	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,0	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
5	0,7	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10	1,0	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
25	1,4	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
50	1,7	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
100	2,0	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
250	2,4	3	3,3 ± 5,8	0,0 ± 0,0
500	2,7	3	6,7 ± 11,5	11,7 ± 12,6

No s'han observat diferències estadísticament significatives en cap dels grups estudiats respecte el grup control

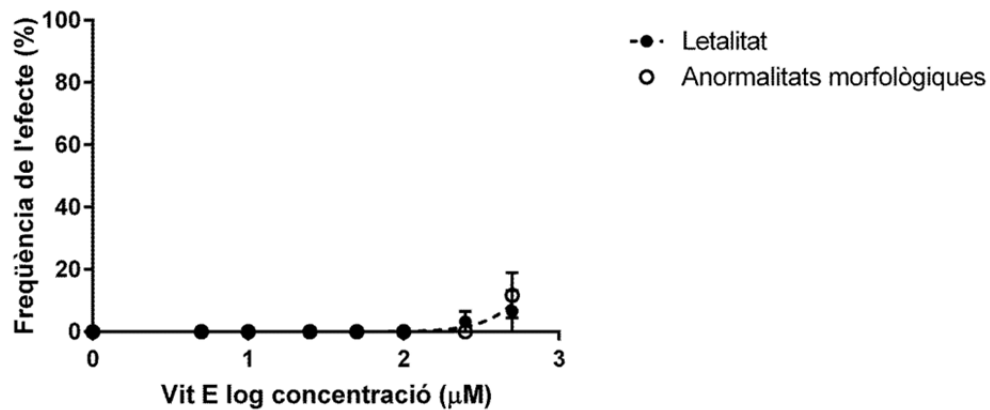


Figura 35: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrió de peix zebra a la vitamina E.

No s'han observat diferències estadísticament significatives en cap dels grups estudiats respecte el grup control

S'han determinat els efectes dels compostos antioxidants en el creixement i desenvolupament embrionari dels ZF i s'ha obtingut la CMT per a cadascun d'ells, per tal de ser utilitzats en l'aplicació del model d'EO en embrió de ZF.

4.1.2. MODULACIÓ DE LA RESPOSTA A ESTRÈS OXIDATIU

Un cop caracteritzats els efectes del tBOOH, la TCHQ, el LPS i la 6-OHDA en els embrió de ZF, la segona part de l'establiment del model ha consistit en confirmar que els efectes observats eren deguts a un mecanisme d'EO.

S'han realitzat assaigs de modulació de la resposta a EO amb l'objectiu d'augmentar i disminuir l'estatus antioxidant dels embrió de ZF. L'augment de l'estatus antioxidant s'ha portat a terme amb NAC i amb L-NAME. La disminució de l'estatus antioxidant s'ha realitzat amb DEM i amb BSO.

La hipòtesi de partida de l'estratègia de modulació de la resposta a EO ha estat que, si l'efecte observat en els embrió exposats als inductors d'EO era degut a un mecanisme d'EO, a l'augmentar l'estatus antioxidant d'aquests, s'activarien els mecanismes de defensa antioxidants i serien necessàries concentracions superiors de l'inductor d'EO per tal d'observar els mateixos efectes que en l'exposició única a l'inductor. Per altra banda, si es disminuïa l'estatus antioxidant dels embrió, aquests presentarien una menor capacitat en les defenses antioxidants i serien més susceptibles a l'efecte de l'EO, de manera que s'observarien els efectes de l'inductor d'EO a concentracions menors del compost. D'aquesta forma, si el compost estudiat actuava per un mecanisme d'EO, al comparar les corbes concentració-resposta dels efectes observats en els embrió pre-exposats al modulador, i seguidament exposats al compost d'estudi, amb les corbes concentració-resposta en l'exposició única al compost, s'observarien diferències estadísticament significatives entre elles, confirmant el mecanisme d'EO.

S'han portat a terme assaigs de modulació de la resposta a EO, que han consistit en l'exposició dels embrió de ZF de les 2 a les 26 hpf a la CMT dels moduladors que incrementen l'estatus antioxidant (NAC i L-NAME) o disminueixen les defenses antioxidants (DEM i BSO), seguit de l'exposició dels embrió a les concentracions de treball dels inductors d'EO.

En els embrions de ZF exposats a tBOOH, la pre-exposició a NAC i L-NAME, ha produït un desplaçament significatiu de les corbes concentració-resposta de letalitat i d'anormalitats morfològiques cap a concentracions majors de tBOOH, indicant un efecte protector d'aquests compostos. La pre-exposició a aquestsE, seguida de l'exposició a tBOOH no ha produït un increment significatiu de la mortalitat en els embrions de ZF, de manera que no s'han pogut calcular els valors de LC₅₀. Per altra banda, en els embrions que han estat pre-exposats a DEM i BSO i seguidament exposats a les concentracions de treball de tBOOH, els efectes en la letalitat i en les anormalitats morfològiques s'han observat a concentracions de tBOOH significativament menors. Aquests resultats indiquen una intensificació dels efectes del tBOOH, ja que aquests s'observen a concentracions inferiors que en l'exposició única (Taula 15 i Figura 36).

Taula 15: Modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats al tBOOH. Moduladors estudiats, concentració letal 50 (LC₅₀) i concentració efectiva 50 per anormalitats morfològiques (EC₅₀).

Modulador de la resposta a estrès oxidatiu	Inductor d'estrès oxidatiu	LC ₅₀ (IC 95%)	EC ₅₀ (IC 95%)
Sense Moduladors	tBOOH	2,38 mM (2,28-2,48)	1,64 mM (1,44-1,87)
NAC		n.d.	2,28 mM ** (2,11-2,46)
L-NAME		n.d.	3,17 mM*** (2,85-3,52)
DEM		2,06 mM * (1,78-2,38)	1,17 mM ** (1,07-1,29)
BSO		1,95 mM*** (1,85-2,05)	1,20 mM * (1,07-1,33)

n.d. = no s'han observat efectes en la letalitat

Diferències estadísticament significatives respecte del grup no tractat amb moduladors:

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

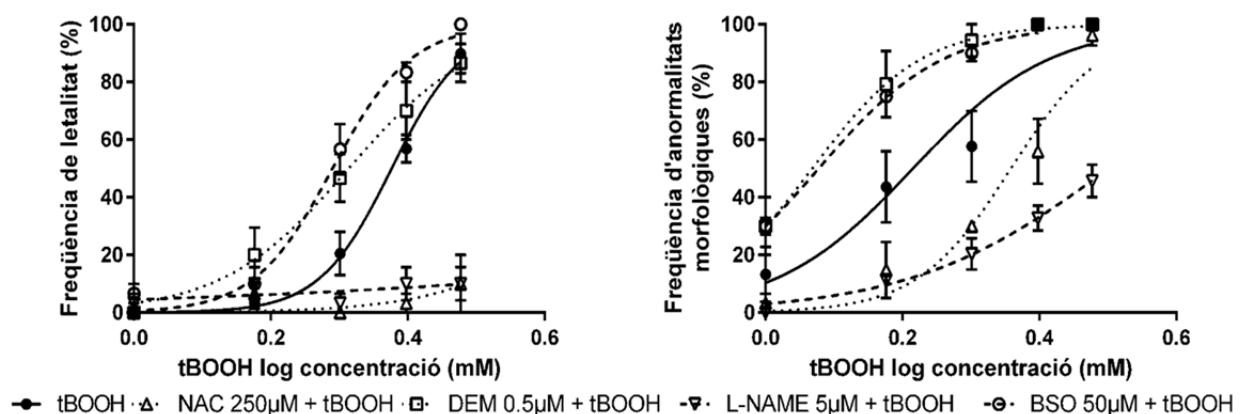


Figura 36: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques per als assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats al tBOOH.

Diferències estadísticament significatives: p < 0,05, en la comparació de les corbes de tots els moduladors de la resposta a estrès oxidatiu amb les corbes de letalitat i d'anormalitats morfològiques de tBOOH.

La modulació de la resposta a l'EO en embrións exposats a TCHQ ha presentat uns resultats similars als del cas del tBOOH (Taula 16 i Figura 37). Quan els embrións de ZF han estat pre-exposats a NAC i a L-NAME, els efectes de letalitat i d'anormalitats morfològiques s'han observat a concentracions significativament més elevades de TCHQ, indicant un efecte protector dels moduladors, ja que eren necessàries concentracions més elevades de TCHQ per tal d'aconseguir els mateixos efectes que en l'exposició única. Quan els embrións s'han exposat primerament a DEM o BSO, seguit de l'exposició a TCHQ, s'ha observat un desplaçament significatiu de les corbes concentració-resposta de letalitat i d'anormalitats morfològiques cap a concentracions menors de TCHQ, indicant una potenciació de l'efecte de la TCHQ, ja que s'observen els efectes en els embrións a concentracions inferiors que en l'exposició única a TCHQ.

Taula 16: Modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrións exposats a la TCHQ. Moduladors estudiats, concentració letal 50 (LC₅₀) i concentració efectiva 50 per anormalitats morfològiques (EC₅₀).

Modulador de la resposta a estrès oxidatiu	Inductor d'estrès oxidatiu	LC ₅₀ (IC 95%)	EC ₅₀ (IC 95%)
Sense Moduladors	TCHQ	15,2 µM (13,8-16,7)	8,84 µM (7,15-10,9)
NAC		19,6 µM * (16,6-23,3)	15,5 µM *** (14,8-16,3)
L-NAME		19,0 µM * (17,3-20,9)	17,1 µM *** (16,9-17,3)
DEM		9,78 µM ** (7,31-13,1)	4,79 µM * (3,88-5,91)
BSO		6,89 µM *** (6,13-7,75)	4,17 µM ** (3,62-4,81)

Diferències estadísticament significatives respecte del grup no tractat amb moduladors:

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

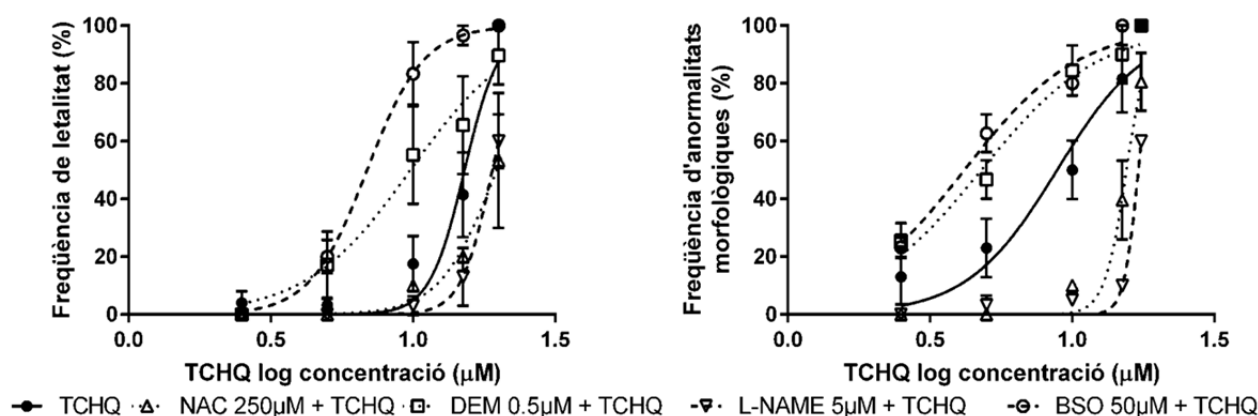


Figura 37: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques per als assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrións exposats a la TCHQ.

Diferències estadísticament significatives: p < 0,05, en la comparació de les corbes de tots els moduladors de la resposta a estrès oxidatiu amb les corbes de letalitat i d'anormalitats morfològiques de TCHQ.

La pre-exposició dels embrions a NAC i L-NAME amb tBOOH i TCHQ ha reduït significativament la mortalitat dels embrions i l'aparició d'anormalitats morfològiques, essent d'especial importància en el cas del tBOOH, en què la pre-exposició a compostos que augmenten l'estatus antioxidant ha impedit l'aparició d'efectes letals. Per contra, quan els embrions han estat pre-exposats a DEM i BSO, per tal de disminuir les reserves de glutatió, s'ha observat un desplaçament cap a l'esquerra de les corbes concentració-resposta de letalitat i d'anormalitats morfològiques. Aquest desplaçament indica que és necessària una menor concentració de tBOOH i de TCHQ per a produir els mateixos efectes letals i de producció d'anormalitats morfològiques que els observats a concentracions majors. Els resultats estadísticament significatius, obtinguts en la modulació de la resposta a EO en els embrions de ZF exposats a tBOOH i a TCHQ, indiquen que els efectes produïts per aquests compostos són deguts a un mecanisme d'EO.

En els embrions exposats a les concentracions de treball de LPS, la pre-exposició als moduladors de l'estatus antioxidant ha produït un desplaçament significatiu de les corbes concentració-resposta de letalitat cap al sentit corresponent en cada cas. En la pre-exposició dels embrions a DEM i BSO, s'ha observat un augment significatiu de la mortalitat, mentre que s'ha observat una disminució significativa de la mortalitat en la pre-exposició a NAC i L-NAME. En el cas del L-NAME, la pre-exposició dels embrions ha produït una disminució significativa de la producció d'anormalitats morfològiques, però aquest efecte no s'ha observat en cap dels altres moduladors estudiats (Taula 17 i Figura 38). Es pot concloure que les anormalitats morfològiques observades en els embrions exposats a LPS, no són degudes majoritàriament a un mecanisme d'EO.

Taula 17: Modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats al LPS. Moduladors estudiats, concentració letal 50 (LC₅₀) i concentració efectiva 50 per a anormalitats morfològiques (EC₅₀).

Modulador de la resposta a estrès oxidatiu	Inductor d'estrès oxidatiu	LC ₅₀ (IC 95%)	EC ₅₀ (IC 95%)
Sense Moduladors	LPS	50,1 µg/mL (48,6-51,8)	36,0 µg/mL (28,4-45,6)
NAC		51,6 µg/mL * (48,8-54,5)	39,6 µg/mL (35,0-44,8)
L-NAME		53,4 µg/mL * (51,9-55,0)	51,3 µg/mL ** (49,6-53,0)
DEM		42,1 µg/mL *** (37,9-46,8)	31,1 µg/mL (26,3-36,6)
BSO		45,2 µg/mL ** (43,2-47,4)	36,2 µg/mL (29,4-44,5)

Diferències estadísticament significatives respecte del grup no tractat amb moduladors: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

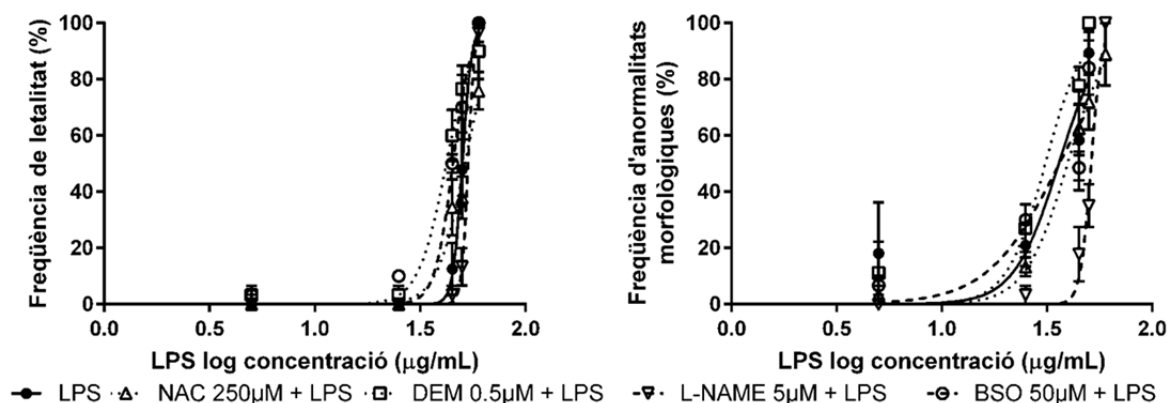


Figura 38: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques per als assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats al LPS.

Diferències estadísticament significatives: $p < 0,05$, en la comparació de la corba de letalitat de tots els modulators de la resposta a estrès oxidatiu i la corba d'anormalitats morfològiques en la pre-exposició a L-NAME, amb les corbes de LPS.

El LPS s'ha utilitzat com a inductor d'inflamació en ZF, ja que s'ha vist que la seva exposició activa la resposta immunitària innata en els embrions, afavorint l'alliberació de factor de necrosi tumoral α , citocines i interleucines, entre altres factors (Watzke et al., 2007). Els resultats obtinguts en aquest estudi, indiquen que la major part dels efectes observats en els embrions de ZF exposats a LPS no són deguts a un mecanisme d'EO. Aquests podrien ser deguts a un mecanisme d'inflamació, ja que el LPS presenta la capacitat de produir una resposta inflamatòria en els embrions de ZF (Novoa et al., 2009).

Els resultats de la pre-exposició dels embrions als modulators, seguida de l'exposició a 6-OHDA es mostren a la Taula 18 i a la Figura 39. La pre-exposició dels embrions a NAC amb 6-OHDA ha produït un augment significatiu de la distància total recorreguda pels embrions, mentre que, quan els embrions han estat pre-exposats a DEM i BSO, s'ha observat un desplaçament significatiu de la corba de la distància total recorreguda cap a concentracions menors de 6-OHDA. En el cas de la pre-exposició a L-NAME s'han obtingut efectes en la distància total recorreguda comparables als de l'exposició única a 6-OHDA. Els resultats estadísticament significatius en els embrions pre-exposats a NAC, DEM i BSO indiquen que els efectes en el moviment dels embrions de ZF exposats a la 6-OHDA, són deguts a un mecanisme d'EO general. Els efectes de la 6-OHDA no serien deguts a un augment de la producció d'espècies reactives de nitrogen, ja que no s'han obtingut resultats significatius en la pre-exposició a L-NAME (Holmberg et al., 2006).

Taula 18: Modulació de la resposta a estrès oxidatiu en embrions exposats a la 6-OHDA. Moduladors estudiats i concentració efectiva 50 per a la distància total recorreguda (EC₅₀).

Modulador de la resposta a estrès oxidatiu	Inductor d'estrès oxidatiu	EC ₅₀ (IC 95%)
Sense Moduladors	6-OHDA	386,9 µM (329,6-454,3)
NAC		1071 µM *** (725-1583)
L-NAME		422,7 µM (361,1-494,9)
DEM		208,1 µM *** (174,4-248,3)
BSO		135,2 µM *** (118,7-153,9)

Diferències estadísticament significatives respecte del grup no tractat amb moduladors:
*** p < 0,001

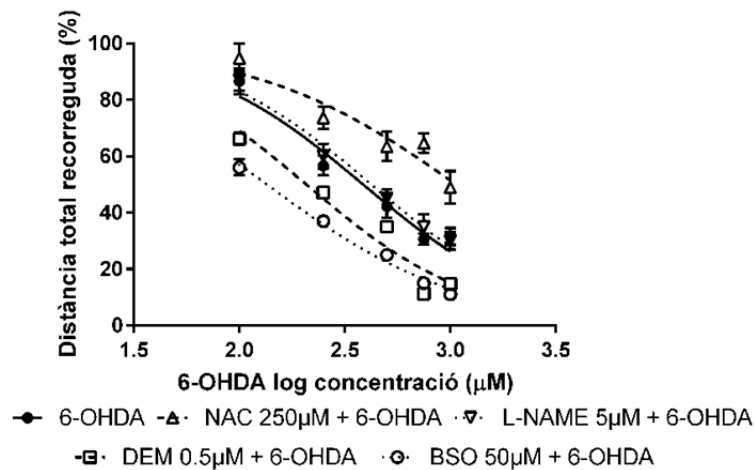


Figura 39: Corbes concentració-resposta per a la distància total recorreguda pels embrions de peix zebra en els assaigs de modulació de la resposta a estrès oxidatiu en l'exposició a la 6-OHDA.

Diferències estadísticament significatives: p < 0,05, en la comparació de la corba de la distància total recorreguda en la pre-exposició a NAC, DEM i BSO, amb la corba de 6-OHDA.

De forma general, els resultats dels assaigs de modulació de la resposta a EO en els embrions exposats als inductors d'EO han produït un desplaçament significatiu de les corbes concentració-resposta dels paràmetres estudiats en els grups de pre-exposició als moduladors de la resposta a EO, respecte de les corbes concentració-resposta de l'exposició única als inductors d'EO, en la majoria dels casos estudiats. Aquests resultats han confirmat un mecanisme d'acció oxidatiu de la major part dels inductors d'EO utilitzats en el model d'estudi d'aquesta tesi doctoral. Altres autors han utilitzat moduladors de la resposta a EO per tal de comprovar el mecanisme oxidatiu de diferents compostos en embrions de ZF (Chen et al., 2014, 2011; Liu et al., 2015; Usenko et al., 2008). Dels resultats obtinguts en la modulació

de la resposta a EO en embrions exposats a diferents inductors d'EO, es pot concloure que els efectes letals i de producció d'anormalitats morfològiques observats en els embrions exposats a tBOOH i TCHQ, així com els efectes en la distància total recorreguda en els embrions exposats a 6-OHDA, han estat deguts a un mecanisme d'EO.

Per tal de simplificar l'aplicació del model d'EO amb embrions de ZF, s'han escollit dos dels inductors estudiats per a ser utilitzats en posteriors assaigs. S'ha seleccionat la 6-OHDA com l'inductor d'EO a utilitzar en l'avaluació dels efectes neuroprotectors de compostos antioxidants naturals, ja que, tal com s'ha indicat anteriorment, presenta un mecanisme d'acció oxidatiu específic a nivell de sistema nerviós (Rodríguez-Pallares et al., 2007). Per altra banda, s'ha establert el tBOOH com l'inductor d'EO a utilitzar en el model d'EO d'aquesta tesi doctoral, per a l'avaluació dels efectes antioxidants *in vivo* de diferents compostos. S'ha seleccionat el tBOOH entre els altres inductors d'EO, ja que ha estat el compost que ha proporcionat els efectes més consistents en la modulació de la resposta a EO.

Degut a la diversitat d'efectes i de vies d'acció en la producció d'EO (Valko et al., 2007), s'han volgut caracteritzar millor els efectes oxidants del tBOOH i s'han realitzat assaigs d'avaluació de l'expressió de gens relacionats amb l'EO.

S'han realitzat assaigs d'avaluació de l'expressió de gens relacionats amb l'EO: glutatió peroxidasa 1 α (gpx1a), catalasa (cat), γ -glutamil cisteïna sintetasa (gclc), glutatió-S-transferasa pi 1 (gstp1), en embrions de ZF exposats a una concentració subletal de tBOOH (1 mM). L'exposició dels embrions de ZF a una concentració subletal de tBOOH, ha produït una inducció significativa del gen *gstp1*, mentre que no s'han observat efectes significatius en l'expressió dels altres gens estudiats. El gen de la *gstp1* ha estat caracteritzat en embrions de ZF i codifica per a l'enzim glutatió S-transferasa pi 1, un enzim que catalitza la conjugació del glutatió amb diferents compostos, per tal de ser eliminats (Suzuki et al., 2005).

A més a més, quan els embrions han estat primerament exposats a la CMT de NAC i seguidament exposats a tBOOH s'ha observat una disminució significativa de l'expressió d'aquest gen. La pre-exposició dels embrions de ZF a DEM, seguida de l'exposició a tBOOH no ha produït diferències significatives en la inducció del gen *gstp1*, en comparació amb la inducció produïda per l'exposició única a tBOOH (Figura 40). Quan els embrions han estat pre-exposats a NAC i seguidament exposats a la concentració subletal de tBOOH, s'ha observat una disminució significativa de l'expressió del gen *gstp1*, respecte de l'expressió gènica en els embrions exposats únicament a tBOOH. Mitjançant aquest assaig s'ha pogut tornar a confirmar l'efecte oxidant del tBOOH en embrions de ZF.

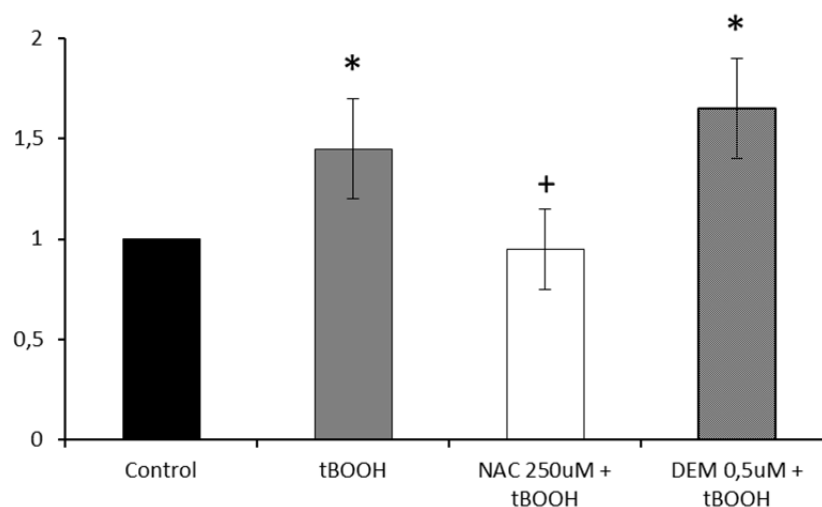


Figura 40: Resultats de l'avaluació de l'expressió del gen *gstp1*.

Diferències estadísticament significatives:

* $p < 0,05$ respecte el grup control, + $p < 0,05$ respecte el grup tBOOH.

A partir de la caracterització dels efectes dels inductors d'EO en els embrions de ZF i dels assaigs de modulació de la resposta a EO, s'ha establert un model *in vivo* de producció d'EO, basat en el test amb embrions de ZF. Així mateix, s'han corroborat les bases del model d'EO establert: les condicions d'exposició que s'han d'utilitzar per tal de produir EO, així com els efectes derivats de l'EO que s'han d'avaluar.

4.1.3. APLICACIÓ DEL MODEL: AVALUACIÓ DELS EFECTES ANTIOXIDANTS IN VIVO DE COMPOSTOS CONEGUTS

El pas final per a comprovar l'adequació del model d'EO amb embrions de ZF, ha estat la verificació de la capacitat d'aquest per a l'avaluació de l'efecte antioxidant de diferents compostos.

Per tal d'avaluar l'efecte antioxidant d'aquests compostos mitjançant el model d'EO establert en aquesta tesi doctoral, s'han pre-exposat els embrions de ZF al compost d'estudi i, seguidament s'han exposat a les concentracions de treball de tBOOH prèviament establertes. Donat que s'ha demostrat que l'efecte letal i de producció d'anormalitats morfològiques en els embrions de ZF exposats a tBOOH és degut a un mecanisme d'EO; si el compost d'estudi té activitat antioxidant, activaria les defenses de manera que serien necessàries concentracions majors de tBOOH per tal d'observar el mateix efecte en la letalitat i en les anormalitats morfològiques que en l'exposició única a tBOOH. Així mateix, en la pre-exposició dels embrions al compost d'estudi, s'observaria un desplaçament significatiu de la corba concentració-resposta de letalitat o d'anormalitats morfològiques cap a concentracions majors de tBOOH, de manera que es confirmaria l'efecte antioxidant d'aquest.

En l'aplicació del model d'EO a l'avaluació de l'efecte antioxidant de compostos amb activitat antioxidant establerta, s'han pre-exposat els embrions a la CMT de vit E, àcid lipoic i quercetina, de les 2 a les 26 hpf. A continuació, els embrions s'han exposat a tBOOH de les 26 a les 50 hpf.

La pre-exposició dels embrions de ZF a vit E, àcid lipoic i quercetina ha produït un desplaçament significatiu de les corbes concentració-resposta de letalitat i d'anormalitats morfològiques cap a concentracions majors de tBOOH, en comparació amb els efectes produïts per l'exposició única a tBOOH (Figura 41 i Taula 19). Els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que la pre-exposició dels embrions a quercetina, vit E i àcid lipoic, produeix un efecte protector enfront als efectes oxidants del tBOOH, ja que serien necessàries concentracions majors d'aquest per tal d'obtenir els mateixos efectes que en l'exposició única.

Aquests resultats han confirmat els efectes antioxidants de la vit E, l'àcid lipoic i la quercetina mitjançant el model *in vivo* d'EO amb embrions de ZF i han corroborat els resultats prèviament descrits per als compostos estudiats.

Taula 19: Efectes dels compostos antioxidants en la letalitat i les anormalitats morfològiques en embrions de peix zebra exposats a tBOOH.

Antioxidants estudiats, concentració letal 50 (LC₅₀) i concentració efectiva 50 per a anormalitats morfològiques (EC₅₀).

Antioxidants	Inductor d'estrès oxidatiu	LC ₅₀ (IC 95%)	EC ₅₀ (IC 95%)
Sense Antioxidants	tBOOH	2,38 mM (2,28-2,49)	1,64 mM (1,44-1,87)
Vit E		2,83 mM *** (2,73-2,94)	2,42 mM *** (2,26-2,60)
Quercetina		3,26 mM *** (3,16-3,37)	3,05 mM *** (2,74-3,41)
Àcid lipoic		3,72 mM *** (3,14-4,40)	3,70 mM *** (3,03-3,37)

Diferències estadísticament significatives respecte del grup no tractat amb moduladors: *** p < 0,001

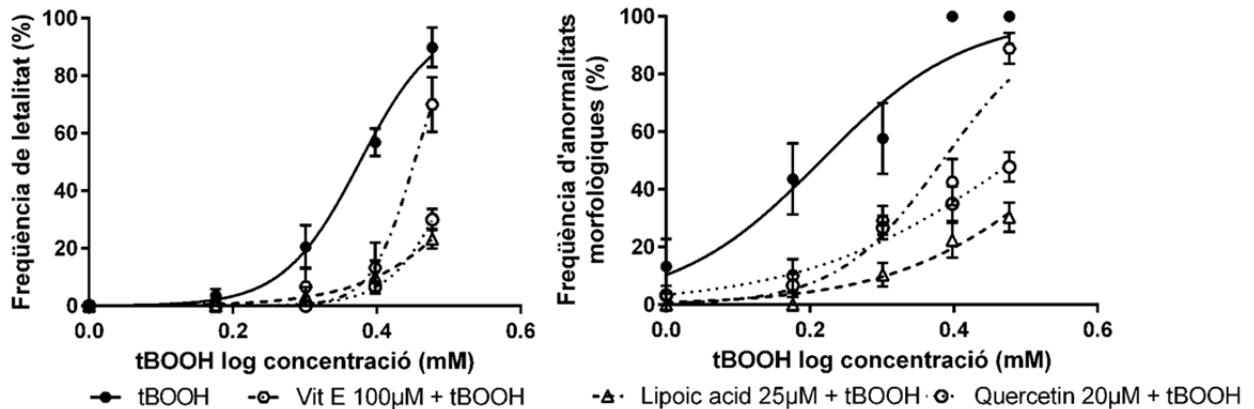


Figura 41: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques per a l'estudi de la capacitat del model d'estrès oxidatiu per a detectar l'activitat antioxidant de la vitamina E, l'àcid lipoic i la quercetina.

Diferències estadísticament significatives: p < 0,001, en la comparació de les corbes de tots els compostos amb activitat antioxidant coneguda amb les corbes de letalitat i d'anormalitats morfològiques de tBOOH.

El test amb embrions de ZF ha estat àmpliament utilitzat en l'estudi de diferents tipus de compostos, entre els que es troben compostos amb un mecanisme d'acció relacionat amb l'EO. Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral concorden amb els obtinguts per Na et al., (2009), que observen l'efecte protector de la vit E en embrions de ZF exposats al bifenil policlorat 126 (PCB126), un compost que causa EO. Hi ha altres estudis en els que s'han avaluat els efectes causats en els embrions de ZF per l'etanol, que és un compost que presenta una mecanisme d'acció relacionat amb l'EO (Reimers et al., 2006). En aquest estudi, van analitzar i confirmar l'efecte preventiu de l'àcid lipoic, en la disfunció cardiovascular produïda per l'etanol en els embrions de ZF. Compostos antioxidants naturals com la quercetina, han demostrat la seva capacitat antioxidant i, també la seva capacitat protectora enfront diverses malalties, mitjançant l'assaig amb embrions de ZF (Zhang et al., 2011).

En l'estudi de Prior et al., (2005) han establert que un mètode estàndard per a l'avaluació de l'activitat antioxidant dels compostos presents en els aliments hauria de complir una sèrie de requisits com per

exemple, que sigui simple, que segueixi una metodologia ben definida i amb avaluació de paràmetres específics, que permeti l'anàlisi de compostos hidròfils i lipòfils i l'adaptació a metodologies *high-throughput*. L'assaig amb embrions de ZF compleix moltes d'aquestes característiques, ja que és un mètode *in vivo*, en el que s'avaluen els efectes dels compostos en l'organisme sencer, però que presenta la major part dels avantatges de les metodologies *in vitro*: fàcil manteniment, gran nombre d'individus amb els que treballar, embrions transparents que es desenvolupen fora de la mare i són fàcilment accessibles per a la seva manipulació, etc. (Scholz et al., 2008). Els ZF presenten gens i enzims que estan implicats en processos de defensa enfront de l'EO. Aquests sistemes han estat estudiats i s'ha demostrat que són anàlegs als sistemes de defensa antioxidants dels mamífers (Timme-Laragy et al., 2012). A més a més, l'embrió de ZF presenta la capacitat de respondre de forma robusta a factors patològics relacionats amb l'EO (Chen et al., 2012) i s'ha establert com un organisme model per a l'estudi dels mecanismes relacionats amb l'EO (Fang i Miller, 2012).

En aquesta tesi doctoral s'ha establert un model d'estudi dels efectes de l'EO en embrions de ZF. Aquest model permet una avaluació ràpida dels efectes dels compostos antioxidants en un model d'animal vertebrat *in vivo*, que suposa una via d'estudi intermèdia entre els assaigs químics d'avaluació de la capacitat antioxidant *in vitro* i l'avaluació dels efectes directament en humans.

4.2. CARACTERITZACIÓ DELS POLIFENOLS DEL VI NEGRE

La dieta Mediterrània és una dieta rica en antioxidants naturals, com els polifenols, que formen part de productes de consum freqüent com les fruites, les verdures, el raïm negre, el vi negre, el cafè, les olives i l'oli d'oliva verge, etc. (Tresserra-Rimbau et al., 2013). En els darrers anys ha augmentat considerablement l'interès per l'estudi dels compostos fenòlics bioactius presents en el raïm negre, així com en els seus derivats com el vi negre. Aquests compostos bioactius són generalment, antocianines, flavanols, flavonols i resveratrol. S'han avaluat les seves activitats biològiques com antioxidants, cardioprotectors, neuroprotectors, anticancerígens, anti-inflamatoris i antiaging, entre altres (De Nisco et al., 2013; Xia et al., 2013). La majoria d'aquests efectes han estat estudiats *in vitro*, mitjançant cultius cel·lulars o tècniques analítiques (Becker et al., 2014; Carbonneau et al., 2014); o bé *in vivo*, mitjançant models animals especialment seleccionats per a l'estudi d'alteracions concretes (Chagas et al., 2015; Phulara et al., 2015; Speroni et al., 1998; Z. J. Zhang et al., 2011).

El segon objectiu que s'ha plantejat en aquesta tesi doctoral ha estat avaluar l'efecte antioxidant *in vivo* de compostos naturals presents en una mostra de vi negre, mitjançant el model d'EO establert en la primera part de la tesi.

4.2.1. AVALUACIÓ DELS EFECTES DE LA MOSTRA DE VI NEGRE EN EMBRIONS DE PEIX ZEBRA

Els embrions de ZF s'han exposat a la mostra de vi negre, a la que prèviament s'havia eliminat l'alcohol, de les 2 a les 26 hpf i s'han avaluat els seus efectes en el creixement i desenvolupament embrionari a les 50 hpf.

Els embrions de ZF s'han exposat a dilucions de la mostra de vi negre amb solució de Danieau; 1:1000, 1:800, 1:600 i 1:400. S'han observat efectes letals i presència d'anormalitats morfològiques a partir de la dilució 1:600 de la mostra de vi negre. Els efectes observats han presentat canvis significatius en la dilució 1:400 (Figura 42). S'ha establert la CMT de la mostra de vi negre en la dilució 1:800 d'aquesta.

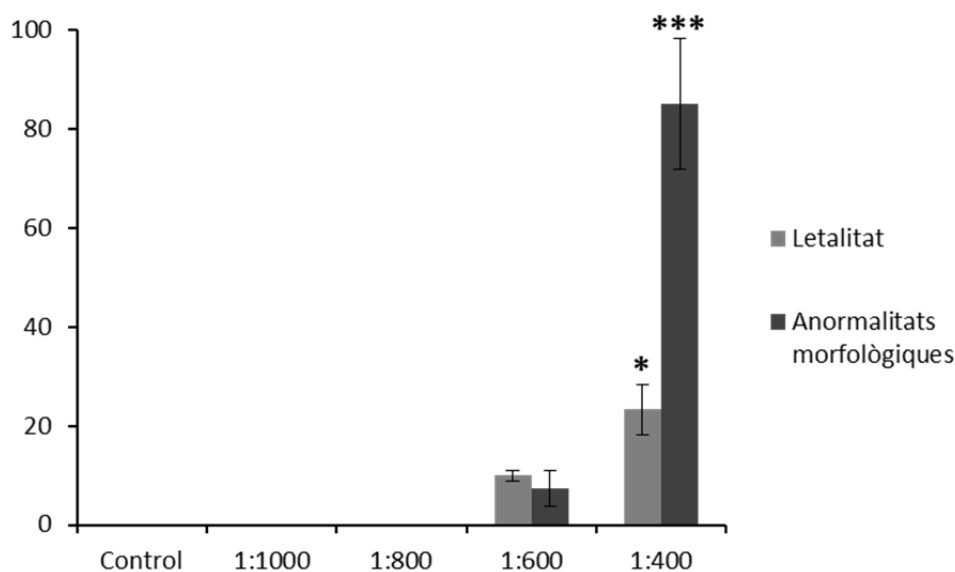


Figura 42: Resultats per a letalitat i presència d'anormalitats morfològiques en l'exposició dels embrions de peix zebra a diferents dilucions de la mostra de vi negre en solució de Danieau.

Diferències estadísticament significatives: $p < 0,05$; $p < 0,001$, respecte el grup control

4.2.2. IDENTIFICACIÓ DELS COMPOSTOS PRESENTS EN LA MOSTRA DE VI NEGRE I EN L'HOMOGENAT D'EMBRIONS DE PEIX ZEBRA

Per tal d'identificar els compostos polifenòlics presents en la mostra de vi negre, i els compostos que tenen la capacitat de penetrar a l'interior dels embrions de ZF, s'han analitzat les mostres de vi negre i de l'homogenat d'embrions de ZF que havien estat exposats a aquesta mitjançant la tècnica d'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS), combinada amb tecnologia Orbitrap i trampa lineal d'ions (LTQ), per tal d'identificar els polifenols presents en cadascuna d'elles.

Les mesures de la massa exacta i l'assignació de la composició elemental són essencials per a la caracterització de les molècules petites identificades (Vallverdú-Queralt et al., 2014). La combinació de les tecnologies utilitzades proporciona informació de la massa exacta de molècules petites, que permet elucidar-ne l'estructura química i, mitjançant la comparació amb la bibliografia o amb estàndards comercials, es poden identificar els compostos químics presents en la mostra analitzada.

S'ha analitzat la mostra de vi negre mitjançant la tècnica HPLC-LTQ-Orbitrap-MS i s'han identificat un total de 43 compostos polifenòlics (Taula 20). Per altra banda, s'han exposat els embrions de ZF a la CMT de la mostra de vi negre, s'han homogeneïtzat i s'ha analitzat la mostra d'homogenat d'embrions de ZF mitjançant la tècnica HPLC-LTQ-Orbitrap-MS. En aquest cas, s'han identificat 19 compostos polifenòlics (Taula 21). En resum, en la mostra de vi negre, s'han identificat àcids fenòlics com àcids cinnàmics i benzoics. A excepció dels àcids gèntísic i ferúlic, s'han identificat els mateixos àcids fenòlics en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF. En les dues mostres avaluades també s'han identificat àcids fenòlics *O*-glucòsids, que són polifenols que majoritàriament es metabolitzen en el plasma, i les seves formes lliures representen només entre el 5 i el 24 % dels metabòlits dels polifenols totals (Zhao et al., 2003). S'han identificat proantocianidines en la mostra de vi negre, que corresponen amb les identificades en l'estudi de Gu et al., (2003), en què estudiaven les procianidines presents en l'extracte de llavors de raïm negre. En el nostre estudi, no s'han identificat molècules de proantocianidines en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF. S'ha establert la hipòtesi que les proantocianidines de la mostra de vi negre, no penetren a l'interior dels embrions de ZF, degut al seu gran tamany i necessitarien ser prèviament metabolitzades. Els efectes de proantocianidines aïllades que provenen d'altres fonts alimentàries com és el te verd (Wang et al., 2009) i el te de coco (Li et al., 2014), han estat estudiades en embrions de ZF. En aquests casos, l'estudi es basa en l'exposició única dels embrions de ZF a les proantocianidines, fet que podria facilitar-ne la seva absorció. Per altra banda, en la mostra de vi negre, així com en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF, s'han detectat els compostos catequina, resveratrol i piceid, que són polifenols típics dels productes derivats del raïm negre (De Nisco et al., 2013). En la mostra de vi negre també s'han identificat les antocianines malvidina i peonidina 3-*O*-glucoside, delfinidina, cianidina i petunidina-*O*-glucòsid. Aquests compostos corresponen amb la identificació de les antocianines presents en raïm i vi negre feta en l'estudi de Da Costa et al., (2000). Per contra, en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF només s'han identificat les antocianines peonidina 3-*O*-glucòsid, malvidina 3-*O*-glucòsid, delfinidina 3-*O*-glucòsid i petunidina *O*-hexòsid. També s'han identificat derivats del flavonol kaempferol, naringenina, quercetina i alguns dels seus derivats en la mostra de vi negre, mentre que en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF, només s'ha identificat el compost kaempferol-3-*O*-glucòsid. S'ha detectat el compost quercetina-*O*-glucurònid en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF. Aquest compost no ha estat detectat en la mostra de vi negre i, degut a que la conjugació dels compostos amb glucurònid és una forma típica de metabolisme de fase II, s'ha formulat la hipòtesi que els embrions de ZF han metabolitzat la quercetina present a la mostra de polifenols a la que havien estat exposats, a la forma quercetina-*O*-glucurònid. Degut a que l'exposició dels embrions és directa a través del medi d'incubació, s'ha descartat la via de metabolisme materna (Mattsson et al., 2012), de manera que s'ha atribuït la capacitat metabòlica als propis embrions. Des de l'inici del desenvolupament embrionari dels ZF, els embrions presenten els enzims que poden facilitar la biotransformació i l'eliminació de compostos químics (Otte et al., 2010; Tseng et al., 2005).

El metabolisme de la quercetina ha estat avaluat en rates i en humans ja que s'ha vist que és un compost que pot tenir capacitat de prevenció del càncer i de malalties cardiovasculars, entre altres (Boots et al., 2008). La quercetina es troba generalment en forma de *O*-glucòsids en aliments com les verdures i les fruites. En humans, després de la seva ingesta, les formes de quercetina *O*-glucòsids s'hidrolitzen i a nivell dels enteròcits es converteixen principalment en quercetina 3'-*O*-sulfat i en quercetina-3-glucurònid (Yokoyama et al., 2009). La quercetina-*O*-glucurònid, juntament amb altres metabòlits de la quercetina, s'han identificat en el plasma humà, després de la ingesta de ceba, una de les majors fonts alimentàries de quercetina (Day et al., 2001). Aquesta forma de la quercetina també ha estat identificada en rates després de l'administració de quercetina via intragàstrica (Moon et al., 2001).

L'assaig amb embrions de ZF havia estat utilitzat per a l'estudi dels efectes dels polifenols (Elkon et al., 2004; Pardal et al., 2014; Richetti et al., 2011), però no s'havien identificat els compostos que havien penetrat al seu interior i que, en conseqüència, podien produir un efecte. Els índexs d'absorció, metabolisme i excreció són paràmetres que determinen la biodisponibilitat i les concentracions efectives del compost en qualsevol organisme, en aquest cas, en els embrions de ZF (Scholz et al., 2008). Durant l'etapa embrionària, els ZF estan envoltats d'una membrana coriònica i de l'espai perivitellí, de manera que només es podran absorbir els compostos que puguin travessar-los (Wiegand et al., 2000). La membrana coriònica dels embrions conté porus que poden representar una limitació per a l'absorció de compostos de mida elevada, mentre que els compostos de mida petita poden ser fàcilment absorbibles (Langheinrich, 2003). Generalment, els polifenols naturals tenen un pes molecular entre 500 i 3000 Da (Haslam 1996), i poden travessar fàcilment la membrana coriònica, penetrar en els embrions de ZF i produir efectes. En aquest sentit, diferents estudis han demostrat que les formes glicosilades dels polifenols s'absorbeixen millor que les formes aglicones, de manera que la seva biodisponibilitat és major (Cao et al., 2001; Manach et al., 2005). Aquest fet concorda amb els resultats de la identificació dels compostos en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF, en què s'han detectat majoritàriament polifenols en la seva forma glicosilada.

Els resultats d'aquest estudi han permès identificar els polifenols que es detectaven amb més intensitat en una mostra de vi negre: quercetina, quercetina 3- β -D-glucòsid, kaempferol 3-glucòsid, peonidina 3-glucòsid i malvidina 3-glucòsid. També s'ha comprovat que alguns d'aquests polifenols eren detectats en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF que havien estat prèviament exposats a la mostra de vi negre, de manera que s'ha formulat la hipòtesi que alguns polifenols i algunes antocianines poden travessar la membrana coriònica dels embrions i ser absorbits, tenint la possibilitat de realitzar funcions antioxidants.

La identificació de polifenols en els embrions, així com la determinació de la seva capacitat metabòlica, han posat de manifest noves avantatges del test amb embrions de ZF, en aquest cas per a l'estudi dels efectes dels polifenols d'origen natural en un model *in vivo*.

Tots els resultats derivats de l'estudi d'identificació dels polifenols en la mostra de vi negre i en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF han estat publicats en l'article (Vallverdú-Queralt et al., 2015), [\(veure Annex\)](#).

Taula 20: Compostos identificats en la mostra de vi negre.

Compostos identificats, temps de retenció, massa exacta, fórmula molecular, error entre la massa obtinguda i la massa exacta i els ions MS-MS utilitzats en la identificació

	Compostos identificats	rt (min)	[M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	Ions MS/MS	Massa exacta	Error (mDa)	Fórmula molecular
1	Procianidina trimer tipus B isòmer 1	1,50	865	695 (100), 739 (70), 577 (65), 407 (40), 287 (20)	865,1985	4	C45H38O18
2	Àcid gàl·lic	1,57	169	125 (100)	169,0142	1,1	C7H6O5
3	Àcid protocatequic-O-hexòsid	1,86	315	153 (100), 109 (20)	315,0721	2,2	C13H16O9
4	Àcid gèntic	2,70	153	123 (100), 109 (10)	153,0188	0,4	C7H6O4
5	Àcid protocatequic	2,79	153	153 (40), 109 (90)	153,0193	0,9	C7H6O4
6	Àcid caftaric	3,22	311	149 (100)	311,0408	2	C13H12O9
7	Procianidina dímer tipus B isòmer 1	3,40	577	425 (100), 451 (60), 407 (50), 559 (30), 289 (30)	577,1346	2,9	C30H26O12
8	Àcid cafeic-C-hexòsid 1	3,54	341	281 (90), 251 (100), 221 (40), 179 (60), 135 (10)	341,0877	2,1	C15H18O9
9	Procianidina dímer tipus B isòmer 2	4,09	577	425 (100), 451 (60), 407 (50), 559 (30), 289 (30)	577,1346	2,9	C30H26O12
10	Àcid cafeic-C-hexòsid 2	4,19	341	281 (90), 251 (100), 221 (40), 179 (60), 135 (10)	341,0877	2	C16H18O8
11	Cumaric-O-hexòsid	4,36	325	163 (100), 119 (12)	325,0928	1,2	C15H18O8
12	Catequina	4,43	289	245 (100)	289,0718	1,7	C15H14O6
13	Àcid p-hidroxibenzoic	4,49	137	93 (100)	137,0244	0,7	C7H6O3
14	Procianidina trimer tipus B isòmer 2	4,75	865	695 (100), 739 (70), 577 (65), 407 (40), 287 (20)	865,1985	4	C45H38O18
15	Procianidina trimer tipus B isòmer 3	5,50	865	695 (100), 739 (70), 577 (65), 407 (40), 287 (20)	865,1985	4	C45H38O18
16	Àcid cafeic	5,72	179	135 (100)	179,0349	1,1	C9H8O4
17	Peonidina-3-glucòsid	6,25	463 [M+H] ⁺	301 (100)	463,1233	0,2	C22H23O11 ⁺
18	Malvidina-3-glucòsid	6,30	493 [M+H] ⁺	331 (100)	493,1341	0,1	C23H25O12 ⁺
19	Epicatequina	6,47	289	245 (100)	289,0718	1,9	C15H14O6
20	Eriodictiol-O-hexòsid	6,64	449	287 (100), 259 (40), 269 (38)	449,1089	2,6	C16H18O8
21	Procianidina trimer tipus B isòmer 4	7,29	865	695 (100), 739 (70), 577 (65), 407 (40), 287 (20)	865,1985	4	C45H38O18
22	Delfindina-O-dihexòsid	7,76	627 [M+H] ⁺	465 (100), 303 (70)	627,1556	0,1	C27H31O17 ⁺
23	Àcid cumàric	8,24	163	119 (100)	163,0400	0,9	C9H8O3
24	Mirectina-O-hexòsid	8,49	479	316 (100), 317 (50)	479,0826	2,2	C21H20O13
25	Kaempferol-3-O-rutinòsid	8,79	593	285 (100)	593,1511	1,6	C27H30O15
26	Àcid ferúlic	9,17	193	178 (70), 149 (100), 134 (50)	193,0506	1,2	C10H10O4
27	Àcid piceid isòmer 1	9,50	389	227 (100), 193 (80), 341 (70)	389,1241	2	C20H22O8
28	Cianidina-O-dihexòsid	9,65	611 [M+H] ⁺	303 (100), 465 (40)	611,1607	1,6	C27H31O16 ⁺
29	Epicatequina-O-galat	9,8	441	289 (100), 331 (20), 271 (19), 169 (30)	441,0822	1,8	C22H18O10
30	Kaempferol-3-O-glucòsid	10,20	447	285 (100)	447,0932	2,4	C21H20O11
31	Quercetina-O-hexòsid	10,20	463	301 (100), 293 (40), 271 (15), 169 (10)	463,0881	2,2	C21H20O12
32	Delfindina-O-hexòsid	10,2	465 [M+H] ⁺	303 (100), 447 (20), 369 (8)	465,1028	0,2	C21H21O12 ⁺
33	Cianidina-O-hexòsid	11,66	449 [M+H] ⁺	287 (100), 431 (30), 263 (5)	449,1078	0,4	C21H21O11 ⁺
34	Quercetina-O-rhamanòsid	11,67	447	301 (100), 284 (20), 285 (20)	447,0932	1,9	C21H20O11
35	Petunidina-O-hexòsid	11,94	479 [M+H] ⁺	317 (100), 359 (5), 461 (12)	479,1184	0,1	C22H23O12 ⁺
36	Àcid piceid isòmer 2	12,23	389	227 (100)	389,1241	2,2	C20H22O8
37	Delfindina acetilhexòsid	13,5	507 [M+H] ⁺	303 (100), 489 (10), 187 (5)	507,1138	1,7	C23H23O13 ⁺
38	Delfindina	16,28	303 [M+H] ⁺	257 (100), 229 (70), 285 (60), 165 (50), 137 (20)	303,0499	0,9	C15H11O7 ⁺
39	Quercetina	16,30	301	179 (100), 151 (90), 107 (10)	301,0353	1,5	C15H10O7
40	Resveratrol	16,58	227	185 (100), 143 (30)	227,0713	2,5	C14H12O5
41	Naringenina	17,88	271	151 (100), 177 (20), 119 (10)	271,0611	1,7	C15H12O5
42	Cianidina	18,29	287 [M+H] ⁺	177 (70), 165 (40), 241 (45), 213 (30)	287,0550	0,1	C15H11O6 ⁺
43	Petunidina	18,43	317 [M+H] ⁺	302 (100), 285 (40), 165 (10), 139 (10)	317,0656	0,2	C16H13O7 ⁺

Taula 21: Compostos identificats en la mostra d'homogenat d'embrions de peix zebra prèviament exposats a la mostra de vi negre.

Compostos identificats, temps de retenció, massa exacta, fórmula molecular, error entre la massa obtinguda i la massa exacta i els ions MS-MS utilitzats en la identificació

Compostos identificats		rt (min)	[M-H] ⁻ / [M-H] ⁺	Ions MS/MS	Massa exacta	Error (mDa)	Fórmula molecular
1	Àcid gàl·lic	1,57	169	125 (100)	169,0142	1,8	C7H6O5
2	Àcid protocatèquic-O-hexòsid	1,86	315	153 (100), 109 (20)	315,0721	0,8	C13H16O9
3	Àcid protocatèquic	2,79	153	153 (40), 109 (90)	153,0193	0,5	C7H6O4
4	Àcid caftaric	3,22	311	149 (100)	311,0408	1	C13H12O9
5	Cumàric-O-hexòsid	4,36	325	163 (100), 119 (12)	325,0928	1,2	C15H18O8
6	Catequina	4,43	289	245 (100)	289,0718	1,2	C15H14O6
7	Àcid p-hidroxibenzoic	4,49	137	93 (100)	137,0244	0,6	C7H6O3
8	Àcid cafeic	5,72	179	135 (100)	179,0349	0,5	C9H8O4
9	Peonidina-3-glucòsid	6,25	463 [M+H] ⁺	301 (100)	463,1233	0,6	C22H23O11+
10	Malvidina-3-glucòsid	6,30	493 [M+H] ⁺	331 (100)	493,1341	0,2	C23H25O12+
11	Àcid Cumàric	9,17	163	163 (100), 119 (12)	163,0400	0,6	C9H8O3
12	Àcid piceid isòmer 1	9,50	389	227 (100), 193 (80), 341 (70)	389,1241	0,9	C20H22O8
13	Quercetina-O-hexòsid 1	10,20	463	301 (100), 293 (40), 271 (15), 169 (10)	463,0881	1	C21H20O12
14	Delfinidina-O-hexòsid	10,20	465 [M+H] ⁺	303 (100), 447 (20), 369 (8)	465,1028	0,2	C21H21O12+
15	Kaempferol-3-O-glucòsid	10,20	447	285 (100)	447,0932	0,8	C21H20O11
16	Petunidina-O-hexòsid	11,94	479 [M+H] ⁺	317 (100), 359 (5), 461 (12)	479,1184	0,2	C22H23O12+
17	Àcid piceid isòmer 2	12,23	389	227 (100)	389,1241	1,1	C20H22O8
18	Quercetina-O-glucurònid	14,80	477	301 (100)	477,0674	0,6	C21H18O13
19	Resveratrol	16,58	227	185 (100), 143 (30)	227,0713	0,9	C14H12O3

4.2.3. AVALUACIÓ DE L'EFECTE ANTIOXIDANT IN VIVO DELS POLIFENOLS DEL VI NEGRE

La segona part de l'estudi ha estat avaluar l'efecte antioxidant dels compostos polifenòlics detectats amb més intensitat en la mostra de vi negre i en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF.

Primerament, s'han exposat els embrions de ZF de les 2 a les 26 hpf, als estàndards comercials dels compostos polifenòlics identificats amb més intensitat en la mostra de vi negre: quercetina, quercetina 3-β-D-glucòsid, kaempferol 3-glucòsid, peonidina 3-glucòsid, malvidina 3-glucòsid. L'exposició s'ha portat a terme de les 2 a les 26 hpf, s'han avaluat els efectes en el creixement i desenvolupament embrionaris a les 50 hpf i s'ha calculat la CMT.

Els embrions s'han exposat a la quercetina 3-β-D-glucòsid en un rang de concentracions de 5 a 111,51 μM (Taula 22). S'han ajustat les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques i s'han obtingut uns valors de LC₅₀ de 73,3 μM i EC₅₀ per anormalitats morfològiques de 106,9 μM (Figura 43). S'ha establert la CMT de la quercetina 3-β-D-glucòsid en 25 μM.

Taula 22: Resultats de l'exposició dels embrions a la quercetina 3-β-D-glucòsid.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats, freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (μM)	Log concentració	N	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	----	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
5	0,7	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10	1,0	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
25	1,4	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
50	1,7	3	30,0 ± 20,0**	8,5 ± 7,5
111,51	2,1	3	73,3 ± 25,17***	53,3 ± 18,9**

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: ** p < 0,01, *** p < 0,001

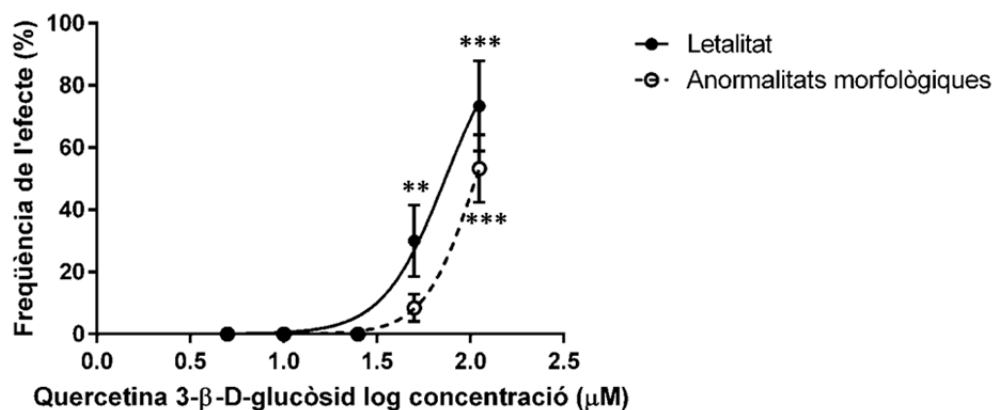


Figura 43: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a la quercetina 3-β-D-glucòsid.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

** p < 0,01; *** p < 0,001

Els embrions s'han exposat a la malvidina 3-glucòsid i a la peonidina 3-glucòsid en un rang de concentracions de 1 a 20 μM . No s'han observat efectes ni en la letalitat, ni en la producció d'anormalitats morfològiques en els embrions de ZF, en cap dels grups de tractament de cap dels dos compostos. S'ha establert la CMT de la malvidina 3-glucòsid i de la peonidina 3-glucòsid en 20 μM .

L'exposició dels embrions al kaempferol 3-glucòsid s'ha portat a terme en un rang de concentracions de 0,5 a 50 μM . No s'han observat efectes de mortalitat en els embrions exposats. S'ha observat un increment significatiu de les anormalitats morfològiques en els embrions a la concentració més alta de kaempferol 3-glucòsid, 50 μM (Taula 23). S'han ajustat les corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques i s'ha obtingut un valor d' EC_{50} per anormalitats morfològiques de 50 μM (Figura 44). La CMT per al kaempferol 3-glucòsid s'ha establert a 5 μM .

Taula 23: Resultats de l'exposició dels embrions al kaempferol 3-glucòsid. Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats, freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (μM)	Log concentració	N	Freqüència de letalitat (%) Mitjana \pm SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana \pm SD
0	----	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
0,5	-0,3	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
1	0,0	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
5	0,7	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
10	1,0	3	0,0 \pm 0,0	3,3 \pm 5,8
25	1,4	3	0,0 \pm 0,0	6,7 \pm 5,8
50	1,7	3	0,0 \pm 0,0	50,0 \pm 10,0***

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: *** $p < 0,001$

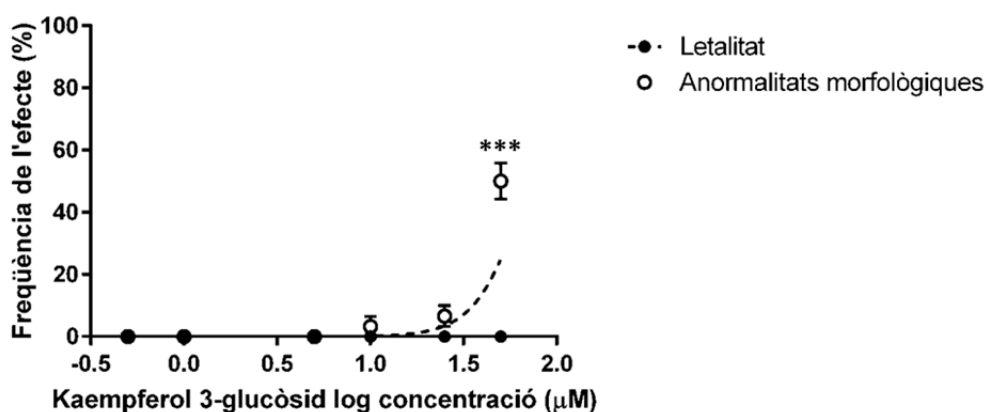


Figura 44: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra al kaempferol 3-glucòsid.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control: *** $p < 0,001$

Els resultats de l'exposició dels embrions de ZF a quercetina han estat descrits prèviament en el punt 4.1.1.3.

Un cop establerta la CMT de cadascun dels compostos polifenòlics, s'ha aplicat el model d'EO a cadascun d'ells per a avaluar-ne els seus efectes antioxidants *in vivo*. S'han exposat els embrions de ZF a aquests de les 2 a les 26 hpf, a continuació s'han exposat a les concentracions de treball de tBOOH de les 26 a les 50 hpf i s'han avaluat els efectes letals i en el desenvolupament embrionari. La pre-exposició dels embrions a la CMT de quercetina 3-β-D-glucòsid, malvidina 3-glucòsid, peonidina 3-glucòsid i kaempferol 3-glucòsid ha produït, en tots els casos, una disminució significativa de la letalitat i de les anormalitats morfològiques, així com un desplaçament significatiu de les corresponents corbes concentració-resposta cap a concentracions superiors de tBOOH (Figura 45). Els resultats dels assaigs de pre-exposició als compostos polifenòlics han demostrat un efecte protector enfront a la letalitat i a les anormalitats morfològiques produïdes pel tBOOH (Taula 24), ja que en la pre-exposició dels embrions a aquests compostos són necessàries concentracions majors de tBOOH per tal d'obtenir els mateixos efectes que en l'exposició única a tBOOH. S'ha pogut estudiar l'efecte protector antioxidant de la quercetina 3-β-D-glucòsid, la malvidina 3-glucòsid, la peonidina 3-glucòsid i el kaempferol 3-glucòsid, mitjançant el model d'EO amb tBOOH. Els resultats de l'aplicació del model d'EO a l'avaluació dels efectes antioxidants *in vivo* de la quercetina, han estat descrits prèviament en el punt 4.1.3.

Taula 24: Efectes dels polifenols en la letalitat i les anormalitats morfològiques en embrions de peix zebra exposats al tBOOH.

Antioxidants estudiats, concentració letal 50 (LC₅₀) i concentració efectiva 50 per a anormalitats morfològiques (EC₅₀).

Polifenols	Inductor d'estrès oxidatiu	LC ₅₀ (IC 95%)	EC ₅₀ (IC 95%)
Sense Polifenols	tBOOH	2,38 mM (2,28-2,49)	1,64 mM (1,44-1,87)
Quercetina 3-β-D-glucòsid		2,90 mM*** (2,77-3,04)	2,75 mM *** (2,58-2,94)
Malvidina 3-glucòsid		2,72 mM *** (2,41-3,05)	2,79 mM *** (2,47-3,15)
Peonidina 3-glucòsid		3,05 mM*** (2,68-3,47)	3,63 mM*** (2,52-4,50)
Kaempferol 3-glucòsid		3,05 mM*** (2,95-3,15)	2,89 mM*** (2,74-3,05)

Diferències estadísticament significatives respecte del grup no tractat amb moduladors: *** p < 0,001

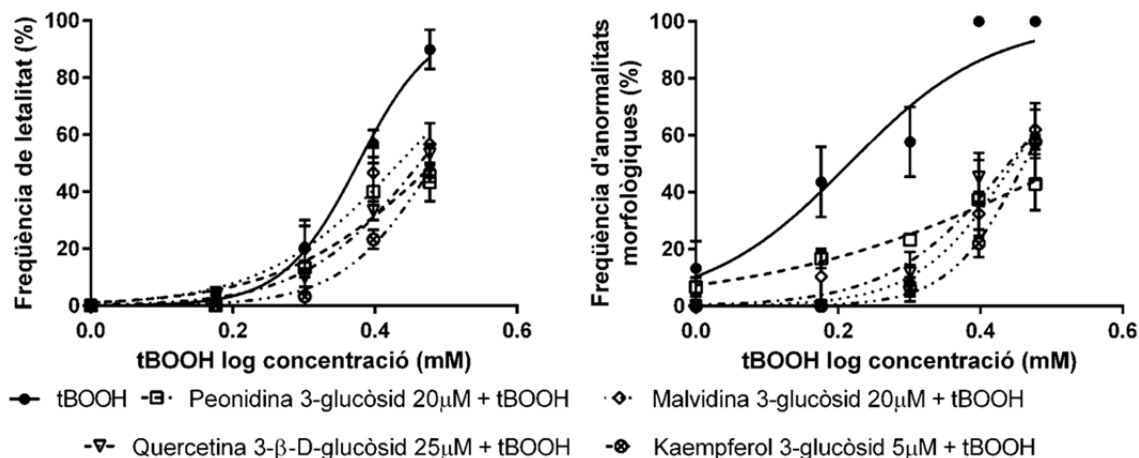


Figura 45: Corbes concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques en l'avaluació de l'efecte antioxidant *in vivo* dels polifenols identificats amb més intensitat en la mostra de vi negre: quercetina 3-β-D-glucòsid, malvidina 3-glucòsid, peonidina 3-glucòsid i kaempferol 3-glucòsid.

Diferències estadísticament significatives: $p < 0,001$, en la comparació de les corbes dels polifenols amb les corbes de letalitat i d'anormalitats morfològiques de tBOOH.

Els compostos polifenòlics són productes del metabolisme secundari de les plantes i estan presents de forma natural en la majoria de productes alimentaris d'origen vegetal. Aquests compostos són part habitual de la dieta dels animals i dels humans, ja que es troben en la majoria dels teixits vegetals (Gülçin, 2012). La major part dels polifenols presenten una activitat segrestadora de radicals lliures, així com una activitat moduladora de diferents enzims i d'interacció amb receptors específics en la regulació redox (Williams et al., 2004). Els compostos fenòlics quercetina 3-β-D-glucòsid, malvidina 3-glucòsid, peonidina 3-O-glucòsid, kaempferol i quercetina han estat identificats en altres mostres d'extractes d'aliments com el raïm, la poma, les maduixes, la soja, etc. i se n'ha avaluat la seva activitat antioxidant mitjançant mètodes químics, confirmant un efecte antioxidant en tots ells (Melo et al., 2015; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2008).

Existeixen una gran quantitat de factors que poden influir en l'activitat antioxidant dels compostos, com són la reactivitat enfront als radicals lliures, la concentració de compost utilitzada, la temperatura, la llum, el tipus de substrat, etc. Per aquest motiu, s'ha considerat que el mètode ideal per a la determinació de les propietats antioxidants d'un compost hauria de ser aquell que permeti avaluar l'efecte en les condicions que mimetitzen l'estatus oxidant *in vivo* (Prior et al., 2005). El model d'EO establert en aquesta tesi doctoral compleix aquests requisits, ja que és un mètode *in vivo*, en el que s'han comprovat els efectes en el creixement i desenvolupament dels embrions de ZF, deguts a la producció d'EO. Mitjançant el model d'EO amb embrions de ZF, s'ha avaluat per primera vegada l'activitat antioxidant dels estàndards comercials de la quercetina 3-β-D-glucòsid, la malvidina 3-glucòsid, la peonidina 3-glucòsid i el kaempferol 3-glucòsid, de forma aïllada i s'ha corroborat l'efecte antioxidant que s'havia observat en el conjunt de la mostra de vi negre, mitjançant les tècniques d'avaluació de la capacitat antioxidant de tipus químic. Així mateix, s'ha tornat a posar de manifest la capacitat del model d'EO amb embrions de ZF per a l'estudi dels efectes antioxidants de diferents compostos, entre els que es troben els polifenols d'origen natural.

4.3. EFECTE NEUROPROTECTOR DELS POLIFENOLS DEL VI NEGRE

El cervell és un òrgan especialment vulnerable al dany oxidatiu degut al seu elevat consum d'oxigen, l'alt contingut d'àcids grassos poliinsaturats i la presència de coure i ferro, que són metalls actius en reaccions redox. Degut a aquestes característiques, l'EO es considera una causa important de malalties neurodegeneratives relacionades amb l'edat com són el Parkinson i l'Alzheimer (Valko et al., 2007).

En la malaltia de Parkinson es produeix una pèrdua selectiva de neurones de l'àrea cerebral denominada substantia nigra. Com a conseqüència, disminueixen els nivells de dopamina en el nucli estriat. Aquesta és una de les causes de la simptomatologia típica en el moviment de les persones afectades per la malaltia de Parkinson (Jenner, 2003). Diversos estudis han relacionat l'EO amb la cascada d'esdeveniments que porten com a conseqüència la degeneració de les neurones dopaminèrgiques (Abdullah et al., 2014; Garcia-Garcia et al., 2012; Tretter et al., 2004; Jenner, 2003; Reeve et al., 2014).

Els antioxidants naturals, s'han proposat com a possibles molècules per al tractament preventiu de malalties neurodegeneratives relacionades amb l'edat (Albarracin et al., 2012). Els compostos identificats amb més intensitat en la mostra de vi negre i en la mostra d'homogenat d'embrions de ZF prèviament exposats a la mostra de vi negre, han estat majoritàriament flavonoides: quercetina, quercetina 3- β -D-glucòsid, kaempferol 3-glucòsid; i antocianines: malvidina 3-glucòsid i peonidina 3-glucòsid. Les antocianines són un grup de compostos polifenòlics presents en el raïm negre, que tenen activitat antioxidant i neuroprotectora, entre altres (Badshah et al., 2015; Kelsey et al., 2011). Els flavonoides han estat estudiats i s'ha vist que degut a la seva activitat com a quelants del ferro, poden presentar un efecte neuroprotector en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i el Parkinson (Obrenovich et al., 2010; Scapagnini et al., 2011).

Per aquests motius, el tercer objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar els efectes neuroprotectors dels polifenols del vi negre en els embrions de ZF.

4.3.1. EFECTES DELS POLIFENOLS DEL VI NEGRE EN EL MOVIMENT

Primerament s'ha aplicat el model d'EO amb la 6-OHDA, a l'avaluació dels efectes de la quercetina, la quercetina 3- β -D-glucòsid, el kaempferol 3-glucòsid, la malvidina 3-glucòsid i la peonidina 3-glucòsid, sobre el moviment en els embrions de ZF. En la primera part d'aquesta tesi doctoral, s'han caracteritzat els efectes de la 6-OHDA en el moviment dels embrions de ZF i s'ha seleccionat aquest compost com l'inductor d'EO a utilitzar per a l'avaluació dels efectes neuroprotectors d'antioxidants naturals. L'exposició a 6-OHDA és un model de malaltia de Parkinson en els embrions de ZF (Anichtchik et al., 2004). Per aquest motiu, s'han exposat els embrions de ZF a la CMT dels compostos polifenòlics de les 2 a les 26 hpf. A continuació, s'ha portat a terme l'exposició dels embrions a les concentracions de treball de la 6-OHDA de les 50 a les 74 hpf i passat el període d'exposició, s'ha avaluat la distància total recorreguda pels embrions.

La pre-exposició dels embrions de ZF als compostos polifenòlics del vi negre, seguida de l'exposició a 6-OHDA, ha produït un augment significatiu de la distància total recorreguda pels embrions, així com un desplaçament significatiu de les corbes concentració-resposta per a la distància total recorreguda cap a concentracions superiors de 6-OHDA, en tots els casos estudiats (Taula 25 i Figura 46). Després de la pre-exposició dels embrions als polifenols, serien necessàries concentracions més elevades de 6-OHDA per a produir el mateix efecte en el moviment que en l'exposició única a 6-OHDA.

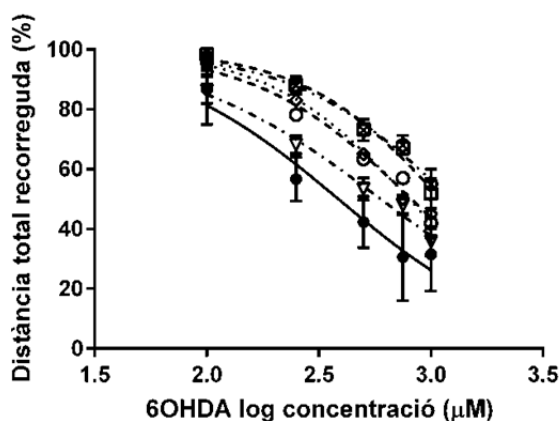
Taula 25: Avaluació de la distància total recorreguda pels embrions en la pre-exposició a polifenols i la posterior exposició a la 6-OHDA.

Polifenols estudiats i concentració efectiva 50 per a la distància total recorreguda (EC₅₀).

Polifenols	Inductor d'estrès oxidatiu	EC ₅₀ (IC 95%)
Sense Polifenols	6-OHDA	386,9 µM (329,6-454,3)
Quercetina 3-β-D-glucòsid		597,5 µM * (502,5-710,4)
Malvidina 3-glucòsid		800,8 µM *** (708,6-905,1)
Peonidina 3-glucòsid		1110 µM *** (926,9-1329)
Kaempferol 3-glucòsid		1234 µM *** (947,2-1608)
Quercetina		819,9 µM *** (703,7-955,3)

Diferències estadísticament significatives respecte del grup no tractat amb moduladors:

* p < 0,05; *** p < 0,001.



● 6-OHDA ■ Peonidina 3-glucòsid 20µM + 6-OHDA ◆ Malvidina 3-glucòsid 20µM + 6-OHDA
 ▼ Quercetina 3-β-D-glucòsid 25µM + 6-OHDA ○ Kaempferol 3-glucòsid 5µM + 6-OHDA
 ◻ Quercetina 20µM + 6-OHDA

Figura 46: Corbes concentració-resposta per a la distància total recorreguda pels embrions en els assaigs de pre-exposició als polifenols i a la 6-OHDA.

Diferències estadísticament significatives: p < 0,05 en la comparació de la corba de la quercetina 3-β-D-glucòsid amb la corba de la distància total recorreguda de la 6-OHDA i p < 0,001, en la comparació de les corbes de la resta de compostos amb la corba de la distància total recorreguda de la 6-OHDA.

Els resultats de l'estudi indiquen un efecte protector de la quercetina, la quercetina 3-β-D-glucòsid, el kaempferol 3-glucòsid, la malvidina 3-glucòsid i la peonidina 3-glucòsid, enfront dels efectes neurotòxics de la 6-OHDA en el moviment dels embrions. Aquests resultats concorden amb l'estudi de Zhang et al., (2012), en què han observat un efecte protector de l'extracte de *Fructus (Alpinia oxyphylla)* enfront els efectes de la 6-OHDA, en embrions de ZF.

4.3.2. EFECTES DELS POLIFENOLS DEL VI NEGRE EN LES NEURONES DOPAMINÈRGiques

Per tal d'aprofundir en l'estudi de l'efecte neuroprotector dels polifenols del vi negre, s'han analitzat les neurones dopaminèrgiques en els embrions de ZF exposats als compostos polifenòlics i a la 6-OHDA.

La tirosina hidroxilasa (TH) és l'enzim limitant en la síntesi de catecolamines, especialment de dopamina. Catalitza la conversió de l'aminoàcid tirosina a dopamina (Feng et al., 2014). La detecció de la TH mitjançant una immunotinció amb un anticòs anti-TH ha estat utilitzada per a la caracterització del sistema catecolaminèrgic en larves de ZF i s'ha establert que les neurones TH positives, corresponen a neurones dopaminèrgiques (Rink i Wullmann, 2001).

La immunotinció anti-TH s'ha realitzat en embrions de ZF de 74 hpf i s'han detectat les neurones dopaminèrgiques mitjançant l'observació en el microscopi confocal. Primerament s'ha realitzat la immunotinció en embrions exposats a la EC_{50} per a la 6-OHDA (386,9 μ M) de les 50 a les 74 hpf. S'ha observat una disminució significativa del nombre de neurones dopaminèrgiques, respecte del grup control, només incubat amb solució de Danieau (Figura 47 i 48). Amb aquest resultat, s'ha comprovat l'efecte neurotòxic de la 6-OHDA, que s'acumula en l'interior dels terminals dopaminèrgics, on produeix ROS que causen mort cel·lular (Rodríguez-Pallares et al., 2007). La pèrdua de neurones dopaminèrgiques està directament relacionada amb l'aparició d'alteracions en el moviment (Kulisevsky et al., 2013).

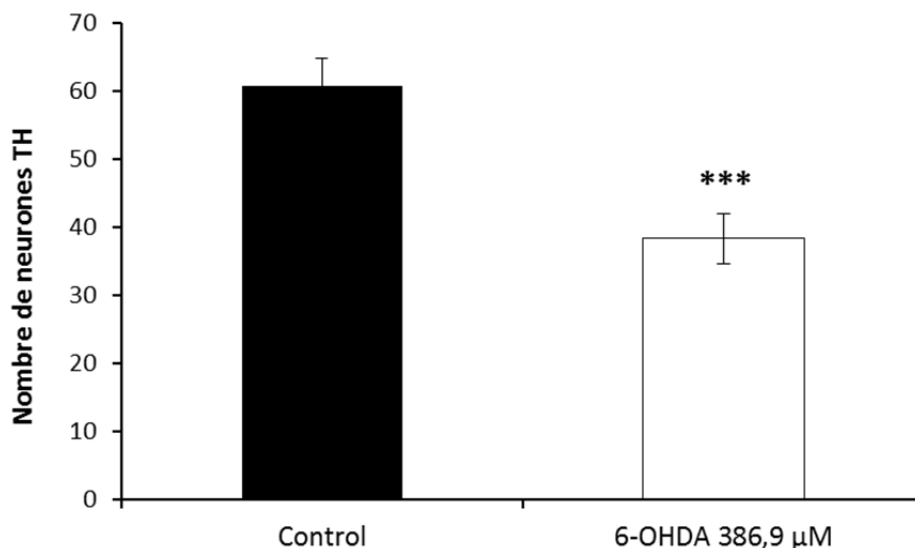


Figura 47: Representació gràfica del nombre de neurones dopaminèrgiques quantificades a partir de la immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en l'assaig d'exposició dels embrions de peix zebra a la 6-OHDA.

Diferències estadísticament significatives respecte del grup control: *** $p < 0,001$

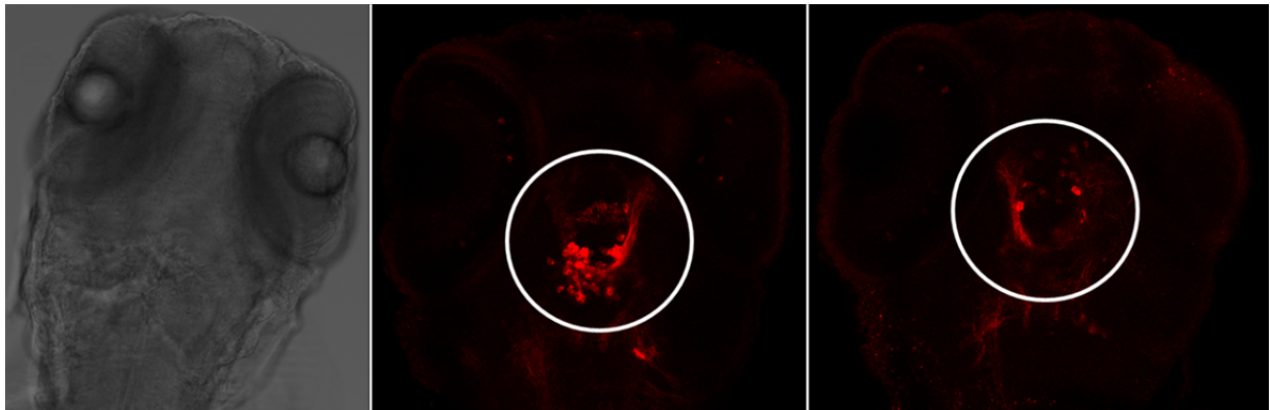


Figura 48: Immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en embrions de peix zebra. A l'esquerra, imatge d'un embrió de peix zebra obtinguda amb llum transmesa; al centre, immunotinció en un embrió control; a la dreta immunotinció en un embrió exposat a 6-OHDA. El cercle blanc indica l'àrea on es localitzen les neurones dopaminèrgiques.

S'han exposat els embrions de ZF a la CMT dels polifenols de les 2 a les 26 hpf i s'han incubat en solució de Danieau fins a les 74 hpf, moment en el que s'ha realitzat la immunotinció TH (Figura 49). No s'han observat diferències entre el nombre de neurones dopaminèrgiques en el grup control (Figura 50A) i els diferents compostos estudiats: malvidina 3-glucòsid (Figura 50B), peonidina 3-glucòsid (Figura 50C), kaempferol 3-glucòsid (Figura 50D) i quercetina (Figura 50E). L'exposició dels embrions a quercetina 3- β -D-glucòsid ha produït una disminució significativa del nombre de neurones dopaminèrgiques en els embrions exposats (Figura 50F).

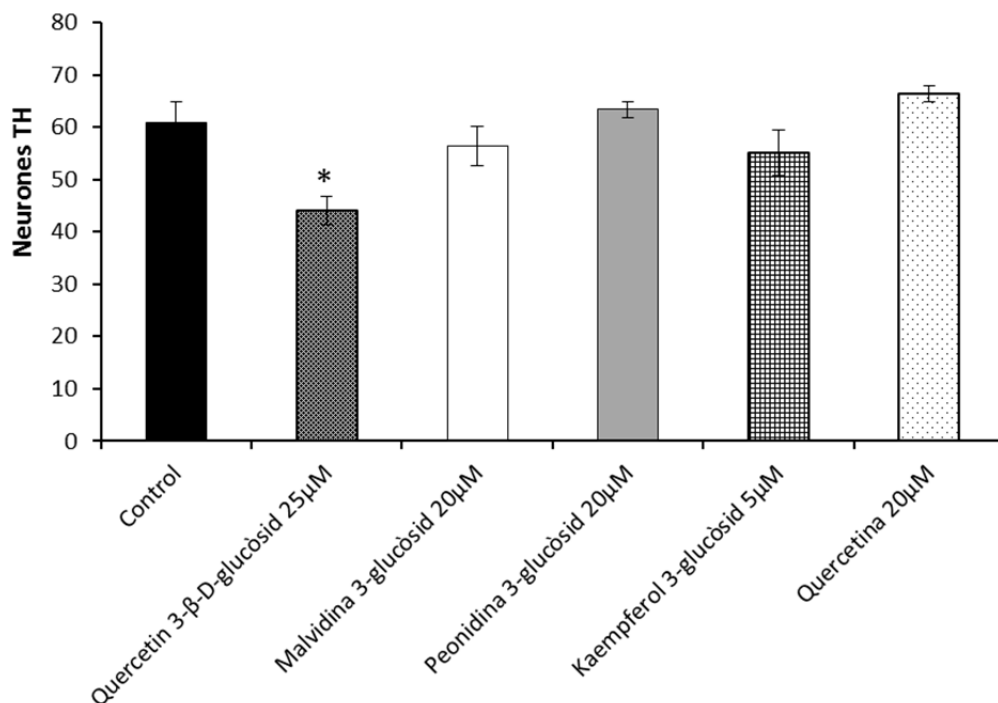


Figura 49: Representació gràfica del nombre de neurones dopaminèrgiques, quantificades a partir de la immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en l'assaig d'exposició dels embrions de peix zebra als polifenols.

Diferències estadísticament significatives respecte del grup control: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$
 Diferències significatives respecte del grup 6-OHDA: + $p < 0,05$; +++ $p < 0,001$

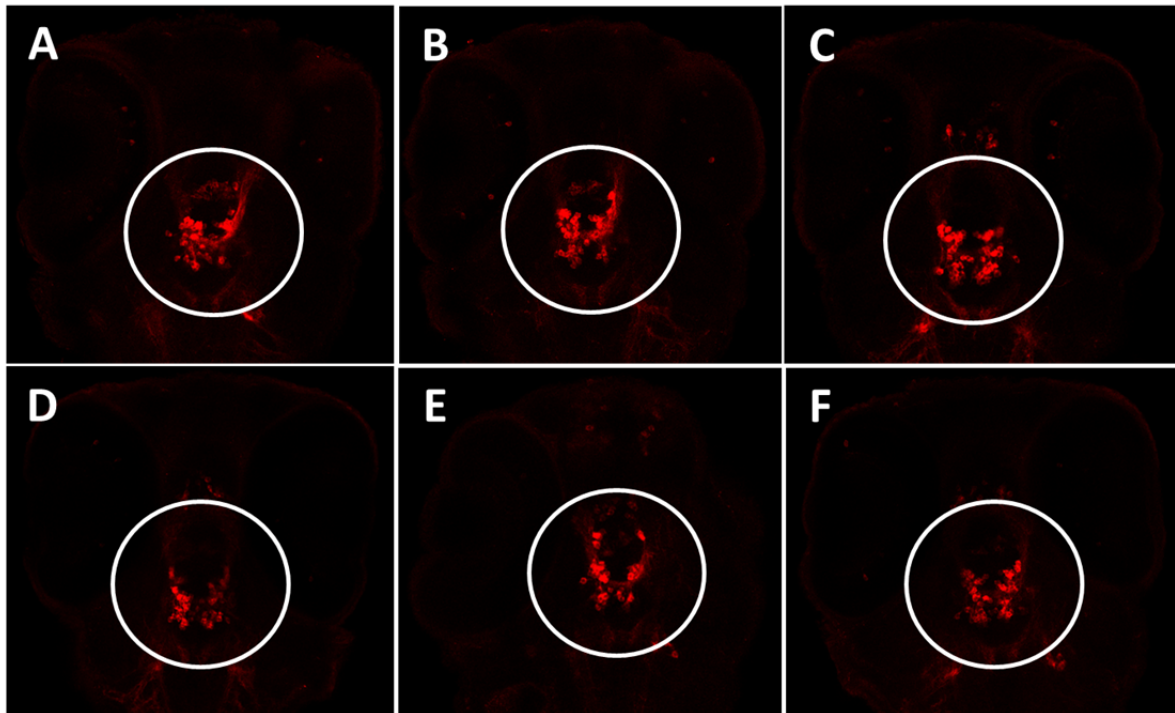


Figura 50: Immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en embrió de peix zebra. Imatges representatives dels embrió control (A) i dels embrió exposats als polifenòls malvidina 3-glucòsid (B), peonidina 3-glucòsid (C), kaempferol 3-glucòsid (D), quercetina (E) i quercetina 3-β-D-glucòsid (F). El cercle blanc indica l'àrea on es localitzen les neurones dopaminèrgiques.

Per comprovar si l'exposició als compostos polifenòlics del vi negre pot prevenir els efectes neurotòxics de la 6-OHDA, s'han pre-exposat els embrió de ZF de les 2 a les 26 hpf a la CMT de la quercetina, la quercetina 3-β-D-glucòsid, el kaempferol 3-glucòsid, la malvidina 3-glucòsid i la peonidina 3-glucòsid. Seguidament s'han exposat a la EC₅₀ de 6-OHDA de les 50 a les 76 hpf i s'ha realitzat la immunotinció TH. Els resultats de la pre-exposició dels embrió als compostos polifenòlics, seguida de l'exposició a 6-OHDA s'ha representat gràficament en la Figura 51. S'ha observat una disminució estadísticament significativa del nombre de neurones dopaminèrgiques respecte del grup control (Figura 52A) en tots els grups de pre-exposició als compostos polifenòlics: quercetina 3-β-D-glucòsid (Figura 52B); malvidina 3-glucòsid (Figura 52C); peonidina 3-glucòsid (Figura 52D); quercetina (Figura 52E). Únicament en el grup de pre-exposició a kaempferol 3-glucòsid (Figura 52F), no s'han observat diferències significatives respecte el grup control. Així mateix, en la comparació amb el grup d'exposició única a 6-OHDA (Figura 52G), s'ha observat un augment significatiu del nombre de neurones dopaminèrgiques en tots els casos. Els resultats obtinguts en el grup de tractament amb el kaempferol 3-glucòsid han estat especialment rellevants, ja que els embrió pre-exposats a aquest compost i seguidament exposats a 6-OHDA, presentaven pràcticament el mateix nombre de neurones dopaminèrgiques que els embrió control.

Els resultats derivats d'aquest estudi indiquen que la pre-exposició dels embrió de ZF als compostos polifenòlics del vi negre, té un efecte preventiu enfront de la pèrdua de neurones dopaminèrgiques produïda per l'exposició 6-OHDA.

La neuroprotecció s'ha definit com el rescat, recuperació o regeneració del sistema nerviós, les seves cèl·lules, estructura o funció (Scapagnini et al., 2011). En l'estudi realitzat s'ha demostrat l'efecte neuroprotector de la quercetina, la quercetina 3-β-D-glucòsid, el kaempferol 3-glucòsid, la malvidina 3-glucòsid i la peonidina 3-glucòsid enfront de la pèrdua de neurones dopaminèrgiques en un model de malaltia de Parkinson en ZF. La prevenció dels efectes neurotòxics de la 6-OHDA per part dels compostos polifenòlics s'ha pogut determinar mitjançant l'observació d'un major nombre de neurones

dopaminèrgiques, així com un augment en la distància total recorreguda en els embrions de ZF pre-exposats als polifenols estudiats.

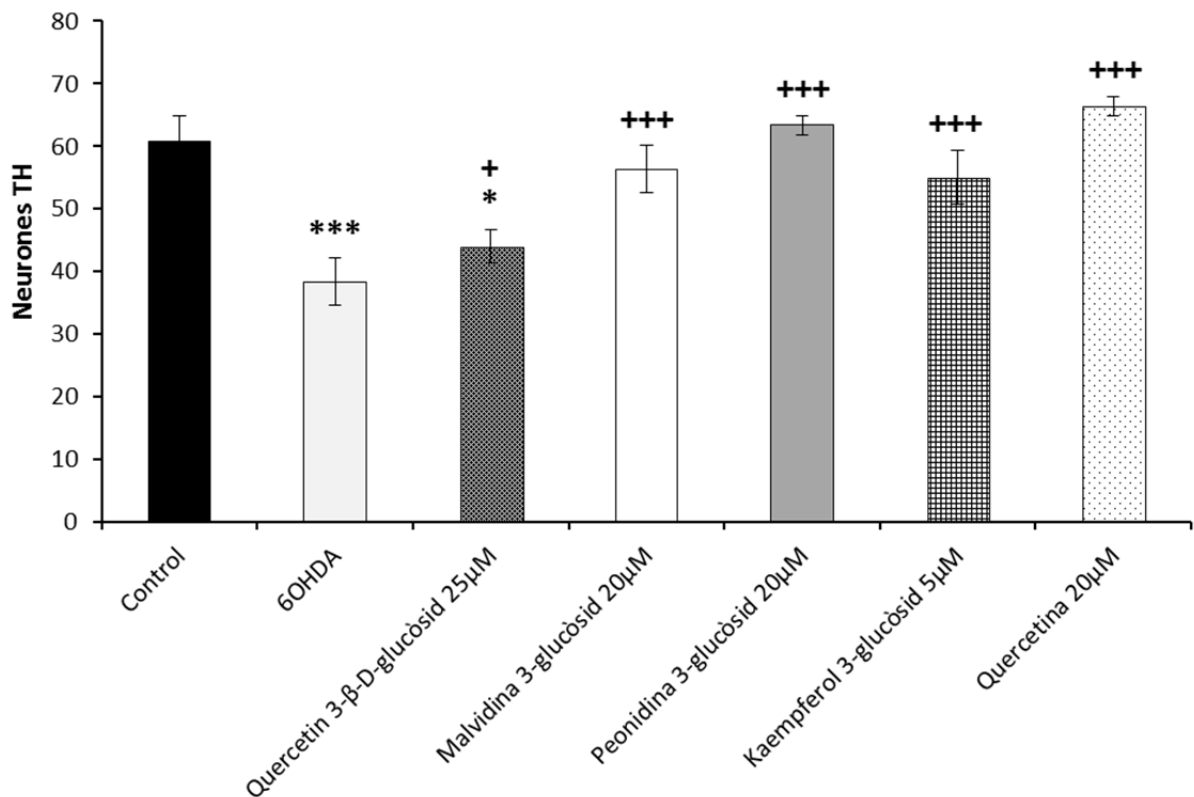


Figura 51: Representació gràfica del nombre de neurones dopaminèrgiques, quantificades a partir de la immunotinció anti-TH en l'assaig de pre-exposició dels embrions de ZF als polifenols i la següent exposició a 6-OHDA.

Diferències estadísticament significatives respecte del grup control:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Diferències significatives respecte del grup 6-OHDA: ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$

Els resultats obtinguts concorden amb altres estudis d'avaluació de l'efecte protector d'antioxidants naturals sobre els efectes de la 6-OHDA en cultius cel·lulars (Han et al., 2014; Kwon et al., 2012), en rates (Dolatshahi et al., 2015; Lv et al., 2014) i en embrions de ZF (Wang et al., 2011; Zhang et al., 2012). S'ha confirmat la capacitat del model d'EO amb 6-OHDA en embrions de ZF, desenvolupat en aquesta tesi doctoral, per a l'avaluació dels efectes neuroprotectors de diferents compostos polifenòlics. L'estudi realitzat ha coincidit amb els resultats obtinguts per Parng et al., (2006), en què s'avaluava la capacitat de l'assaig amb embrions de ZF per a identificar compostos neuroprotectors *in vivo*. Així mateix, el model desenvolupat ha permès una avaluació ràpida dels efectes neurotòxics de la 6-OHDA, produïts per un mecanisme d'EO, així com l'estudi de la prevenció d'aquests efectes per part de compostos amb activitat neuroprotectora.

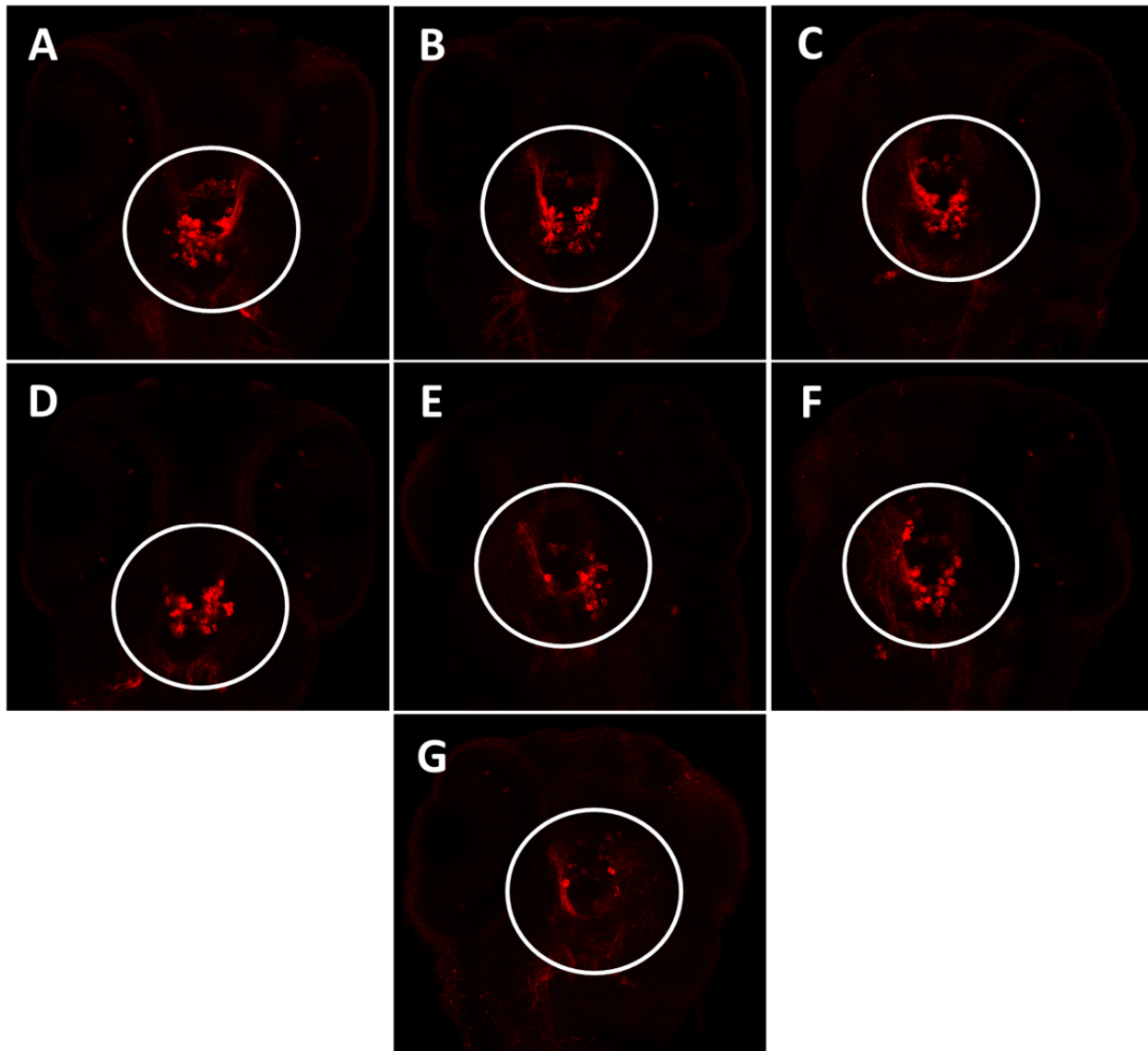


Figura 52: Immunotinció anti-tirosina hidroxilasa en embrions de peix zebra pre-exposats als polifenols i posteriorment exposats a 6-OHDA. Imatges representatives dels embrions control (A) i dels embrions pre-exposats als polifenols quercetina 3-β-d-glucòsid (B), malvidina 3-glucòsid (C), peonidina 3-glucòsid (D), quercetina (E), kaempferol 3-glucòsid (F) i d'embrions exposats únicament a 6-OHDA (G). el cercle blanc indica l'àrea on es localitzen les neurones dopaminèrgiques.

La relació entre l'EO i les causes dels processos d'envelliment (Finkel i Holbrook, 2000), així com per a algunes malalties neurodegeneratives (Jenner 2003; Scapagnini et al., 2011), ha estat àmpliament estudiada. L'activació de vies antioxidants és especialment important en teixits que presenten menys defenses antioxidants, com és el cervell. Per aquest motiu, la utilització d'antioxidants presents en la dieta que tinguin la capacitat d'accedir al cervell, podria suposar una estratègia terapèutica per retardar l'inici de malalties neurodegeneratives, ja que aquests poden actuar com a neuroprotectors (Scapagnini et al., 2011). El potencial neuroprotector d'alguns antioxidants naturals ha estat estudiat en models de malaltia d'Alzheimer (Badshah et al., 2015; Santa-Maria et al., 2012) i de malaltia de Parkinson (Solanki et al., 2015; Zhang et al., 2012). Els diferents estudis realitzats suporten la hipòtesi que els compostos antioxidants naturals podrien ser molècules diana farmacològica per a la prevenció d'efectes neurotòxics. Tot i així, s'han desenvolupat pocs compostos efectius per a la seva aplicació clínica (Albarracín et al., 2012).

En la present tesi doctoral, s'han estudiat els efectes neuroprotectors dels polifenols del vi negre en un embrió de ZF exposats a 6-OHDA, de manera que presentaven una disminució del nombre de neurones dopaminèrgiques i per tant, suposen un model animal de malaltia de Parkinson. La suplementació de la dieta amb polifenols del raïm, ha produït una disminució dels canvis neurodegeneratius que es produeixen en el consum crònic d'alcohol, en rates Sprague-Dawley (Sun et al., 1999). Així mateix, la capacitat neuroprotectora de les antocianines i dels flavonoides com a família de compostos ha estat estudiada (Badshah et al., 2015; Solanki et al., 2015). Tot i així, els efectes biològics de la resta dels polifenols del vi negre analitzats en aquesta tesi no havien estat estudiats prèviament, a excepció de la quercetina, que ha estat àmpliament estudiada i els seus efectes neuroprotectors han estat confirmats (Boots et al., 2008; Dajas et al., 2015; Zhang et al., 2011). Aquest és el primer estudi en el que s'han avaluat i confirmat els efectes neuroprotectors de la pre-exposició dels embrions de ZF als compostos polifenòlics quercetina 3- β -D-glucòsid, malvidina 3-glucòsid, peonidina 3-glucòsid i kaempferol 3-glucòsid, en un model animal de malaltia de Parkinson.

4.4. ASSAIG AMB NEUROESFERES HUMANES

El model de neuroesferes humanes és un sistema *in vitro* en tres dimensions, en el que les cèl·lules progenitores neurals humanes que el formen creixen en forma d'esfera. Aquest model permet mimetitzar els processos bàsics del desenvolupament cerebral: proliferació de cèl·lules progenitores neurals, migració, diferenciació i apoptosi (Moors et al., 2009). Les neuroesferes poden exposar-se a diferents compostos a través del medi de cultiu. Mitjançant l'avaluació de diferents paràmetres en la proliferació, migració i diferenciació, pot determinar-se la capacitat neurotòxica del compost estudiat (Fritsche et al., 2011). Amb el model de neuroesferes humanes s'han estudiat els efectes de neurotoxines a nivell funcional i a nivell molecular (Gassmann et al., 2010). Així mateix, ha estat utilitzat per a l'estudi dels efectes de l'EO sobre la neurogènesi (Gassmann et al., 2012).

El quart objectiu de la present tesi doctoral ha estat estudiar els efectes de l'estrès oxidatiu i els antioxidants en el model de neuroesferes humanes.

4.4.1. CARACTERITZACIÓ DELS EFECTES DE L'EXPOSICIÓ A COMPOSTOS INDUCTORS D'ESTRÈS OXIDATIU I ANTIOXIDANTS EN NEUROESFERES HUMANES.

4.4.1.1. TCHQ

Primerament, s'han caracteritzat els efectes de l'exposició de les neuroesferes a inductors d'EO i antioxidants. L'inductor d'EO seleccionat per a l'exposició de neuroesferes ha estat la TCHQ.

Per tal d'estudiar els efectes de la TCHQ en les neuroesferes s'han seleccionat diferents finestres d'exposició. Les neuroesferes s'han exposat a la TCHQ durant 8 hores, per tal de seleccionar les concentracions de treball i durant 48 hores, per tal de seleccionar una concentració baixa a la que no s'observin canvis significatius en els paràmetres estudiats.

L'exposició a TCHQ durant 8 hores s'ha realitzat en el dia 5 de cultiu, en neuroesferes de menys de 3 mesos d'edat ($nsf < 3$ mesos) i en un rang de concentracions de 1 a 50 μM . Aquesta exposició ha produït una disminució significativa de la viabilitat de les neuroesferes en tots els grups de tractament, essent màxima a la concentració de 50 μM on no s'han observat neuroesferes viables (Figura 53A). En l'avaluació de la diferenciació a neurones de les cèl·lules progenitores neurals que formen les $nsf < 3$ mesos després de l'exposició a TCHQ, s'ha observat una disminució significativa del percentatge de neurones en els grups de concentració de 5 μM i de 10 μM de TCHQ (Figura 53C), indicant un efecte neurotòxic significatiu.

A més a més, també s'ha analitzat l'efecte de l'exposició curta a TCHQ en neuroesferes de més de tres mesos d'edat ($nsf > 3$ mesos). Les $nsf > 3$ mesos són considerades cèl·lules en procés d'envelliment i durant aquesta etapa s'accentuen els processos relacionats amb l'EO, que poden afectar al funcionament cel·lular (Simm i Klotz 2015). S'han exposat les $nsf > 3$ mesos a TCHQ durant 8 hores, per tal d'estudiar els efectes d'un inductor d'EO en unes cèl·lules que presenten característiques oxidatives augmentades. No s'han observat efectes significatius en la viabilitat i en la diferenciació neuronal en els $nsf > 3$ mesos exposades a les concentracions baixes de TCHQ. Per altra banda en l'exposició d'aquestes a les concentracions altes de TCHQ, no s'han observat cèl·lules viables en cap dels casos, i no es va poder avaluar la diferenciació neuronal (Figura 53B i 53D). Els resultats observats indiquen un augment dels efectes tòxics en les neuroesferes, després de l'exposició a TCHQ.

S'han avaluat els resultats obtinguts en la viabilitat i en el percentatge de neurones, de les $nsf < 3$ mesos i $nsf > 3$ mesos exposades a TCHQ durant 8 hores. En les $nsf < 3$ mesos s'ha obtingut un valor d' EC_{50} per a la viabilitat de 9,11 μM i un valor d' EC_{50} en el percentatge de neurones de 7,53 μM . Pel que fa a les nsf

> 3 mesos, degut a la dispersió en els resultats, només s'ha pogut realitzar una aproximació en el valor d'EC₅₀ per a viabilitat i per al percentatge de neurones, que ha resultat de 5,30 μM en ambdós casos. Donat que els valors d'EC₅₀ en l'exposició de les nsf > 3 mesos a TCHQ han estat menors que en el cas de l'exposició de les nsf < 3 mesos, aquests resultats indicarien que les nsf > 3 mesos han resultat més sensibles a l'efecte de l'exposició a TCHQ durant 8 hores.

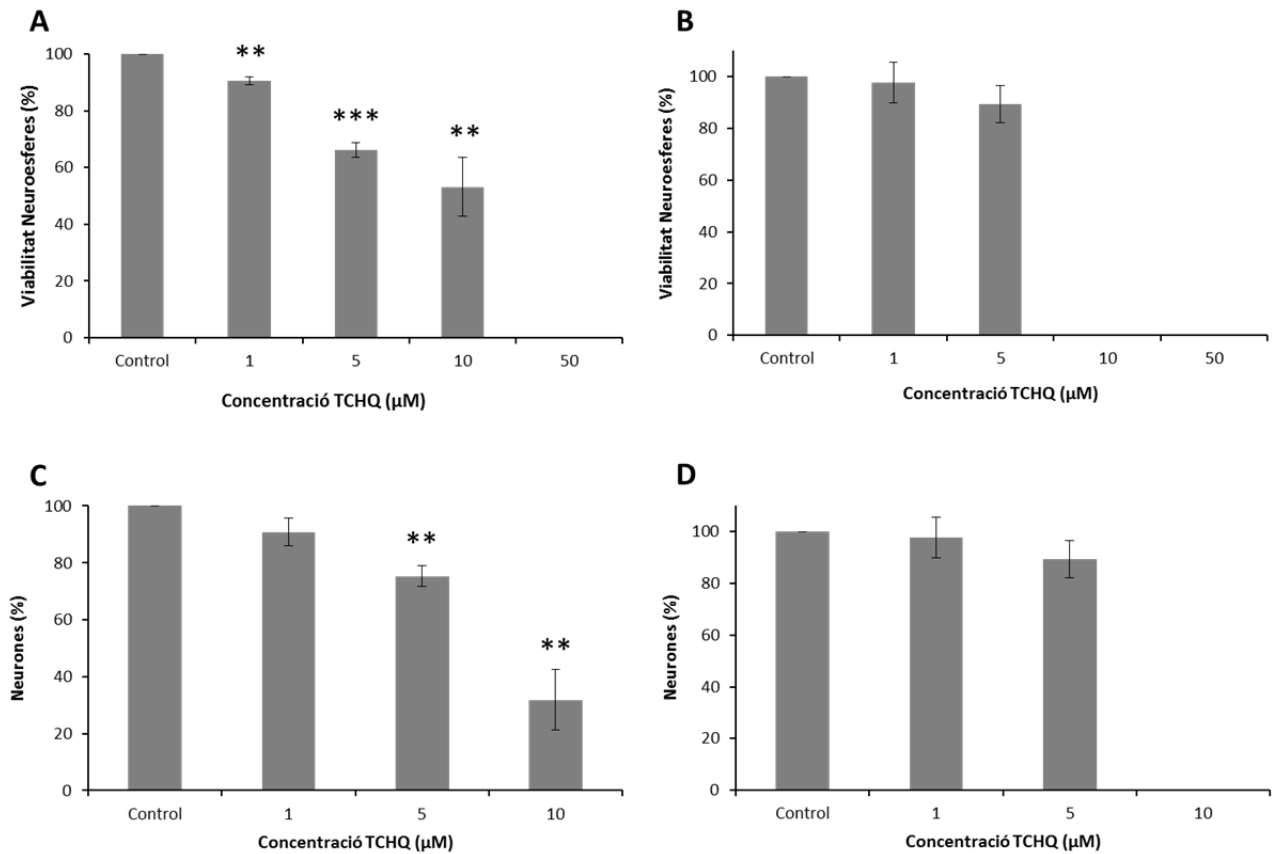


Figura 53: Representació gràfica de la viabilitat i del percentatge de neurones en les neuroesferes de menys de 3 mesos d'edat (A i C), i de les neuroesferes majors de 3 mesos d'edat (B i D), en l'exposició a TCHQ durant 8 hores.

La viabilitat està expressada en percentatge respecte el grup control.

Diferències estadísticament significatives respecte el grup control: *** p < 0,001

L'exposició de les neuroesferes a TCHQ durant 48 hores s'ha portat a terme en un rang de concentracions inferior, de 0,05 a 0,5 μM. En aquest cas, s'ha observat una disminució significativa de la viabilitat i del percentatge de neurones en el grup de tractament de 0,5 μM, al comparar-lo amb el grup control (Figures 54 i 55).

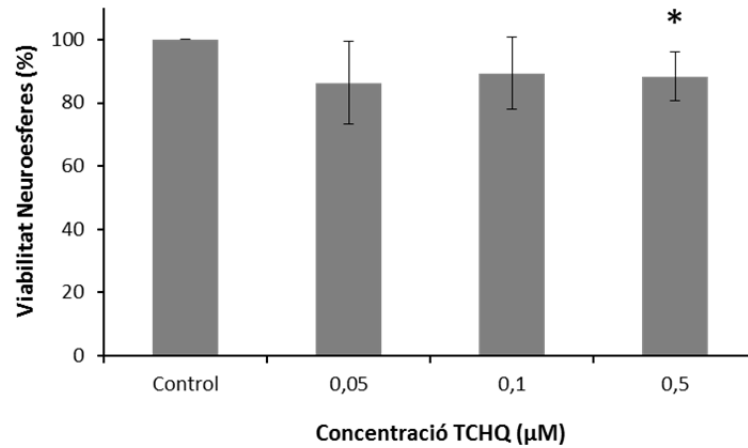


Figura 54: Representació gràfica de la viabilitat i del percentatge de neurones en les neuroesferes de menys de 3 mesos d'edat (A i C), i de les neuroesferes majors de 3 mesos d'edat (B i D), en l'exposició a TCHQ durant 8 hores.

La viabilitat està expressada en percentatge respecte el grup control.

Diferències estadísticament significatives respecte el grup control: * $p < 0,05$.

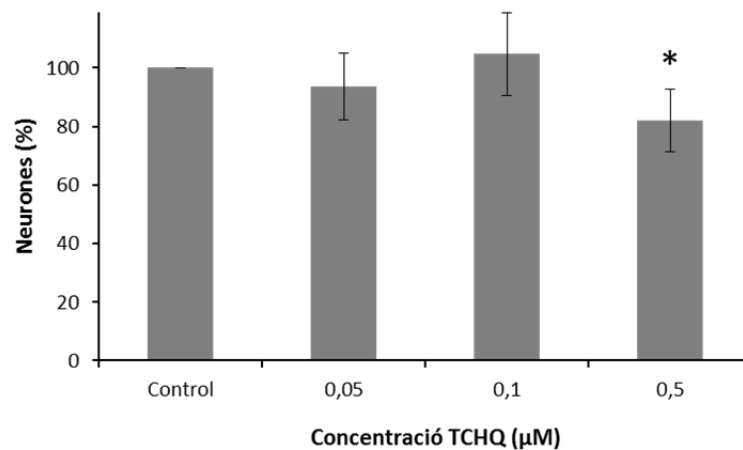


Figura 55: Representació gràfica del percentatge de neurones respecte el grup control, obtingut en les neuroesferes exposades a TCHQ durant 48 hores.

Diferències estadísticament significatives respecte el grup control: * $p < 0,05$.

A partir dels resultats obtinguts en l'exposició de les neuroesferes a la TCHQ en diferents finestres d'exposició, s'han seleccionat les concentracions de treball de TCHQ de 1, 5 i 10 μM i la concentració baixa de 0,05 μM, per tal de ser utilitzades en posteriors assaigs.

4.4.1.2. ANTIOXIDANTS

Les neuroesferes s'han exposat als antioxidants hesperetina i kaempferol. La hesperetina és la forma aglicona de l'hesperidina, el principal flavonoide de les fruites cítriques. Ambdós compostos presenten una activitat segrestadora de radicals lliures (Hirata et al., 2005). El kaempferol és un flavonol natural present en diferents tipus d'aliments, entre els que es troben el te, el bròcoli, les tomates, les maduixes i el raïm. El seu mecanisme antioxidant es basa en la captació de radicals lliures, així com en una activitat inhibidora de l'enzim xantina oxidasa, que és l'enzim responsable de l'oxidació de la xantina a àcid úric. La reacció catalitzada per aquest enzim és coneguda com a font de radicals lliures (Calderón-Montaño et al., 2011).

Les neuroesferes s'han exposat als antioxidants hesperetina i kaempferol durant 5 dies en un rang de concentracions de 0,1 a 5 μM i s'han avaluat els seus efectes en la migració, viabilitat i diferenciació a neurones de les cèl·lules progenitores neurals que formen la neuroesfera.

L'exposició a hesperetina no ha produït canvis significatius en la migració de les neuroesferes exposades (Figura 56). S'ha observat una disminució significativa de la viabilitat de les neuroesferes i de la diferenciació a neurones a la concentració d'hesperetina de 5 μM (Figura 57 i 58).

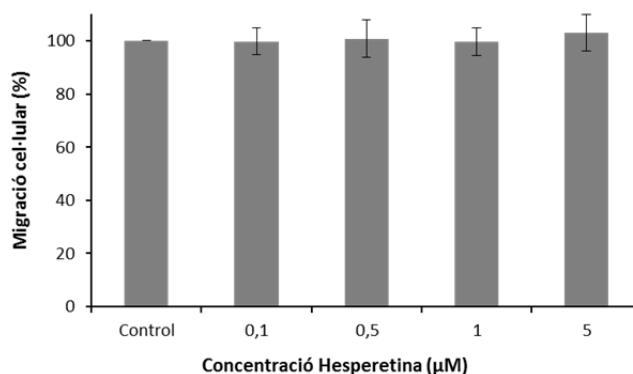


Figura 56: Representació gràfica de la migració de les cèl·lules progenitores neurals que formen la neuroesfera en l'exposició a hesperetina durant 5 dies.

La migració està expressada en percentatge respecte del grup control.

No s'han observat diferències estadísticament significatives respecte el grup control.

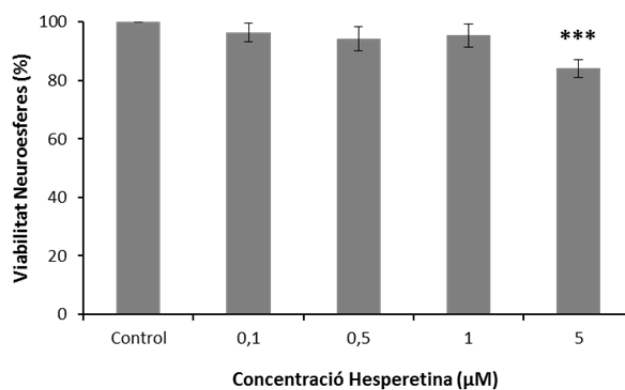


Figura 57: Representació gràfica de la viabilitat de les neuroesferes exposades a hesperetina durant 5 dies.

La viabilitat està expressada en percentatge respecte el grup control.

Diferències estadísticament significatives respecte el grup control: *** $p < 0,001$.

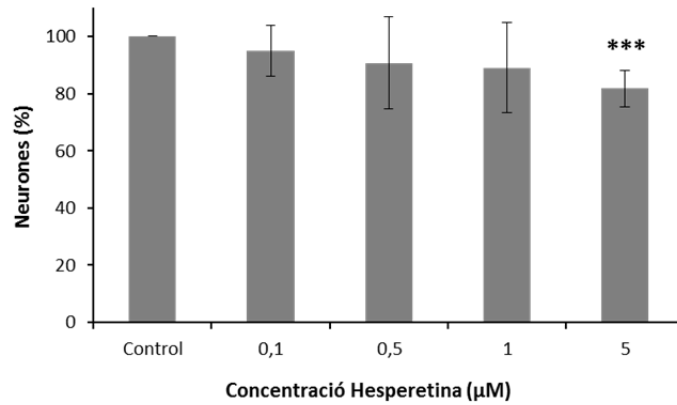


Figura 58: Representació gràfica del percentatge de neurones respecte el grup control, obtingut en les neuroesferes exposades a hesperetina durant 5 dies.

Diferències estadísticament significatives respecte el grup control: *** $p < 0,001$.

L'exposició de les neuroesferes a kaempferol no ha produït canvis significatius en la migració i en la viabilitat de les neuroesferes exposades (Figura 59 i 60). S'ha observat una disminució significativa del percentatge de neurones en els grups de tractament amb kaempferol de 1 i 5 µM (Figura 61).

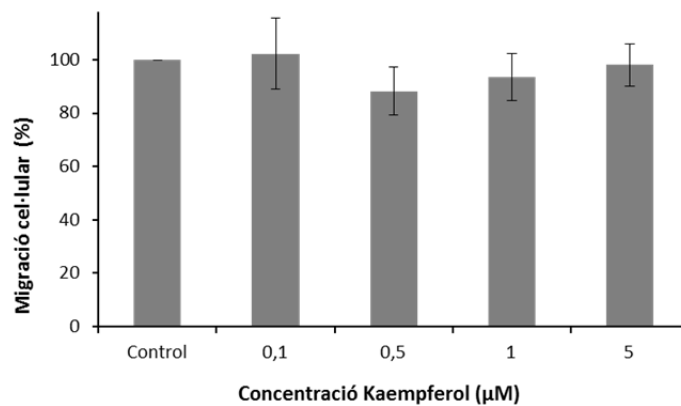


Figura 59: Representació gràfica de la migració de les cèl·lules progenitores neurals que formen la neuroesfera en l'exposició a kaempferol durant 5 dies.

La migració està expressada en percentatge respecte del grup control.

No s'han observat diferències estadísticament significatives respecte el grup control.

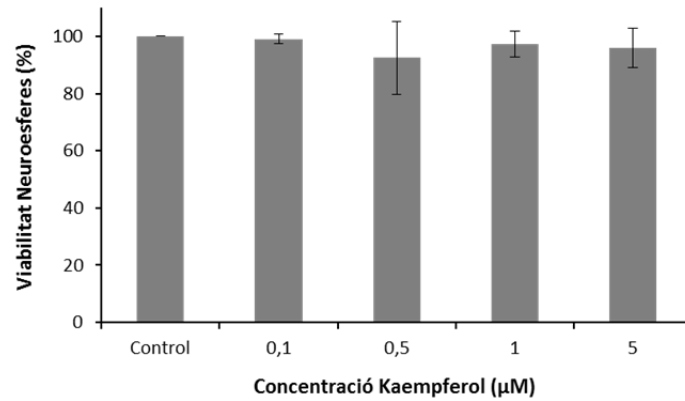


Figura 60: Representació gràfica de la viabilitat de les neuroesferes exposades a kaempferol durant 5 dies.

La viabilitat està expressada en percentatge respecte el grup control.

No s'han observat diferències estadísticament significatives respecte el grup control.

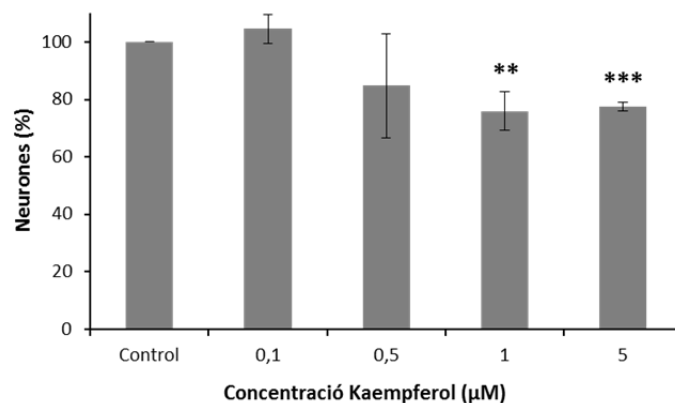


Figura 61: Representació gràfica del percentatge de neurones respecte el grup control, obtingut en les neuroesferes exposades a kaempferol durant 5 dies.

Diferències estadísticament significatives respecte el grup control: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.4.2. ESTUDIS D'EXPOSICIÓ COMBINADA DE COMPOSTOS INDUCTORS D'ESTRÈS OXIDATIU I ANTIOXIDANTS EN NEUROESFERES HUMANES

En la segona part de l'estudi amb el model de neuroesferes humanes s'ha realitzat una primera aproximació a l'estudi de l'efecte protector dels antioxidants en neuroesferes humanes en una situació d'EO.

S'ha portat a terme un estudi preliminar en què les neuroesferes s'han exposat durant tot el cultiu a la concentració d'hesperetina de 1 µM, que no produïa canvis significatius en els paràmetres de migració viabilitat i diferenciació cel·lular. A continuació, en el dia 5 de cultiu, s'han exposat a les concentracions de treball de TCHQ de 1, 5 i 10 µM durant 8 hores. S'han avaluat els efectes en la viabilitat de les

neuroesferes i s'han comparat amb els efectes en la viabilitat de les neuroesferes exposades únicament a les concentracions de treball de TCHQ.

En les neuroesferes pre-exposades a hesperetina, s'ha produït un desplaçament significatiu de la corba concentració-resposta de viabilitat cap a concentracions majors de TCHQ, al comparar-la amb la corba de l'exposició única a TCHQ (Figura 62). El valor d' EC_{50} per a la viabilitat en l'exposició única a TCHQ ha estat de 3,48 μM , mentre que el valor d' EC_{50} per a la viabilitat en la pre-exposició a hesperetina, seguida de l'exposició a TCHQ ha estat de 6,15 μM .

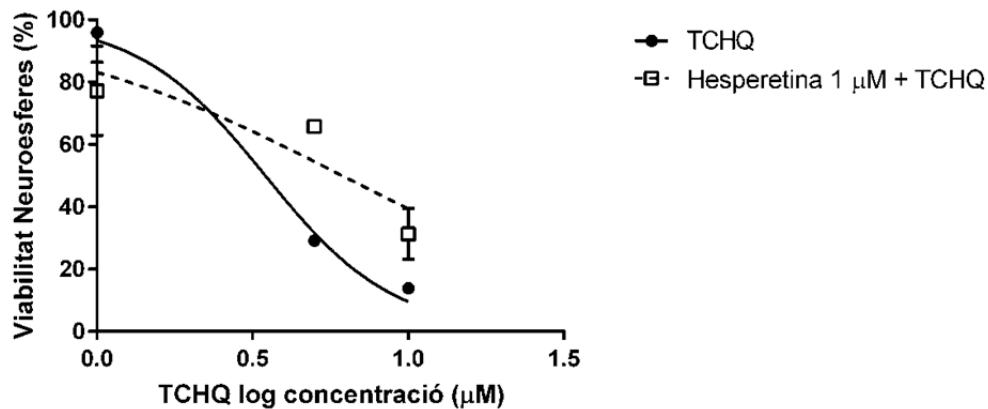


Figura 62: Corbes concentració-resposta per a la viabilitat de les neuroesferes en l'assaig de pre-exposició a hesperetina, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i de l'exposició única a TCHQ.

Aquests resultats preliminars semblen indicar un possible efecte protector antioxidant de l'hesperetina sobre els efectes en la viabilitat de la TCHQ, ja que després de la pre-exposició de les neuroesferes a la hesperetina serien necessàries concentracions majors de TCHQ per a produir els mateixos efectes que en l'exposició única. Aquests resultats concorden amb l'estudi realitzat per Hwang i Yen (2009), en que es va comprovar els efectes protectors antioxidants de l'hesperetina en cèl·lules PC12 a les que s'indueix EO amb peròxid d'hidrogen.

La teoria de la hormesi es refereix al fet que una dosi baixa d'un compost potencialment tòxic pot produir efectes beneficiosos. Aquesta teoria ha estat aplicada a l'EO i s'ha vist que una dosi baixa d'un inductor d'EO, pot produir efectes antioxidants, ja que pot activar mecanismes de defensa antioxidants i de reparació cel·lular (Radak et al., 2005). En la present tesi doctoral s'ha aplicat aquesta teoria al model de neuroesferes humanes per a l'estudi del possible efecte hormètic d'una concentració baixa de TCHQ, enfront de l'EO produït per les concentracions de treball de TCHQ.

S'han pre-exposat les nsf < 3 mesos a una concentració baixa de TCHQ (0,05 μM) durant 48 hores, a continuació, en el dia 5 de cultiu, s'han exposat a les concentracions de treball de TCHQ (1, 5 i 10 μM) durant 8 hores. Finalment, s'han avaluat els efectes en la viabilitat i en el percentatge de neurones i aquests s'han comparat amb els efectes obtinguts en l'exposició única a les concentracions de treball de TCHQ. Aquest assaig també s'ha realitzat amb nsf > 3 mesos, per tal d'estudiar l'efecte hormètic en una situació d'envelliment.

La pre-exposició de les nsf < 3 mesos a la concentració de TCHQ de 0,05 μM , seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ ha produït un desplaçament significatiu de la corba de viabilitat cap a concentracions superiors de TCHQ, al comparar-la amb la corba de viabilitat de l'exposició única a TCHQ

(Figura 63A). En l'exposició única a TCHQ s'ha obtingut un valor d' EC_{50} per a la viabilitat de les neuroesferes de 11,22 μM , mentre que en la pre-exposició a la concentració baixa de TCHQ, la EC_{50} ha estat de 14,04 μM . Aquest resultat indica un efecte protector hormètic de la concentració de 0,05 μM de TCHQ en la viabilitat de les neuroesferes, ja que serien necessàries concentracions de treball de TCHQ majors per tal d'obtenir els mateixos efectes que en l'exposició única.

En el cas de les nsf > 3 mesos, la pre-exposició a la concentració de TCHQ de 0,05 μM , seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ, ha produït un desplaçament significatiu de la corba de viabilitat, però cap a concentracions inferiors de TCHQ (Figura 63B). El valor d' EC_{50} en el cas de l'exposició única a TCHQ ha estat de 4,38 μM , mentre que el valor d' EC_{50} en l'assaig de pre-exposició a la concentració baixa de TCHQ ha estat de 2,36 μM . De manera que, la pre-exposició de les nsf > 3 mesos a la concentració baixa de TCHQ exacerba l'efecte de la TCHQ, i són necessàries concentracions de treball de TCHQ menors per a produir els mateixos efectes en la viabilitat de les neuroesferes que en l'exposició única a TCHQ.

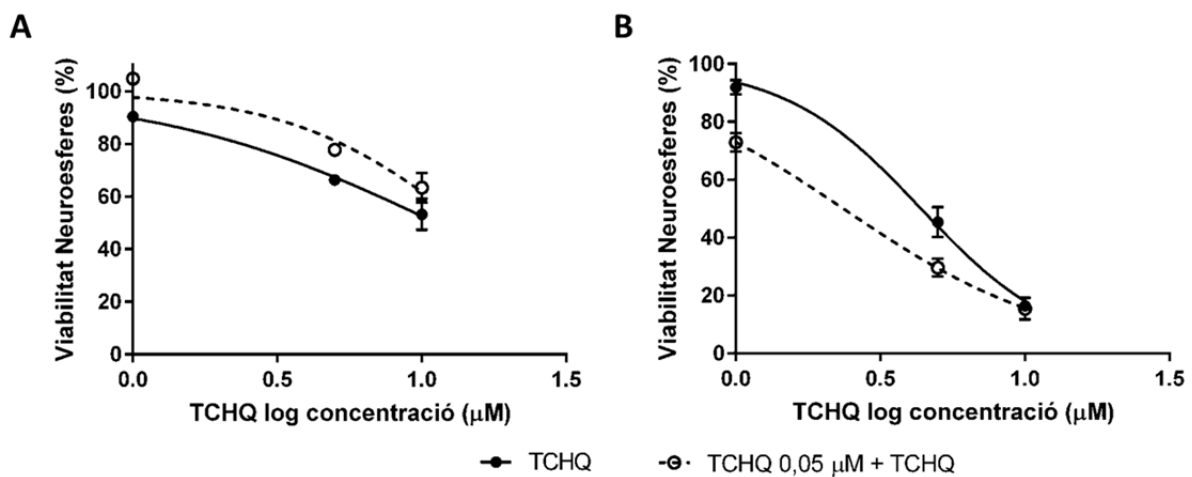


Figura 63: Corbes concentració-resposta per a la viabilitat de les neuroesferes de menys de tres mesos d'edat (A) i de les neuroesferes de més de 3 mesos d'edat (B), en l'assaig de pre-exposició a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i de l'exposició única a TCHQ.

Diferències estadísticament significatives: $p < 0,05$, en la comparació de les corbes de viabilitat de l'assaig de pre-exposició a la concentració baixa de TCHQ amb les corbes de viabilitat de l'exposició única a les concentracions de treball de TCHQ.

Pel que fa a l'avaluació de la diferenciació cel·lular en les nsf < 3 mesos, no s'han observat diferències significatives en el percentatge de neurones entre el grup d'exposició única a TCHQ i el grup de pre-exposició a la concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ. Tot i així, la corba concentració-resposta per al percentatge de neurones en la pre-exposició a la concentració baixa de TCHQ presenta una tendència cap a concentracions de TCHQ majors que la corba concentració-resposta per al percentatge de neurones en l'exposició única (Figura 64A). El valor d' EC_{50} per al percentatge de neurones en l'exposició única ha estat de 7,53 μM i el valor d' EC_{50} en el cas de la pre-exposició a la concentració baixa de TCHQ ha estat de 9,2 μM . Aquests resultats indiquen que la pre-exposició a la concentració baixa de TCHQ no influeix significativament en els efectes de la TCHQ en la diferenciació a neurones.

En el cas de les nsf > 3 mesos, la pre-exposició a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ, ha produït un desplaçament significatiu de la corba del

percentatge de neurones cap a concentracions inferiors de TCHQ, en comparació amb la corba de percentatge de neurones de l'exposició única a TCHQ (Figura 64B). Els resultats obtinguts en aquest assaig indiquen que la pre-exposició a una concentració baixa de TCHQ en nsf > 3 mesos produeix una disminució en el percentatge de neurones a concentracions inferiors que en l'assaig d'exposició única, de manera que s'intensifica l'efecte en la diferenciació cel·lular de la TCHQ.

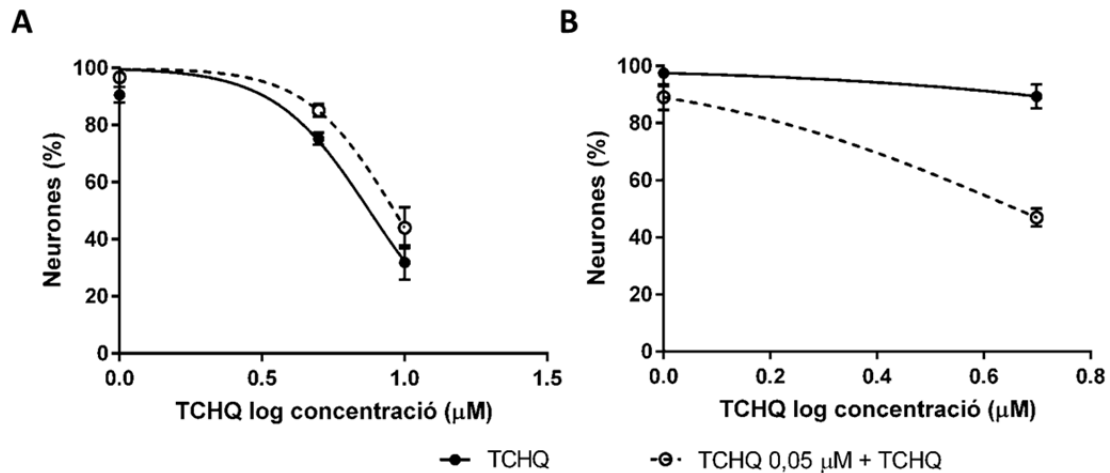


Figura 64: Corbes concentració-resposta per al percentatge de neurones de les neuroesferes de menys de tres mesos d'edat (A) i de les neuroesferes de més de 3 mesos d'edat (B), en l'assaig de pre-exposició a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i de l'exposició única a TCHQ.

No s'han observat diferències estadísticament significatives respecte el grup control en la comparació de la corba de percentatge de neurones de la pre-exposició de les neuroesferes de menys de tres mesos a la concentració baixa de TCHQ i la corba de l'exposició única a les concentracions de treball de TCHQ.

Diferències estadísticament significatives: $p < 0,001$, en la comparació de la corba de percentatge de neurones de l'assaig de pre-exposició de les neuroesferes de més de tres mesos a la concentració baixa de TCHQ amb la corba de percentatge de neurones de l'exposició única a les concentracions de treball de TCHQ.

La pre-exposició de les neuroesferes menors de 3 mesos d'edat (nsf < 3 mesos) a la concentració baixa de TCHQ ha produït efectes significatius en la viabilitat, indicant un efecte protector hormètic de l'exposició a una concentració baixa de TCHQ enfront als seus efectes oxidants en el model de neuroesferes humanes. La situació és totalment a l'inrevés en la pre-exposició de les nsf > 3 mesos a la concentració baixa de TCHQ. En aquest cas, s'ha produït un increment dels efectes neurotòxics de la TCHQ. Aquests resultats permeten confirmar la hipòtesi que les nsf > 3 mesos presenten un increment fisiològic de l'EO, degut a la seva condició d'envelliment (Finkel i Holbrook, 2000), que impossibilita l'increment en la capacitat de la protecció antioxidant produïda per la concentració baixa d'un inductor d'EO.

El paradigma de la hormesi es basa en una estimulació de l'efecte protector a dosis baixes i una inhibició d'aquest a dosis altes. Els efectes hormètics han estat estudiats en neurociències i s'han observat efectes en la supervivència de les neurones, l'aparició de neurites, en la memòria i en el dany relacionat amb malalties neurodegeneratives (Calabrese, 2008; Calabrese et al., 2010). La teoria de la hormesi en situacions d'EO ha estat estudiada en models d'exercici físic, ja que en la pràctica regular d'exercici físic es produeixen petites quantitats de ROS, que podrien tenir un paper important en la inducció d'antioxidants, reparació de l'ADN i de proteïnes, etc., resultant en una disminució en la incidència de malalties relacionades amb l'EO i retard en el procés d'envelliment (Pingitore et al., 2015; Radak et al., 2005).

Mitjançant el model de neuroesferes humanes amb nsf < 3 mesos, s'ha pogut comprovar la teoria de la hormesi en l'efecte protector antioxidant d'una concentració baixa de TCHQ, enfront dels efectes en la viabilitat i en la diferenciació a neurones produïts per les concentracions de treball de la TCHQ.

4.4.3. REPRODUCCIÓ DELS ESTUDIS DE DOBLE EXPOSICIÓ A TCHQ EN NEUROESFERES AL MODEL D'EMBRIÓ DE PEIX ZEBRA

Per tal de comprovar si també es complia la teoria de l'hormesi en l'efecte protector antioxidant d'una concentració baixa de TCHQ en el model d'embrió de peix zebra, s'han reproduït els estudis de doble exposició a inductors d'EO que s'havien portat a terme amb el model de neuroesferes humanes.

Primerament, s'han realitzat assaigs per tal de seleccionar la concentració baixa de TCHQ a la qual s'havia de portar a terme la pre-exposició. S'han exposat els embrions de les 2 a les 26 hpf a un rang de concentracions de TCHQ de 0,025 µM a 10 µM, s'han avaluat els embrions a les 50 hpf i s'han obtingut les corbes concentració-resposta de letalitat i d'anormalitats morfològiques (Figura 65). Els resultats d'aquest assaig s'han representat a la Taula 26. S'ha establert la concentració de TCHQ de 0,025 µM, com la concentració baixa a testar en la doble exposició dels embrions a TCHQ.

Taula 26: Resultats de l'exposició dels embrions a TCHQ de les 2 a les 26 hpf.

Rang de concentracions estudiades, número d'assaigs realitzats, freqüència de letalitat i freqüència d'anormalitats morfològiques.

Concentració (µM)	Log concentració	N	Freqüència de letalitat (%) Mitjana ± SD	Freqüència d'anormalitats morfològiques (%) Mitjana ± SD
0	---	7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,025	-1,6	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
0,5	-0,3	3	0,0 ± 0,0	5 ± 5,5*
1	0,0	7	0,0 ± 0,0	12,9 ± 25,6**
2,5	0,4	4	5 ± 5,5	19,4 ± 20,7***
5	0,7	7	11,4 ± 13,5**	50,1 ± 37,4***
10	1,0	7	28,6 ± 35,6***	73 ± 36,5***

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

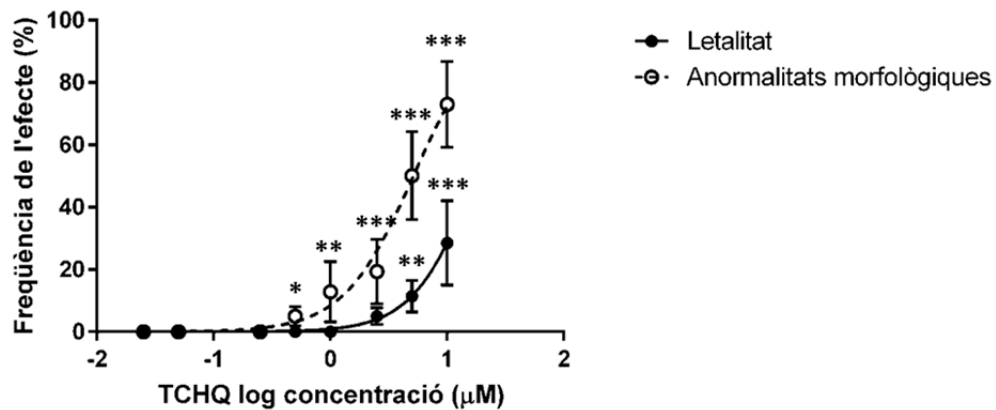


Figura 65: Corba concentració-resposta per a letalitat i per a anormalitats morfològiques, resultant de l'exposició dels embrions de peix zebra a TCHQ de les 2 a les 26 hpf.

Diferències estadísticament significatives de cada grup de tractament respecte el grup control:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Els embrions s'han pre-exposat a la concentració de TCHQ de $0,025 \mu\text{M}$ de les 2 a les 26 hpf i, seguidament s'han exposat a les concentracions de treball de TCHQ ($0,025$ a $10 \mu\text{M}$) de les 26 a les 50 hpf. Al final de l'exposició s'han avaluat els efectes en la letalitat i en la producció d'anormalitats morfològiques.

La pre-exposició a la concentració de $0,025 \mu\text{M}$ de TCHQ en els embrions de peix zebra, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ ha produït un desplaçament significatiu de la corba de letalitat cap a concentracions superiors de TCHQ, en comparació amb la corba de letalitat de l'exposició única a TCHQ (Figura 66). El màxim percentatge de letalitat obtingut en els embrions pre-exposats a la concentració baixa de TCHQ i seguidament exposats a les concentracions de treball de TCHQ ha estat del 13,3 %, mentre que el percentatge màxim de letalitat en l'exposició única a TCHQ ha estat significativament superior, 35 %. Aquests resultats indiquen un efecte protector en la letalitat de la pre-exposició dels embrions a la concentració baixa de TCHQ, ja que serien necessàries concentracions de TCHQ superiors per tal d'obtenir els mateixos efectes letals que en l'exposició única a les concentracions de treball de TCHQ.

Pel que fa a la producció d'anormalitats morfològiques, en comparació amb l'exposició única a TCHQ, la pre-exposició a la concentració baixa de TCHQ i la posterior exposició a les concentracions de treball de TCHQ ha produït un desplaçament significatiu de la corba concentració-resposta d'anormalitats morfològiques cap a concentracions superiors de TCHQ (Figura 67). La pre-exposició a $0,025 \mu\text{M}$ de TCHQ seguida de l'exposició a les concentracions de treball ha aportat un valor d' EC_{50} per anormalitats morfològiques de $4,4 \mu\text{M}$, mentre que en l'exposició única a TCHQ s'ha obtingut un valor d' EC_{50} per anormalitats morfològiques de $1,03 \mu\text{M}$. La pre-exposició dels embrions de ZF a una concentració baixa de TCHQ, protegeix enfront als efectes de la TCHQ en la producció d'anormalitats morfològiques, ja que, en aquest cas, serien necessàries concentracions majors de TCHQ per tal d'obtenir els mateixos efectes que en l'exposició única a TCHQ.

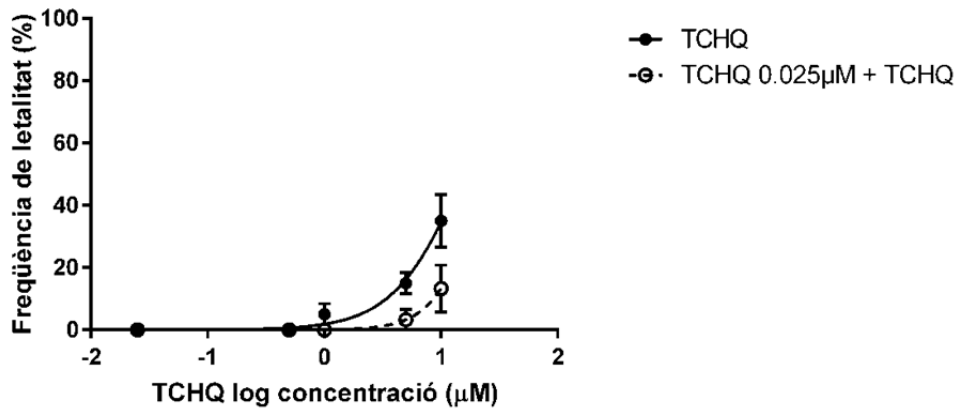


Figura 66: Corbes concentració-resposta per a letalitat en la pre-exposició dels embrions de peix zebra a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i en l'exposició única a TCHQ.

Diferències estadísticament significatives: $p < 0,001$, en la comparació de la corba de l'exposició a una concentració baixa de TCHQ amb la corba de letalitat de les concentracions de treball de TCHQ.

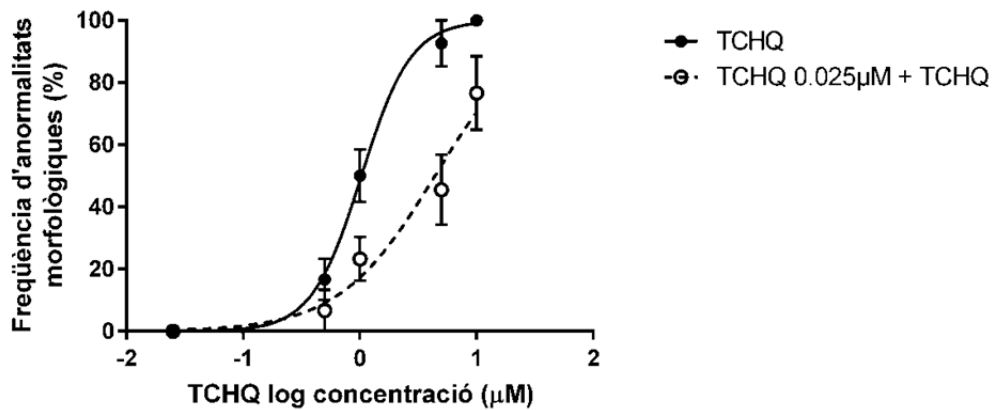


Figura 67: Corbes concentració-resposta per a anormalitats morfològiques en la pre-exposició dels embrions de peix zebra a una concentració baixa de TCHQ, seguida de l'exposició a les concentracions de treball de TCHQ i en l'exposició única a TCHQ.

Diferències estadísticament significatives: $p < 0,001$, en la comparació de la corba de l'exposició a una concentració baixa de TCHQ amb la corba d'anormalitats morfològiques de les concentracions de treball de TCHQ.

Aquests resultats concorden amb els obtinguts en el model de neuroesferes humanes. Donat que en la primera part d'aquesta tesi doctoral s'ha comprovat que els efectes de la TCHQ en la letalitat i en la producció d'anormalitats morfològiques en els embrions de ZF eren deguts a un mecanisme d'EO, els resultats de la doble exposició dels embrions a la TCHQ indiquen un efecte protector hormètic antioxidant de la concentració baixa de TCHQ.

CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

The conclusions derived from the present work are as follows:

Regarding objective 1: *Set up an oxidative stress model for the evaluation of antioxidant effects of different compounds with the zebrafish embryo test*, the conclusions are:

- The evaluation of the effects of different compounds related to oxidative stress on the zebrafish embryonic growth and development reinforced the zebrafish embryo as a useful model to study the effects of oxidative processes.
- The modulation of the response to oxidative stress, consisting in the pre-exposure of the embryos to modulators of antioxidant status, followed by the exposure to the oxidative stress inducers, confirmed the oxidative mechanism in the effects produced by these compounds in the zebrafish embryos.
- An oxidative stress model for the evaluation of antioxidant effects, based on the exposure of zebrafish embryos to the oxidative stress inducers *tert*-butyl hydroperoxide (tBOOH) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA), was developed, confirmed and applied.

Regarding objective 2: *Evaluate the in vivo antioxidant effect of natural compounds present in a red wine sample*, the conclusions are:

- Some polyphenolic compounds were detected for the first time inside zebrafish embryos which were previously exposed to red wine samples.
- The metabolic capacity of zebrafish embryos was determined by the detection of quercetin-*O*-glucuronide, a metabolite of quercetin, in the homogenate of zebrafish embryos previously exposed to a red wine sample.
- *In vivo* antioxidant activity of polyphenolic compounds which were identified with major intensity in the red wine samples was confirmed by the application of the oxidative stress model with tBOOH.

Regarding objective 3: *Study neuroprotective effects of red wine polyphenols in zebrafish embryos*, the conclusions are:

- Pre-exposure of zebrafish embryos to polyphenolic compounds of red wine increased the total distance moved by the zebrafish embryos and prevented dopaminergic neuronal loss, produced by the exposure of the embryos to 6-OHDA.
- Neuroprotective activity of polyphenolic compounds of red wine was demonstrated *in vivo* through the oxidative stress model with the neurotoxin 6-OHDA.

Regarding objective 4: *Study oxidative stress effects and antioxidants with the human neurospheres model*, the conclusions are:

- Exposure to TCHQ produced significant neurotoxic effects in neurospheres, which were related to oxidative stress.
- The hormesis paradigm as an antioxidant strategy was applied in the human neurospheres model and in the zebrafish embryo model. Pre-exposure of neurospheres and zebrafish embryos

to a low concentration of TCHQ prevented oxidative damage produced by the exposure to working concentrations of TCHQ in both experimental models.

The final conclusion is as follows:

- The oxidative stress model using the zebrafish embryo developed in the present work integrates and combines different experimental procedures which allow an *in vivo*, rapid and efficient screening of antioxidant compounds.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- A**bbott, W., 1987. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3, 302–303.
- Abdullah, R., Basak, I., Patil, K.S., Alves, G., Larsen, J.P., Møller, S.G., 2015. Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. *Exp. Gerontol.* 68, 33–38.
- Ahmad, N., Gupta, S., Mukhtar, H., 2000. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 376, 338–346.
- Albarracin, S.L., Stab, B., Casas, Z., Sutachan, J.J., Samudio, I., Gonzalez, J., Gonzalo, L., Capani, F., Morales, L., Barreto, G.E., 2012. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. *Nutr. Neurosci.* 15, 1–9.
- Aly, H. A. A., El-Beshbishy, H. A., Banjar, Z.M., 2012. Mitochondrial dysfunction induced impairment of spermatogenesis in LPS-treated rats: Modulatory role of lycopene. *Eur. J. Pharmacol.* 677, 31–38.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R.L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R.M., Joseph, J. A., 2005. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr. Neurosci.* 8, 111–120.
- Anichtchik, O. V, Kaslin, J., Peitsaro, N., Scheinin, M., Panula, P., 2004. Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine. *J. Neurochem.* 88, 443–453.
- Annunziato, L., Amoroso, S., Pannaccione, A., Cataldi, M., Pignataro, G., D'Alessio, A., Sirabella, R., Secondo, A., Sibaud, L., Di Renzo, G.F., 2003. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: Role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol. Lett.* 139, 125–133.
- Badshah, H., Kim, T.H., Kim, M.O., 2015. Protective effects of Anthocyanins against Amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. *Neurochem. Int.* 80, 51–59.
- B**akkers, J., 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* 91, 279–288.
- Baumann, J., Gassmann, K., Masjosthusmann, S., DeBoer, D., Bendt, F., Giersiefer, S., Fritsche, E., 2015. Comparative human and rat neurospheres reveal species differences in chemical effects on neurodevelopmental key events. *Arch. Toxicol.* *Article in press.*
- Becker, K., Schroecksnadel, S., Gostner, J., Zaknun, C., Schennach, H., Überall, F., Fuchs, D., 2014. Comparison of in vitro tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. *Phytomedicine* 21, 164–171.
- Belanger, S.E., Rawlings, J.M., Carr, G.J., 2013. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1768–1783.

- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76.
- Best, J.H., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Eddy, F.B., Metcalf, J.S., Codd, G. a., 2002. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 60, 223–231.
- Boix, N., Teixido, E., Vila-Cejudo, M., Ortiz, P., Ibáñez, E., Llobet, J.M., Barenys, M., 2015. Triclabendazole sulfoxide causes stage-dependent embryoletality in zebrafish and mouse in vitro. *PLoS One* 10, e0121308.
- Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 325–337.
- Bouzd, M.A., Filaire, E., McCall, A., Fabre, C., 2015. Radical oxygen species, exercise and aging: An update. *Sport. Med.* 45, 1215–1261.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Leb. Wisen Technol.* 28, 25–30.
- Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N., 2005. Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species -- an update. *ALTEX Altern. zu Tierexperimenten* 22, 87–102.
- Breier, J.M., Gassmann, K., Kayser, R., Stegeman, H., De Groot, D., Fritsche, E., Shafer, T.J., 2010. Neural progenitor cells as models for high-throughput screens of developmental neurotoxicity: State of the science. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 4–15.
- Brown, L., Kroon, P. A., Das, D.K., Das, S., Tosaki, A., Chan, V., Singer, M. V., Feick, P., 2009. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33, 1513–1523.
- Bugel, S.M., Tanguay, R.L., Planchart, A., 2014. Zebrafish: A Marvel of High-Throughput Biology for 21st Century Toxicology. *Curr. Environ. Heal. Reports* 1, 341–352.
- C**alabrese, E.J., 2008. Neuroscience and hormesis: overview and general findings. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 249–252.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Dinkova-Kostova, A.T., Calabrese, E.J., Mattson, M.P., 2010. Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1763–1811.
- Calderón-Montaña, J.M., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., López-Lázaro, M., 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.* 11, 298–344.
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G., 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 303–311.

- Cao, G., Muccitelli, H.U., Sánchez-Moreno, C., Prior, R.L., 2001. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: A pharmacokinetic study. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 920–926.
- Carbonneau, M.A., Cisse, M., Mora-Soumille, N., Dairi, S., Rosa, M., Michel, F., Lauret, C., Cristol, J.P., Dangles, O., 2014. Antioxidant properties of 3-deoxyanthocyanidins and polyphenolic extracts from Côte d'Ivoire's red and white sorghums assessed by ORAC and in vitro LDL oxidisability tests. *Food Chem.* 145, 701–7090.
- CellTiter-Blue® Cell Viability Assay [en línia] Promega; [consulta: 8 de Juliol de 2015]. Disponible a: <http://www.promega.es/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/>
- Cerebro [en línia] Batanga™ by Batanga Media; [consulta: 15 d'Agost de 2015]. Disponible a: <http://www.batanga.com/ciencia-y-tech>
- Chagas, P.M., Weber Fulco, B. da C., Pesarico, A.P., Roehrs, J.A., Wayne, N.C., 2015. Bis(phenylimidazol-selenazolyl) diselenide as an antioxidant compound: An in vitro and in vivo study. *Chem. Biol. Interact.* 233, 14–24.
- Chen, T.H., Lin, C.C., Meng, P.J., 2014. Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Hazard. Mater.* 277, 134–140.
- Chen, T.-H., Lin, C.Y., Tseng, M.C., 2011. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Pollut. Bull.* 63, 303–308.
- Chen, Y., Zeng, S.F., Cao, Y.F., 2012. Oxidative stress response in zebrafish (*Danio rerio*) gill experimentally exposed to subchronic microcystin-LR. *Environ. Monit. Assess.* 184, 6775–6787.
- Coppedè, F., Migliore, L., 2014. DNA damage in neurodegenerative diseases. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 776, 84–97.
- Cordero, M.D., Moreno-Fernández, A.M., Gomez-Skarmeta, J.L., de Miguel, M., Garrido-Maraver, J., Oropesa-Ávila, M., Rodríguez-Hernández, Á., Navas, P., Sánchez-Alcázar, J.A., 2009. Coenzyme Q10 and alpha-tocopherol protect against amitriptyline toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 329–337.
- Crofton, K.M., Mundy, W.R., Shafer, T.J., 2012. Developmental neurotoxicity testing: A path forward. *Congenit. Anom.* 52, 140–146.
- D**a Costa, C.T., Horton, D., Margolis, S. A., 2000. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 881, 403–410.
- Dajas, F., Abin-Carriquiry, J.A., Arredondo, F., Blasina, F., Echeverry, C., Martínez, M., Rivera, F., Vaamonde, L., 2015. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. *Neurochem. Int.* 1–9.
- Davis, S., Davis, B.M., Richens, J.L., Vere, K.-A., Petrov, P.G., Winlove, C.P., O'shea, P., 2015. α -Tocopherols Modify the Membrane Dipole Potential Leading to Modulation of Ligand Binding by P-glycoprotein. *J. Lipid Res.* 56, 1543–1550.

Day, A.J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M.R., Williamson, G., 2001. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic. Res.* 35, 941–952.

De Esch, C., Sliker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., de Groot, D., 2012. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 545–553.

De Nisco, M., Manfra, M., Bolognese, A., Sofo, A., Scopa, A., Tenore, G.C., Pagano, F., Milite, C., Russo, M.T., 2013. Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. (cv. Aglianico). *Food Chem.* 140, 623–629.

Dolatshahi, M., Farbood, Y., Khodadadi, A., Sarkaki, A., Taqhi Mansouri, S.M., 2015. Ellagic acid improves hyperalgesia and cognitive deficiency in 6-hydroxydopamine induced rat model of Parkinson's disease. *Iran J Basic Med Sci* 18, 38–46.

Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.

ECVAM DB-ALM, 2010a. Embryonic Stem Cell Test (EST) DB-ALM Protocol n ° 113 Data Analysis / Prediction Model.

ECVAM DB-ALM, 2010b. Embryotoxicity Testing in Post-Implantation Whole Embryo Culture (WEC) - Method of Piersma DB-ALM Protocol n ° 123 Developmental toxicity 1–16.

ECVAM DB-ALM, 2009. The Micromass Test - Method of Brown DB-ALM Protocol n ° 122 Data Analysis / Prediction Model.

Elkon, H., Melamed, E., Offen, D., 2004. Oxidative stress, induced by 6-hydroxydopamine, reduces proteasome activities in PC12 cells: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* 24, 387–400.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M.-I., Corella, D., Ards, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutierrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R.M., Serra-Majem, L., Pinto, X., Basora, J., Muñoz, M.A., Sorli, J. V., Martinez, J.A., Martinez-Gonzalez, M.A., 2013. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N. Engl. J. Med.* 368, 1279–1290.

Fang, J., 2014. Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab. Rev.* 46, 508–520.

Fang, L., Miller, Y.I., 2012. Emerging applications for zebrafish as a model organism to study oxidative mechanisms and their roles in inflammation and vascular accumulation of oxidized lipids. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1411–1420.

Faria, A., Meireles, M., Fernandes, I., Santos-buelga, C., Calhau, C., 2014. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chem.* 149, 190–196.

Feng, C.W., Wen, Z.H., Huang, S.Y., Hung, H.C., Chen, C.H., Yang, S.N., Chen, N.F., Wang, H.M., Hsiao, C.D., Chen, W.F., 2014. Effects of 6-hydroxydopamine exposure on motor activity and biochemical expression in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Zebrafish* 11, 227–39.

- Fenton, H.J.H., 1894. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, 65, 899–910.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Frankel, E.N., Finley, J.W., 2008. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4901–4908.
- Fritsche, E., Cline, J.E., Nguyen, N.-H., Scanlan, T.S., Abel, J., 2005. Polychlorinated biphenyls disturb differentiation of normal human neural progenitor cells: clue for involvement of thyroid hormone receptors. *Environ. Health Perspect.* 113, 871–876.
- Fritsche, E., Gassmann, K., Schreiber, T., 2011. Neurospheres as a model for developmental neurotoxicity testing., in: *Methods in Molecular Biology: In Vitro Neurotoxicology*. 99–114.
- G**arcia-Garcia, A., Zavala-Flores, L., Rodriguez-Rocha, H., Franco, R., 2012. Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1764–1784.
- Gassmann, K., Abel, J., Bothe, H., Haarmann-Stemmann, T., Merk, H.F., Quasthoff, K.N., Rockel, T.D., Schreiber, T., Fritsche, E., 2010. Species-specific differential ahr expression protects human neural progenitor cells against developmental neurotoxicity of PAHs. *Environ. Health Perspect.* 118, 1571–1577.
- Gassmann, K., Baumann, J., Giersiefer, S., Schuwald, J., Schreiber, T., Merk, H.F., Fritsche, E., 2012. Automated neurosphere sorting and plating by the COPAS large particle sorter is a suitable method for high-throughput 3D in vitro applications. *Toxicol. Vitro.* 26, 993–1000.
- Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., Bremer, S., Becker, K., 2001. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *European Centre for the Validation of Alternative Methods. Altern. Lab. Anim.* 30, 151–176.
- Ghosh, D., Scheepens, A., 2009. Vascular action of polyphenols. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 322–331.
- Griffith, O.W., 1982. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* 257, 13704–13712.
- Grunwald, D.J., Eisen, J., 2002. Headwaters of the zebrafish-emergences of a new model vertebrate. *Nat. Rev. Genet.* 3, 717–724.
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J.F., Zhang, Z., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Prior, R.L., 2003. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *J. Mass Spectrom.* 38, 1272–1280.
- Guan, S., Zhang, X.L., Ge, D., Liu, T.Q., Ma, X.H., Cui, Z.F., 2011. Protocatechuic acid promotes the neuronal differentiation and facilitates survival of phenotypes differentiated from cultured neural stem and progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 471–478.

- Gülçin, I., 2012. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch. Toxicol.* 86, 345–391.
- Guo, S., 2009. Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function. *Expert Opin. Drug Discov.* 4, 715–726.
- Gupta, S., Agarwal, A., Banerjee, J., Alvarez, J.G., 2007. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet. Gynecol. Surv.* 62, 335–347.
- Gustafson, A.L., Stedman, D.B., Ball, J., Hillegass, J.M., Flood, A., Zhang, C.X., Panzica-Kelly, J., Cao, J., Coburn, A., Enright, B.P., Tornesi, M.B., Hetheridge, M., Augustine-Rauch, K. a., 2012. Inter-laboratory assessment of a harmonized zebrafish developmental toxicology assay - Progress report on phase I. *Reprod. Toxicol.* 33, 155–164.
- Halliday, G.M., Leverenz, J.B., Schneider, J.S., Adler, C.H., 2014. The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 29, 634–650.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1988. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol* 7, 7–13.
- Han, X.H., Cheng, M.N., Chen, L., Fang, H., Wang, L.J., Li, X.T., Qu, Z.Q., 2014. 7,8-Dihydroxyflavone protects PC12 cells against 6-hydroxydopamine-induced cell death through modulating PI3K/Akt and JNK pathways. *Neurosci. Lett.* 581, 85–88.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Haslam E, 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possibles modes of action. *J. Nat. Prod.* 59, 205–215.
- Hirata, A., Murakami, Y., Shoji, M., Kadoma, Y., Fujisawa, S., 2005. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res.* 25, 3367–3374.
- Holmberg, A., Olsson, C., Holmgren, S., 2006. The effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gut motility in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. *J. Exp. Biol.* 209, 2472–2479.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J. a, Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Mortimer, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S.,

Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H. a, Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Roest Crolius, H., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.

Hwang, S.L., Yen, G.C., 2009. Modulation of Akt, JNK, and p38 activation is involved in citrus flavonoid-mediated cytoprotection of PC12 cells challenged by hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2576–2582.

Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *An. Neurol.* 53, S26–S38.

Kalt, W., Blumberg, J.B., McDonald, J.E., Vinqvist-Tymchuk, M.R., Fillmore, S.A.E., Graf, B.A., O'Leary, J.M., Milbury, P.E., 2008. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. *J. Agric. Food Chem.* 56, 705–712.

Kanupriya, Prasad, D., Sai Ram, M., Sawhney, R.C., Ilavazhagan, G., Banerjee, P.K., 2007. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicol. Vitr.* 21, 846–854.

Kasraee, B., Handjani, F., Aslani, F.S., 2003. Enhancement of the depigmenting effect of hydroquinone and 4-hydroxyanisole by all-trans-retinoic acid (Tretinoin): The impairment of glutathione-dependent cytoprotection? *Dermatology* 206, 289–291.

Kastenhuber, E., Kratochwil, C.F., Ryu, S., Schweitzer, J., Driever, W., 2010. Genetic dissection of dopaminergic and noradrenergic contributions to catecholaminergic tracts in early larval zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 518, 439–458.

Kelsey, N., Hulick, W., Winter, A., Ross, E., Linseman, D., 2011. Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress. *Nutr. Neurosci.* 14, 249–259.

Kerksick, C., Willoughby, D., 2005. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2, 38–44.

Kim, H., Choi, H.R., Kim, D.S., Park, K.C., 2012. Topical hypopigmenting agents for pigmentary disorders and their mechanisms of action. *Ann. Dermatol.* 24, 1–6.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.

Kishi, S., Bayliss, P.E., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Qi, J., Nanjappa, P., Imamura, S., Islam, A., Neuberg, D., Amsterdam, A., Roberts, T.M., 2008. The identification of zebrafish mutants showing alterations in senescence-associated biomarkers. *PLoS Genet.* 4, e1000152.

- Klüver, N., Yang, L., Busch, W., Scheffler, K., Renner, P., Strähle, U., Scholz, S., 2011. Transcriptional response of zebrafish embryos exposed to neurotoxic compounds reveals a muscle activity dependent hspb11 expression. *PLoS One* 6, e29063.
- Kobayashi, A., Kang, M.I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K., Yamamoto, M., 2006. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 221–229.
- Kovacic, P., Somanathan, R., 2006. Mechanism of teratogenesis: Electron transfer, reactive oxygen species, and antioxidants. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* 78, 308–325.
- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 463–471.
- Kulisevsky, J., Luquin, M.R., Arbelo, J.M., Burguera, J.A, Carrillo, F., Castro, A., Chacón, J., García-Ruiz, P.J., Lezcano, E., Mir, P., Martínez-Castrillo, J.C., Martínez-Torres, I., Puente, V., Sesar, A., Valldeoriola-Serra, F., Yañez, R., 2013. Enfermedad de Parkinson avanzada. Características clínicas y tratamiento (parte I). *Neurología* 28, 503–521.
- Kwon, S.H., Hong, S.I., Jung, Y.H., Kim, M.J., Kim, S.Y., Kim, H.C., Lee, S.Y., Jang, C.G., 2012. *Lonicera japonica* THUNB. protects 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by inhibiting activation of MAPKs, PI3K/Akt, and NF- κ B in SH-SY5Y cells. *Food Chem. Toxicol.* 50, 797–807.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 196–209.
- Langheinrich, U., 2003. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* 25, 904–912.
- Lee, H., Inselman, A.L., Kanungo, J., Hansen, D.K., 2012. Alternative models in developmental toxicology. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 10–22.
- Lepesant, J.A., 2015. The promises of neurodegenerative disease modeling. *C. R. Biol.* 338, 584–592.
- Li, K.K., Liu, C.L., Tam, J.C.W., Kwok, H.F., Lau, C.P., Leung, P.C., Ko, C.H., Ye, C.X., 2014. In vitro and in vivo mechanistic study of a novel proanthocyanidin, GC-(4→8)-GCG from cocoa tea (*Camellia ptilophylla*) in antiangiogenesis. *J. Nutr. Biochem.* 25, 319–328.
- Liu, H., Gooneratne, R., Huang, X., Lai, R., Wei, J., Wang, W., 2015. A rapid in vivo zebrafish model to elucidate oxidative stress-mediated PCB126-induced apoptosis and developmental toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 84, 91–102.
- Liu, R.H., Finley, J., 2005. Potential cell culture models for antioxidant research. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4311–4314.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

Lv, H., Liu, J., Wang, L., Zhang, H., Yu, S., Li, Z., Jiang, F., Niu, Y., Yuan, J., Cui, X., Wang, W., 2014. Ameliorating Effects of Combined Curcumin and Desferrioxamine on 6-OHDA-Induced Rat Mode of Parkinson's Disease. *Cell Biochem. Biophys.* 70, 1433–1438.

Maczurek, A., Hager, K., Kenklies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D.A., Münch, G., 2008. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1463–1470.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81 (suppl), 230S–242S.

Mattsson, A., Ullerås, E., Patring, J., Oskarsson, A., 2012. Albendazole causes stage-dependent developmental toxicity and is deactivated by a mammalian metabolism system in a modified zebrafish embryotoxicity test. *Reprod. Toxicol.* 34, 31–42.

Medina-Remón, A., Tresserra-Rimbau, A., Pons, A., Tur, J.A., Martorell, M., Ros, E., Buil-Cosiales, P., Sacanella, E., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Ortega-Calvo, M., García-Valdúez, M., Arós, F., Saez, G.T., Serra-Majem, L., Pinto, X., Vinyoles, E., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., 2015. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 25, 60–67.

Melo, P.S., Massarioli, A.P., Denny, C., dos Santos, L.F., Franchin, M., Pereira, G.E., de Sousa Vieira, T.M.F., Rosalen, P.L., de Alencar, S.M., 2015. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. *Food Chem.* 181, 160–169.

Moon, J.H., Tsushida, T., Nakahara, K., Terao, J., 2001. Identification of quercetin 3-O-b-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1274–1285.

Moors, M., Rockel, T.D., Abel, J., Cline, J.E., Gassmann, K., Schreiber, T., Shuwald, J., Weinmann, N., Fritsche, E., 2009. Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environ. Health Perspect.* 117, 1131–1138.

Mortensen, A., 2006. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl. Chem.* 78, 1477–1491.

Na, Y.-R., Seok, S.-H., Baek, M.-W., Lee, H.-Y., Kim, D.-J., Park, S.-H., Lee, H.-K., Park, J.-H., 2009. Protective effects of vitamin E against 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) induced toxicity in zebrafish embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 714–719.

Nagel, R., 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19, 38–48.

Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Tsujita, T., Akiyama, S.I., Wakasa, T., Mukaigasa, K., Kaneko, H., Tamaru, Y., Yamamoto, M., Kobayashi, M., 2011. Tissue-restricted expression of Nrf2 and its target genes in zebrafish with gene-specific variations in the induction profiles. *PLoS One* 6, e26884.

- Novoa, B., Bowman, T.V., Zon, L., Figueras, A., 2009. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 26, 326–331.
- NRC- National Research Council, 2007. *Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy.*, Washington DC: The National Academies Press.
- O**brenovich, M.E., Nair, N.G., Beyaz, A., Aliev, G., Reddy, V.P., 2010. The role of polyphenolic antioxidants in health, disease, and aging. *Rejuvenation Res.* 13, 631–643.
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 2, OECD Publ. 1–22.
- Otte, J.C., Schmidt, A.D., Hollert, H., Braunbeck, T., 2010. Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 100, 38–50.
- P**ardal, D., Caro, M., Tueros, I., Barranco, A., Navarro, V., 2014. Resveratrol and piceid metabolites and their fat-reduction effects in zebrafish larvae. *Zebrafish* 11, 32–40.
- Park, K.H., Cho, K.H., 2011. A zebrafish model for the rapid evaluation of pro-oxidative and inflammatory death by lipopolysaccharide, oxidized low-density lipoproteins, and glycated high-density lipoproteins. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 904–910.
- Parng, C., Roy, N.M., Ton, C., Lin, Y., McGrath, P., 2007. Neurotoxicity assessment using zebrafish. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 55, 103–112.
- Parng, C., Ton, C., Lin, Y.X., Roy, N.M., McGrath, P., 2006. A zebrafish assay for identifying neuroprotectants in vivo. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 509–516.
- Pasinetti, G.M., Wang, J., Marambaud, P., Ferruzzi, M., Gregor, P., Knable, L.A., Ho, L., 2011. Neuroprotective and metabolic effects of resveratrol: Therapeutic implications for Huntington's disease and other neurodegenerative disorders. *Exp. Neurol.* 232, 1–6.
- Phulara, S.C., Shukla, V., Tiwari, S., Pandey, R., 2015. *Bacopa monnieri* promotes longevity in *Caenorhabditis elegans* under stress conditions. *Pharmacogn. Mag.* 11, 410–416.
- Pingitore, A., Pereira Lima, G.P., Mastorci, F., Quinones, A., Iervasi, G., Vassalle, C., 2015. Exercise and Oxidative Stress: Potential Effects of Antioxidant Dietary Strategies in Sports. *Nutrition* 31, 916–922.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74.
- Prieto, M.A., Murado, M.A., 2014. A Critical Point: The problems associated with the variety of criteria to quantify the antioxidant capacity 62, 5472–5484.
- Prior, R.L., Guohua, C., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. 27, 1173–1181.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302.

Priya, S., Nigam, A., Bajpai, P., Kumar, S., 2014. Diethyl maleate inhibits MCA+TPA transformed cell growth via modulation of GSH, MAPK, and cancer pathways. *Chem. Biol. Interact.* 219, 37–47.

Radak, Z., Chung, H.Y., Goto, S., 2005. Exercise and hormesis: Oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology* 6, 71–75.

Reeve, A., Simcox, E., Turnbull, D., 2014. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res. Rev.* 14, 19–30.

Reimers, M.J., La Du, J.K., Periera, C.B., Giovanini, J., Tanguay, R.L., 2006. Ethanol-dependent toxicity in zebrafish is partially attenuated by antioxidants. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 497-508.

Renaud, S., De Lorgeril, M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523–1526.

Richetti, S.K., Blank, M., Capiotti, K.M., Piato, A.L., Bogo, M.R., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2011. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 217, 10–15.

Rink, E., Wullimann, M.F., 2001. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res.* 889, 316–330.

Rodriguez-Pallares, J., Parga, J.A., Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M.J., Labandeira-Garcia, J.L., 2007. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 103, 145–156.

Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users., in: *Bioinformatics Methods and Protocols.* 365–386.

Rubinstein, A.L., 2003. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 6, 218–223.

Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The principles of human experimental technique.* Methuen, London.

Santa-Maria, I., Diaz-Ruiz, C., Ksiezak-Reding, H., Chen, A., Ho, L., Wang, J., Pasinetti, G.M., 2012. GSPE interferes with tau aggregation in vivo: implication for treating tauopathy. *Neurobiol. Aging* 33, 2072–2081.

Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M., 2005a. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 215–217.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005b. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 287–306.

- Scapagnini, G., Sonya, V., Nader, A.G., Calogero, C., Zella, D., Fabio, G., 2011. Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: A nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* 44, 192–201.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 394–404.
- Selvatici, R., Marani, L., Marino, S., Siniscalchi, A., 2013. In vitro mitochondrial failure and oxidative stress mimic biochemical features of Alzheimer disease. *Neurochem. Int.* 63, 112–120.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T., 2011. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease pic hallmarks. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006189.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of foli-ciocalteu reagent. *Methods Enzym.* 299, 152–178.
- Smith, L.L., Beggs, A.H., Gupta, V. a, 2013. Analysis of Skeletal Muscle Defects in Larval Zebrafish by Birefringence and Touch-evoked Escape Response Assays. *J. Vis. Exp.* 3–8.
- Solanki, I., Parihar, P., Mansuri, M., Parihar, M., 2015. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Adv. Nutr.* 6, 64–72.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* 83, 13–34.
- Speroni, E., Guerra, M.C., Minghetti, A., Crespi-Perellino, N., Pasini, P., Piazza, F., Roda, A., 1998. Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant. *Phytother. Res.* 12, 14–24.
- Sun, G., Xia, J., Draczynska-Lusiak, Bozena Simonyi, A., Sun, A., 1999. Grape polyphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration. *Neuroreport* 10, 93–96.
- Suzuki, T., Takagi, Y., Osanai, H., Li, L., Takeuchi, M., Katoh, Y., Kobayashi, M., 2005. Pi class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish. *Biochem. J.* 388, 65–73.
- T**arozzi, A., Morroni, F., Hrelia, S., Angeloni, C., Marchesi, A., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., 2007. Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 424, 36–40.
- Teixidó, E., Piqué, E., Gómez-Catalán, J., Llobet, J.M., 2013. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. *Toxicol. Vitro.* 27, 469–478.
- Teixidó, E., Piqué, E., Gonzalez-Linares, J., Llobet, J.M., Gómez-Catalán, J., 2015. Developmental effects and genotoxicity of 10 water disinfection by-products in zebrafish. *J. Water Health* 13, 54–66.
- Timme-Laragy, A.R., Karchner, S.I., Franks, D.G., Jenny, M.J., Harbeitner, R.C., Goldstone, J. V., McArthur, A.G., Hahn, M.E., 2012. Nrf2b, novel zebrafish paralog of oxidant-responsive transcription factor NF-E2-related factor 2 (NRF2). *J. Biol. Chem.* 287, 4609–4627.

- Timme-Laragy, A.R., Van Tiem, L.A., Linney, E.A., Di Giulio, R.T., 2009. Antioxidant responses and NRF2 in synergistic developmental toxicity of PAHs in Zebrafish. *Toxicol. Sci.* 109, 217–227. doi:10.1093/toxsci/kfp038
- Tobia, C., De Sena, G., Presta, M., 2011. Zebrafish embryo, a tool to study tumor angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 505–509.
- Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remón, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M.A., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M.A., Saez, G.T., Ruiz-Gutiérrez, V., Warnberg, J., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., 2013. Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 23, 953–959.
- Tretter, L., Sipos, I., Adam-Vizi, V., 2004. Initiation of Neuronal Damage by Complex I Deficiency and Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Neurochem. Res.* 29, 569–577.
- Tseng, H.P., Hseu, T.H., Buhler, D.R., Wang, W. Der, Hu, C.H., 2005. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 247–258.
- Tsoi, B., Yi, R.N., Cao, L.F., Li, S.B., Tan, R.R., Chen, M., Li, X.X., Wang, C., Li, Y.F., Kurihara, H., He, R.R., 2015. Comparing antioxidant capacity of purine alkaloids: A new, efficient trio for screening and discovering potential antioxidants in vitro and in vivo. *Food Chem.* 176, 411–419.
- U**senko, C.Y., Harper, S.L., Tanguay, R.L., 2008. Fullerene C60 exposure elicits an oxidative stress response in embryonic zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229, 44–55.
- V**alko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- Vallverdú-Queralt, A., Boix, N., Piqué, E., Gómez-catalan, J., Medina-Remon, A., Sasot, G., Mercader-Martí, M., M, Llobet .J.M., Lamuela-Raventos, R.M., 2015. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Chem.* 181, 146–151.
- Vallverdú-Queralt, A., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Lamuela-Raventós, R.M., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., 2012. Changes in the polyphenol profile of tomato juices processed by pulsed electric fields. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9667–9672.
- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Martínez-Huélamo, M., Rinaldi Alvarenga, J.F., Leal, L.N., Lamuela-Raventos, R.M., 2014. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.* 154, 299–307.

- W**ang, M., Zhang, Z., Cheang, L.C.V., Lin, Z., Lee, S.M.Y., 2011. Eriocaulon buergerianum extract protects PC12 cells and neurons in zebrafish against 6-hydroxydopamine-induced damage. *Chin. Med.* 6, 16.
- Wang, Y.H., Wen, C.C., Yang, Z.S., Cheng, C.C., Tsai, J.N., Ku, C.C., Wu, H.J., Chen, Y.H., 2009. Development of a whole-organism model to screen new compounds for sun protection. *Mar. Biotechnol.* 11, 419–429.
- Wang, Y.J., Ho, Y.S., Chu, S.W., Lien, H.J., Liu, T.H., Lin, J.K., 1997. Induction of glutathione depletion, p53 protein accumulation and cellular transformation by tetrachlorohydroquinone, a toxic metabolite of pentachlorophenol. *Chem. Biol. Interact.* 105, 1–16.
- Wang, Y.J., Lee, C.C., Chang, W.C., Liou, H.B., Ho, Y.S., 2001. Oxidative stress and liver toxicity in rats and human hepatoma cell line induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone. *Toxicol. Lett.* 122, 157–169.
- Watzke, J., Schirmer, K., Scholz, S., 2007. Bacterial lipopolysaccharides induce genes involved in the innate immune response in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 23, 901–905.
- Wayner, D.D.M., Burton, G.W.U., Ingold, K., Locke, S., 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.* 187, 33–37.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Giese, M., Frank, H., Steinberg, C., 2000. Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 122–131.
- Wijesinghe, W.A.J.P., Kim, E.A., Kang, M.C., Lee, W.W., Lee, H.S., Vairappan, C.S., Jeon, Y.J., 2014. Assessment of anti-inflammatory effect of 5β-hydroxypalisadin B isolated from red seaweed *Laurencia snackeyi* in zebrafish embryo in vivo model. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 110–117.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C., 2004. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* 36, 838–849.
- Wolfe, K.L., Liu, R.H., 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8896–8907.
- X**i, Y., Noble, S., Ekker, M., 2011. Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 11, 274–282.
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., Lim H.B. 2013. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. 11, 622-646.
- Y**okoyama, A., Sakakibara, H., Crozier, A., Kawai, Y., Matsui, A., Terao, J., Kumazawa, S., Shimoi, K., 2009. Quercetin metabolites and protection against peroxynitrite-induced oxidative hepatic injury in rats. *Free Radic. Res.* 43, 913–921.

Young, I.S., Woodside, J. V, 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54, 176–186.

Yuan, H., Zhang, W., Li, H., Chen, C., Liu, H., Li, Z., 2013. Neuroprotective effects of resveratrol on embryonic dorsal root ganglion neurons with neurotoxicity induced by ethanol. *Food Chem. Toxicol.* 55, 192–201.

Zebrafish Genome Project [en línia] Wellcome Trust Sanger Institute [consulta: 20 d'Agost de 2015]
Disponible a: <http://www.sanger.ac.uk/resources/zebrafish/genomeproject.html>

Zhang, R.F., Zhang, F.X., Zhang, M.W., Wei, Z.C., Yang, C.Y., Zhang, Y., Tang, X.J., Deng, Y.Y., Chi, J.W., 2011. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 chinese black soybean (*Glycine max* L. Merr.) varieties. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5935–5944.

Zhang, Y.J., Seeram, N.P., Lee, R., Feng, L., Heber, D., 2008. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell anti proliferative properties. *J. Agric. Food Chem.* 56, 670–675.

Zhang, Z., Li, G., Szeto, S.S.W., Chong, C., Quan, Q., Huang, C., Cui, W., Guo, B., Wang, Y., Han, Y., Michael Siu, K.W., Lee, S.M.Y., Chu, I.K., 2015. Examining the neuroprotective effects of protocatechuic acid and chrysin on in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 84, 331–343.

Zhang, Z.J., Cheang, L.C.V., Wang, M.W., Lee, S.M.Y., 2011. Quercetin exerts a neuroprotective effect through inhibition of the iNOS/NO system and pro-inflammation gene expression in PC12 cells and in zebrafish. *Int. J. Mol. Med.* 195–203.

Zhang, Z.J., Cheang, L.C. V, Wang, M.W., Li, G.H., Chu, I.K., Lin, Z.X., Lee, S.M.Y., 2012. Ethanol extract of fructus alpinia oxyphylla protects against 6-hydroxydopamine-induced damage of PC12 cells in vitro and dopaminergic neurons in zebrafish. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32, 27–40.

Zhao, Z., Egashira, Y., Sanada, H., 2003. Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. *J. Nutr.* 133, 1355–1361.

ANNEX

7. ANNEX

Publicacions derivades de la present tesi doctoral:

Vallverdú-Queralt A. & Boix N., Piqué E., Gómez-Catalán J., Medina-Reimon A., Sassot G., Mercader-Martí M., Llobet JM., Lamuela-Raventós RM., 2015. **Identification of phenolic compounds in red grape extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS.** Food Chem. 181, 146-151.

[Tornar a l'apartat 4.2.2.](#)

Boix N., Teixidó E., Piqué E., Llobet J.M., Gómez-Catalán J. **An oxidative stress model for testing the antioxidant capacity of compounds with the zebrafish embryo test.** *En procés de redacció*

Boix N., Teixidó E., Piqué E., Llobet J.M., Gómez-Catalán J. **Evaluation of neuroprotective activity of natural antioxidants with a zebrafish embryo model of oxidative stress.** *En procés de redacció*

