

VALORACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS DE *Leandra subseriata* (Naudin) Cong
COMO AGENTE ANTIOXIDANTE Y DE REGULACIÓN DE LIBERACIÓN GRÁNULOS
DE GELATINASA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS.

LUIS IGNACIO GÓMEZ CUMBAL

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2018

VALORACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS DE *Leandra subseriata* (Naudin) Cong
COMO AGENTE ANTIOXIDANTE Y DE REGULACIÓN DE LIBERACIÓN GRÁNULOS
DE GELATINASA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS.

Presentado por:
LUIS IGNACIO GÓMEZ CUMBAL

Asesorado por:
JAQUELINE MENA HUERTAS
Doctora en Ciencias, Mención en Biología Celular y Molecular

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo
Modalidad Trabajo de investigación

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2018

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas de los autores”

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Directora

Jaqueline Mena Huertas, *PhD*

Jurado

Carolina Manosalva Altamirano, *PhD*

Jurado

Edith Mariela Burbano Rosero, *PhD*

San Juan de Pasto, 16 de Agosto de 2018

DEDICATORIA

A mis abuelos, por haberme apoyado en todo, por sus valiosos consejos, sus valores, su comprensión, por creer en mí, por la motivación constante que me ha permitido salir adelante y especialmente por su amor.

A mis padres por sus ejemplos de perseverancia y constancia con los cuales he forjado carácter y coraje para lograr mis metas. A mi hermana, por su compañía su apoyo en momentos difíciles y quien me ha enseñado una forma diferente de ver el mundo.

Luis Ignacio Gómez Cumbal.

RESUMEN

Las bayas contienen gran cantidad de compuestos que otorgan diferentes tipos de beneficios, especialmente por la presencia de flavonoides que aportan capacidad antioxidante, antiinflamatoria y quimiopreventiva, las bayas de la planta silvestre *Leandra subseriata* (Naudin) Cong; actualmente son consumidas esporádicamente por habitantes de la región y por la fauna silvestre, no se encuentra ningún registro de investigaciones relacionadas con su composición, propiedades biológicas y/o potenciales beneficios para la salud; por ello se propuso como objetivo de estudio evaluar el efecto antioxidante del extracto de los frutos maduros de *Leandra subseriata* (Naudin) Cong en presencia de radicales libres del oxígeno, 2,2-Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS) y en la regulación de respuestas tempranas de neutrófilos humanos estimulados con Lipopolisacárido (LPS). Para cuantificar las antocianinas en el fruto se trabajó con bayas maduras y el extracto se obtuvo por maceración directa en metanol 1:1, se realizó cuantificación alternativa por el método de Giusty & Wrolstad, los resultados se expresan en Cianidina-3-Gucosido (C3G); para evaluar capacidad antioxidante se trabajó con extracto acuoso obtenido por maceración directa y zonicación, se determinó la capacidad de reducción del radical catiónico ABTS con base en curvas de calibración establecidas con Trolox y Ácido Ascórbico, adicionalmente se realizó pruebas de generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en neutrófilos humanos aislados de sangre periférica. Para evaluar la regulación de liberación de metaloproteinasa 9 (MMP-9) se trabajó con tres concentraciones del extracto acuoso de bayas maduras (10 -25 -50 µg/ml) sobre 1×10^6 neutrófilos incubados en HBSS+Ca⁺² a 37°C por 10 minutos, posteriormente fueron estimulados por 30min con LPS (10 µg/mL), se recuperó sobrenadante por centrifugación y se realizó análisis de Zimografía. Para verificar que los efectos observados no eran producto de muerte celular de neutrófilos se realizaron pruebas de citotoxicidad con yoduro de propídido (IP 5 mM) utilizando como control positivo en muerte celular Tritón X 100 (0,2%).

Se encontró que el extracto metanólico de los frutos maduros presentaron una concentración promedio de antocianos totales de 6,898mg C3G por cada 100g de fruto; en cuanto a la capacidad antioxidante, se demostró que el extracto acuoso presentó un porcentaje de captación en la reducción del radical libre ABTS que va desde el 16,19% hasta el 74,53%; las pruebas in vitro sobre neutrófilos humanos demostraron que la capacidad antioxidante del extracto inhibe la producción de EROs en neutrófilos estimulados con Factor Activante Plaquetario (PAF) 100 µM. De igual manera se demostró que el extracto de frutos maduros de *L. subseriata* (50 µg/mL) disminuye significativamente la liberación de MMP-9 en neutrófilos estimulados con LPS. En la prueba de citotoxicidad se demostró que hubo una disminución significativa de muerte celular al incubar los neutrófilos con el extracto de *L. subseriata* (10, 25 y 50 µg/mL) con respecto al control positivo.

Se evidenció que el extracto acuoso de las bayas maduras de *L. subseriata* presenta una potencial capacidad antioxidante, posiblemente asociado a la presencia de compuestos fenólicos tipo antocianatos como Cianidina-3-Glucosido (Antocianina más común en frutos); esta capacidad antioxidante es capaz de inhibir in vitro la producción de EROs en neutrófilos humanos estimulados con PAF, de igual manera el extracto a concentración de 50 µg/mL disminuye significativamente la liberación de MMP-9 en neutrófilos estimulados con LPS lo cual evidencia potencial actividad antiinflamatoria del extracto. Los resultados obtenidos en este estudio, son efecto de la acción del extracto sobre neutrófilos viables ya que en ninguna de las concentraciones se determinó citotoxicidad cuando se realizó el ensayo con IP.

Palabras Clave: Bayas, Antioxidantes, Antocianinas, Inflamación, MMP-9, EROs, *Leandra subseriata*.

Abstract

The berries contain compounds that provide different types of benefits, especially the presence of flavonoids that provide antioxidant, anti-inflammatory and chemopreventive effects. Berries of the wild plant *Leandra subseriata* (Naudin) Cong; are sporadically consumed by inhabitants of the region and by the wild fauna, there is no record of investigations related to their composition, biological properties and / or potential health benefits; therefore, it was proposed as a study objective to evaluate the antioxidant effect of the extract of the mature fruits of *Leandra subseriata* (Naudin) Cong in the presence of oxygen free radicals, 2,2-Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfonic (ABTS) and in the regulation of early responses of human neutrophils stimulated with Lipopolysaccharide (LPS). To quantify the anthocyanins in the fruit worked with blueberries and the extract was obtained by direct maceration in methanol 1: 1, alternative quantification was performed by the Giusty & Wrolstad method, the results are expressed in Cyanidin-3-Gucoside (C3G). To evaluate the antioxidant capacity worked with aqueous extract obtained by direct maceration and zonation; the ABTS cationic radical reduction capacity was determined based on calibration curves established with Trolox and Ascorbic Acid, additionally tests were carried out to generate reactive oxygen species (ROS) in human neutrophils isolated from peripheral blood. To evaluate the regulation of release of metalloproteinase 9 (MMP-9), three concentrations of the aqueous extract of blueberries (10 -25 -50 µg / ml) were studied on 1×10^6 neutrophils incubated in HBSS + Ca^{+2} at 37°C for 10 minutes, later they were stimulated by 30 min with LPS (10 µg / mL), supernatant was recovered by centrifugation and Zymography analysis was performed. To verify that the observed effects were not a product of neutrophil death, cytotoxicity tests were performed with propidium iodide (IP 5 mM) using Triton X 100 (0.2%) as cell death positive control.

Was found that the methanolic extract of the blueberries presented an average concentration of total anthocyanins of 6,898 mg C3G per 100 g of fruit; regarding the antioxidant capacity, it was shown that the aqueous extract showed a reduction percentage was found that the methanolic extract of the ripe fruits presented an average concentration of total anthocyanins of 6,898 mg C3G per 100 g of fruit; regarding the antioxidant capacity, it was shown that the aqueous extract showed a reduction percentage of the ABTS free radical that goes from 16.19% to 74.53%; *In vitro* tests on human neutrophils showed that the antioxidant capacity of the extract inhibits the production of ROS in neutrophils stimulated with 100 µM Platelet Activating Factor (PAF). Likewise, it was demonstrated that the extract of blueberries of *L. subseriate* (50 µg / mL) significantly decreases the release of MMP-9 in neutrophils stimulated with LPS. In the cytotoxicity test, it was shown that there was a decrease in the number of dead cells in neutrophils incubated with *L. subseriate* extract (10, 25 and 50 µg / ml) in comparison with positive control.

Was evidenced that the aqueous extract of the blueberries of *L. subseriata* presents a potential antioxidant capacity, possibly associated with the presence of anthocyanin-like phenolic compounds such as Ciandina-3-Glucoside (Anthocyanin more common in fruits); This antioxidant capacity is able to inhibit production of EROs *in vitro* in human neutrophils stimulated with PAF, in the same way the extract of concentration of 50 µg / ml that the significant release of MMP-9 in neutrophils stimulated with LPS which evidences potential activity anti-inflammatory of the extract. The results obtained in this study are an effect of the action of the extract in viable neutrophils because no cytotoxicity was determined in IP test.

Key Words: Blueberries, Antioxidants, Anthocyanins, Inflammation, MMP-9, ROS, *Leandra subseriata*.

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. Introducción.....	16
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo	
General.....	17
2.2 Objetivos	
Específicos.....	17
3. Marco	
Teórico.....	25
3.1 Plantas medicinales con potencial antioxidante y antiinflamatorio.....	25
3.1.1 Familia Melastomataceae.....	25
3.1.2 Genero Leandra.....	27
3.1.2.1 <i>Leandra subseriata</i> (Naudin) Cong.....	27
3.2 Antioxidantes.....	28
3.3 Compuestos fenólicos y polifenólicos con actividad antioxidante.....	28
3.3.1 Antocianinas.....	30
3.3.2 Antioxidantes presentes en diversas bayas.....	30
3.4 Estrés oxidativo y su asociación con procesos inflamatorios.....	31
3.5 Procesos inflamatorios crónicos.....	32
3.6 Neutrófilos.....	33
3.6.1 Formación de gránulos.....	33
3.6.2 Vesículas secretoras.....	34
3.6.3 Control de la exocitosis de gránulos.....	34
3.6.4 Interacciones celulares neutrófilos – endotelio.....	36
3.6.4.1 Transmigración endotelial.....	36
3.6.4.2 Familia de las metaloproteinasas.....	37
3.6.4.2.1 Metaloproteinasa-9 (MMP-9).....	38
3.6.4.2.2 Efecto de antioxidantes en la liberación de MMP-9.....	39

3.7 Rol de flavonoides en la respuesta de neutrófilos.....	39
4 Metodología.....	41
4.1 Recolección del material vegetal.....	41
4.2 Obtención del extracto total de frutos maduros de <i>L. subseriata</i> (Naudin).....	42
4.3 Obtención de neutrófilos a partir de sangre periférica humana.....	43
4.3.1 Aislamiento de neutrófilos bovinos.....	44
4.4 Determinación de Antocianos Totales (AT).....	44
4.5 Ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2'-Azino-bis3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS).....	45
4.6 Generación Especies Reactivas del Oxígeno (EROS) en neutrófilos.....	47
4.7 Evaluar la capacidad regulatoria de los extractos de <i>L. subseriata</i> (Naudin) Cong sobre la liberación de gránulos de gelatinasa de Neutrófilos humanos.....	48
4.7.1 Análisis de zimografía.....	49
4.8 Ensayos de muerte celular (Citotoxicidad).....	50
4.9 Análisis estadístico.....	50
4.10 Consideraciones éticas.....	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Identificación taxonómica de la especie.....	52
5.2 Resultados asociados al cumplimiento del objetivo específico 1.....	52
5.2.1 Determinación de Antocianos Totales (AT).....	52
5.2.2 Ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2'-Azino-bis3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS).....	53
5.2.3 Porcentaje de Captación del ABTS.....	55
5.3 Generación Especies Reactivas del Oxígeno (EROS) en neutrófilos.....	57
5.4 Evaluar capacidad regulatoria de los extractos de <i>Leandra subseriata</i> (Naudin) Cong sobre la liberación de gránulos de gelatinasa en Neutrófilos humanos....	60
5.4.1 Ensayo preliminar con neutrófilos bovinos para para establecer concentración de trabajo y tiempo de incubación del extracto de frutos maduros de <i>Leandra subseriata</i>	60

5.5	Evaluar efecto de extractos de frutos maduros de <i>L. subseriata</i> (Naudin) Cong en la liberación de gránulos de gelatinasa (MMP-9) de neutrófilos humanos pre - estimulados con LPS.....	62
5.6	Ensayos de muerte celular (Citotoxicidad) del extracto de <i>Leandra subseriata</i> ...	64
6	DISCUSIÓN	65
7	CONCLUSIONES	69
8	RECOMENDACIONES	70
9	FINANCIACIÓN	71
10	DIFUSIÓN DE RESULTADOS	72
11	BIBLIOGRAFÍA	74
12	ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cuantificación alternativa de Antocianinas (Cianidin 3- Glucosido).....	51
Figura 2: Curvas de Calibración: A. Curva de Calibración de Trolox - B Curva de Calibración de la Vitamina C (Ácido Ascórbico).....	52
Figura 3: Comportamiento de la reacción del ABTS con las diferentes concentraciones del Extracto de <i>Leandra subseriata</i> medido en absorbancia de 754nm, cada 30 segundos por 10 minutos.....	53
Figura 4: Actividad antioxidante equivalente a unidades TROLOX (TEAC) de los extractos de <i>L. subseriata</i>	54
Figura 5: Actividad antioxidante equivalente a unidades de Vitamina C de los extractos de <i>L. subseriata</i>	54
Figura 6: Porcentaje de Captación del ABTS por acción de diferentes concentraciones de extracto de frutos maduros de <i>L. subseriata</i>	55
Figura 7: Curva de generación de ROS con diferentes estímulos.....	56
Figura 8: Actividad de diferentes concentraciones de extracto de frutos de <i>L. subseriata</i> en la disminución de ROS en neutrófilos estimulados con PAF.....	57
Figura 9: Resultado representativo de análisis de Pureza y grado de activación de Neutrófilos aislados de sangre periférica evaluada en Citómetro de Flujo.....	58
Figura 10: Efecto del extracto del fruto de <i>Leandra subseriata</i> sobre la actividad de MMP-9 inducida por LPS en neutrófilos Bovinos.....	58
Figura 11: Efecto del extracto del fruto de <i>Leandra subseriata</i> sobre la actividad de MMP-9 inducida por LPS en neutrófilos Humanos.....	59
Figura 12: Citotoxicidad medida en VarioSkan.....	62

LISTA DE ANEXOS

- A. Certificado de Identificación Taxonómica *Leandra subseriata* (Naudin) Cong.
- B. Absorbancias de Trolox
- C. Absorbancias de Ácido Ascórbico
- D. Formato Consentimiento Informado
- E. Acta de Aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño
- F. Acta de Cumplimiento financiación
- G. Carta de Aceptación III Congreso Colombiano de Biotecnología y Biología Molecular.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

BLUEBERRY: Fruto de color púrpura con propiedades antioxidantes proporcionadas por antocianinas, además son fuente natural de otros fitoquímicos quimiopreventivos tales como: Flavonoides, ácidos fenólicos, ácido elágico, vitaminas C y E, ácido fólico y β -sitosterol. No es frecuente que frutas o cualquier otro material vegetal demuestre diversos grados de actividad biológica (Boivin, Blanchette, Barrette, Moghrabi, & Beliveau, 2007).

ANTIOXIDANTE: Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan las reacciones en cadena quitando los intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos; debido a esto los antioxidantes son agentes reductores como por ejemplo antocianinas (Elejade, 2001; Huanqui, 1997).

ANTOCIANINA: Pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a hojas, flores y frutos (Wagner, 1982). Frutos de plantas que contienen antocianinas presentan una elevada actividad antioxidante y antiinflamatoria que incrementa su valor comercial, alimenticio y potencialmente farmacéutico (Coelho, Assumpção, Prestes, & Denadai, 2015).

ESTRÉS OXIDATIVO: El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier célula, órgano, sistema o grupo celular especializado (Ames, Shigenaga, & Hagen, 1993).

RADICALES LIBRES: Son especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, son moléculas ubicuarias y difusibles que se produce por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones y las reacciones de oxidación, por lo que produce daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas (Elejade, 2001).

INFLAMACION: Respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios. La respuesta inflamatoria ocurre solo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado. Se considera por tanto un mecanismo de inmunidad innata, estereotipado, en contraste con la reacción inmune adaptativa, específica para cada tipo de agente infeccioso (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2014), el mayor problema que surge de la inflamación es que la defensa se dirija tanto hacia agentes dañinos como a no dañinos, de manera que provoque lesión en tejidos u órganos sanos.

NEUTROFILOS: Conocidos como granulocitos o leucocitos polimorfonucleares (PMN), juegan un papel crucial en la inmunidad innata contra patógenos bacterianos y fúngicos; participan en el desarrollo de la reacción inflamatoria y como efectores de la inmunidad adaptativa (Winkler et al., 2010).

METALOPROTEINASA-9: Entre las enzimas proteolíticas identificadas en los PMNs, las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) han atraído considerable atención por su papel propuesto en la destrucción de la matriz extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas (Ley, Smith, & Stark,

2006; Winkler et al., 2010). La secreción de MMP-9 es inducida por citoquinas proinflamatorias, y es importante en la regulación de la inflamación en diversas patologías, pues facilita la migración de neutrófilos al sitio de la infección (Atkinson & Senior, 2003; Kim, Kwon, & Kim, 2012). Adicionalmente, esta gelatinasa (MMP-9) contribuye a la remodelación de tejidos, induce la formación de vasos sanguíneos (Angiogénesis), mejora la migración celular, activa o inactiva las citoquinas proinflamatorias, de allí la importancia del estudio de su regulación en el progreso de diversas patologías (Fiore, Fusco, Romero, & Stamenkovic, 2002; Kim et al., 2012).

Leandra subseriata: Son arbustos que pueden alcanzar entre 1 a 3 m de altura; presenta ramas jóvenes redondeadas, pecíolos e inflorescencias cubiertas con abundantes tricomas. Las hojas de aproximadamente $6.5-19 \times 2-9.5$ cm, de forma elíptico-ovadas a ovado-lanceoladas, nervio principal paralelamente dividido en la base. Presenta inflorescencias en panículas, multifloras; flores subsésiles o con pedicelos; bractéolas persistentes. Flores pentámeras, pétalos de color blanco y textura granulosa. Las tecas de las anteras de color amarillo, ovario ínfero, trilocular, collar apical corto, ciliado. Los frutos son tipo bayas 4-5 mm de diámetro, púrpuras cuando maduras; semillas de 0.5 mm. Presenta un número de cromosomas diploides $2n = 34$ (Mendoza & Ramírez, 2006).

ABREVIACIONES

µg: microgramos

µg/mL: microgramos por mililitro

MMP-9: Matriz Metaloproteinasa 9

ECM: Matriz Extra Celular

LPS: Lipopolisacárido

PAF: Factor Activante Plaquetario

fMLP: y N-formilmetionina-leucil-fenilalanina

IL-8: Interleuquina-8

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

ABTS: 2,2-Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico

Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

E1: Concentración Extracto *Leandra subseriata* en 10 µg/mL

E2: Concentración Extracto *Leandra subseriata* en 25 µg/mL

E3: Concentración Extracto *Leandra subseriata* en 50 µg/mL

HBSS: Solución Salina Equilibrada de Hanks

HBSS + Ca⁺²: Solución Salina Equilibrada de Hanks más calcio

PMNs: Polimorfonucleares

TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral Alfa

LRU: Unidades Relativas de Luminiscencia

UAD: Unidades Relativas de Densitometría

1. INTRODUCCIÓN

La oxidación consiste en un proceso bioquímico en el cual un elemento cede electrones (Oxidación) y otro compuesto los capta (Reducción); en otras palabras, un compuesto pierde electrones y el otro los acepta (Elejade, 2001; Sies, 2015). Por éste motivo, es común hablar del término general de reacciones de óxido reducción (redox). La propia vida es el resultado

del fenómeno redox puesto que procesos oxidativos participan en la obtención de la energía celular (Elejade, 2001). Sin embargo, cuando se genera un desbalance entre procesos de oxidación y reducción se produce el estrés oxidativo, el cual no puede ser medido con un solo parámetro y es una realidad compleja que afecta todos los niveles biológicos (Elejade, 2001).

Durante el estrés oxidativo la producción de radicales libres aumenta en forma descontrolada y aunque las células cuentan con agentes antioxidantes que funcionan como mecanismos para la protección contra su efecto nocivo, la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y destrucción de moléculas tóxicas generado por mala nutrición, enfermedad u otras causas, dan lugar al aumento en la concentración celular de radicales libres (Sies, 2015). Es durante el estrés oxidativo cuando se manifiestan lesiones producidas por la reacción química de los radicales libres con proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN al interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, desencadenando daños irreversibles que incluso pueden llevar a la muerte celular (Venereo, 2002).

Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo y al ataque de radicales libres en moléculas biológicas son por ejemplo el cáncer, aterosclerosis, cataratas, envejecimiento y cuadros inflamatorios crónicos, que a su vez están asociados con el desarrollo de enfermedades tales como artritis, asma, invasión tumoral, metástasis y progreso de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Díaz, Guevara, Espinosa, Chávez, & Limon, 2012; Kang et al., 2001; Venereo, 2002).

Durante procesos inflamatorios, los neutrófilos conocidos como granulocitos o leucocitos polimorfonucleares (PMN), juegan un papel crucial en la inmunidad innata, combatiendo patógenos; participan en el desarrollo de la reacción inflamatoria y como efectores de la inmunidad adaptativa (Winkler et al., 2010). Los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio de la infección, desplegando un potente arsenal de enzimas y moléculas para destruir el agente infeccioso, así como a las células circundantes y tejidos infectados (Winkler et al., 2010).

Entre las enzimas proteolíticas identificadas en los PMNs, las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) son de considerable atención por su papel propuesto en la destrucción de la matriz extracelular en condiciones fisiológicas y patológicas (Ley et al., 2006; Winkler et al., 2010). La secreción de la gelatinasa MMP-9 (MMP de Interés) es inducida por citoquinas proinflamatorias y es importante en la regulación de la inflamación, en diversas patologías, pues facilita la migración de neutrófilos al sitio de la infección (Atkinson & Senior, 2003; Kim et al., 2012). La MMP-9 contribuye a la remodelación de tejidos, mejora

la migración celular, activa o inactiva las citoquinas proinflamatorias, induce la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis), de allí la importancia del estudio de su regulación en el progreso de diversas patologías crónicas (Fiore et al., 2002; Kim et al., 2012). Aunque los neutrófilos son considerados benéficos, una activación inadecuada de estos que conlleve a una liberación exacerbada de MMP-9 puede conducir al desarrollo de daños en los tejidos durante reacciones inflamatorias crónicas o procesos autoinmunes (Ley et al., 2006; Mócsai, 2013; Winkler et al., 2010)

En los últimos años, el interés por investigar problemas relacionados con procesos inflamatorios exacerbados, especies reactivas del oxígeno (EROs), estrés oxidativo, radicales libres, y la necesidad por encontrar posibles alternativas de solución con el uso de antioxidantes han aumentado exponencialmente; por ello es de gran importancia realizar estudios de antioxidantes esenciales en diversos campos como bioquímica, biología y medicina (Venereo, 2002).

Algunas plantas tienen una contribución importante en el sistema de salud de muchas comunidades locales, debido a que su uso es frecuente en la mayoría de la población rural (Mimura, Salatino, & Salatino, 2004; Spessoto, Ferreira, Crotti, Silva, & Cunha, 2003). Estas plantas desempeñan un papel predominante en la investigación, como punto de partida para el desarrollo e innovación en la producción de fármacos; es así como el conocimiento de las plantas medicinales cada día se ubica en un lugar destacado como una de las practicas

alternativas de amplia eficacia, seguridad y bajos costos, siempre y cuando sea usado en forma responsable por personal calificado (Krozel, 1991).

Plantas ricas en flavonoides han sido usadas en medicina tradicional como agentes antimicrobianos, antiinflamatorios y antioxidantes; particularmente en relación a la modulación de respuestas primarias de neutrófilos se ha determinado que la acción de antocianinas pueden disminuir la respuesta inflamatoria en neutrófilos estimulados con Lipopolisacarido (LPS) *ex vivo*; las antocianinas disminuyen la producción y liberación de factores pro-inflamatorios como la elastasa, EROs, Interleuquina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y matriz metaloproteinasa 9 (MMP-9). Modulando de esta manera la respuesta inflamatoria de neutrófilos humanos por la inhibición de citoquinas seleccionadas y enzimas pro-inflamatorias (Granica, Piwowarski, & Kiss, 2015).

Las plantas de la familia Melastomatácea han sido usadas en medicina tradicional, especialmente en Asia y Latinoamérica (Schultes, 1981). Es considerada una de las familias de importancia botánica (plantas con valor nutricional) y se ha reportado que sus principales componentes químicos son de tipo: flavonoide (Mimura et al., 2004) triterpenos (Clausing & Renner, 2001), polifenólico, especialmente taninos hidrolizables monoméricos ó pentáméricos y en menor medida sustancias cianogénicas y alcaloides (Isaza, Ito, & Yoshida, 2004).

Dentro de la familia Melastomatácea se encuentra el género *Leandra*, de ubicación neotropical y subtropical con más de 200 especies (Wurdack, 1973, 1980). Para Colombia,

se conocen registros de 26 especies en todos los ecosistemas desde el nivel del mar hasta los 3.200 m de altitud, excepto zonas xerofíticas y sub-xerofíticas. Son predominantes en zonas bajas amazónicas, piedemonte oriental de los Andes y Chocó Biogeográfico (Mendoza & Ramírez, 2006; Tabarelli & Peres, 2002). La especie *Leandra subseriata* (Naudin) Cogn presenta un fruto tipo baya que es de gran interés debido a que es consumido localmente y por el color púrpura que presenta cuando están maduros, indicando que podría contener antocianinas; pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color púrpura, rojo o azul a frutos, flores y hojas, (Wagner, 1982; Wurdack, 1973, 1980). Plantas cuyos frutos contienen antocianinas presentan una elevada actividad antioxidante y antiinflamatoria que incrementa su valor comercial, alimenticio y potencialmente farmacéutico (Coelho, Assumpção, Prestes, & Denadai, 2015).

Por estudios fitoquímicos previos en la familia Melastomataceae (Clausing & Renner, 2001; Isaza et al., 2004; Mimura et al., 2004) y en el género *Leandra* (Clemes, Beirith, & Zeni, 2015), es probable que los frutos de *L. subseriata* (Naudin) Cong presenten antocianinas o sus derivados que son de interés particular en el control de estrés oxidativo y procesos inflamatorios agudos (Wagner, 1982). En este contexto, para el desarrollo de esta investigación se propone determinar la actividad antioxidante y evaluar la capacidad reguladora de respuestas de liberación de gránulos de gelatinasa en neutrófilos humanos con el extracto del fruto maduro de *L. subseriata* (Naudin) Cong.

Diferentes estudios se han enfocado en investigar la relación existente entre el estrés oxidativo y algunas enfermedades, logrando concluir que una dieta alta en antioxidantes puede mejorar y prevenir significativamente el cáncer de estómago, enfermedades

coronarias, displasia mamaria, infarto en el miocardio y procesos inflamatorios crónicos (Elejade, 2001; Venereo, 2002). En todo el mundo este tema ha dejado de ser solo interés de bioquímicos y fisiológicos para convertirse en una herramienta más en la comprensión del origen de las enfermedades que afectan actualmente a la humanidad (Tabarelli & Peres, 2002).

Las bayas son una excelente fuente de antioxidantes naturales, razón por la cual han aumentado su popularidad en la dieta humana (Moyer, Hummer, Finn, Frei, & Wrolstad, 2002; Pantelidis, Vasilakakis, Manganaris, & Diamantidis, 2007; Seeram, Adams, Zhang, Lee, Sand, Scheuller, & Heber, 2006). Las antocianinas presentes en bayas son importantes por los efectos beneficiosos en salud asociados con sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y quimiopreventivas (sustancias químicas que previenen la aparición de una enfermedad) (Meyers, Watkins, Pritts, & Liu, 2003; Tulio, Reese, Wyzgoski, Rinaldi, Fu, Scheerens, & Miller, 2008). Además de las antocianinas, las bayas de color azul (blueberries) son también una fuente natural de otros fitoquímicos quimiopreventivos tales como: diferentes tipos de flavonoides, ácidos fenólicos, vitaminas C y E, ácido elágico, β -sitosterol y ácido fólico (Boivin, Blanchette, Barrette, Moghrabi, & Beliveau, 2007; Määttä, Kamal-Eldin, & Törrönen, 2004; Mirto et al., 2018).

Colombia cuenta con una prodigiosa riqueza natural. Ocupa el segundo lugar entre los diez países con mayor diversidad biológica del mundo, después de Brasil (Bryant, Nielsen, & Tangley, 1997; Mittermeier, Goettsch, & Robles, 1997), aunque actualmente muchas plantas

han sido analizadas para determinar la presencia de sustancias con propiedades antibióticas, antifúngicas, alimenticias, antitumorales o antioxidantes (Bryant et al., 1997); otras cuentan con muy pocos estudios, tal es el caso de la planta *L. subseriata* (Naudin) Cong cuyos frutos maduros presentan un color púrpura posiblemente proporcionado por antocianinas almacenadas en las vacuolas de las células y que podrían tener actividad antioxidante y capacidad de regulación de respuestas tempranas de neutrófilos.

Actualmente los frutos de la planta *L. subseriata* (Naudin) Cong están siendo sub-utilizados y carecen de valor económico ya que es una planta silvestre que suele encontrarse esporádicamente en el perímetro de ciertas zonas ganaderas. Teniendo en cuenta el potencial valor comercial, alimenticio y farmacéutico que presentan los frutos que contienen antocianinas, encontrar respuestas favorables en el estudio proporcionaría elementos para en un futuro implementar el cultivo de la planta resultando en un medio de ingreso adicional para los productores de la zona. Encontrar características biológicas benéficas para la salud proporcionaría bases viables para la formulación de medicamentos que ayuden a prevenir, controlar y contrarrestar enfermedades provocadas por estrés oxidativo o procesos inflamatorios exacerbados en los que se encuentre una producción descontrolada de EROs o liberación exacerbada de MMP-9. Por lo tanto la pregunta de investigación que se desarrolló fue: ¿Cuál es el efecto antioxidante del extracto de los frutos maduros de *Leandra subseriata* (Naudin) Cong en presencia de radicales libres (2,2-Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS)) y en la regulación de liberación de gránulos de gelatinasa de neutrófilos humanos estimulados con Lipopolisacárido?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antioxidante del extracto de los frutos maduros de *Leandra subseriata* (Naudin) Cong en presencia de radical libre, 2,2-Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS) y en la regulación de respuestas tempranas de neutrófilos humanos pre-estimulados con Lipopolisacárido (LPS).

2.2 Objetivos específicos

Determinar capacidad antioxidante del extracto de los frutos maduros de *Leandra subseriata* (Naudin) Cong en pruebas diferenciales de pH y ensayos de capacidad de reducción de radicales libres, ABTS.

Establecer el efecto del extracto de frutos maduros de *Leandra subseriata* (Naudin) Cong en la liberación de gránulos de gelatinasa (MMP-9) de neutrófilos humanos pre-estimulados con lipopolisacárido.

3. MARCO TEORICO.

3.1. Plantas medicinales con potencial antioxidante y antiinflamatorio

Las plantas medicinales han sido utilizadas ampliamente como opciones tradicionales para tratar distintas enfermedades y procesos inflamatorios exacerbados generados por diversos factores (lesiones, virus, bacterias, etc.), debido a esto representan nuevas oportunidades para la investigación e implementación de alternativas terapéuticas, porque cuentan con una riqueza potencialmente farmacológica, cosmética y alimenticia (Mimura et al., 2004; Spessoto, Ferreira, Crotti, Silva, & Cunha, 2003).

3.1.1. Familia Melastomatácea. Durante mucho tiempo en la medicina tradicional, plantas de la familia Melastomatácea han sido utilizadas en regiones de Asia y Latinoamérica (Schultes, 1981). Es considerada una familia botánica de gran importancia debido a su valor nutricional (Boege, 2009). En Colombia, algunas especies de esta familia han sido usadas en el tratamiento de diferentes patologías como malaria, enfermedades respiratorias, heridas de la piel y diferentes infecciones genitourinarias, funciona como diurético y un típico remedio para irritaciones en las encías (Arias, 2008). La decocción de los tallos de *Artherostemma volubile* (Blompl. Ec Naudin) Triana y *A. macrodesmun* Gleason, son utilizados, como antipirético. La decocción de toda la planta *Brachyotum strigosum* (L.f) Triana y *Chaetolepis microphylla* (Blompl.) Miq, es usada para tratar cálculos en la vejiga y como un fuerte diurético (Krozel, 1991; Schultes, 1981).

Los principales componentes fitoquímicos descritos en la familia Melastomatácea son de tipo flavonoide (Mimura et al., 2004), triterpenos (Clausing & Renner, 2001), polifenóles, especialmente taninos hidrolizables monoméricos o pentaméricos y en menor medida

sustancias cianogénicas y alcaloides (Isaza et al., 2004). En este sentido varios estudios expresan la presencia de diversos fitoquímicos como triterpenos, cumarinas y benzoquinonas (Jang et al., 2006). Estudios realizados en el género *Tibouchina* han mostrado su alta riqueza en taninos hidrolizables oligoméricos, flavonoides y compuestos fenólicos (Yoshida, Yoshidaa, Amakuraa, Yokuraa, Itoa, Hipólito, Rennerc, 1999). Las antocianinas, obtenidas del extracto de flores de *Tibouchina semidecandra* L. son utilizadas como colorantes naturales en alimentos (Mimura et al., 2004).

Particularmente, la especie de interés *L. subseriata* (Naudin) Cong, es caracterizada por presentar frutos tipo baya, de colores azules a púrpuras intensos que potencialmente podrían presentar una excelente fuente de antioxidantes naturales, lo que hace que esta especie sea de interés farmacológico (Moyer, Hummer, Finn, Frei, & Wrolstad, 2002; Pantelidis, Vasilakakis, Manganaris, & Diamantidis, 2007; Seeram et al., 2006). Es poco frecuente que frutas o cualquier otro material vegetal demuestre diversos grados de actividad biológica (Boivin, Blanchette, Barrette, Moghrabi, & Beliveau, 2007); sin embargo en el caso de las bayas de color azul, rojo o púrpura, las antocianinas presentes les confieren efectos beneficiosos para la salud asociados con sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y/o quimiopreventivas (Tulio et al., 2008), estas bayas azules son también una fuente natural de otros fitoquímicos quimiopreventivos tales como: flavonoides, vitaminas C y E, ácidos fenólicos, ácido elágico, ácido fólico y β -sitosterol (Boivin, Blanchette, Barrette, Moghrabi, & Beliveau, 2007; Määttä, Kamal-Eldin, & Törrönen, 2004; Mirto et al., 2018).

3.1.2. Género Leandra: Es un género presente en el neotrópico y subtrópico con más de 200 especies que se distribuyen en Las Antillas y desde el sur de México hasta Argentina y el sur de Brasil; gran parte de las especies se concentran en el sudeste de Brasil (Wurdack, 1973, 1980). Para Colombia, se tienen registros de 26 especies en la mayoría de los ecosistemas exceptuando zonas xerofíticas y sub-xerofíticas. Son predominantes en zonas bajas amazónicas, piedemonte oriental de los Andes y el Chocó Biogeográfico (Arias, 2008).

3.1.2.1. *Leandra subseriata* (Naudin) Cong. Se distribuye por Sudamérica (Mendoza & Ramírez, 2006). Son arbustos que pueden alcanzar entre 1 a 3 m de altura; presenta ramas jóvenes redondeadas, pecíolos e inflorescencias cubiertas con abundantes tricomas. Las hojas de aproximadamente $6,5-19 \times 2-9,5$ cm, de forma elíptico-ovadas a ovado-lanceoladas, nervio principal paralelamente dividido en la base. Presenta inflorescencias en panículas, multifloras; flores subsésiles o con pedicelos; bractéolas persistentes. Flores pentámeras, pétalos de color blanco y textura granulosa. Las tecas de las anteras de color amarillo, ovario ínfero, trilocular, collar apical corto, ciliado. Los frutos son tipo baya de 4-5 mm de diámetro, púrpuras cuando maduras; semillas de 0,5 mm. Presenta un número de cromosomas diploides $2n = 34$ (Mendoza & Ramírez, 2006).

Actualmente los frutos de la planta están siendo sub-utilizados (consumidos esporádicamente por habitantes de la zona y utilizados por la fauna silvestre) y no tienen valor comercial ya que esta es una planta silvestre; pero de encontrar potenciales beneficios para la salud proporcionaría bases para realizar la formulación de posibles medicamentos derivados de estas bayas que ayuden a prevenir, controlar y contrarrestar enfermedades provocadas por estrés oxidativo o procesos inflamatorios exacerbados.

3.2. Antioxidantes

Son compuestos con la capacidad de captar moléculas inestables del oxígeno y disminuir en gran medida la velocidad de oxidación de sustratos *in vitro* o *in vivo* (Sies, 2015). Presentan un amplio impacto en industrias como la farmacéutica, tratamientos de prevención de enfermedades como cáncer, artritis, osteoporosis, en la industria de alimentos es usado para retardar la alteración oxidativa y la pérdida en la calidad nutritiva, en preservación y estabilidad de productos (Montoya et al., 2009; Sies, 2015). El efecto de un antioxidante depende básicamente del coeficiente de partición y el potencial de óxido-reducción (redox) que tenga el compuesto, los antioxidantes pueden actuar libremente en la interface celular como protectores celulares y de lipoproteínas, estabilizando compuestos oxidantes y previniendo la peroxidación lipídica (Cotes, Cristancho, & García, 2006).

3.3. Compuestos fenólicos y polifenólicos con actividad antioxidante

Los polifenoles son compuestos naturales que actúan como potentes antioxidantes y que están presentes en frutas y verduras en las que cumplen funciones como otorgar protección contra agentes oxidantes, en coloración de flores importante en el proceso de polinización. Compuestos de tipo flavonoide, ácidos fenólicos y taninos se encuentran principalmente en cítricos, bayas azules (blueberries), uvas, legumbres, té verde, ajo, semillas de café, frutos del olivo, entre otros; estas sustancias son capaces de oxidarse capturando EROs (Coelho et al., 2015; Cotes et al., 2006).

De entre las particularidades químicas que establecen la capacidad antioxidante de los flavonoides están, la presencia de estructura O-dihidroxi la cual que confiere estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; doble ligadura; grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Bors, Heller, Michel, & Saran, 1990). Variaciones en la composición general de los flavonoides dan origen a distintos tipos de estructuras funcionales como flavanoles, flavonoles, flavonas y antocianidinas (Martínez, González, Culebras, & Tuñon, 2002).

Las antocianidinas más una fracción azucarada forman antocianinas (Badui, 2006), las cuales están presentes en diversas bayas y son caracterizadas por presentar efecto antiinflamatorio, debido a su capacidad antioxidante atrapando EROs (Aguilera, Reza, Chew, & Meza, 2011). Las EROs producidas y liberadas por la enzima mieloperoxidas (MPO) y liberados por los neutrófilos son un potente oxidante para hacer frente en la defensa contra agentes infecciosos; sin embargo su producción exacerbada, causa graves daños histológicos en el hospedero y conlleva a la aparición de procesos inflamatorios debido a su espectro de reactividad (Onel, Pereira, & Flores, 1998).

3.3.1. Antocianinas. Están presentes en gran cantidad en bayas, son pigmentos hidrosolubles almacenados en las vacuolas de células vegetales y que confieren el color rojo, azul o púrpura a hojas, flores y frutos (Coelho et al., 2015; Wagner, 1982) y se caracterizan por su efecto antiinflamatorio, debido a su capacidad antioxidante al atrapar EROs (Aguilera et al., 2011). Frutos de plantas que contienen antocianinas presentan una elevada actividad

antioxidante y antiinflamatoria que incrementa su valor comercial, alimenticio y potencialmente farmacéutico (Coelho et al., 2015).

3.3.2. Antioxidantes presentes en diversas Bayas. Estudios han demostrado que una dieta rica en frutas y verduras que aporten antioxidantes está asociada con la disminución en el riesgo de contraer enfermedades crónicas (algunos tipos de cáncer) y patologías cardiovasculares; atribuyendo el efecto protector a la presencia de compuestos bioactivos, entre los cuales se destacan los polifenoles y los antioxidantes (Kroon & Williamson, 2005; Rangkadilok, Worasuttayangkurn, Bennett, & Satayavivad, 2005; Shao et al., 2018).

Frutos tipo baya son fuente importante de fenoles, debido a que contienen antocianinas como, quercitina, elagitaninos además de cantidades importantes de kaemferol y ácido elágico, otro tipo de compuestos antioxidantes (Mullen, Stewart, et al., 2002). Por otro lado, está bien documentado el efecto antioxidante que los compuestos fenólicos de las diferentes bayas poseen (Aaby, Skrede, & Wrolstad, 2005; Mullen, McGinn, et al., 2002; Zafrilla, Ferreres, & Tomás-Barberán, 2001), así como la importancia de esta actividad en el posible rol protector contra el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas; los flavonoides, por su capacidad antioxidante, sirven para tratar y prevenir el daño tisular de enfermedades inflamatorias y han sido estudiados sobre diversas líneas celulares como los neutrófilos, los cuales producen especies reactivas de oxígeno como anión superóxido y radical hidroxilo (O_2^- y OH^\cdot , respectivamente), esenciales para la eliminación de agentes infecciosos, pero un aumento descontrolado en su producción desencadena procesos inflamatorios perjudiciales

para la salud (Carlsen, Myhrstad, Thoresen, Moskaug, & Blomhoff, 2003; Graef et al., 2010; Heo & Lee, 2005).

3.4 Estrés oxidativo y su asociación con procesos inflamatorios

El estrés oxidativo ocurre en organismos en los cuales por mala nutrición, enfermedad u otras causas se genera un desbalance entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes (Sies, 2015). El estrés oxidativo genera producción descontrolada de radicales libres los cuales oxidan estructuras biológicas, dañándolas, lo que se conoce como daño oxidativo y que es importante causa del envejecimiento, cáncer, aterosclerosis, cataratas y procesos inflamatorios crónicos (Boyd & McGuire, 1991; Venereo, 2002), la inflamación es la forma de manifestarse de muchas enfermedades. Se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por agentes inflamatorios (Abbas et al., 2014).

3.5. Procesos inflamatorios crónicos

La respuesta inflamatoria es una cascada de eventos moleculares y celulares complejos, que tiene como objetivo eliminar patógenos e impedir el daño tisular. En condiciones fisiológicas, la fase resolutive de la cascada inflamatoria restaura la homeostasis. Sin embargo, cuando el proceso inflamatorio persiste ya sea por un déficit del sistema inmunológico para corregir el daño, el impedimento de eliminar el patógeno, por una sobre-activación de los componentes celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria, o el estrés oxidativo, entre otras causas, se generan de forma anómala una serie de mediadores proinflamatorios (citoquinas, proteínas de fase aguda, factores tisulares y Especies reactivas

de Oxígeno, Interleucinas, entre otras) que contribuyen a la cronicidad de la inflamación (Abbas et al., 2014; del Valle, 2011). El estrés oxidativo y la inflamación son dos procesos íntimamente relacionados, uno conlleva al otro, y viceversa (del Valle, 2011).

En el proceso inflamatorio, participan diferentes componentes celulares que hacen parte de la inmunidad innata y adquirida; los neutrófilos conocidos como granulocitos o leucocitos polimorfonucleares (PMN) hacen parte de la inmunidad innata, participan en el desarrollo de la reacción inflamatoria y como efectores de la inmunidad adaptativa; juegan un papel crucial en la defensa contra patógenos bacterianos, virales, parasitarios y fúngicos (Winkler et al., 2010).

3.6. Neutrófilos

Los neutrófilos son indispensables para la defensa contra la invasión de microorganismos, son las primeras células en llegar al sitio infección y en el proceso de resolución de la infección despliegan un potente arsenal de moléculas para destruir el agente infeccioso, así como las células circundantes y tejidos infectados (Ley et al., 2006; Winkler et al., 2010), su función es eliminar los patógenos y sus componentes mediante el proceso de fagocitosis, el estallido respiratorio o la liberación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) (Futosi, Fodor, & Mócsai, 2013).

En el proceso de resolución de la infección, el neutrófilo produce EROs, con la activación de la enzima NADPH oxidasa, la cual convierte el O_2 en O_2^- que oxidará lípidos, proteínas y

ADN, causando la muerte bacteriana. Sin embargo grandes cantidades de EROs también pueden provocar daño a nuestra salud, desencadenando enfermedades como artritis reumatoide y cáncer (Huanqui, 1997).

3.6.1. Formación de gránulos. La aparición de gránulos marca la transición de mieloblastos a promielocitos, sin embargo la formación de gránulos continúa hasta que alcanzan la etapa segmentada de maduración (Johansson et al., 2001; Theilgaard-Mönch et al., 2006; Theilgaard-Mönch et al., 2005). No todas las proteínas de los gránulos se almacenan con la misma eficacia (Arnljots, Sørensen, Lollike, & Borregaard, 1998; Lollike, Kjeldsen, Sengeløv, & Borregaard, 1995; Sørensen, Bratt, Johnsen, Madsen, & Borregaard, 1999). Los gránulos de neutrófilos se clasifican en tres subconjuntos distintos basados en la presencia de gránulos característicos: azurófilos o primarios (mieloperoxidasa-MPO), específicos o secundarios (lactoferrina) y terciarios (gelatinasa)(Borregaard & Cowland, 1997; Borregaard, Sehested, Nielsen, Sengelov, & Kjeldsen, 1995; Faurschou, Sørensen, Johnsen, Askaa, & Borregaard, 2002; Lominadze et al., 2005; Rørvig et al., 2009; Udby, Calafat, Sørensen, Borregaard, & Kjeldsen, 2002), los gránulos formados en las diferentes etapas durante la maduración llevan una carga diferente de proteínas de la matriz y de membrana (Le Cabec, Cowland, Calafat, & Borregaard, 1996).

3.6.2. Vesículas secretoras. La idea que las vesículas únicamente funcionan como orgánulos de almacenamiento de gránulos proteicos para ser liberados en los fagosomas ha cambiado con el descubrimiento que en esta membrana se encuentra el complejo p22phox-

gp91phox antes conocido NADPH oxidasa y que está presente en gránulos específicos y en procesos de activación de neutrófilos (Borregaard, Sørensen, & Theilgaard-Mönch, 2007; Borregaard & Tauber, 1984). Las vesículas secretoras incorporan su membrana en la membrana citoplasmática de los neutrófilos en respuesta a péptidos quimiotácticos (Borregaard et al., 2007) y están completamente integradas en la superficie durante la transmigración endotelial de los neutrófilos (Sengeløv et al., 1995).

3.6.3. Control de la exocitosis de gránulos. Las vesículas secretoras se movilizan completamente por varios estímulos que son relevantes en la interacción de neutrófilos con endotelio activado, tales como la señalización de las selectinas y sus proteínas afines, y por quimiocinas, tales como IL-8 y N-formilmetionina-leucil-fenilalanina (fMLP), virus, hongos y LPS (Borregaard et al., 1994; Borregaard, Kjeldsen, Lollike, & Sengeløv, 1993; Borregaard et al., 1992; Sengeløv, Kjeldsen, & Borregaard, 1993). Los gránulos de gelatinasa tienen un umbral más bajo para la exocitosis, cuando los neutrófilos son activados por diferentes sustancias (Kjeldsen, Bainton, Sengelov, & Borregaard, 1993; Kjeldsen, Bjerrum, Askaa, & Borregaard, 1992), los gránulos específicos tienen un umbral más alto que los gránulos gelatinasa y los gránulos azurófilos sólo pueden ser movilizados parcialmente (Faurischou et al., 2002; Sengeløv et al., 1993). En neutrófilos la vía ERK 1/ 2 MAPK es una de las estudiadas; en estas células diferenciadas, sin capacidad de proliferación, esta vía cumple roles adicionales en adhesión celular, estallido respiratorio, degranulación, quimiotaxis, expresión de genes, sobrevivencia y fagocitosis y puede ser activada por fMLP, PAF, TNF α , entre otros (Y. Y. Chen, Hsu, Sheu, Lee, & Hsieh, 2013; Fiore et al., 2002; Futosi et al., 2013; Mócsai, 2013; Yu et al., 2012); la vía p38 MAPK regula la función de los neutrófilos activados por estímulos externos, participando en la liberación de IL8, fosforilación de

factores de transcripción, adhesión, degranulación, quimiotaxis, estallido respiratorio y apoptosis (Akgul, Moulding, & Edwards, 2001; Borregaard, 2010; Suzuki, Hino, Hato, Tatsumi, & Kitagawa, 1999; Suzuki et al., 2001). En relación a PI3K/Akt, dependiendo del estímulo se ha señalado que puede estar regulando la migración transendotelial pues desempeña un papel importante en la formación del polo de migración, en el remodelamiento de actina, también activa la liberación de MMP-9 y regula procesos de apoptosis y expresión de genes (Juss et al., 2012; Kumar et al., 2014; Xu, Loison, & Luo, 2010).

3.6.4 Interacciones celulares neutrófilos - endotelio. Los neutrófilos tienen que cruzar la pared vascular para llegar al sitio de entrada de los microorganismos (Gehart, Kumpf, Ittner, & Ricci, 2010; Hidalgo, Peired, Wild, Vestweber, & Frenette, 2007). La unión inicial de los neutrófilos a las células endoteliales está determinada por las células endoteliales (Abram & Lowell, 2009; Anthis et al., 2009; Bunting, Harris, McIntyre, Prescott, & Zimmerman, 2002).

Cuando se ha establecido la adhesión firme, se pueden tomar dos caminos para la migración transendotelial: la vía transcelular, mediante el cual los neutrófilos penetran en la célula endotelial del individuo, o el camino paracelular, mediante el cual los neutrófilos se aprietan entre las células endoteliales (Barreiro et al., 2002; Oh et al., 2007; Sato, Funayama, Nagafuchi, Yonemura, & Tsukita, 1992; Tsukita, S., & Yonemura, 1999; Tsukita, Yonemura, & Tsukita, 1997; van Buul et al., 2010). Durante este proceso de transmigración endotelial participan las Metaloproteinasas de Matriz Extracelular (MMPs) en la destrucción de la

matriz extracelular facilitando de esta manera la migración de neutrófilos hasta el sitio de infección (Ley et al., 2006; Winkler et al., 2010).

3.6.4.1. Transmigración endotelial. La matriz extracelular (ECM) está formada por componentes clasificados en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (laminina y fibronectina). Estos componentes están interconectados y requieren proteasas para su degradación; las MMPs, que degradan las proteínas integrantes de dicha ECM y activan factores de crecimiento y receptores de superficie (Sato et al., 1992; Tsukita et al., 1997).

3.6.4.2. Familia de las metaloproteinasas. Gross & Lapiere, 1962 demostraron la existencia de enzimas que degradan geles de colágeno fibrilar, desde entonces se han identificado las MMPs, que se caracterizan por depender del zinc (Zn^{+2}) para desarrollar su actividad catalítica, y de esta manera degradar proteínas estructurales de la ECM (Coronato, Laguens, & Di Girolamo, 2012; Manicone & McGuire, 2008). Han sido descritos 25 miembros de la familia de las MMPs, que se clasifican en diferentes subgrupos: gelatinasas, colagenasas, estromelisin, matrilisin, metaloproteasas de membrana (MT-MMP) y otras MMPs que no se agrupan con las anteriores (Coronato et al., 2012; Manicone & McGuire, 2008). Todas difieren en su estructura, pero especialmente en su afinidad por el sustrato, la acción combinada de estas enzimas conduce a la degradación prácticamente total de los componentes macromoleculares de la ECM convirtiendo a las MMPs en protagonistas durante el desarrollo del cáncer ya que la destrucción tisular puede favorecer la angiogénesis que estimula la metástasis (Chambers & Matrisian, 1997; Lochter & Bissell, 1999; Nishida, Yano, Nishida, Kamura, & Kojiro, 2006). Las MMPs degradan la membrana basal y la matriz extracelular, facilitando así la invasión de las células malignas a través de los tejidos

conectivos y paredes de los vasos sanguíneos resultando en el establecimiento de las metástasis (Bernhard, Gruber, & Muschel, 1994; Chambers & Matrisian, 1997; Hua & Muschel, 1996; Kawamata et al., 1995; Mañes et al., 1997; Mira, Mañes, Lacalle, Márquez, & Martínez-a, 1999; Powell et al., 1993).

3.6.4.2.1. Metaloproteinasa-9 (MMP-9). Entre las enzimas proteolíticas identificadas en polimorfonucleares (PMNs) como neutrófilos y macrófagos, las MMPs atraen considerable atención por su papel en la destrucción de la ECM en condiciones fisiológicas y patológicas (Winkler et al., 2010). Entre las MMPs se destaca la MMP-9, presente en neutrófilos, la cual cumple funciones gelatinolíticas y es liberada con relativa facilidad, puesto que es almacenada como un granulo terciario (Ley et al., 2006; Winkler et al., 2010); su secreción es inducida por compuestos como interleucina 8 (IL8), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), lipopolisacárido (LPS), Factor Activante Plaquetario (PAF), citoquinas proinflamatorias, y es importante para regular procesos inflamatorios en diversas patologías, pues facilita la remodelación de tejidos, mejora la migración transcelular, activa o inactiva las citoquinas proinflamatorias e induce la angiogénesis, de allí la importancia del estudio de su regulación en el progreso de diversas patologías (Atkinson & Senior, 2003; Fiore et al., 2002; Kim et al., 2012).

Para evaluar los niveles de liberación de MMPs se utiliza la técnica de Zimografía, que consta de una separación electroforética de proteínas, sin agentes reductores, usando un gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina o caseína. Las proteínas analizadas son renaturalizadas mediante el uso de un detergente no iónico (Tritón X-100), posteriormente el gel es incubado en una solución apropiada para el estudio de las proteínas analizadas y teñido

con azul de Coomassie, observándose las zonas de actividad enzimática como bandas claras contra un fondo oscuro (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994).

3.6.4.2.2 Efecto de antioxidantes en la liberación de MMP-9. Estudios previos indican que los antioxidantes podrían ejercer un efecto protector sobre la lesión de las células endoteliales mediada por neutrófilos, disminuyendo la adherencia de los PMNs a las células endoteliales y reduciendo los metabolitos de EROs (Jonas, Dwenger, & Hager, 1993).

Estudios evidencian que sustancias de origen vegetal con capacidad antioxidante son capaces de regular respuestas inflamatorias en neutrófilos humanos por inhibición en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, disminución de producción y liberación de MMP-9, disminuyen la expresión de receptores de superficie Toll-like receptor 4 (TLR-4) entre otros. Los materiales vegetales ricos en flavonoides se usan comúnmente en la medicina tradicional como agentes antiinflamatorios externos, antioxidantes y antimicrobianos. Los extractos de plantas que contienen cantidades significativas se utilizan a menudo en la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios (Granica et al., 2015).

3.7. Rol de flavonoides en la respuesta de neutrófilos. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica, como se mencionó, los neutrófilos producen EROs para eliminar los patógenos; sin embargo, su producción descontrolada en el tiempo causa daño a los tejidos; los flavonoides debido a su capacidad antioxidante son utilizados para prevenir este daño producido por EROs (Grael et al., 2010). Flavonoides como las antocianinas pueden unirse a enzimas, transportadores de hormonas y ADN, catalizar el transporte de electrones, depurar radicales libres y quelar iones

metálicos transitorios, tales como Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} (van Acker, Bast, van der Vijgh, Rice-Evans, & Pecker, 1997). Debido a estas propiedades se han descrito efectos potencialmente protectores en patologías tales como: cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, diabetes mellitus, úlcera estomacal y duodenal y procesos inflamatorios crónicos y alérgicos (van Acker et al., 1997; Vrijsen, Everaert, & Boeyé, 1988), así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria (Huanqui, 1997). Además según Kim-Park et al., 2016, las antocianinas pueden inhibir la producción de EROs y a su vez modular la respuesta en el neutrófilo para regular la actividad de MMP-9.

Las bayas son una excelente fuente de antioxidantes naturales, razón por la cual ha aumentado su consumo en la dieta humana (Moyer et al., 2002; Pantelidis et al., 2007; Seeram et al., 2006). En estudios fitoquímicos realizados en la familia Melastomataceae se encontró componentes de interés debido a su amplio espectro de actividad biológica (Clausing & Renner, 2001; Isaza et al., 2004; Kausar et al., 2012; Mimura et al., 2004); en el caso de *L. subseriata* (Naudin) Cong, presenta frutos color púrpura donde posiblemente se encuentren antocianinas o compuestos con actividad antioxidante, con lo cual es plausible pensar en profundizar en el estudio de la reducción de radicales libres y en la regulación de respuestas tempranas de neutrófilos (liberación de MMP-9). En estudios con el género *Leandra* se determinó la presencia de antocianinas en hojas y folíolos (Clemes et al., 2015), lo cual hace más probable encontrar compuestos antioxidantes en los frutos de la especie *L. subseriata* (Naudin) Cong y que posiblemente regulen la liberación de MMP-9 en neutrófilos humanos estimulados con LPS.

4. METODOLOGIA

4.1. Recolección del material vegetal

Se recolectó el material vegetal en el municipio de La Florida, departamento de Nariño acorde con el decreto 3016 de diciembre 2013 del Ministerio del Medio ambiente y Desarrollo de Colombia, y la resolución 126 del 23 de febrero de 2015 de Corponariño (Anexo 1). Acorde con las recomendaciones de González-Beltran, 2011, una muestra se llevó al Herbario PSO de la Universidad de Nariño para su identificación taxonómica, evaluada por la directora del herbario Aida Elena Bacca, quien solicito corroboración al Dr. Humberto Mendoza, experto en la familia Melastomatáceae. Se confirmó la clasificación de la planta como *Leandra subseriata* (Naudin) Cong y se conserva un ejemplar identificado con numero colección LIGO 001Nariño.

Se realizó un muestreo aleatorio simple y se seleccionaron los frutos maduros y libres de patógenos aparentes; se verificó que todas las bayas presenten el mismo color de maduración azul-oscuro (cercano a negro) para disminuir sesgos en los resultados derivados de diferentes grados de maduración (Peña, Salinas, & Ríos-Sánchez., 2006). Se transportaron a laboratorio en bolsas plásticas sellables, donde se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio a 0,2% con el fin de eliminar polvo y posibles contaminantes, después los frutos se revisaron con estereoscopio para descartar los frutos contaminados por hongos o que presenten cualquier tipo de daño o malformación.

4.2. Obtención del extracto total de frutos maduros de *Leandra subseriata* (Naudin)

Cong.

Dependiendo de la actividad a evaluar se trabajó con 3 metodologías diferentes de obtención de extractos de frutos maduros de *L. subseriata*:

- Para cuantificar antocianos totales (Cianidina 3 Glucosido – C3G), se realizaron extracciones a partir de 5 g de frutos frescos con 10 ml de metanol 95%, a los cuales se les realizó una disgregación mecánica, con la que se obtuvo el extracto crudo de bayas de *Leandra subseriata*, éste se recolectó en tubos falcón estériles cubiertos con papel aluminio y se realizó su evaluación inmediata (González-Beltrán, 2011).
- Para evaluar actividad antioxidante se realizaron extracciones 1:1 con agua destilada y filtrada en este caso se pesaron 100 g del fruto, se realizó una disgregación mecánica, posteriormente se realizó zonación por una hora, de la solución madre se realizaron 3 diluciones diferentes (10 µg/mL, 25 µg/mL, y 50 µg/mL) para evaluar la reducción del radical catiónico ABTS.
- Para evaluar el efecto sobre los neutrófilos humanos, el extracto de las bayas de *L. subseriata* se preparó en Solución Salina Balanceada de Hanks más calcio (HBSS + Ca⁺²) en relación 1:1 para evitar activación o alteración de neutrófilos por agentes externos a los compuestos inherentes del fruto; para evaluar EROs, liberación de MMP-9 y citotoxicidad se consideraron las concentraciones: 10 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL.

4.3 Aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica humana

La sangre fue recogida por punción venosa periférica en condiciones asépticas y por personal capacitado para el proceso. Los donantes estaban clínicamente sanos y participaron de manera voluntaria en la investigación, para lo cual firmaron un formato de consentimiento informado (Anexo 2) acorde con los parámetros de ética de la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y con los protocolos requeridos por el Comité de Ética de la Universidad de Nariño. Los neutrófilos se aislaron de acuerdo con el protocolo de Figueroa et al., 1992, brevemente, se tomó 5 mL de sangre periférica en tubos ACD (Acido Citrato – Dextrosa 1 ml/5 mL de sangre) y se mezcló suavemente. Se adicionó 6 mL de dextrán 3% preparado con NaCl 0,85% a 6 mL de sangre, se mezcló y dejó sedimentar por 40 minutos a temperatura ambiente, hasta que se observó dos fases, el sobrenadante se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se centrifugó a 500 g por 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 4 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, N_2HPO_4 1mM, KH_2PO_4 , pH 7,2) frío y depositado suavemente en un tubo falcón que contenía 4 mL de Ficoll- Hypaque 1077, se llevó a centrifugar a 300 g por 40 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se realizó lisis celular 2 veces, para ello se resuspendió el precipitado en 2 mL de solución salina de NaCl 0,2% mezclando continuamente con una micropipeta durante 40 segundos y posteriormente se adicionó 2 mL de NaCl 1,6% y se mezcló, se aforó con PBS frío y se llevó a centrifugar a 300 g por 6 minutos a 4 °C, el pellet obtenido se resuspendió en 4 mL de HBSS y se mantuvo en hielo hasta su evaluación. La viabilidad, fue determinada por exclusión con azul tripán 0,4%, siempre se usó con un porcentaje mayor o igual a 95%. La pureza de neutrófilos fue evaluada por citometría de flujo o por coloración de Wright (Mena et al., 2016).

4.3.1 Aislamiento de neutrófilos bovinos.

Se colectó sangre mediante punción venosa yugular de tres vaquillas Holstein sanas de un hato de la Universidad Austral de Chile, las muestras se recogieron en tubos ACD. Los neutrófilos se aislaron de acuerdo con el método descrito por Hidalgo et al., 2007, teniendo en cuenta las consideraciones éticas requeridas. La viabilidad se determinó mediante ensayos de exclusión con azul tripán, la pureza de neutrófilos se evaluó mediante citometría de flujo (BD FACSCanto II; Becton Dickinson) usando un gráfico de puntos de dispersión frontal frente a dispersión lateral para determinar el tamaño relativo y la granularidad de las células: para ambos casos se utilizaron valores mayores o iguales 95% (Mena et al., 2016).

Procedimientos asociados al desarrollo del objetivo 1

4.4. Determinación de Antocianos Totales (AT): Se utilizó el Método por diferencia de pH sugerido Giusti & Wrolstad, 2001, que permite la estimación alternativa del contenido de antocianos totales. Se usaron dos sistemas tampón: ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1,0 (0,025 M) y ácido acético/acetato sódico de pH 4,5 (0,4 M). A 0,2 mL de una muestra diluida en proporción 1:2 (muestra: solvente) con absorbancia en el rango de 0,100-1,200 a 510 nm; se añadió 1,8 mL de la correspondiente disolución tampón y se midió la absorbancia frente a un blanco a 510 y 700 nm. Se calculó la absorbancia final a partir de la ecuación sugerida por Giusti & Wrolstad, 2001:

$$A = (A_{\text{max. vis}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{\text{max vis}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}4,5}$$

La concentración de pigmentos monoméricos en el extracto se expresa en cianidina-3-glucósido, la antocianina más común encontrada en gran variedad de bayas (Orjuela, 2015) y la concentración final de antocianos (mg/100g) se calculó con base al volumen de extracto y peso de muestra con la ecuación de Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005.

$$\text{Antocianos monoméricos (mg/100 g)} = (A \times PM \times FD \times 100)/(E \times 1)$$

Dónde: A = Absorbancia; PM: 449,2= peso molecular de la cianidina-3-glucósido; D = Factor de dilución; E = 26900 absortividad molar.

4.5. Ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2'-Azino-bis3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS): Las pruebas de actividad antioxidante se realizaron según el método sugerido por Re et al., 1999 con modificaciones; este método evalúa la actividad antioxidante del extracto sobre el generador de radicales libres ABTS. Se realizaron curvas de referencia con (Trolox) y Ácido ascórbico (vitamina C) y posteriormente se hizo la evaluación de 3 concentraciones del extracto acuoso de frutos de *L. subseriata*.

Par ello, inicialmente se disolvió 50 mg de ABTS (Sigma-Aldrich), en 50 mL de agua desionizada, luego se adicionó 2,45 mg de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), la solución se dejó reaccionar a 3°C durante 48 horas en la oscuridad. Posteriormente se prepararon soluciones de trabajo hasta obtener una absorbancia de $0,750 \pm 0,050$ nm, a una longitud de onda de 754 nm (Orjuela, 2015).

Con el fin de realizar las curvas de referencia, se preparó una solución stock 250 mg de Trolox o ácido ascórbico por litro de metanol. A partir de la solución madre de Trolox se prepararon diluciones de 1;3;6 y 9 mg/L de metanol; y a partir de la solución madre de ácido ascórbico se prepararon diluciones de 1; 2,5; 4; 5,5 y 7 mg/L de metanol, (Modificado de Orjuela, 2015). A 600 μ L del radical ABTS, se adicionó 200 μ L de cada una de las diluciones de Trolox o ácido ascórbico; la medición se realizó cada 30 segundos durante 10 minutos a 754 nm. Este ensayo se realizó por triplicado.

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos de los frutos maduros de *L. subseriata* (Naudin) Cong., se preparó el extracto a una solución madre de 250 mg/L de agua destilada y filtrada, a partir de esta solución se realizaron diluciones de 50, 25 y 10 μ g/mL en medio acuoso; en una celda de cuarzo se agregó 600 μ L del radical ABTS y se midió la absorbancia a 754 nm, luego se adicionó 200 μ L de extracto de cada una de las concentraciones a evaluar, se midió la absorbancia en las mismas condiciones establecidas para elaborar las curvas de referencia (Trolox y ácido ascórbico), se calculó el porcentaje de captación el cual representa la pérdida del color verde-azul del radical ABTS, cuando está en contacto con un compuesto antioxidante, disminuyendo así la absorbancia de la solución; éste se calculó con base en la ecuación de Orjuela, 2015:

$$\% \text{ Captación ABTS} = [(A \text{ inicial} - A \text{ final}) / A \text{ inicial}] \times 100$$

(Orjuela, 2015).

4.6. Generación Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) en neutrófilos: Se utilizó el protocolo sugerido por Conejeros et al., 2012. Para ello 1×10^6 neutrófilos se suspendieron en

250 μL de HBSS + Ca^{+2} y se depositaron en pozos de una placa de Elisa de 96 pocillos, se pre-incubaron con 50; 25 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto de frutos maduros de *L. subseriata*, durante 10 minutos a 37 °C. Después se añadió Luminol 80 μM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) (Conejeros et al., 2012), la solución se mezcló suavemente; posteriormente los neutrófilos se estimularon con 100 μM de PAF.

Como control positivo se utilizó el estímulo únicamente con PAF y como control negativo se mantuvo neutrófilos incubados en HBSS + Ca^{+2} sin ningún estímulo. La producción de EROs se midió utilizando un luminómetro Luminoskan Ascent™ (Thermo Labsystems) para 2000 segundos. Los datos se presentan como área bajo la curva (AUC) medidos en Unidades Relativas de Luminiscencia (LRU).

Procedimientos asociados al desarrollo del objetivo 2

4.7. Evaluar capacidad regulatoria de los extractos de *L. subseriata* (Naudin) Cong sobre la liberación de gránulos de gelatinasa de Neutrófilos humanos.

Teniendo como base los resultados del primer objetivo se establecieron tres concentraciones de trabajo: 10; 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto de *L. subseriata* preparado en HBSS + Ca^{+2} . Se realizó un ensayo preliminar de tiempo de incubación de 10 min y de estimulación con LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en neutrófilos bovinos y al obtener resultados positivos se seleccionó este tiempo de trabajo para neutrófilos humanos.

1×10^6 neutrófilos humanos se suspendieron en 500 μL de HBSS + Ca^{+2} y se peincubaron por 5 min a 37 °C en tubos eppendorf de 1,5 μL . Luego se estimularon por 10 min con cada una de las concentraciones del extracto de *L. subseriata* y finalmente se estimularon por 30 min

con LPS a una concentración final de 10 µg/mL (Trentini et al., 2014). Al final del ensayo se sometieron a centrifugación a 300 g por 6 min. a 4 °C y se recuperó 300 µL del sobrenadante para posterior análisis por zimografía.

Como control negativo de estos ensayos se usó HBSS + Ca⁺², como control positivo LPS a una concentración final de 10 µg/mL, como control adicional ácido ascórbico 50 µg/mL (Jonas et al., 1993), en condiciones similares de incubación a las de los ensayos.

Cada estudio se realizó por triplicado para garantizar la fiabilidad de los resultados.

4.7.1 Análisis de zimografía: Para determinar variaciones en la liberación de MMP-9, acorde al protocolo establecido por Li, Zhao, & Ma, 1999; 10 µL de cada sobrenadante recuperado se cargó en geles de poliacrilamida 10% (0,75 mm de espesor) que contenía 0,2% de gelatina. Los geles se corrieron a 200 V durante 1 hora y 40 minutos en un sistema Bio-Rad Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) a 4 °C y luego se lavaron dos veces en solución 2,5% de Tritón X-100 en agua destilada, en un agitador a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, los geles se sumergieron en tampón de reacción (Tris 100 mM pH 7,5 y CaCl₂ 10 mM) a 37 °C durante toda la noche. Los geles se tiñeron en solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 a 0,5% en ácido acético: metanol: agua (1:3:6). La evidencia de la actividad enzimática se determinó por áreas no tinturadas en el gel que representan la degradación de gelatina por la MMP. Para la identificación de los diferentes tipos de metaloproteinasas se utilizó un marcador de peso molecular (Pageruler Prestained Protein Ladder 26616 de Thermo Scientific). Teniendo en cuenta que Ernens, Rouy, Velot, Devaux, & Wagner, 2006 explican que para neutrófilos humanos la banda

correspondiente a la pro-MMP-9 es representativa de la actividad de la MMP-9. El cálculo del peso molecular de las bandas gelatinolíticas se estableció utilizando un marcador estándar de referencia (Li et al., 1999). Los geles se digitalizaron, y la intensidad de las bandas se determinó usando el software ImageJ 1.35s contabilizando las unidades arbitrarias de densitometría (UAD).

4.8 Ensayos de muerte celular (Citotoxicidad).

En una placa de 96 pocillos de Elisa se colocaron $1 \times 10^6 / 500 \mu\text{l}$ Neutrófilos humanos, se pre-incubaron 5 min a 37°C , posteriormente se incubaron 10 min con el extracto de bayas maduras de *L. subseriata* en concentraciones de 10, 25 y $50 \mu\text{g/mL}$. Como control positivo para la muerte celular, las células se trataron a 37°C durante 30 min con Tritón X-100 a 0,2% diluido en tampón de HBSS+ Ca^{+2} . Para medir la muerte celular las células se incubaron con ioduro de propídio $5 \mu\text{M}$ (IP; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), diluido en buffer de HBSS+ Ca^{+2} durante 15 minutos. Las señales de IP se detectaron con un lector de múltiples fluorescencias (Varioskan®, Thermo Scientific) a 530 nm de longitud de onda de emisión y 620 nm de excitación (Alarcón et al., 2017).

4.9 Análisis estadístico

Cada una de las pruebas de trabajo fue realizada por triplicado, los resultados se ilustraron en gráficos de barras como media \pm SEM.

Los resultados obtenidos en zimografía se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las medias se evaluaron con una prueba de comparación múltiple de Dunnett o Tukey. Todos los ensayos se realizaron con un mínimo de N=3 (ensayos a partir de 3 personas diferentes) y fueron analizados con el software Graph Pad Prism v7.0 de (GraphPad Software Inc. CA, EE.UU.), utilizando un nivel de significancia de 5%.

4.10 Consideraciones éticas

Para el desarrollo del trabajo se tuvo en cuenta las recomendaciones éticas de la Resolución 8430 del 04 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia y la Declaración de Helsinki promulgada por la Asociación Médica Mundial (AMM). La investigación fue aprobada por el comité de ética de la Universidad de Nariño y se tuvo en cuenta los siguientes aspectos generales:

- La participación de donantes de sangre fue de manera voluntaria y posterior a la firma del consentimiento informado (Anexo 4). La toma de muestras la realizó un profesional de salud autorizado.
- Todos los procedimientos de laboratorio se realizaron acorde a las recomendaciones de bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud (Manual de bioseguridad - OMS 2005, 2005).
- Se tuvo en cuenta los procesos de desinfección de los espacios de trabajo con soluciones de hipoclorito en una relación de 1 g/L para uso general, y en caso de derrames se utilizó 5 g/l. El material de descarte fue autoclavado y recolectado en recipientes especiales para ser procesado por la empresa Salvi de Pasto.

5. RESULTADOS

5.1 Identificación taxonómica de la especie

En los meses de abril y mayo de 2017 se recolectaron muestras en estado reproductivo de la planta, en el municipio de La Florida (N) departamento de Nariño, Colombia. Se revisaron las características morfológicas de las muestras comparando con los ejemplares registrados en el Herbario de Investigaciones –HERBARIO PSO- de la Universidad de Nariño y posteriormente se envió a confirmación por el especialista en la familia botánica Melastomataceae: Dr. Humberto Mendoza, quien confirmó que la especie corresponde a *Leandra subseriata* (Naudin) Cong. (Familia Melastomataceae). (Anexo 1).

Las figuras que se presentan en este documento son resultado de la investigación.

5.2 Resultados asociados al cumplimiento del objetivo específico 1.

5.2.1 Determinación de Antocianos Totales (AT). A partir del ensayo sugerido por Giusti & Wrolstad, 2001, se obtuvo una cuantificación de antocianatos expresada en Cianidina 3-Glucósido promedio de 6,876 mg C3G, a partir de un total de 24 repeticiones con diferentes muestras. La *Figura 1* representa el Numero de valores (N), mínimo (Min), máximo (Max), promedio (Mean), desviación estándar (SD) y media de la desviación estándar (SEM) de la cuantificación de antocianos totales expresado en miligramos de C3G en cada 100 gramos del fruto de *L. subseriata*.

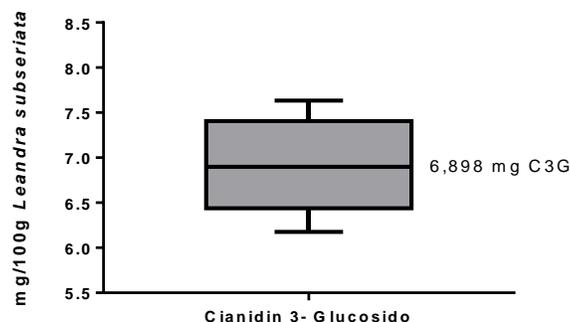


Figura 1: Cuantificación alternativa de antocianinas (Cianidin 3- Glucosido). Determinado por las absorbancias obtenidas al someter las diferentes concentraciones del extracto frente a las soluciones tampón de pH 1 y 4,5. N=24, Mín=6,177 mg C3G, Máx=7,633 mg C3G, Mean=6,898 mg C3G, SD=0,4953 y SEM=0,1011.

5.2.2 Ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2'-Azino-bis3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS).

Inicialmente se prepararon las curvas de referencia; Trolox y ácido ascórbico (Vitamina C); la medición se realizó a 754nm durante 10 minutos, el ABTS se ajustó en absorbancia de $0,75 \pm 0,05$ nm (Orjuela, 2015). La *Figura 2A* representa la curva de calibración obtenida con Trolox usando diferentes concentraciones (0 g/L, 1 g/L, 3 g/L, 6 g/L y 9 g/L) que reaccionan con el ABTS; la curva presenta un $R^2= 0,996$. La *Figura 2B* representa la curva de calibración obtenida con diferentes concentraciones de Ácido Ascórbico (Vitamina C: 0 g/L, 1 g/L, 2,5g/L, 4 g/L, 5,5 g/L y 7 g/L) que reaccionan con el ABTS, se observó un $R^2= 0,987$ y fue usada para la cuantificación de Capacidad Antioxidante Equivalente a Vitamina C (VCTEAC).

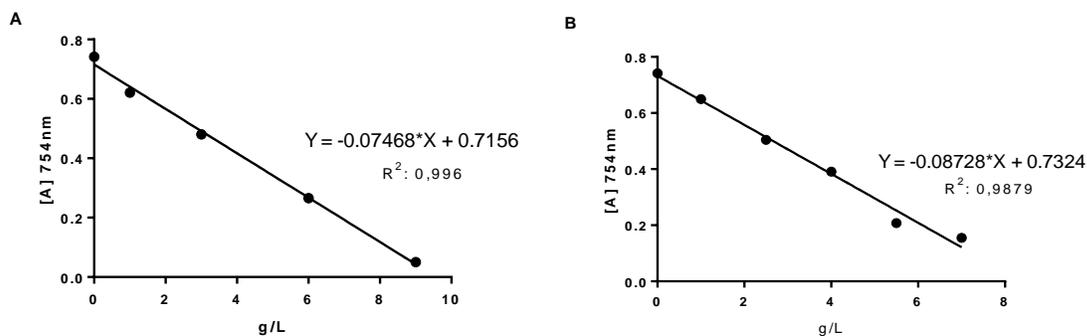


Figura 2: Curvas de Calibración: Determinadas por las absorbancias obtenidas a 754nm y obtenida mediante el método de Folin-Ciocalteu **A. Curva de Calibración de Trolox** - (Anexo 2 Absorbancias Trolox). **B Curva de Calibración de la Vitamina C (Ácido Ascórbico)** - (Anexo 3 Absorbancias Vitamina C).

Luego se procedió a evaluar la actividad antioxidante del extracto de los frutos de *L. subseriata* en las concentraciones: 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$; la medición se realizó en las mismas condiciones usadas para generar las curvas de calibración (Orjuela, 2015). En la *Figura 3* se evidencia el comportamiento de la absorbancia observada en cada una de las concentraciones evaluadas, con éstas se confirmó la capacidad antioxidante del extracto, se evidencia que a mayor concentración del extracto acuoso mayor era la inhibición del radical catiónico por lo cual la absorbancia medida disminuyó considerablemente.

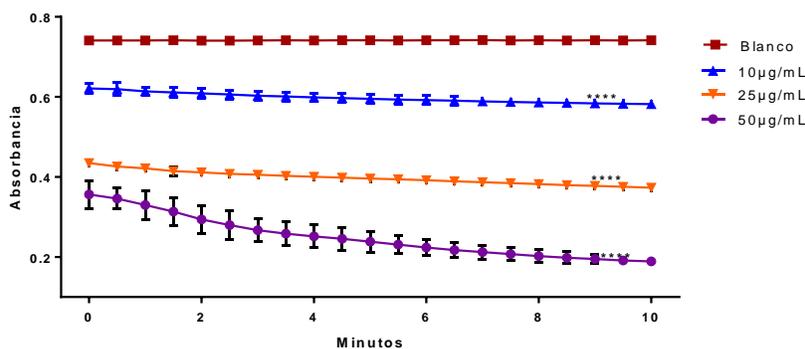


Figura 3: Comportamiento de la reacción del ABTS con las diferentes concentraciones del extracto de *L. subseriata*. Resultados obtenidos por espectrofotometría en absorbancia de 754nm, cada 30 segundos por 10 minutos. Se utilizó como blanco ABTS. Cada línea representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, **** $p \leq 0,0001$ mediante Test de Dunnett.

Con base en estos resultados y teniendo en cuenta las ecuaciones derivadas de las curvas de calibración de Trolox y Vitamina C, se determinó la actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) (Figura 4A) y la actividad antioxidante equivalente a vitamina C (VCTEAC) (Figura 5A) para las diferentes concentraciones del extracto de frutos maduros de *L. subseriata*. Se encontró que en promedio la actividad antioxidante observada en el extracto de frutos maduros de *L. subseriata* equivale a 1,221 $\mu\text{Mol TEAC/gFr}$ (Figura 4B) y que la concentración en miligramos de VTEAC por cada cien gramos del fruto maduro de *L. subseriata* es equivalente a 28,16 mg VCTEAC/100gFr (Figura 5B).

5.2.3. Porcentaje de Captación del ABTS

Para determinar la capacidad antioxidante se calculó el porcentaje de captación del ABTS con las absorbancias obtenidas en los anteriores ensayos siguiendo la metodología de Orjuela, 2015.

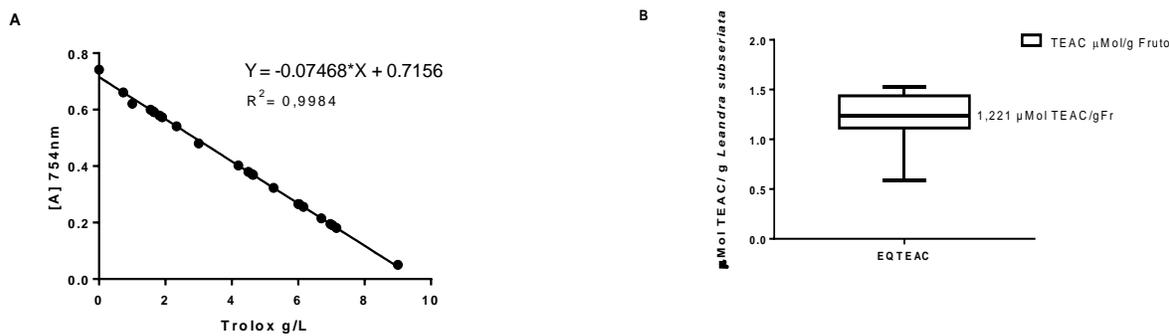


Figura 4: Actividad antioxidante equivalente a unidades Trolox (TEAC) de los extractos de *L. subseriata*. **A.** Interpolación de absorbancias de diferentes concentraciones del extracto de *L. subseriata* con el radical catiónico ABTS sobre la curva de calibración del Trolox **B.** Concentración en unidades equivalentes a Trolox (EQTEAC) $\mu\text{Mol TEAC/gFr}$ N= 19, Min= 0,584 $\mu\text{Mol TEAC/gFr}$, Max= 1,522 $\mu\text{Mol TEAC/gFr}$, Mean= 1,221 $\mu\text{Mol TEAC/gFr}$, SD=0,2452, SEM=0,05626

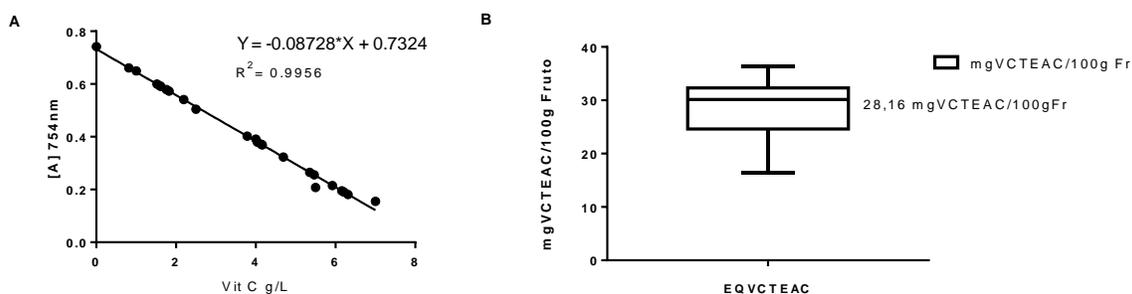


Figura 5: Actividad antioxidante equivalente a unidades de Vitamina C de los extractos de *L. subseriata*. **A** Interpolación de absorbancias de diferentes concentraciones del extracto de *L. subseriata* con el radical catiónico ABTS sobre la curva de calibración de Vitamina C. **B.** Concentración de actividad antioxidante equivalente a Vitamina C (VCTEAC) en mgVCTEAC/100g Fr; N=19, Min= 16,36 mgVCTEAC/100gFr, Max= 36,45 mgVCTEAC/100gFr, Mean= 28,16 mgVCTEAC/100gFr, SD= 5,567, SEM= 1,277

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto acuoso de las bayas maduras de *L. subseriata* en concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ y se obtuvo que a mayor concentración del extracto, mayor era la capacidad de reducción del radical ABTS, que se evidencia en un porcentaje de inhibición máximo de 74,53% obtenido con la concentración 50 $\mu\text{g/mL}$, con lo cual se demostró la capacidad antioxidante del extracto de los frutos de *L. subseriata* (Figura 6).

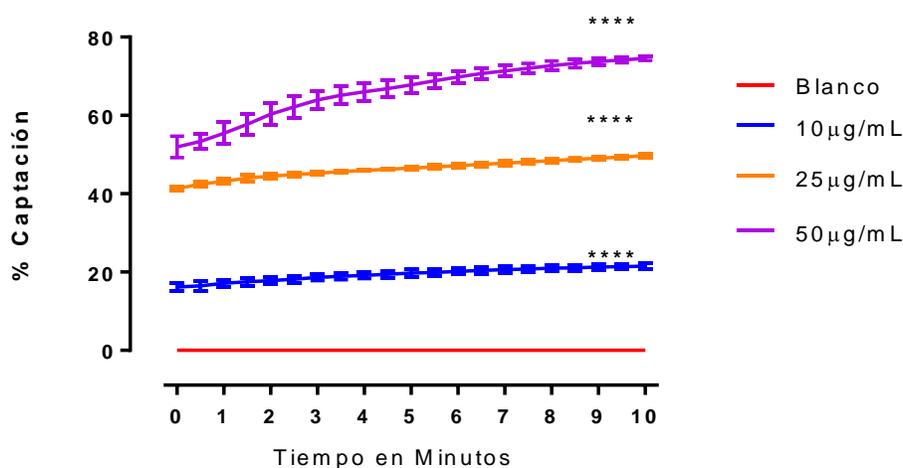


Figura 6: Porcentaje de Captación del ABTS por acción de diferentes concentraciones de extracto de frutos maduros de *L. subseriata*. Curvas porcentaje de captación observadas con cada una de las concentraciones del extracto evaluadas por espectrofotometría. Se utilizó como blanco ABTS. Cada línea representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, **** $p \leq 0,0001$ mediante Test de Dunnett.

5.3 Generación Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) en neutrófilos.

Inicialmente de acuerdo al protocolo de Conejeros et al., 2012 se realizó una prueba con diferentes estímulos, para determinar el control positivo para usar en el ensayo de producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en neutrófilos humanos (Figura 7). Los resultados se presentan en Unidades Relativas de Luminiscencia (LRU). Se observa que la mayor

producción de EROs se presentó al estimular los neutrófilos con PAF 100nM, razón por la cual este estímulo fue seleccionado como control positivo del ensayo.

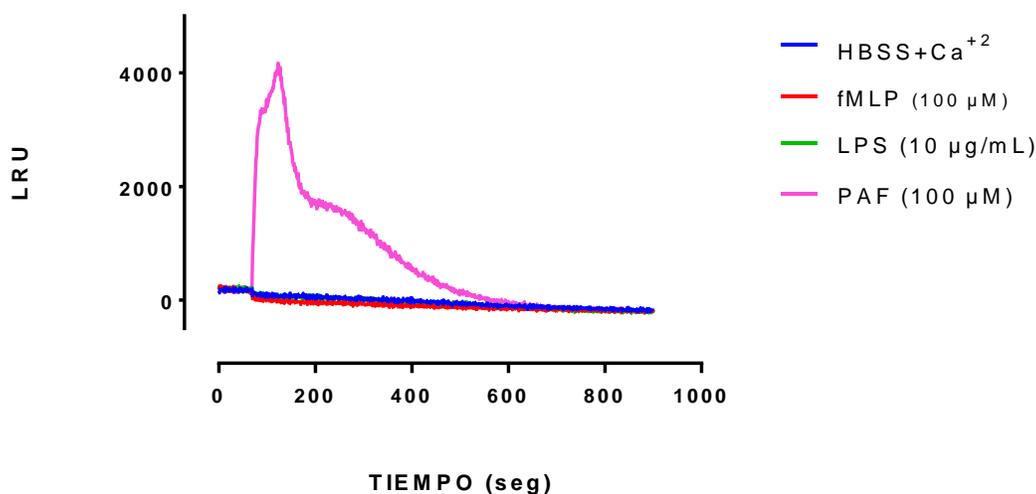


Figura 7: Curva de generación de EROs con diferentes estímulos. $1 \times 10^6/250 \mu\text{L}$ Neutrófilos humanos, estimulados por 10 min con N-formilmetionil-leucil-fenilalanin (fMLP 100 μM), o Lipopolisacarido (LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o Factor Activante Plaquetario (PAF 100nM). Resultados de lecturas en equipo LuminoSkan ASCENTTM por 2000 segundos.

Se pre-incubaron 1×10^6 neutrófilos a 37°C por 5 minutos, posteriormente se incubaron 10 minutos con 3 diferentes concentraciones de extracto de frutos maduros de *L. subseriata* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y finalmente se estimularon con PAF (100 nM) e inmediatamente se realizó la lectura de resultados de producción de EROS en el equipo LuminoSkan ASCENTTM por 2000 segundos. En la *Figura 8A* se observan los resultados representativos de producción de EROs por luminiscencia obtenidos con el extracto del fruto; la *Figura 8B* se analiza el área bajo la curva de 3 ensayos diferentes y se evidencia que el extracto de los frutos maduros de *L. subseriata* inhibe la producción de EROs, cuando los neutrófilos son estimulados con PAF; se evidencia que a mayor concentración del extracto,

mayor es la inhibición de la producción de EROs; sin embargo de acuerdo al análisis de Tukey, solo se presentan diferencias estadísticas significativas en la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto con respecto al control positivo ($p=0,0180$).

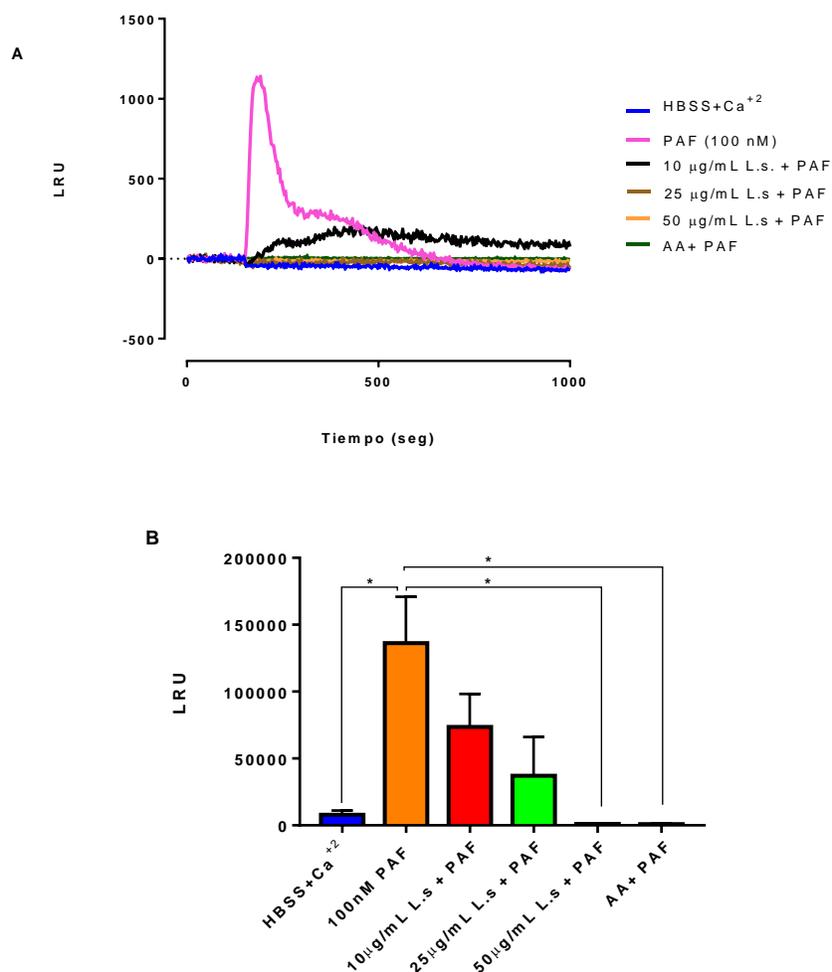


Figura 8: Actividad de diferentes concentraciones de extracto de frutos de *L. subseriata* en la producción de EROs en neutrófilos estimulados con PAF. A Curvas de un ensayo representativo de evaluación del efecto de extractos de *L. subseriata* en la disminución de EROS en neutrófilos humanos evaluados en LuminoSkan ASCENT **B**: LRU producidas por neutrófilos humanos estimulados 10 minutos con diferentes concentraciones de extracto de frutos maduros de *L. subseriata* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y posterior estímulo con PAF (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Control de actividad antioxidante en Ácido Ascórbico (AA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, * $p \leq 0,05$ mediante Test de Tukey.

5.4. Evaluar capacidad regulatoria de los extractos de *Leandra subseriata* (Naudin)

Cong sobre la liberación de gránulos de gelatinasa en neutrófilos humanos.

Los neutrófilos obtenidos durante el aislamiento a partir de sangre periférica presentaban condiciones adecuadas de pureza y viabilidad (*Figura 9*)

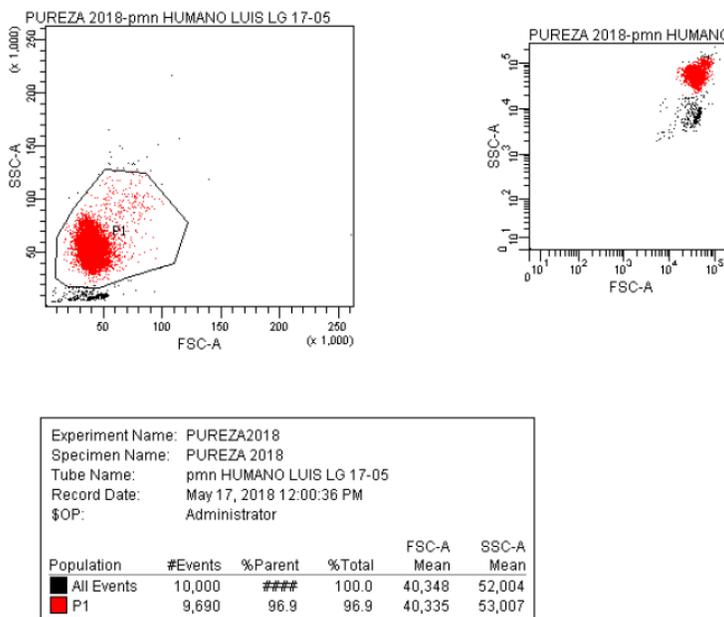


Figura 9: Resultado representativo de análisis de pureza y grado de activación de neutrófilos aislados de sangre periférica evaluada en citómetro de flujo (BD FACSCanto II; Becton Dickinson y software FlowJo 7.6). Se evidencia un porcentaje de pureza mayor a 95% y el estado de activación (Inactivo) de los neutrófilos (Nube de neutrófilos concentrada dentro de los parámetros de color rojo); la agrupación de puntos negros indica la presencia de contaminación por eritrocitos.

5.4.1. Ensayo preliminar con neutrófilos bovinos para para establecer concentración de trabajo y tiempo de incubación del extracto de frutos maduros de *Leandra subseriata*.

Estas pruebas se realizaron en el instituto de Farmacología y morfofisiología de la Universidad Austral de Chile, por eso los ensayos se realizaron en neutrófilos bovinos; aunque los neutrófilos bovinos presentan ciertas diferencias en tamaño, estructura y

composición de gránulos en comparación con los neutrófilos humanos, funcionan como un modelo ideal para ser utilizado de base para realizar pruebas con neutrófilos humanos ya que poseen funciones similares en la defensa del huésped (Brown & Roth, 1991; Gennaro, Dewald, Horisberger, Gubler, & Baggiolini, 1983). Se consideró evaluar las mismas concentraciones del extracto de frutos maduros con las cuales se obtuvo resultados positivos de capacidad antioxidante (10 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL), para evitar el efecto del solvente el extracto se obtuvo por maceración directa de frutos liofilizados en HBSS Ca²⁺. Los resultados de estas pruebas evidenciaron que al incubar por 10 min los neutrófilos en diferentes concentraciones del extracto de frutos maduros de *L. subseriata* (10 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL) no se observan cambios significativos con respecto al control donde los neutrófilos se mantuvieron incubados con HBSS Ca²⁺. Adicionalmente, se observa una disminución estadísticamente significativa en la liberación de la MMP-9 en los neutrófilos que fueron pre-incubados con el extracto de *Leandra subseriata* y posteriormente estimulados por 30 min con LPS (10 µg/mL) con respecto al control positivo con LPS (*Figura 10*) (Trentini et al., 2014). Razón por la cual se consideraron las mismas concentraciones del extracto del fruto y el mismo tiempo de incubación para realizar los ensayos en neutrófilos humanos estimulados con LPS.

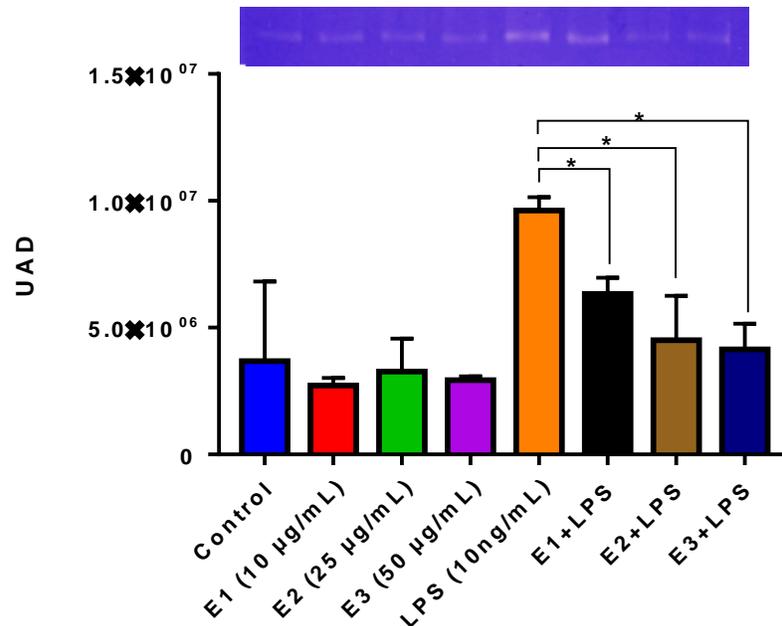


Figura 10: Efecto del extracto del fruto de *Leandra subseriata* sobre la actividad de MMP-9 inducida por LPS en neutrófilos Bovinos. Análisis de densitometría realizado en las bandas claras del gel de poliacrilamida, donde se evidencia la actividad gelatinolítica de MMP-9. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, $*p \leq 0,05$ mediante Test de Dunnett.

5.5. Evaluar efecto de extractos de frutos maduros de *L. subseriata* (Naudin) Cong en la liberación de gránulos de gelatinasa (MMP-9) de neutrófilos humanos pre - estimulados con LPS. Los ensayos se trabajaron con las condiciones de tiempo de incubación y concentraciones de extracto preestablecidas para neutrófilos bovinos. Para cada ensayo se usaron $1 \times 10^6 / 500 \mu\text{L}$ neutrófilos aislados que fueron resuspendidos en solvente (HBSS + Ca^{2+}) y pre-incubados 5 min a 37°C .

Los resultados obtenidos en este ensayo demuestran que en una concentración $50 \mu\text{g/mL}$ de los extractos de frutos maduros de *L. subseriata* se disminuye significativamente la liberación

de la MMP-9 en neutrófilos pre-estimulados con LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *Figura 11*. Adicional a los ensayos realizados con neutrófilos bovinos, en humanos se usó un control con Ácido Ascórbico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para determinar el efecto provocado por un antioxidante conocido en la regulación de la MMP-9 (Harakeh et al., 2018).

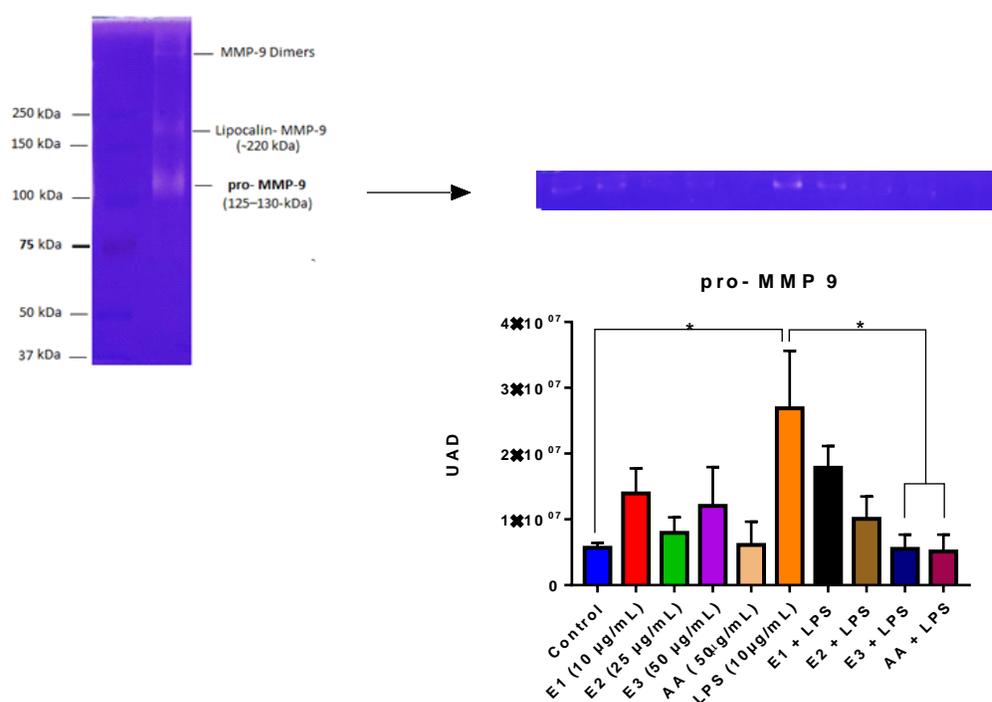


Figura 11: Efecto del extracto del fruto de *Leandra subseriata* sobre la actividad de MMP-9 inducida por LPS en neutrófilos Humanos. Para determinar la concentración de trabajo 1×10^6 Neutrófilos humanos fueron incubados con diferentes concentraciones de extractos de frutos maduros de *L. subseriata* (E1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, E2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E3 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estimulación posterior por 30 min con LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); en condiciones idénticas a las del ensayo anterior con neutrófilos bovinos. Finalmente se realizó un análisis de densitometría donde las bandas claras indican la actividad de la gelatinasa (pro-MMP-9). Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, * $p \leq 0,05$ mediante Test de Dunnett.

5.6 Ensayos de muerte celular (Citotoxicidad) del extracto de *Leandra subseriata*.

Para verificar que los resultados obtenidos en neutrófilos eran producto de la inhibición de la producción de EROs y de la regulación de la MMP-9 y no de la muerte celular causada por las tres concentraciones probadas (10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$) del extracto de frutos maduros de *L. subseriata* en se realizaron pruebas de citotoxicidad en VarioSkan utilizando Ioduro de propídio. Los resultados demuestran que existen diferencias estadísticas significativas entre los neutrófilos tratados con Tritón X-100 (control positivo de toxicidad) (Alarcón et al., 2017) y los tratamientos con las diferentes concentraciones del extracto (Figura 12), incluso los datos tienden a ser ligeramente menores con respecto al control negativo. Los resultados son expresados en Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU).

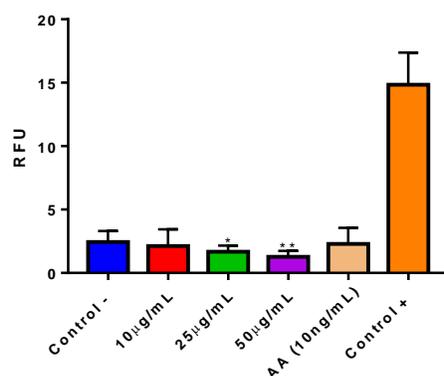


Figura 12: Citotoxicidad de diferentes concentraciones de extractos de frutos maduros de *L. subseriata* en Neutrófilos Humanos. 1×10^6 neutrófilos fueron incubados durante 10 minutos 37°C con diferentes concentraciones de extractos de frutos maduros de *L. subseriata* (E1 10 $\mu\text{g/mL}$, E2 25 $\mu\text{g/mL}$; E3 50 $\mu\text{g/mL}$). Como control negativo se utilizó HBSS+ Ca^{+2} y como control positivo Tritón X-100 a 0,2%. Las señales de IP se detectaron con un lector de múltiples fluorescencias (Varioskan®, Thermo Scientific) a 530 nm de longitud de onda de emisión y 620 nm de excitación. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, $**p \leq 0,05$ mediante Test de Tukey.

6. DISCUSIÓN

Frutos tipo baya se caracterizan por ser jugosos, carnosos y por tener las semillas envueltas por el pericarpo (Mendoza & Ramírez, 2006). Desde hace algunos años se ha evidenciado el incremento en el interés por parte de la comunidad científica en buscar y utilizar principios activos provenientes de la flora silvestre, aprovechando su biodiversidad y los conocimientos relacionados con los usos ancestrales medicinales; las bayas son de potencial interés debido a sus elevadas propiedades antioxidantes (Robards, 2003).

Teniendo en cuenta el elevado interés por estudiar plantas con potencial actividad biológica, el objetivo de esta investigación fue evaluar las propiedades de las bayas maduras de *L. subseriata* (Naudin) Cong, que están siendo consumidas esporádicamente por habitantes o por la fauna silvestre de las regiones donde se producen; sin embargo, en la actualidad no se reporta ningún estudio de su potencial beneficio. Siguiendo este enfoque, se evaluó la capacidad antioxidante a través de la inhibición del radical ABTS, una cuantificación alternativa de antocianos totales presentes en las bayas y se realizaron pruebas *in vitro* en neutrófilos humanos para determinar el efecto de diferentes concentraciones del extracto de frutos maduros de *L. subseriata* sobre la producción de EROs y la regulación de la actividad de MMP-9.

Las bayas azules y sus compuestos flavonoides son investigados por su elevada capacidad antioxidante, con el fin de potenciar su uso en el tratamiento de diversas enfermedades (Figueira et al., 2016), por ello en esta esta investigación se avaluó la presencia de compuestos de este tipo en los frutos maduros de *L. subseriata* y se demostró con técnicas de Giusti & Wrolstad, 2001 la presencia de una concentración baja de antocianos totales (C3G) en el extracto acuoso de las bayas evaluadas; sin embargo mediante la evaluación de

la inhibición del radical ABTS se determinó una buena capacidad antioxidante, encontrándose una correlación positiva entre la concentración del extracto y la inhibición del radical ABTS, alcanzando un porcentaje de inhibición de hasta 74,53% en la mayor concentración evaluada (50 µg/mL). El hecho de demostrar capacidad antioxidante *in vitro* en una planta cuyas propiedades están siendo subutilizadas abre posibilidades en la formulación de nuevos proyectos además de alternativas para combatir diferentes patologías causadas por estrés oxidativo o el efecto exacerbado de los radicales libres (Martínez et al., 2002; Serra & Cafaro, 2007; Sies, 2015).

La capacidad antioxidante detectada con la inhibición del radical ABTS, se relaciona directamente con la presencia de antocianinas en las bayas (Berker, Ozdemir Olgun, Ozyurt, Demirata, & Apak, 2013), pero debido a que se trata de un extracto total, de esta mezcla compleja no se descarta la presencia de diferentes compuestos en el fruto que en cierto modo incrementen la capacidad para reducir el radical libre ABTS.

En el extracto acuoso del fruto maduro de *L. subseriata* se encontró un promedio de 1,221 µMol TEAC/gFr y 28,16 mg VCTEAC/100gFr; estos valores, indican la cantidad de compuestos equivalentes comparados con Trolox y ácido ascórbico respectivamente, no se los puede comparar con otros estudios, dado que en estas pruebas se utilizaron los extractos en medios acuosos debido a que el siguiente objetivo del trabajo abordó la evaluación del extracto en neutrófilos humanos, aunque es plausible realizar una extracción agresiva de los compuestos del fruto maduro de *L. subseriata*, la purificación requiere tiempo y costos,

aunque muy seguramente realizando procesos de liofilización y una disgregación mecánica utilizando solventes agresivos como el fenol-cloroformo se encontrará mayor cantidad de antocianos totales y de igual manera la capacidad de reducción del radical ABTS aumentaría; de esta manera será posible comparar con diferentes plantas reportadas en literatura (Ramirez, Zambrano, Sepúlveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2015).

Los polifenoles ejercen una gran cantidad de efectos fisiológicos beneficiosos sobre la salud de los seres humanos (Harborne, 1988); dentro del grupo polifenol, las antocianidinas y sus formas glucosiladas, las antocianinas, han ganado atención significativa debido a los numerosos estudios que indican sus posibles beneficios para la salud humana (Bell & Gochenaur, 2006; Vuorela et al., 2005). Se sabe que las antocianinas poseen propiedades antioxidantes (Noda, Kaneyuki, Mori, & Packer, 2002), ejercen efectos antimutagénicos (Azevedo et al., 2007), neuroprotectores (Galli, Shukitt-Hale, Youdim, & Joseph, 2002; Youdim & Deans, 2000) y reducen el riesgo de enfermedad arterial coronaria (Renaud & de Lorgeril, 1992); además, ejercen efectos sobre vasos sanguíneos y plaquetas (Andriambeloson et al., 1998; Demrow, Slane, & Folts, 1995), además estos compuestos han sido estudiados sobre distintas líneas celulares, como queratinocitos y neutrófilos humanos (Woźniak, Michalak, Wyszomierska, Dudek, & Kiss, 2018); estos últimos de especial interés ya que hacen parte de la inmunidad innata y regulan la inmunidad adquirida por lo cual están directamente involucrados en enfermedades inflamatorias cuando ocurre una activación descontrolada y prolongada.

Cuando se evaluó el efecto del extracto de las bayas maduras de *Leandra subseriata* sobre neutrófilos humanos estimulados con PAF, se observó que a medida que aumentaban las concentraciones del extracto (10, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), disminuía la producción de EROs. La producción de especies reactivas de oxígeno por el neutrófilo, se relaciona con distintas enfermedades inflamatorias, como por ejemplo artritis reumatoide y psoriasis, en ambas patologías están presentes grandes cantidades de neutrófilos productores de EROs que causan daño al tejido debido a la oxidación de proteínas y del ADN, generando así inflamación de carácter crónico (Winterbourn, Kettle, & Hampton, 2016). Por lo tanto, compuestos con capacidad antioxidante capaces de inhibir la producción de EROs generados por neutrófilos, son candidatos a tener en cuenta para ser investigados con mayor profundidad (Woźniak et al., 2018).

El extracto de las bayas de *L. subseriata*, demostró tener capacidad antioxidante por el método del ABTS y de igual manera se observó inhibición en la producción de EROs producida por neutrófilos cuando fueron estimulados con PAF *in vitro*. Estos resultados positivos son comparables con los resultados obtenidos con infusiones de lila común *Syringa vulgar* realizado por Woźniak et al., 2018, quienes además observaron que el tratamiento de neutrófilos con éste extracto disminuía la fosforilación de vías MAPK, que pueden estar involucradas en la generación de EROs en neutrófilos. La investigación realizada por Vera, 2017 con extracto de *Amomyrtus luma* determinó que a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el extracto es capaz de disminuir significativamente la generación de EROs en neutrófilos humanos, en el presente estudio se reporta que el extracto acuoso de bayas maduras de *L. subseriata* disminuye significativamente la producción de EROs a partir de una

concentración de 10 µg/mL, esto probablemente, debido a que el extracto de *L. subseriata* al ser derivado de una baya azul no toxica, podría otorgar un aporte superior de polifenoles, los cuales por su estructura le confieren estabilidad al forma radical, ejercen máximo potencial antioxidante y participa en la deslocalización de los electrones (Bors et al., 1990); esto permite regular la actividad de la enzima NADPH oxidasa atrapando los EROs que libera la misma y que se activa para controlar agentes infecciosos, pero que en condiciones descontroladas desencadena en la aparición de diferentes enfermedades como artritis reumatoide y cáncer (Huanqui, 1997; Woźniak et al., 2018).

Los neutrófilos son productores de MMP-9, contribuyendo al daño de tejidos y su remodelación, la actividad elevada de esta enzima está involucrada en enfermedades como el cáncer, debido a que esta enzima proteolítica promueve la angiogénesis (Mehner et al., 2014), artritis reumatoide y enfermedades cardiovasculares por tratarse de una proteasa que degrada colágeno tipo IV y elastasa (Gupta, Kim, Prasad, & Aggarwal, 2010; Kim-Park et al., 2016). Estudios previos, han demostrado que algunas antocianinas ejercen efectos antiinflamatorios en Linfocitos T (línea celular Jurkat) al suprimir la acetilación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células β activadas (NF-κβ) e inhibir la producción de TNFα e IL-6 (Pro-inflamatorios) cuando los Linfocitos son estimulados por LPS (Seong et al., 2011), razón por la cual se decidió evaluar el efecto del extracto de las bayas maduras de *L. subseriata* sobre la actividad de MMP-9 en neutrófilos humanos. Los neutrófilos fueron incubados con el extracto y posteriormente estimulados con el agente proinflamatorio (LPS 10µg/mL), encontrándose que con el extracto más concentrado (50 µg/mL) se presentó una significativa disminución en la actividad de MMP-9.

El extracto de la planta *A. luma* presenta polifenos según, pero no se observó efecto en la disminución de liberación de MMP-9 en neutrófilos estimulados con PAF, probablemente porque en el extracto pueden existir elementos tóxicos junto con los polifenoles (Vera, 2017). En un estudio realizado por Kim-Park et al., 2016, evaluaron el extracto metanólico de *Camellia sinensis* y sus principales catequinas, encontrándose que producían una inhibición significativa de la actividad de MMP-9 y ésta disminución estaba asociada con su capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos. Algo similar se observó en el estudio de Woźniak et al., 2018 en el cual se sugiere que existe una asociación entre el efecto de disminución de producción de EROs, la disminución de la fosforilación de las vías de las MAPK y la consecuente disminución de liberación de MMP-9. Teniendo en cuenta que los resultados de este estudio son similares a los de Kim-Park et al., 2016 y los de Woźniak et al., 2018, es necesario continuar profundizando en la participación de vías de señalización en la regulación de las respuestas evaluadas en neutrófilos tratados con extractos de *L. subseriata*. Estos resultados sugieren la necesidad de profundizar en la caracterización química del extracto de este fruto para poder determinar y cuantificar la presencia de flavonoides como las antocianinas, las cuales son capaces de unirse a enzimas transportadores de hormonas y ADN, catalizar el transporte de electrones, depurar radicales libres y quelar iones metálicos transitorios, tales como Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} . (van Acker et al., 1997), propiedades que están relacionadas con la inhibición en la producción de EROs e igualmente importantes en la regulación de la liberación de MMP-9 ya que al ser estas enzimas dependientes de zinc y siendo las antocianinas quelantes de zinc se controlaría el cofactor de las enzimas y esto reduce y/o inhibe la respuesta del neutrófilo. Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y

los activadores del plasminógeno son familias que regulan la degradación de la membrana basal (Brandstetter et al., 2001; Wang & Stoner, 2008). Los extractos de antocianina de diferentes tipos de bayas, arroz negro y berenjenas han sido evaluados por su capacidad para inhibir la invasión de múltiples tipos de células cancerosas en La membrana basal para matriz Corning (Matrigel) (Chen et al., 2006; Coates et al., 2007; Nagase, Sasaki, Kito, Haga, & Sato, 1998). Se descubrió que los extractos de antocianinas inhiben la invasión de células cancerígenas mediante la reducción de la expresión de MMP y del activador de urocinasa plasmínica (u-PA), que degradan la matriz extracelular como parte del proceso invasivo y estimulan la expresión de inhibidores tisulares de la matriz de metaloproteínasa (TIMPs) y de un inhibidor del activador del plasminógeno (PAI), los cuales contrarrestan la acción de las MMPs y u-PA (Brandstetter et al., 2001; Wang & Stoner, 2008).

Adicionalmente a los objetivos planteados en el proyecto se realizó prueba de citotoxicidad sobre neutrófilos humanos, para determinar si el efecto inhibidor de MMP-9 y de EROs era generado por acción del extracto y no por muerte celular provocada por agentes tóxicos presentes en el mismo, con lo cual se demostró satisfactoriamente que el extracto no presenta toxicidad frente a neutrófilos humanos en ninguna de las concentraciones probadas y en cambio se evidencia la tendencia a disminuir la muerte celular en comparación con el control negativo (HBSS+ Ca^{+2}) generado posiblemente por el efecto protector que ejercen los antioxidantes del extracto hacia los neutrófilos.

En general los resultados de este estudio concuerdan con otras investigaciones similares realizadas con bayas azules (blueberries). Estos son los primeros resultados obtenidos del extracto acuoso de las bayas de *L. subseriata*, donde se encontró capacidad antioxidante, que resultó suficiente para regular la producción de EROs, y disminuir la liberación de MMP-9, esto sugiere que esta baya podría ser incorporada en la dieta humana produciendo potenciales beneficios para la salud. Sin embargo son necesarios estudios relacionados con la inhibición de las posibles rutas en los neutrófilos y de igual manera ampliar la investigación a diferentes grupos celulares para luego incorporar investigaciones *in vivo* y obtener la potencial formulación de un nuevo fármaco para el tratamiento de distintas enfermedades basado en la utilización de material vegetal de nuestra región, pudiendo convertir esta planta en una posibilidad económica factible para los productores de la zona.

Adicionalmente las pruebas realizadas con neutrófilos bovinos donde se observó una disminución en la liberación de MMP-9, indican que los efectos benéficos en relación al control de procesos inflamatorios puede presentarse en otras especies, por esto las bayas podrían ser utilizadas en la dieta de otros mamíferos, particularmente podría considerarse su inclusión en preparaciones de ensilaje para bovinos. Sin embargo es necesario profundizar su estudio, evaluando otras respuestas en neutrófilos incluida la toxicidad, generación de EROs, activación de vías de señalización entre otros.

7. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de las bayas maduras de *L. subseriata* presenta una potencial capacidad antioxidante, posiblemente asociado a la presencia de compuestos fenólicos tipo antocianatos como la Cianidin-3-Glucosido. Esta capacidad antioxidante es capaz de inhibir *in vitro* la producción de especies reactivas de oxígeno por neutrófilos humanos estimulados con factor activante plaquetario.
- El extracto acuoso de las bayas maduras de *L. subseriata* a una concentración de 50 µg/mL disminuye significativamente la liberación de MMP-9 en neutrófilos estimulados con lipopolisacárido. lo cual evidencia una potencial actividad antiinflamatoria del extracto.
- En ninguna de las concentración de trabajo se evidencio citotoxicidad cuando se realizó el ensayo con ioduro de propídio, esto es un indicativo de que los resultados de la liberación de MMP-9 y la generación de Especies Reactivas de Oxigeno son derivados de la regulación fisiológica ejercida por el extracto y no asociado a procesos de muerte celular.

8. RECOMENDACIONES

- Es necesario continuar evaluando la capacidad de regulación de este extracto en la activación de vías de señalización importantes en la modulación de respuestas del neutrófilo como lo son MAPK, NF- κ B, PI3K-AKT; así como en la regulación de expresión de agentes proinflamatorios como IL8 y COX2.
- El estudio solo se enfocó en el extracto acuoso de los frutos maduros de *L. subseriata*, sería conveniente replicar estos ensayos en fracciones etanólicas, metanólicas, fenólicas entre otros.

9. FINANCIACIÓN

El proyecto fue financiado por el Sistema de Investigación de la Universidad de Nariño, mediante la convocatoria de trabajos de grado 2017 identificado con el código 1373 (Anexo 4)

10. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

- Resultados del proyecto fueron presentados para ponencia en el III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular, recibimos notificación que fue aprobado para su presentación (Anexo 7).
- Resultados relacionados con neutrófilos bovinos fueron presentados al 53 Congreso de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, estamos esperando respuesta debida a la ampliación de fecha en la recepción de resúmenes.

11. BIBLIOGRAFIA

- Aaby, K., Skrede, G., & Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4032–4040.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences.
- Abram, C. L., & Lowell, C. A. (2009). The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annual Review of Immunology*, *27*, 339–362.
- Aguilera, O. M., Reza, V. M. del C., Chew, M. R. G., & Meza, V. J. A. (2011). Propiedades Funcionales De Las Antocianinas. *BIOtecnia*, *13*(2), 16.
<https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Akgul, C., Moulding, D. A., & Edwards, S. W. (2001). Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Letters*, *487*(3), 318–322.
- Alarcón, P., Manosalva, C., Conejeros, I., Carretta, M. D., Muñoz-Caro, T., Silva, L. M. R., ... Burgos, R. A. (2017). D(-) lactic acid-induced adhesion of bovine neutrophils onto endothelial cells is dependent on neutrophils extracellular traps formation and CD11b expression. *Frontiers in Immunology*, *8*(AUG), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00975>
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(17), 7915–7922.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>
- Andriambelason, E., Magnier, C., Haan-Archipoff, G., Lobstein, A., Anton, R., Beretz, A., & Andriantsitohaina, R. (1998). Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *The Journal of Nutrition*, *128*(12), 2324–2333.
- Anthis, N. J., Wegener, K. L., Ye, F., Kim, C., Goult, B. T., Lowe, E. D., & Campbell, I. D. (2009). The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *The EMBO Journal*, *28*(22), 3623–3632.
- Arias, C. J. (2008). ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL POR GC-MS DE METABOLITOS DEL EXTRACTO O EN DICLOROMETANO DE LA MELASTOMATÁCEA *Clidemia rubra*. *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*, *1*, 1–101.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Arnljots, K., Sørensen, O., Lollike, K., & Borregaard, N. (1998). Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. *Leukemia*, *12*(11), 1789–1795.
- Atkinson, J. J., & Senior, R. M. (2003). Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *28*(1), 12–24.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0166TR>

- Azevedo, L., de Lima, P. L. A., Gomes, J. C., Stringheta, P. C., Ribeiro, D. A., & Salvadori, D. M. (2007). Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(5), 852–858.
- Badui, D. S. (2006). *Química de los alimentos*. Ed. Pearson educación. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Serrador, J. M., Montoya, M. C., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., & Sánchez-Madrid, F. (2002). Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *The Journal of Cell Biology*, *157*(7), 1233–1245.
- Bell, D. R., & Gochenaur, K. (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology*, *100*(4), 1164–1170.
- Berker, K. I., Ozdemir Olgun, F. A., Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2013). Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(20), 4783–4791.
- Bernhard, E. J., Gruber, S. B., & Muschel, R. J. (1994). Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(10), 4293–4297.
- Boege, E. (2009). Retos y perspectivas de conservación en México. *Capital Natural de México, Vol. II: Estado de Conservación y Tendencias de Cambio.*, 49. Retrieved from http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol II/II00_Preliminares Guia de lectura Indice Siglas.pdf
- Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., & Beliveau, R. (2007). Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF induced activation of NFκB by edible berry juice. *Anticancer Research*, *27*, 937–948.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, *33*(5), 657–670.
- Borregaard, N., & Cowland, J. B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, *89*(10), 3503–3521.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Sengelø, H., Diamond, M. S., Springer, T. A., Anderson, H. C., & Bainton, D. F. (1994). Borregaard, N., Sørensen, O. E., & Theilgaard-Mönch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends in immunology, *28*(8), 340–345. *Journal of Leukocyte Biology*, *56*(1), 80–87.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Løllike, K., & Sengelø, H. (1993). Granules and vesicles of human neutrophils. The role of endomembranes as source of plasma membrane proteins. *European Journal of Haematology*, *51*(5), 318–322.
- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Rygaard, K., Bastholm, L., Nielsen, M. H., Sengelø, H., & Johnsen, A. H. (1992). Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, *90*(1), 86–96.

- Borregaard, N., Sehested, M., Nielsen, B. S., Sengelov, H., & Kjeldsen, L. (1995). Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood*, *85*(3), 812–817.
- Borregaard, N., Sørensen, O. E., & Theilgaard-Mönch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends in Immunology*, *28*(8), 340–345.
- Borregaard, N., & Tauber, A. I. (1984). Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. b-Cytochrome and associated flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(1), 47–52.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. B. T.-M. in E. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants* (Vol. 186, pp. 343–355). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I)
- Boyd, N., & McGuire, V. (1991). The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Radical Biology and Medicine*, *10*(3–4), 185–190.
- Brandstetter, H., Grams, F., Glitz, D., Lang, A., Huber, R., Bode, W., ... Engh, R. A. (2001). The 1.8-Å Crystal Structure of a Matrix Metalloproteinase 8-Barbiturate Inhibitor Complex Reveals a Previously Unobserved Mechanism for Collagenase Substrate Recognition. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(20), 17405–17412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007475200>
- Brown, G. B., & Roth, J. A. (1991). Comparison of the response of bovine and human neutrophils to various stimuli. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *28*(3–4), 201–218.
- Bryant, D., Nielsen, D., & Tangle, L. (1997). *Last Frontier Forests: Ecosystems and Economies on the Edge*. *Frontiers: A Journal of Women Studies*. Retrieved from <http://pdf.wri.org/lastfrontierforests.pdf>
- Bunting, M., Harris, E. S., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., & Zimmerman, G. A. (2002). Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving β 2 integrins and selectin ligands. *Current Opinion in Hematology*, *9*(1), 30–35.
- Carlsen, H., Myhrstad, M. C., Thoresen, M., Moskaug, J. Ø., & Blomhoff, R. (2003). Research Communication: Berry Intake Increases the Activity of the γ -Glutamylcysteine Synthetase Promoter in Transgenic Reporter Mice. *The Journal of Nutrition*, *133*(7), 2137–2140.
- Chambers, A. F., & Matrisian, L. M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, *89*(17), 1260–1270.
- Chen, P., Kuo, W., Chiang, C., Chiou, H., Hsieh, Y., & Chu, S. (2006). Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chemico-Biological Interactions*, *163*(3), 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.08.003>
- Chen, Y. Y., Hsu, M. J., Sheu, J. R., Lee, L. W., & Hsieh, C. Y. (2013). Andrographolide, a

- novel NF- κ B inhibitor, induces vascular smooth muscle cell apoptosis via a ceramide-p47phox-ROS signaling cascade. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013, 1–11.
- Clausing, G., & Renner, S. S. (2001). Evolution of growth form in epiphytic Dissochaeteae (Melastomataceae). *Organisms Diversity and Evolution*, 1(1), 45–60.
<https://doi.org/10.1078/1439-6092-00004>
- Clemes, S. D. M., Beirith, A., & Zeni, A. L. B. (2015). Avaliação de polifenóis e capacidade antioxidante de seis espécies da Mata Atlântica. *Scientia Plena*, 11(5), 1–8.
- Coates, E., Popa, G., Gill, C., McCann, M., McDougall, G., Stewart, D., & Rowland, I. (2007). Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *Journal of Carcinogenesis*, 6, 1–13.
- Coelho, L., De Lima, R., De Oliveira Assumpção, C., Prestes, J., & Denadai, B. S. (2015). Consumption of cherries as a strategy to attenuate exercise-induced muscle damage and inflammation in humans. *Nutr Hosp. Nutr Hosp. Nutr Hosp*, 323232(5), 1885–1893. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.5.9709>
- Conejeros, I., Jara, E., Carretta, M. D., Alarcón, P., Hidalgo, M. A., & Burgos, R. A. (2012). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) reduces respiratory burst, MMP-9 release and CD11b expression, and increases l-selectin shedding in bovine neutrophils. *Research in Veterinary Science*, 92(1), 103–110.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.005>
- Coronato, S., Laguens, G., & Di Girolamo, V. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina (Argentina)*. <https://doi.org/ISSN: 0025-7680>
- Cotes, A. M., Cristancho, E., & García, X. M. (2006). *Antioxidantes, Oportunidades para la producción agropecuaria y agroindustria. Ministerio de agricultura y Desarrollo rural*.
- del Valle, L. G. (2011). Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine & Aging Pathology*, 1(1), 1–7.
- Demrow, H. S., Slane, P. R., & Folts, J. D. (1995). Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation Research*, 91(4), 1182–1188.
- Díaz, A., Guevara, J., Espinosa, B., Chávez, R., & Limon, R. (2012). La Inflamación como un Factor Clave para Desencadenar la Neurodegeneración. *Mensaje Bioquímico*, 36, 127–137.
- Elejade, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos. *An Med Interna (Madrid)*, 18(326–335), 50–59.
- en el Laboratorio, M. D. B. (2005). *Organización Mundial de la Salud. OMS. Tercera Edición. Ginebra*.
- Ernens, I., Rouy, D., Velot, E., Devaux, Y., & Wagner, D. R. (2006). Adenosine inhibits

matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca²⁺ pathway. *Circulation Research*, 99(6), 590–597.

- Faurschou, M., Sørensen, O. E., Johnsen, A. H., Askaa, J., & Borregaard, N. (2002). Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1591(1–3), 29–35.
- Figueira, M. E., Oliveira, M., Direito, R., Rocha, J., Alves, P., Serra, A. T., & Freitas, M. (2016). Protective effects of a blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 1191–1202.
- Figuroa, C., Henderson, K. J., R., D. L. C., R., C., W., M.-E., & K., B. (1992). Immunovisualization of High HK and Low LK Molecular Weight Kininogens on Isolated Human Neutrophils. *Blood*, 79(3), 754–759.
- Fiore, E., Fusco, C., Romero, P., & Stamenkovic, I. (2002). Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9/gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Oncogene*, 21(34), 5213–5223. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205684>
- Futosi, K., Fodor, S., & Mócsai, A. (2013). Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*, 17(4), 1185–1197.
- Galli, R. L., Shukitt-Hale, B., Youdim, K. A., & Joseph, J. A. (2002). Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959(1), 128–132.
- Gehart, H., Kumpf, S., Ittner, A., & Ricci, R. (2010). MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness?. *EMBO Reports*, 11(11), 834–840.
- Gennaro, R., Dewald, B., Horisberger, U., Gubler, H. U., & Baggiolini, M. (1983). A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *The Journal of Cell Biology*, 96(6), 1651–1661.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (August 2001), 0–13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- González-Beltrán, M. M. (2011). *Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de Agraz y su posible efecto Citotóxico in vitro en células leucémicas OCI AML3 y MOLT4 (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias)*.
- Grael, C. F., Kanashiro, A., Kabeya, L. M., Jordão, C. O., Takeara, R., Gobbo-Neto, L., & Lopes, J. L. C. (2010). In vitro study of antioxidant and scavenger properties of phenolic compounds from *Lychnophora* species. *Química Nova*, 33(4), 867–870.
- Granica, S., Piwowarski, J. P., & Kiss, A. K. (2015). Ellagitannins modulate the inflammatory response of human neutrophils ex vivo. *Phytomedicine*, 22(14), 1215–1222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.10.004>

- Gross, J., & Lapiere, C. M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(6), 1014–1022.
- Gupta, S. C., Kim, J. H., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(3), 405–434.
- Harakeh, S., Khalife, J., Baydoun, E., Azar, R., Al-Hejin, A., Barbour, E., & Kamal, M. A. (2018). Effects of Ascorbic Acid on Tax, NF-KB and MMP-9 in Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 Positive Malignant T-Lymphocytes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(2), 237–244.
- Harborne, J. B. (1988). Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*, 280, 17–27.
- Heo, H. J., & Lee, C. Y. (2005). Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1984–1989.
- Hidalgo, A., Peired, A. J., Wild, M. K., Vestweber, D., & Frenette, P. S. (2007). Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26(4), 477–489.
- Hua, J., & Muschel, R. J. (1996). Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Research*, 56(22), 5279–5284.
- Huanqui, G. C. (1997). Oxidantes-Antioxidantes en Reumatología. *Revista Peruana De Reumatología*, 3(1), 35–40.
- Isaza, J. H., Ito, H., & Yoshida, T. (2004). Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry*, 65(3), 359–367.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.11.017>
- Jang, D. S., Su, B.-N., Pawlus, A. D., Kang, Y.-H., Kardono, L. B. S., Riswan, S., ... Kinghorn, A. D. (2006). Beccaridiol, an unusual 28-nortriterpenoid from the leaves of *Diplectria beccariana*. *Phytochemistry*, 67(16), 1832–1837.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.026>
- Johansson, B., Malm, J., Persson, T., Janciauskiene, S., Andersson, P., Carlson, J., & Egesten, A. (2001). Alpha-1-antitrypsin is present in the specific granules of human eosinophilic granulocytes. *Clinical & Experimental Allergy*, 31(3), 379–386.
- Jonas, E., Dwenger, A., & Hager, A. (1993). In vitro effect of ascorbic acid on neutrophil–endothelial cell interaction. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 8(1), 15–20.
- Juss, J. K., Hayhoe, R. P., Owen, C. E., Bruce, I., Walmsley, S. R., Cowburn, A. S., & Chilvers, E. R. (2012). Functional redundancy of class I phosphoinositide 3-kinase

- (PI3K) isoforms in signaling growth factor-mediated human neutrophil survival. *PLoS ONE*, 7(9), 1–15.
- Kang, T., Yi, J., Guo, A., Wang, X., Overall, C. M., Jiang, W., ... Pei, D. (2001). Subcellular Distribution and Cytokine- and Chemokine-regulated Secretion of Leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21960–21968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007997200>
- Kausar, H., Jeyabalan, J., Aqil, F., Chabba, D., Sidana, J., Singh, I. P., & Gupta, R. C. (2012). Berry anthocyanidins synergistically suppress growth and invasive potential of human non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Letters*, 325(1), 54–62.
- Kawamata, H., Kameyama, S., Kawai, K., Tanaka, Y., Nan, L., Barch, D. H., & Oyasu, R. (1995). Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A. *International Journal of Cancer*, 63(4), 568–575.
- Kim-Park, W. K., Allam, E. S., Palasuk, J., Kowolik, M., Park, K. K., & Windsor, L. J. (2016). Green tea catechin inhibits the activity and neutrophil release of Matrix Metalloproteinase-9. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4), 343–346.
- Kim, Y. H., Kwon, H.-J., & Kim, D.-S. (2012). Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)-dependent Processing of β ig-h3 Protein Regulates Cell Migration, Invasion, and Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38957–38969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357863>
- Kjeldsen, L., Bainton, D. F., Sengelov, H., & Borregaard, N. (1993). Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood*, 82(10), 3183–3191.
- Kjeldsen, L., Bjerrum, O. W., Askaa, J., & Borregaard, N. (1992). Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochemical Journal*, 287(2), 603–610.
- Kleiner, D. E., & Stetler-Stevenson, W. G. (1994). Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Analytical Biochemistry*, 218(2), 325–329. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1994.1186>
- Kroon, P., & Williamson, G. (2005). Perspective polyphenols: dietary components with established benefits to health?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1239–1240.
- Krozel, C. (1991). *Guía de medicina natural*.
- Kumar, S., Xu, J., Kumar, R. S., Lakshmikanthan, S., Kapur, R., Kofron, M., & Filippi, M. D. (2014). The small GTPase Rap1b negatively regulates neutrophil chemotaxis and transcellular diapedesis by inhibiting Akt activation. *Journal of Experimental Medicine*, 211(9), 1741–1758.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005).

- Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Le Cabec, V., Cowland, J. B., Calafat, J., & Borregaard, N. (1996). Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: the specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6454–6457.
- Ley, K., Smith, E., & Stark, M. A. (2006). IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunologic Research*, 34(3), 229–242.
<https://doi.org/10.1385/IR:34:3:229>
- Li, X., Zhao, X., & Ma, S. (1999). Secretion of 92 kDa gelatinase (MMP-9) by bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 67(3), 247–258.
[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00228-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00228-1)
- Lochter, A., & Bissell, M. J. (1999). An odyssey from breast to bone: multi-step control of mammary metastases and osteolysis by matrix metalloproteinases. *Apmis*, 107(1-6), 128–136.
- Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., & Borregaard, N. (1995). Lysozyme in human neutrophils and plasma. A parameter of myelopoietic activity. *Leukemia*, 9(1), 159–164.
- Lominadze, G., Powell, D. W., Luerman, G. C., Link, A. J., Ward, R. A., & McLeish, K. R. (2005). Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(10), 1503–1521.
- Määttä, R. K., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species family Rosaceae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52(20), 6178–6187.
- Mañes, S., Mira, E., del Mar Barbacid, M., Ciprés, A., Fernández-Resa, P., Buesa, J. M., & Martínez-A, C. (1997). Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25706–25712.
- Manicone, A. M., & McGuire, J. K. (2008). No TitleMatrix metalloproteinases as modulators of inflammation. In *Seminars in Cell & Developmental Biology Academic Press.*, 19(1), 34–41.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñon, M. (2002). Los Flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6), 271–278.
- Mehner, C., Hockla, A., Miller, E., Ran, S., Radisky, D. C., & Radisky, E. S. (2014). Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 5(9), 2736–2749.
- Mena, S. J., Manosalva, C., Carretta, M. D., Teuber, S., Olmo, I., Burgos, R. A., &

- Hidalgo, M. A. (2016). Differential free fatty acid receptor-1 (FFAR1/GPR40) signalling is associated with gene expression or gelatinase granule release in bovine neutrophils. *Innate Immunity*, 22(6), 479–489.
- Mendoza, H., & Ramírez, B. E. (2006). *Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia*.
- Meyers, J., Watkins, B., Pritts, P., & Liu, R. (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 6887–6892.
- Mimura, M. R. M., Salatino, A., & Salatino, M. (2004). *Distribution of flavonoids and the taxonomy of Huberia (Melastomataceae)*. *Biochemical Systematics and Ecology* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.08.001>
- Mira, E., Mañes, S., Lacalle, R. A., Márquez, G., & Martínez-a, C. (1999). Insulin-like growth factor I-triggered cell migration and invasion are mediated by matrix metalloproteinase-9. *Endocrinology*, 140(4), 1657–1664.
- Mirto, A., Iannuzzi, F., Carillo, P., Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., & Fuggi, A. (2018). Metabolic characterization and antioxidant activity in sweet cherry (*Prunus avium* L.) Campania accessions: Metabolic characterization of sweet cherry accessions. *Food Chemistry*, 240, 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.162>
- Mittermeier, R. A., Goettsch, C., & Robles, P. (1997). *Megadiversidad: los países biológicamente más ricos del mundo*.
- Mócsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *Journal of Experimental Medicine*, 210(7), 1283–1299.
- Montoya, C. G., Ochoa, O. C., Sánchez, M. N., Medina, C. C., Lobo, A. M., Galeano, G. P., & Rojano, B. (2009). Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* SW). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 519–528.
- Moyer, R., Hummer, K., Finn, C., Frei, B., & Wrolstad, R. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 519–525.
- Mullen, W., McGinn, J., Lean, J. M., Maclean, R. M., Gardner, P., Duthie, G. G., & Crozier, A. (2002). Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5191–5196.
- Mullen, W., Stewart, J. A., Lean, J. M., Gardner, P., Duthie, G. G., & Crozier, A. (2002). Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids and antioxidant capacity of red raspberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(18), 5197–5201.
- Nagase, H., Sasaki, K., Kito, H., Haga, A., & Sato, T. (1998). Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness in vitro. *Planta Medica*, 64(03), 216–219.

- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213–219.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., & Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 166–171.
- Oh, H. M., Lee, S., Na, B. R., Wee, H., Kim, S. H., Choi, S. C., & Jun, C. D. (2007). RKIKK motif in the intracellular domain is critical for spatial and dynamic organization of ICAM-1: functional implication for the leukocyte adhesion and transmigration. *Molecular Biology of the Cell*, 18(6), 2322–2335.
- Onel, G. M., Pereira, R. N., & Flores, S. R. M. (1998). Enzimas Generadoras de Eespecies Reactivas del Oxígeno: Mieloperoxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed*, 17(3), 191–197.
- Orjuela, R. A. A. (2015). *Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de Chromolaena perglabra (BL Robinson) RM King y H. Robinson (Bachelor's thesis)*.
- Pantelidis, G., Vasilakakis, M., Manganaris, G., & Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin, and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777–783.
- Peña, V., Salinas, M., & Ríos-Sánchez. (2006). Contenido de Antocianinas Totales y Actividad Antioxidante en Frutos de Frambuesa *Rubus idaeus* L. con Diferente Grado de Maduración. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2), 159–163.
- Powell, W. C., Knox, J. D., Navre, M., Grogan, T. M., Kittelson, J., Nagle, R. B., & Bowden, G. T. (1993). Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Research*, 53(2), 417–422.
- Ramirez, J. E., Zambrano, R., Sepúlveda, B., Kennelly, E. J., & Simirgiotis, M. J. (2015). Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC–HR-ESI-ToF-MS. *Food Chemistry*, 176, 106–114.
- Rangkadilok, N., Worasuttayangkurn, L., Bennett, R. N., & Satayavivad, J. (2005). Identification and quantification of polyphenolic compounds in Logan *Euphoria longana* Lam. fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(5), 1387–1392.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Renaud, S. D., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523–1526.
- Robards, K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 657–691.
- Rørvig, S., Honore, C., Larsson, L. I., Ohlsson, S., Pedersen, C. C., Jacobsen, L. C., &

- Borregaard, N. (2009). Ficolin-1 is present in a highly mobilizable subset of human neutrophil granules and associates with the cell surface after stimulation with fMLP. *Journal of Leukocyte Biology*, *86*(6), 1439–1449.
- Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., & Tsukita, S. (1992). A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *Journal of Cell Science*, *103*(1), 131–143.
- Schultes, R. (1981). Medicinal Plants of East and Southeast Asia. *Journal or Ethnopharmacology*, *4*(1), 124–124.
- Seeram, N., Adams, L., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *54*, 9329–9339.
- Sengeløv, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Lollike, K., Dahlgren, C., & Borregaard, N. (1995). Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *The Journal of Immunology*, *154*(8), 4157–4165.
- Sengeløv, H., Kjeldsen, L., & Borregaard, N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *The Journal of Immunology*, *150*(4), 1535–1543.
- Seong, A. R., Yoo, J. Y., Choi, K., Lee, M. H., Lee, Y. H., Lee, J., & Yoon, H. G. (2011). Delphinidin, a specific inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses inflammatory signaling via prevention of NF- κ B acetylation in fibroblast-like synoviocyte MH7A cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *410*(3), 581–586.
- Serra, H. M., & Cafaro, T. A. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *41*(4), 525–532.
- Shao, Y., Hu, Z., Yu, Y., Mou, R., Zhu, Z., & Beta, T. (2018). Phenolic acids, anthocyanins, proanthocyanidins, antioxidant activity, minerals and their correlations in non-pigmented, red, and black rice. *Food Chemistry*, *239*, 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.009>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, *4*, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sørensen, O., Bratt, T., Johnsen, A. H., Madsen, M. T., & Borregaard, N. (1999). The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(32), 22445–22451.
- Spessoto, M., Ferreira, D., Crotti, A., Silva, M., & Cunha, W. (2003). Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine*, *10*, 606–609.
- Suzuki, K., Hino, M., Hato, F., Tatsumi, N., & Kitagawa, S. (1999). Cytokine-Specific Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Subtype Cascades in Human Neutrophils Stimulated by Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Tumor Necrosis Factor- α . *Blood*, *93*(1),

341–349.

- Suzuki, K., Hino, M., Kutsuna, H., Hato, F., Sakamoto, C., Takahashi, T., & Kitagawa, S. (2001). Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1 β . *The Journal of Immunology*, *167*(10), 5940–5947.
- Tabarelli, M., & Peres, C. A. (2002). Abiotic and vertebrate seed dispersal in the Brazilian Atlantic forest: Implications for forest regeneration. *Biological Conservation*, *106*(2), 165–176. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(01\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00243-9)
- Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L. C., Nielsen, M. J., Rasmussen, T., Udby, L., Gharib, M., ... Borregaard, N. (2006). Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood*, *108*(1), 353–361. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3890>
- Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L. C., Rasmussen, T., Niemann, C. U., Udby, L., Borup, R., & Porse, B. T. (2005). Highly glycosylated α 1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, *78*(2), 462–470.
- Trentini, A., Bellini, T., Manfrinato, M. C., Dallochio, F., Fainardi, E., Alvisi, R., ... Volta, C. A. (2014). Balanced and unbalanced solutions modulate the release of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) from neutrophils in response to inflammatory stimuli: An in vitro study. *Inflammation Research*, *63*(5), 325–328. <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0709-5>
- Tsukita, S., & Yonemura, S. (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(49), 34507–34510.
- Tsukita, S., Yonemura, S., & Tsukita, S. (1997). ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, *9*(1), 70–75.
- Tulio Jr, A., Reese, R., Wyzgoski, F., Rinaldi, P., Fu, R., Scheerens, J., & Miller, A. (2008). Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *56*, 1880–1888.
- Udby, L., Calafat, J., Sørensen, O. E., Borregaard, N., & Kjeldsen, L. (2002). Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology*, *72*(3), 462–469.
- van Acker, S. A., Bast, A., van der Vijgh, W. J., Rice-Evans, C. A., & Pecker, L. (1997). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Flavonoids in Health and Disease*, 221–251.
- van Buul, J. D., van Rijssel, J., van Alphen, F. P. J., Hoogenboezem, M., Tol, S., Hoeben, K. A., ... Hordijk, P. L. (2010). Inside-out regulation of ICAM-1 dynamics in TNF- α -activated endothelium. *PLoS ONE*, *5*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011336>
- Venereo, G. J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana*

- de Medicina Militar*, 31(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00046-X>
- Vera, R. (2017). *Efecto del Extracto de las Bayas de Amomyrtus luma Sobre la Respuesta Oxidativa y no Oxidativa en Neutrófilos Humanos*. Universidad Austral de Chile.
- Vrijisen, R., Everaert, L., & Boeyé, A. (1988). Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. *Journal of General Virology*, 69(7), 1749–1751.
- Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. (2005). Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8492–8497.
- Wagner, G. J. (1982). Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. *Recent Advances in Phytochemistry*, 16, 1–45.
- Wang, L. S., & Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269(2), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.020>. Anthocyanins
- Winkler, I. G., Barbier, V., Wadley, R., Zannettino, A. C. W., Williams, S., & Lévesque, J. P. (2010). Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: Serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood*, 116(3), 375–385. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-233437>
- Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., & Hampton, M. B. (2016). Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 765–792.
- Woźniak, M., Michalak, B., Wyszomierska, J., Dudek, M. K., & Kiss, A. K. (2018). Effects of Phytochemically Characterized Extracts From *Syringa vulgaris* and Isolated Secoiridoids on Mediators of Inflammation in a Human Neutrophil Model. *Frontiers in Pharmacology*, 9(art 349), 1–15.
- Wurdack, J. (1973). *Melastomataceae (Memecylaceae by T. Morley)*. *Flora de Venezuela*.
- Wurdack, J. (1980). *Melastomataceae*. *Flora of Ecuador*.
- Xu, Y., Loison, F., & Luo, H. R. (2010). Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3K γ , ROS, and actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 2950–2955.
- Yoshida, T., Yoshida, T., Amakuraa, Y., Yokuraa, N., Itoa, H., Hipólito, J., & Renner, S. S. (1999). Oligomeric Hydrolyzable tannins from *Tibouchina multiflora*. *Phytochemistry*, 52(8), 1661–1666.
- Youdim, K. A., & Deans, S. G. (2000). Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *British Journal of Nutrition*, 83(1), 87–93.
- Yu, T. C., Chen, S. E., Ho, T. H., Peh, H. C., Liu, W. B., Tiantong, A., & Chang, C. J. (2012). Involvement of TNF- α and MAPK pathway in the intramammary MMP-9

release via degranulation of cow neutrophils during acute mammary gland involution. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 147(3–4), 161–169.

Zafrilla, P., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry *Rubus idaeus* jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651–3655.

ANEXOS

A. Certificado de Identificación Taxonómica *Leandra subseriata* (Naudin) Cong.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA HERBARIO P.S.O.

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La suscrita directora del **HERBARIO PSO DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO**, certifica que el estudiante **Luis Ignacio Gómez Cumbal**, identificado con cédula de ciudadanía No. 1086018997, solicitó el servicio de identificación taxonómica para una muestra botánica, la cual contiene la siguiente información:

Nombre común reportado: No reportado

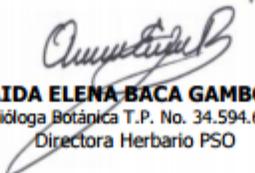
Lugar de colecta: Municipio de La Florida Nariño, Departamento de Nariño a 24.7 km de Pasto.

Fecha de colecta: 23 de abril de 2017

Una vez revisadas las características morfológicas del ejemplar, comparado con los exsiccados registrados en el Herbario de Investigaciones –HERBARIO PSO–, como única colección vegetal legalmente registrada en el departamento de Nariño, y posterior confirmación del especialista en Melastomataceae Humberto Mendoza, la muestra corresponde a la especie:

***Leandra subseriata* (Naudin) Cong.
(Familia Melastomataceae)**

Se expide a solicitud del interesado, a los quince (15) días del mes de mayo de 2017.



AIDA ELENA BACA GAMBOA
Bióloga Botánica T.P. No. 34.594.606
Directora Herbario PSO

B. Absorbancias Trolox

Muestra	Dilución Factor	Ordenadas [A]	Concentración [mg/L]
BLANCO	1	0,742	0,169
10	1	0,560	2,536
10-2	1	0,565	2,473
10-3	1	0,590	2,145
25	1	0,350	5,266
25-2	1	0,347	5,312
25-3	1	0,381	4,066
40	1	0,308	5,811
40-2	1	0,247	6,601
40-3	1	0,247	5,601
50	1	0,216	7,015
50-2	1	0,175	7,540
50-3	1	0,167	7,644

C. Absorbancias Acido Ascórbico

Muestra	Dilución Factor	Ordenadas [A]	Concentración [mg/L]
BLANCO	1	0,742	-0,055
10	1	0,563	1,993
10-2	1	0,568	1,941
10-3	1	0,592	1,665
25	1	0,356	4,360
25-2	1	0,353	4,393
25-3	1	0,388	3,990
40	1	0,313	4,841
40-2	1	0,250	5,571
40-3	1	0,246	5,613
50	1	0,172	6,456
50-2	1	0,181	6,352
50-3	1	0,166	6,528

D. Consentimiento Informado

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

Identificación de la Facultad y el Programa

Título de la investigación: VALORACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS DE Leandra subseriata (Naudin) Cong COMO AGENTE ANTIOXIDANTE Y DE REGULACIÓN DE LIBERACIÓN GRÁNULOS DE GELATINASA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO O AUTORIZACIÓN PARA ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Yo, _____ mayor de edad identificado (a) con c.c. _____ de _____, actuando en nombre propio.

DECLARO:

Que he recibido toda la información clara y concreta por parte de LUIS IGNACIO GOMEZ CUMBAL, estudiante de pregrado de Biología, Universidad de Nariño el día ____ del mes de _____ del año _____, sobre el trabajo de investigación relacionado con la "VALORACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS DE Leandra subseriata (Naudin) Cong COMO AGENTE ANTIOXIDANTE Y DE REGULACIÓN DE LIBERACIÓN GRÁNULOS DE GELATINASA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS" para el cual es crucial la extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud (mayores de 18 años de edad) para extracción de neutrófilos. Que será realizado bajo su responsabilidad, de acuerdo a la resolución 8430 de 1993, (Cap.1 Art.11 - Art. 15, en el cual se hace aclaración que es una investigación con riesgo mínimo) y con asesoría de JAQUELINE MENA HUERTAS, docente del programa de Biología e integrante del grupo de investigación de Salud Pública y con apoyo del Centro de Estudios en Salud; para participar en el trabajo de investigación que tiene como objetivo "Evaluar el efecto antioxidante del extracto de los frutos maduros de Leandra subseriata (Naudin) Cong en presencia de radicales libres del oxígeno, 2,2-Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS*+) y en la regulación de respuestas tempranas de neutrófilos humanos pre-estimulados con Lipopolisacárido (LPS)".

Me ha advertido que en la Investigación en que participo, en ningún momento se hará público mi nombre y/o documento de identificación, como tampoco saldrán a la luz pública hechos relacionados que puedan identificarme y sobre los cuales se guardarán siempre y en todo momento del estudio, toda las reservas y discrecionalidades correspondientes.

Me ha explicado y he comprendido satisfactoriamente la naturaleza y propósito del estudio aludido y de las posibles implicaciones que podría tener al donar 5 ml de sangre periférica para el estudio. Me han explicado que la toma de muestra la realizará un profesional de salud. He podido preguntar mis inquietudes al respecto y recibido las respuestas y explicaciones en forma satisfactoria.

También se me ha informado de mi derecho a rechazar esta autorización o revocarla cuando así yo lo requiera.

He sido interrogado (a) sobre la aceptación o no, de esta autorización para este estudio, por lo tanto,

AUTORIZO:

Para que LUIS IGNACIO GOMEZ CUMBAL Y JAQUELINE MENA HUERTAS y el grupo de investigación Salud Pública realice la investigación correspondiente (Evaluar el efecto antioxidante del extracto de los frutos maduros de Leandra subseriata (Naudin) Cong en presencia de radicales libres del oxígeno, 2,2-Azino-bis-3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS*+) y en la regulación de respuestas tempranas de neutrófilos humanos pre-estimulados con Lipopolisacárido (LPS)). Se firma el presente documento a los _____ días del mes ____ del Año _____

FIRMA Y C.C. DEL AUTORIZADO o del tutor _____

FIRMA Y c.c. del investigador _____

Nombre, firma y c,c, de testigo _____

Nombre, firma y c,c, de testigo _____

E. Acta de Aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño



Universidad de Nariño
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES,
POSTGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES

Acta de Aprobación No. 74

EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO.

Creado por el Sistema de Investigaciones mediante Resolución Rectoral No. 1608 de abril 20 del 2010, el cual se rige por la Resolución No. 008430 del 4 de octubre 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, mediante la cual se establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

Que en relación al proyecto de investigación "VALORACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS DE *Leandra subseriata* (Naudin) Cong COMO AGENTE ANTIOXIDANTE Y DE REGULACIÓN DE LIBERACIÓN GRÁNULOS DE GELATINASA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS" Certifica que:

1. Los integrantes del proyecto de investigación en mención adjuntaron los siguientes documentos:
 - Proyecto de investigación.
 - Aval Institucional **N/A**
 - Consentimiento Informado **SI**
2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité
3. Según las categorías establecidas en el artículo 11 de la resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene el siguiente riesgo

Sin Riesgo Riesgo mínimo Riesgo mayor del mínimo

4. El Comité informará de manera inmediata a las directivas institucionales toda novedad que reciba acerca de:
 - a. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisada y aprobada por el Comité.



Universidad de Nariño
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES,
POSTGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES

5. El presente proyecto ha sido aprobado por el periodo correspondiente al cronograma propuesto por los investigadores **(6 meses)**
6. El investigador principal deberá informar al Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Nariño a saber:
 - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité, excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgo para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso serio en las primeras 24 horas de ocurrido.
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - e. Cualquier decisión tomada por otros Comités de Ética.
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - g. El investigador principal de la Universidad de Nariño deberá presentar un informe semestral al Comité de Ética en Investigación.

Por medio de la presente, el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño, avala el proyecto arriba mencionado en el marco de los principios, políticas y procedimientos de la declaración de Helsinki, de la Asamblea Médica Mundial, de la ley 44 de 1993 de la República de Colombia y de la reglamentación vigente del Comité de Ética de la Universidad de Nariño.

Dado en Pasto a los diecinueve días (19) del mes de septiembre del dos mil diecisiete (2017)


PABLO SANTACRUZ GUERRERO

Presidente

Elabora: Marilyn Rosero Chicunque

F. Acta de Cumplimiento N° 77.

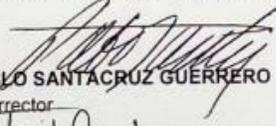


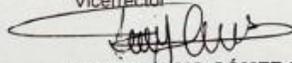
Universidad de Nariño
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES,
POSTGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES

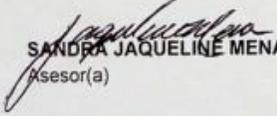
ACTA DE CUMPLIMIENTO No. 77

Entre los suscritos Pablo Santacruz Guerrero identificado con cédula de ciudadanía número 12.967.309 quien en su calidad de VICERRECTOR DE INVESTIGACIONES, POSTGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES actúa en nombre y representación legal de la Universidad de Nariño y que para la presente se denominará la VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES de una parte y de la otra los (las) estudiantes LUIS IGNACIO GÓMEZ CUMBAL identificados con cédulas de ciudadanía No. 1086018997, respectivamente, se celebra la presente acta de cumplimiento, la cual se regirá por las siguientes cláusulas PRIMERA. LA UNIVERSIDAD a través del FONDO DEL SISTEMA DE INVESTIGACIONES se compromete a financiar el proyecto de investigación titulado "VALORACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS DE Leandra subseriata (Naudin) Cong COMO AGENTE ANTIOXIDANTE Y DE REGULACIÓN DE LIBERACIÓN GRÁNULOS DE GELATINASA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS" aprobado según acuerdo N° 169 del 19 de septiembre de 2017 expedido por el Comité de Investigaciones de la Universidad de Nariño, por la suma de SIETE MILLONES TRESCIENTOS SETENTA Y SIETE MIL CIENTO SETENTA PESOS M/L (\$ 7377170) los cuales serán invertidos de acuerdo al presupuesto definido para el proyecto. SEGUNDA.-EL (LOS) ESTUDIANTES se compromete(n) a realizar la investigación en un término de 6 meses. Los investigadores deberán entregar además lo correspondiente a implicaciones éticas de acuerdo con los compromisos adquiridos según lo estipulado en el proyecto. Una vez se entregue dicha información en CD, se podrá expedir el acta de terminación del proyecto. TERCERA.- EL (LOS) ESTUDIANTE(S) se comprometen a presentar el informe final del proyecto de Investigación en 6 meses contados a partir de la firma de la presente Acta de Cumplimiento. CUARTA.- LA VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES se reserva la facultad de vigilar la manera y la calidad de cómo los investigadores dan cumplimiento a las obligaciones y podrá hacerles las sugerencias y recomendaciones que estime convenientes para la mejor ejecución del proyecto. QUINTA.- Los bienes no fungibles que se adquieran en el desarrollo de este trabajo, son de propiedad de la Universidad y deben ser entregados con el informe final y acta de entrega del Director del Grupo de Investigación.- SEXTA.- EL (LOS) ESTUDIANTE (S) se compromete (n) a legalizar el avance entregado con los recibos en original y copia. SÉPTIMA.- EL (LOS) ESTUDIANTES DEBERÁN devolver los dineros entregados por la Universidad para la investigación, cuando sin causa justificada no entregue(n) el informe parcial y final dentro de los plazos previamente estipulados. OCTAVA. Para reglamentar el cumplimiento de esta acta EL (LOS) ESTUDIANTES SUSCRIBIRÁN una póliza de cumplimiento que cubrirá el valor total de lo entregado (\$7377170) la cual tendrá vigencia hasta DOS MESES posteriores a la fecha de la entrega del informe final.

Se firma en San Juan de Pasto, a los diecinueve (19) días del mes de septiembre de 2017.


PABLO SANTACRUZ GUERRERO
Vicerrector


LUIS IGNACIO GÓMEZ CUMBAL
Estudiante


SANDRA JAQUELINE MENA HUERTAS
Asesor(a)

Proyectó: María Constanza Cabrera Dulce, Sistema de Investigaciones

Sede Las Acacias - Bloque 5 - Investigaciones 7292389 - Postgrados 7222900 - ORIC 7360088
<http://vipri.udenar.edu.co> - Pasto - Nariño - Colombia



G. Carta de aceptación III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología molecular

13/8/2018

Carta aceptación C2B2

Bogotá, 13/08/2018

Señores:

Gómez Cumbal L
Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología. Grupo de investigación Salud Pública. Ciudadela Universitaria Torobajo, Calle 18 Cr 50, San Juan de Pasto, Colombia

Mena Huertas S
Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología. Grupo de investigación Salud Pública. Ciudadela Universitaria Torobajo, Calle 18 Cr 50, San Juan de Pasto, Colombia

Hidalgo Gómez M
Universidad Austral de Chile. Campus Isla Teja. Valdivia, Región de los Ríos, Chile

Teuber Volke S
Universidad Austral de Chile. Campus Isla Teja. Valdivia, Región de los Ríos, Chile

C2B2_69_2018

Estimados Señores:

Reciban un cordial saludo. En nombre del Comité Científico agradecemos su participación en el Tercer Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular a realizarse en la ciudad de Bogotá, Colombia, los días 1, 2 y 3 de noviembre de 2018.

Nos complace comunicarle que su trabajo titulado:
POTENCIAL ANTIOXIDANTE Y REGULACIÓN DE LIBERACIÓN DE GRÁNULOS DE GELATINASA EN NEUTRÓFILOS HUMANOS, DEL EXTRACTO DE LOS FRUTOS DE *Leandra subseriata* (Naudin) Cong.
ha sido aceptado para presentación en el Área Salud humana & Animal, en la modalidad Oral. En una próxima comunicación le estaremos informando la fecha y hora de su presentación. Cualquier inquietud, por favor no dude en contactarnos.

Cordialmente,



Patricia del Portillo
Presidenta Comité Científico
III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología
Molecular C2B2