

EFFECTO DEL MACERADO TOTAL Y DEL ACEITE ESENCIAL DE FRUTOS MADUROS
DE *Carica candamarcensis* Hook (sin. *Vasconcellea pubescens*) EN LA FOSFORILACIÓN DE
LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MAPK (ERK1/2 y p38) EN NEUTRÓFILOS AISLADOS DE
SANGRE PERIFÉRICA HUMANA.

NELLY PAOLA ORDONEZ GOMEZ

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

2019

EFFECTO DEL MACERADO TOTAL Y DEL ACEITE ESENCIAL DE FRUTOS MADUROS
DE *Carica candamarcensis* Hook (sin. *Vasconcellea pubescens*) EN LA FOSFORILACIÓN DE
LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MAPK (ERK1/2 y p38) EN NEUTRÓFILOS AISLADOS DE
SANGRE PERIFÉRICA HUMANA.

Presentado por:

NELLY PAOLA ORDOÑEZ GOMEZ

Asesor:

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

2019

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

Luz Estela Lagos Mora, *MSc*

San Juan de Pasto, 5 de septiembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

La autora de este trabajo expresa sus agradecimientos:

Principalmente a Dios por guiarme, por darme fortaleza y sabiduría para culminar este proyecto de grado y mi carrera universitaria de manera satisfactoria.

A mi familia por apoyarme en cada momento de mi vida y por ser la inspiración para cumplir cada meta propuesta.

A nuestra Alma Mater, la Universidad de Nariño por darme la oportunidad de ser parte de ella, por haberme permitido tener una preparación académica idónea y por haberme permitido crecer de manera personal y profesional.

A todos los docentes que contribuyeron a mi formación académica, profesional y personal. Especialmente, a la doctora Jaqueline Mena Huertas por haberme orientado, acompañado y apoyado en el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

Esta gran meta cumplida la entrego primordialmente a Dios, el motor de mi vida, quien bendice cada paso que doy y me permite superar cada obstáculo que se presente para poder alcanzar todos mis propósitos. A mis padres: Jesús Erley Ordoñez Gomez y Libia Gomez Urbano por su apoyo incondicional e infinito, por estar presentes cada día de mi vida, por haberme apoyado en este sueño tan grande de convertirme en una profesional. A mi hermano Gregory Ordoñez Gómez, por guiarme y por apoyarme. A mi novio Yan Carlos Gallardo Bolaños por su apoyo y compañía incondicional. Gracias a toda mi familia, ustedes son la inspiración de mi vida, la razón para seguir luchando y para levantarme cada día, superar los obstáculos que se presenten y salir adelante. Gracias infinitas familia. Lo logramos, porque sé que este no solo era mi sueño sino también, el de ustedes.

Nelly Paola Ordoñez Gomez

RESUMEN

Los neutrófilos representan cerca de 60% de los leucocitos, pertenecen a la primera línea de defensa innata del organismo, participan en la reacción inflamatoria y son efectores de la inmunidad adaptativa. Diversos estímulos inducen su activación, desencadenando variadas respuestas como quimiotaxis, degranulación, liberación de EROS y citoquinas. Todos estos procesos están regulados por vías de señalización como las MAPK. Sin embargo, su inadecuada activación provoca daño tisular y enfermedades degenerativas inflamatorias, siendo importante su regulación. Por ello el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de los extractos de frutos maduros de *C. candamarcensis* en la fosforilación de ERK1/2 y p 38 en neutrófilos humanos. Los neutrófilos se aislaron mediante un gradiente de percoll y se estimularon con los extractos, posteriormente se realizó la extracción de proteínas y el análisis inmunoblot. Sumado a ello se evaluó el efecto de los extractos sobre la viabilidad de neutrófilos, y la actividad antioxidante del macerado total mediante el método de ABTS. Inicialmente se ajustó el protocolo de inmunoblot en variables como, la cantidad de proteína a cargar, el tiempo de corrida y el tiempo de revelado. Se encontró que el aceite vegetal de semilla no afecta la viabilidad de los neutrófilos y que incrementa la fosforilación de ERK1/2 y p 38 relacionado posiblemente a un efecto priming. En cuanto al macerado total no se pudieron validar los resultados de su efecto sobre estas vías, debido a que se presentaron inconvenientes con los controles de carga que no permitieron normalizar los datos. En adición se evidencio que el macerado no afecta la viabilidad de los neutrófilos y que posee un potencial antioxidante.

Palabras claves: *Carica candamarcensis*, neutrófilos, ERK1/2, p 38, proteínas, inmunoblot.

ABSTRACT

The neutrophils represent about 60% of the leukocytes, they belong to the first innate line of defense that the living organism has, they participate in the inflammatory reaction and they are the effectors of the adaptive immunity. Various stimuli lead to its activation triggering several responses as chemotaxis, degranulation, release of ROS and cytokines. All these processes are regulated by signaling pathways like the MAPK. Nevertheless, its inadequate activation provokes tissue damage and degenerative inflammatory illnesses, being important its regulation. Therefore, the objective of this research was to evaluate the effect of the ripe fruit of *C. candamarcensis* in the phosphorylation of ERK1/2 and p 38 in human neutrophils. The neutrophils were isolated through a gradient of percoll and they were stimulated with the extracts, subsequently, it was carried out the extraction of proteins and the immunoblot analysis. In addition, it was assessed the effect of the extracts over the neutrophils viability, and the antioxidant activity of the total macerate through the method of ABTS. Initially, the immunoblot protocol was adjusted in variables like the quantity of protein to load, the running time, the developing time, among others. It was found that the seed vegetal oil does not affect the viability of the neutrophils that increases the phosphorylation of ERK1/2 and p 38, probably, related to a priming effect. Regarding to the total macerate, the results of its effects over the pathways, could not be validated due to some issues with the loading controls which do not allow to normalize the data. Additionally, it was evident that it does not affect the viability of the neutrophils, and that it does not have a potential antioxidant.

Key words: *Carica candamarcensis*, neutrophils, ERK1/2, p 38, proteins, immunoblot.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. MARCO TEÓRICO	26
3.1 Neutrófilos	26
3.1.1 Mecanismos dependientes de oxígeno	28
3.1.2 Mecanismos independientes de oxígeno	28
3.1.3 Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	29
3.2 Señalización en neutrófilos	30
3.2.1 Vía de señalización ERK ½ MAPK	32
3.2.2 Vía de señalización p38 MAPK	33
3.3 Extractos vegetales en la regulación de enfermedades inmunológicas	34
3.3.1 <i>Carica candamarcensis</i> Hook. F. (1875).....	36
3.3.1.1 Antecedentes del tema, potencial terapéutico de <i>Carica candamarcensis</i> Hook. F. (1875)	37
5. OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo general	40
4.2 Objetivos específicos	40
5. METODOLOGÍA	41

5.1	Diseño experimental.....	41
5.2	Recolección de los frutos maduros de <i>C. candamarcensis</i>	42
5.3	Obtención de extractos de frutos maduros de <i>C. candamarcensis</i>	42
5.4	Aislamiento de Neutrófilos	44
5.5	Análisis de Western blot	45
5.5.1	<i>Extracción de proteínas totales.....</i>	46
5.5.2	<i>Cuantificación de proteínas.....</i>	46
5.5.3	<i>Separación de proteínas totales mediante electroforesis</i>	47
5.5.4	<i>Electrotransferencia de proteínas a membranas PVFS.....</i>	47
5.5.5	<i>Inmunodetección</i>	48
5.5.6	<i>Análisis estadístico.....</i>	49
5.6	Ensayo de supervivencia de neutrófilos.....	49
5.7	Actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de <i>C. candamarcensis</i>	49
5.8	Implicaciones éticas.....	52
6.	RESULTADOS	54
6.1	Inocuidad de los extractos de <i>C. candamarcensis</i>	54
6.2	Viabilidad y pureza de neutrófilos	54
6.3	Resultados asociados al cumplimiento del objetivo específico 1	55
6.3.1	<i>Extracción de proteínas</i>	55
6.3.2	<i>Separación de proteínas totales mediante electroforesis</i>	56

6.3.3 <i>Electrotransferencia de proteínas a membranas PVFS</i>	58
6.3.4 <i>Inmunodetección</i>	59
6.4 Resultados relacionados con el objetivo 2	59
6.5 Resultados relacionados con el objetivo 3	62
6.6 Resultados complementarios.....	63
6.6.1 <i>Ensayo de supervivencia de neutrófilos</i>	63
6.6.2 <i>Actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de C. candamarcensis</i>	65
7. DISCUSIÓN	69
7.1 Inocuidad de los extractos	69
7.2 Viabilidad y pureza de neutrófilos	69
7.3 Extracción de proteínas	70
7.4 Western Blot.....	71
7.4.1 <i>Separación Electroforética</i>	73
7.4.2 <i>Transferencia</i>	73
7.4.3 <i>Inmunodetección</i>	74
7.5 Efecto de los extractos de <i>C. candamarcensis</i> sobre la fosforilación de vías de señalización MAPK	75
8. CONCLUSIONES	85
9. RECOMENDACIONES	86
10. FINANCIACIÓN	87

11. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	88
12. BIBLIOGRAFÍA	89
13. ANEXOS	101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** verificación de la ausencia de bacterias de los extractos de *C. candamarcensis* mediante siembra en caja Petri con agar nutritivo. A) Izquierda control (sin siembra), derecha siembra de macerado total. B) Izquierda control (sin siembra), derecha siembra de aceite vegetal semilla..... -54-
- Figura 2:** Imágenes de microscopia directa de viabilidad y pureza de neutrófilos aislado de sangre periférica humana. A) Muestras de neutrófilos con una viabilidad superior al 90%, mediante el método de tinción con azul de tripán. B) Pureza de las muestras de neutrófilos superior al 90% mediante tinción de Wright..... -55-
- Figura 3:** Grafica de la curva de referencia realizada con BSA y su ecuación que permite la cuantificación de proteínas presentes en las muestras a analizar. Resultados obtenidos por espectrofotometría en absorbancia de 595 nm..... -56-
- Figura 4:** Bandas de proteínas después de la tinción con azul de coomassie y posterior desteñido con solución de metanol al 50%. En la imagen se observa la presencia de proteínas y su correcta separación..... -57-
- Figura 5:** Tinción del gel con azul de coomassie después de la electrotransferencia. Se observa la ausencia de bandas, sugiriendo que las proteínas se transfirieron a la membrana..... -58-
- Figura 6:** bandas observadas después de la incubación con los anticuerpos y posterior revelado. A) Bandas observadas en los tratamientos con macerado total. B) Bandas observadas en los tratamientos de macerado total + LPS..... -60-

Figura 7: Tinción de membranas. A) Tinción de membranas con rojo de ponceau. B) Tinción de membranas con azul de coomassie. En los 2 casos no se observa bandas de proteínas que permitirán la normalización de los resultados..... -60-

Figura 8: Tinción de geles con azul de coomassie para verificar la presencia de proteínas de neutrófilos tratados con diferentes concentraciones de macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*..... -61-

Figura 9: Efecto del aceite vegetal de semillas de fruto maduros de *C. candamarcensis* sobre la fosforilación de las vías de señalización MAPK realizando análisis de densitometría de las bandas presentes en los films. A) Efecto de los diferentes tratamientos sobre la fosforilación de la vía ERK1/2. B) Efecto de los diferentes tratamientos de aceite vegetal de semilla sobre la fosforilación de la vía p38 en neutrófilos humanos. C) Efecto de los diferentes tratamientos de aceite vegetal de semilla sobre la fosforilación de la vía p38 en neutrófilos humanos estimulados con LPS. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, n = 3, *p \leq 0,05 mediante Test Dunnett..... -62 y 63-

Figura 10: Supervivencia de los neutrófilos humanos tratados con extractos de *C. candamarcensis* A) Efecto de diferentes concentraciones de macerado total sobre la viabilidad de neutrófilos. B) Efecto del aceite vegetal de semilla sobre la viabilidad de neutrófilos humanos. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de 2 vías y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo (HBSS+Ca⁺²) y el control positivo (LPS 5 μ g/mL) a los 180 minutos después de iniciado el ensayo, con un p value = 0,0152..... -64 y 65-

Figura 11: Curvas de Calibración obtenidas mediante el método de decoloración del radical catiónico ABTS, a una longitud de onda de 754nm durante 10 minutos. A. Curva de Calibración

de Trolox. B Curva de Calibración de la Vitamina C (Ácido Ascórbico)
..... -66-

Figura 12: Comportamiento de la reacción del ABTS con las diferentes concentraciones del macerado total de *C. candamarcensis*. 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 Dunett..... -67-

Figura 13. Actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*.
A) Actividad antioxidante en unidades equivalentes a Trolox (EQTEAC) μ MolTEAC/mLFr. B)
Actividad antioxidante equivalente a Vitamina C (EQVCTEAC) en μ gVCTEAC/mLFr..... -68-

LISTA DE ANEXOS

1. Formato Consentimiento Informado
2. Permiso de Corponariño para la colecta de material vegetal
3. Certificado de asistencia al LIV Congreso Nacional & V Internacional de Ciencias Biológicas,

GLOSARIO DE TERMINOS

Neutrófilos: Conocidos también como granulocitos polimorfonucleares, son los leucocitos más abundantes en el torrente sanguíneo humano, pertenecen a la primera línea de defensa innata del organismo contra patógenos bacterianos y fúngicos potencialmente dañinos, además participan en el desarrollo de la reacción inflamatoria y son efectores de la inmunidad adaptativa (Pérez, 2008)

MAPK: Son una familia de proteínas quinasa serina /treonina altamente conservadas, que regulan la respuesta de los neutrófilos frente a un estímulo, influyendo en procesos de quimiotaxis, degranulación estallido respiratorio, apoptosis, entre otros (Carus, 2014).

ERK1/2: son proteínas de serina /treonina quinasas (ERK1 p44 kDa y ERK2 p42 kDa) activadas por señales extracelulares, que en neutrófilos juega un rol importante en procesos como la inflamación, granulación, quimiotaxis, adhesión celular, estallido respiratorio, apoptosis, fagocitosis, entre otros, y puede ser activada por diferentes estímulos extracelulares como LPS, fMLP, PAF y GM-CSF, TNF- α (Futosi, Fodor, & Mócsai, 2013).

P 38: Son conocidas como proteínas quinasas activadas por estrés, en células con actividad inflamatoria como los neutrófilos se encuentran las isoformas p38 α y p38 δ . Esta vías pueden ser activada por condiciones de estrés en el medio celular, cumpliendo un rol importante en procesos como adhesión, degranulación, apoptosis, liberación de IL8 y citoquinas proinflamatorias, entre otros (Alemán, 2003; Mócsai et al., 2000; Sáenz, 2015).

Antioxidante: Son compuestos que se caracterizan por su capacidad de retardar o prevenir la oxidación de las moléculas. Durante las reacciones de oxidación, una molécula químicamente estable transfiere un electrón a un agente oxidante, produciendo una reacción en cadena que produce daño celular. Las moléculas con actividad antioxidante finalizan la reacción eliminando los intermediarios de los radicales libres (Elejade, 2001).

Carica candamarcensis: Es una planta originaria de los Andes, que pertenece a la familia Caricaceae y es comúnmente conocida como chilacuan, papayo o papayuela de la montaña. Se caracteriza por la presencia de látex con un elevado contenido de papaina, además sus frutos tipo baya tiene un agradable sabor debido a su elevado contenido de azúcares (Vidal, Finot, Mora, & Venegas, 2009).

Western blot: Es una técnica analítica, ampliamente utilizada en biología celular y molecular, que permite la detección de una determinada proteína específica en una muestra biológica de interés. Para su detección se utilizan anticuerpos que reconocen la proteína mediante la especificidad de unión entre antígeno y anticuerpo (Martínez-Flores et al., 2017).

ABREVIACIONES

µg: microgramos

µg/mL: microgramos por mililitro

LPS: Lipopolisacarido

EROS: Especies reactiva de oxígeno

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

ERK1/2: Quinasas reguladas por señales extracelulares.

PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa.

fMLP: N-formilmetionina-leucil-fenilalanina

PAF: Factor Activante Plaquetario

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

PKC: Proteína quinasa C

IL: Interleuquina

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos

TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral Alfa

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

PBS: Buffer de fosfato salino

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

MT1: Macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* al 2,5 %

MT2: Macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* al 1,25 %

MT3: Macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* al 0,625 %

AV1: Aceite vegetal de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis* 2:100

AV2: Aceite vegetal de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis* 1:100

AV3: Aceite vegetal de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis* 0,5:100

1. INTRODUCCIÓN

Los neutrófilos también conocidos como granulocitos polimorfonucleares, representan cerca de 60% de los leucocitos circulantes en el torrente sanguíneo humano (Pérez, 2008), pertenecen a la primera línea de defensa innata del organismo contra patógenos bacterianos y fúngicos potencialmente dañinos, además participan en el desarrollo de la reacción inflamatoria y son efectores de la inmunidad adaptativa. Se forman y maduran en la médula ósea, donde producen compartimientos intracelulares que almacenan proteínas (péptidos antimicrobianos, enzimas proteolíticas, etc.) que serán útiles una vez salgan al torrente sanguíneo y migren a los diferentes tejidos para encontrar, capturar y fagocitar microorganismos (Borregaard, Sørensen, & Theilgaard-Mönch, 2007).

Diversos estímulos y procesos infecciosos provocan la liberación y posterior migración de los neutrófilos al sitio afectado, tal es el caso de los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las membranas de las bacterias Gram-negativas, los cuales estimulan el neutrófilo y desencadenan complejos procesos de activación celular, que incluyen la liberación de gránulos intracelulares, liberación de elevados niveles de mediadores pro inflamatorio, citoquinas, moléculas de adhesión celular que modulan la migración y adhesión de neutrófilos, fagocitosis de microorganismos, producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), liberación de trampas extracelulares (NETs), quimiotaxis, entre otros (Chakravorty & Kumar, 1998; Trentini et al., 2014). Todos los procesos de respuesta de los neutrófilos están regulados por la activación de complejas vías de señalización celular, en donde está involucrada una molécula receptora que reconoce los estímulos y una efectora que desencadena la cascada de señalización (Mócsai et al., 2000; Segal, 2005).

Para el reconocimiento de una invasión microbiana los neutrófilos expresan un gran número de receptores en su superficie celular, incluyendo receptores acoplados a proteínas G, receptores de Fc, receptores de citoquinas, receptores tipo Toll, entre otros, la activación de estos conduce a programas especializados anteriormente mencionados que permiten contrarrestar la infección (Futosi et al., 2013; Segal, 2005). Las vías de señalización MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases* o Proteínas quinasas activadas por mitógenos) son una de las más estudiadas en neutrófilos, estas juegan un rol importante en la traducción de señales que regulan la supervivencia y apoptosis. La vía ERK1/2 o quinasa regulada por señal extracelular, puede ser activada por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), factor activador de plaquetas (PAF por sus siglas en inglés *Platelet-Activating Factor*), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF por sus siglas en inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), factor de necrosis tumoral α (TNF- α por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor α*), LPS. Además, regula diferentes procesos como degranulación, adhesión celular, estallido respiratorio, regulación de la apoptosis, quimiotaxis, fagocitosis (Futosi et al., 2013). Por otro lado, la vía p38 MAPK puede ser activada por estímulos externos, fMLP, LPS, etc. Esta vía cumple un rol importante en procesos de adhesión, degranulación, apoptosis, entre otros (Mócsai et al., 2000).

Sin embargo aunque la participación de los neutrófilos es fundamental en la defensa del hospedero contra infecciones bacterianas y fúngicas, su inadecuada activación también puede provocar daño tisular y el desarrollo de diversas enfermedades degenerativas inflamatorias, como formación de aneurismas, artritis reumatoide y aterosclerosis, también se ha relacionado con el

desarrollo del cáncer debido a que puede conducir a una proliferación celular descontrolada aumentando la probabilidad de errores en la replicación (Castañeda, 2010; Pérez, 2008).

En la actualidad es de gran interés el estudio de sustancias presentes en las plantas con capacidad de regular la activación de diferentes células inmunológicas. En el estudio realizado por Lee y colaboradores en 2010 se demostró que el pretratamiento o postratamiento con luteolina presente en *Lonicera japónica* tiene efectos beneficiosos en la regulación de la lesión pulmonar aguda inducida por lipopolisacárido, debido a que inhibe la afluencia de leucocitos en el pulmón, además atenúa el estallido respiratorio y la quimiotaxis de neutrófilos inducida por fMLP, posiblemente por el bloqueo de las cascadas de señalización relacionadas con la vía MEK/ERK y PI3K/Akt. (Del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*) Por otra parte, los flavonoides presentes en el cacao (*Theobroma cacao*) modulan algunas vías de señalización que se activan al ser estimuladas por LPS como la MAPK lo que lleva a una disminución en la liberación de EROS (Kenny, Shu, Moritoki, Keeny, & Gershwin, 2009).

Es de particular interés para el grupo de salud pública de la Universidad de Nariño, continuar los estudios con *Carica candamarcesis* puesto que evidencias demuestran que el extracto acuoso y aceite esencial de la pulpa de frutos maduros de *C. candamarcensis* no poseen efecto mutagénico, genotóxico y citotóxico, aunque recomiendan realizar más estudios para descartar daños relevantes en el ADN (ácido desoxirribonucleico) (Mena et al., 2011), además la fracción proteolítica P1G10 del látex de esta planta ejercerse un efecto inmunomodulador que ayuda a combatir efectivamente la infección bacteriana de *Salmonella tiphymurium* incrementando la supervivencia de los ratones a la infección (Ralph et al., 2014).

En la actualidad no se conoce el efecto que tienen los extractos del fruto maduro de esta planta en la regulación de la activación de los neutrófilos, es por ello que en el presente estudio pretende evaluar si el macerado total y el aceite de semillas del fruto maduro de *C. candamarcensis* disminuyen la fosforilación de ERK1/2 y p38 (MAPK) en neutrófilos aislados de sangre periférica, de ser así se contribuiría al conocimiento biológico de *C. candamarcensis* en la regulación de neutrófilos, y de un posible valor terapéutico adicional. Con base en lo anterior se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es el efecto del macerado total y aceite de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis* en la fosforilación de ERK1/2 y p38 (MAPK) en neutrófilos aislados de sangre periférica estimulados con LPS de *E. coli* 055.B5?

2. JUSTIFICACIÓN

Las plantas cumplen un papel fundamental en el diario vivir del hombre, quien las ha utilizado como fuente de alimento, materia prima para la elaboración de vivienda y vestido, entre otras. De igual manera se han empleado de forma empírica para combatir problemas de salud, debido a que sus múltiples compuestos aparentemente producen efectos fisiológicos importantes, haciéndolas útiles para el tratamiento de diferentes patologías humanas. Por esta razón muchos estudios se han centrado en las propiedades terapéuticas de diferentes plantas que permitan la fabricación de productos alimenticios o medicamentos alternativos para el tratamiento de diversas patologías (Castro, 2006).

En la actualidad uno de los enfoques de gran interés es el estudio de extractos vegetales que posean algún efecto regulador de las vías de señalización de diferentes células inmunológicas como los neutrófilos, debido a que modulan las respuestas de estos frente a un estímulo. Las vías de señalización ERK 1/2 y p38 MAPK han sido ampliamente estudiadas debido a que juegan un papel fundamental en los mecanismos de respuesta oxidativos, quimiotaxis, formación de NETs y apoptosis, por lo que su inadecuada activación está relacionada con la excesiva liberación de EROS y otros mediadores químicos que provocan daño tisular y posterior desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, además fallas en la ruta ERK 1/2 han sido relacionadas con la progresión de tumores (Futosi et al., 2013; Mócsai et al., 2000), razón por la cual investigaciones relacionadas con mecanismos de regulación de estas vías son de gran importancia, como es el caso de los compuestos luteolina y flavonoides que son capaces de regular la activación de distintas vías de señalización (Kenny et al., 2009).

C. candamarcensis es una planta originaria de los Andes, que se caracteriza por la presencia de la enzima proteolítica papaína que es utilizada para ablandar carne y curtir de pieles. Su cáscara y la pulpa se utilizan para eliminar hematomas como también para mejorar afecciones digestivas, además posee actividad mitogénica. Sumado a ello investigaciones realizadas han demostrado que la fracción proteolítica P1G10 obtenida del látex estimula la proliferación de diferentes líneas celulares como L929 (tejido conectivo de ratón) y BHK-21 (riñón de hámster dorado) lo que posiblemente está asociado al incremento de la actividad de la vía ERK 1/2 MAPK (Gomes et al., 2005; Silva et al., 2003), adicionalmente se determinó que la misma fracción del látex de esta planta ejerce un efecto inmunomodulador, además estimula la proliferación y circulación de neutrófilos, sugiriendo una probable relación con la activación de ERK 1/2 (Ralph et al., 2014). Por lo anteriormente dicho existe una elevada posibilidad de que el macerado total y aceite de semilla de frutos maduros de *C. candamarcensis* posean también un efecto inmunomodulador de las vías de señalización MAPK específicamente ERK 1/2 y p38 en neutrófilos, de ser así se estará avanzando en el conocimiento del potencial biológico de esta planta, que permitirá a futuro el desarrollar un nuevo producto alimenticio o farmacéutico para el tratamiento de algunas enfermedades, como también la generación de beneficios económicos para la comunidad agrícola pues se consolidara como una planta de interés comercial.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Neutrófilos

Los neutrófilos también conocidos como leucocitos o granulocitos polimorfonucleares, representan cerca del 60% de glóbulos blancos circulantes en el torrente sanguíneo humano, (Pérez, 2008), pertenecen a la primera línea de defensa innata del organismo contra patógenos bacterianos y fúngicos potencialmente dañinos, además participan en el desarrollo de la reacción inflamatoria, son efectores de la inmunidad adaptativa, y están implicados en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Gabelloni et al., 2013).

Los neutrófilos se forman y maduran en la médula ósea, a partir de células madre pluripotenciales allí localizadas. Su desarrollo se da a través de 2 fases, la primera es mitótica, en ella las células maduran de mieloblastos a promielocitos y mielocitos, mientras que en la segunda fase no mitótica se desarrollan a metamielocitos, neutrófilos encayado y finalmente neutrófilos maduros. Durante este proceso han adquirido antígenos de superficie y al menos 3 tipos de gránulos citoplasmáticos: azurófilos o primarios que contienen mieloperoxidasa, proteínas catiónicas, defensinas; gránulos secundarios o específicos que contienen lisozima, lactoferrinas, gelatinasas, receptor de fMLP que se expresan en la membrana; y gránulos terciarios que contienen gelatinasas, lisozimas. Todo esto es de gran utilidad para los neutrófilos una vez salgan al torrente sanguíneo y migren a los diferentes tejidos para encontrar, capturar y fagocitar microorganismos

(Barbieri Petrelli, Flores Guillén, & Vignoletti, 2005; Borregaard et al., 2007; Gabelloni et al., 2013).

Diversos estímulos y procesos infecciosos provocan la liberación y posterior migración de los neutrófilos al sitio afectado, tal es el caso de las quimiocinas liberadas por macrófagos o factores quimiotácticos provenientes de patógenos como los lipopolisacáridos presentes en las membranas de las bacterias Gram-negativas (Barbieri Petrelli et al., 2005; Piñol & Paniagua, 1999). Su activación inicialmente incrementa la expresión de moléculas como selectinas e integrinas que modulan y facilitan la adhesión al endotelio del capilar y su posterior extravasación y acumulación en el tejido diana, donde desencadenan complejos procesos de activación celular que incluye, exocitosis de gránulos intracelulares, liberación de citoquinas, fagocitosis de microorganismos, producción de especies reactivas de oxígeno, formación de trampas extracelulares (NETs), entre otros. Además, el LPS induce la producción de IL-8 en otras líneas celulares que no pertenecen al sistema inmunitario y que influyen en la activación de neutrófilos (Chakravorty & Kumar, 1998; Patiño, 2009; Trentini et al., 2014). En presencia de una reacción inflamatoria o proceso infeccioso los neutrófilos pueden sobrevivir hasta 2 días, en ausencia de estos estímulos mueren por apoptosis pocas horas después de su liberación al torrente sanguíneo (Mócsai et al., 2000).

Los neutrófilos son una de las principales líneas de defensa del hospedero, para ello utilizan diversas vías o mecanismos de respuesta que les permiten contrarrestar procesos infecciosos causados por lesiones o por patógenos bacterianos y fúngicos los cuales se resumen a continuación (Mócsai et al., 2000; Toro, 2009).

3.1.1 Mecanismos dependientes de oxígeno

Se caracterizan por la producción de intermediarios reactivos de oxígeno generados por la reducción parcial del oxígeno molecular, proceso conocido como estallido respiratorio, uno de los más conocidos es el complejo multienzimático NADPH (por sus siglas en inglés nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidasa (Trevani et al., 2004). En un neutrófilo en reposo este complejo está inactivo, debido a la separación de sus componentes, ya que tres se encuentran en el citosol ($p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ y $p67^{PHOX}$) y dos como proteínas de membrana ($gp91^{PHOX}$ y $p22^{PHOX}$) conocidas como citocromo b_{558} . Cuando un estímulo activa la enzima los componentes citosólicos migran a la membrana donde se asocian con el citocromo allí presente, lo que da lugar al complejo NADPH oxidasa activo que produce el anión superóxido (O_2^-). Generalmente este anión por su bajo potencial oxidante e inestabilidad no cumple un rol importante en el ataque oxidativo sobre patógenos, sin embargo constituye el principal sustrato para la formación de intermediarios reactivos de oxígeno a través de reacciones espontáneas o con la participación de enzimas (Segal, 2005; Toro, 2009; Trevani et al., 2004; Trevani, Zwirner, Geffner, & Fainboim, 2005).

Las especies reactivas de oxígeno atacan a los microorganismos mediante la lisis al degradar enlaces no saturados, desnaturalizar proteínas, dañar sitios hemo de diferentes enzimas, oxidar los ácidos nucleicos, entre otros mecanismos. En neutrófilos las vías de señalización MAPK cumplen funciones de vital importancia en la regulación de este tipo de respuestas (Patiño, 2009).

3.1.2 Mecanismos independientes de oxígeno

Los mecanismos independientes de oxígeno incluyen diferentes enzimas con actividad microbicida contenidas en los gránulos citoplasmáticos cuya principal función es la destrucción o digestión de microorganismos potencialmente dañinos dentro del fagolisosoma a pHs generalmente ácidos (Borregaard et al., 2007).

En los gránulos primarios se almacenan moléculas con actividad microbicida como las defensinas que combaten patógenos al insertarse en sus membranas y afectar el flujo iónico; la proteína bactericida que aumenta la permeabilidad de la membrana afecta a bacterias Gram-negativas induciendo el reordenamiento de sus lípidos al unirse con los LPS presentes en ella generando un daño tisular letal (Peakman & Vernagi, 2011). Los gránulos secundarios contienen moléculas receptoras preformadas que incrementan la especificidad de la respuesta una vez liberadas en las membranas del neutrófilo, como receptores de complemento y activados por fMLP (R-fMLP), además contienen proteínas como lactoferrina que capta hierro inhibiendo el crecimiento bacteriano (Peakman & Vernagi, 2011; Toro, 2009). Los gránulos terciarios almacenan principalmente gelatinasas como metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) la cual degrada la matriz extracelular facilitando la migración de neutrófilos al tejido afectado y finalmente vesículas secretoras que se caracterizan por un alto contenido de proteínas con actividad fosfatasa (Larocca, Moreno, Garmendia, & De sanctis, 2010).

3.1.3 Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs del inglés *Neutrophil extracellular traps*)

La formación de NETs es un mecanismo de defensa del hospedero contra microbios y virus poco conocido, se trata de estructuras extracelulares en forma de red compuestas por fibras de cromatina nuclear (ADN e histonas) combinada con proteínas de los gránulos (enzimas proteolíticas y péptidos antimicrobianos) las cuales son liberadas minutos después de la activación del neutrófilo, ocasionando su muerte debido a la pérdida del material nuclear. Es una respuesta innata de gran importancia que inmoviliza y destruye microorganismos impidiendo su propagación, sin embargo, su inadecuada regulación puede desencadenar diferentes patologías como la formación de trombos (Kumar, Abbas, & Aster, 2013; Toro, 2009). La liberación de NETs es producida por la activación de receptores específicos que al ser estimulados desencadenan una cascada de señalización mediada por la proteína quinasa C (PKC), la vía ERK $\frac{1}{2}$ y la formación de EROS (Vélez, Rocha, Arias, & López, 2016).

3.2 Señalización en neutrófilos

Todos los procesos de respuesta de los neutrófilos están regulados por múltiples interacciones entre moléculas que desencadenan complejas vías de señalización celular, en donde está involucrada una molécula receptora que reconoce los estímulos y una efectora que desencadena la cascada de señalización. Existen diferentes tipos de receptores expresados en las membranas de estas células como, receptores Fc, receptores de citoquinas, receptores acoplados a proteínas G, moléculas de adhesión como integrinas y selectinas /ligandos de selectina, receptores tipo Toll, entre otros, los cuales normalmente tienen la capacidad de diferenciar entre las moléculas

expresadas por patógenos y las de su hospedero, permitiéndoles reconocer invasiones microbianas o el desarrollo de procesos inflamatorios (Futosi et al., 2013; Segal, 2005).

Mediante las vías de señalización se transmite y se amplifica información proveniente de diferentes estímulos intra y extracelulares, la cual es conducida de la membrana al citoplasma y posteriormente al núcleo donde regulan la expresión génica y actividad metabólica dependiendo de las necesidades de la célula (Carus, 2014; Segal, 2005). Sin embargo, la inadecuada activación de las vías de señalización en neutrófilos puede desencadenar respuestas exacerbadas provocando inflamación crónica y daño tisular que son características claves de diferentes patologías humanas como, aneurismas, artritis reumatoide, aterosclerosis, cáncer, enfermedades cardiovasculares, formación de trombos, etc. (Castañeda, 2010; Pérez, 2008).

En neutrófilos las vías de señalización MAPKs, son de gran interés, debido a que estas normalmente estimulan la división celular, sin embargo, como estas son células maduras que no se dividen cumplen funciones diferentes como la regulación de la apoptosis, degranulación, etc. (Segal, 2005).

Las MAPKs son proteínas serina treonina quinasa altamente conservadas que pueden ser activadas por la unión de factores estimulantes de diferente naturaleza (citoquinas, fMLP, LPS, PAF, TNF- α , etc.) a sus correspondientes receptores, lo que promueve la cascada de señalización mediante la fosforilación de residuos tirosina- treonina específicos (proceso que se realiza mediante la adición ordenada de fosfatos a tirosina y luego a treonina) de las MAPKK quinanas

(MAPKKK, MKKK o MAP3K) posteriormente estas activan las MAPK quinasas (MAPKK, MKK o MAP2K), que finalmente fosforilan la MAPKs. Una vez activadas, las MAPKs pueden actuar fosforilando una gran cantidad de proteínas a manera de transcripción, lo que conduce finalmente a la expresión de diversos genes y productos metabólicos que modulan la respuesta de los neutrófilos (Burboa, 2012; Johnson & Lapadat, 2002). Las proteínas fosfatasa de las MAPKs regulan su actividad, debido a que eliminan los residuos fosfato desactivando el neutrófilo, lo que permite la recuperación de la homeostasis celular (Carus, 2014).

Entre las proteínas pertenecientes a la familia de las MAPKs se encuentran las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares ERK 1/2 y p38 las cuales se explican a continuación (Burboa, 2012).

3.2.1 Vía de señalización ERK 1/2 MAPK

ERK 1/2 MAPK son una familia de proteínas de serina /treonina quinasas (ERK1 p44 kDa y ERK2 p42 kDa) que en neutrófilos juega un rol importante en procesos como la inflamación, granulación, quimiotaxis, adhesión celular, estallido respiratorio, apoptosis, fagocitosis, entre otros, y puede ser activada por diferentes estímulos extracelulares como LPS, fMLP, PAF, GM-CSF y TNF- α (Futosi et al., 2013).

Durante la activación de esta vía los receptores presentes en la superficie del neutrófilo son activados por un estímulo generando una señal que es transmitida mediante diferentes mecanismos

a Ras GTPasas (abundantes en la membrana plasmática) las cuales reclutan y activan mediante fosforilación, homodimerización o heterodimerización las proteínas Raf-1 y B Raf (Raf MAPKKK), que a su vez transmite la señal a MEK 1/2 (MAPKK) fosforilando sus dos residuos de serina, finalmente esta fosforila los residuos treonina serina del dominio treonina-ácido glutámico-tirosina (Thr-Glu- Tyr) de ERK 1/2 (MAPK) permitiendo el paso de la señal a diferentes sustratos localizados en orgánulos celulares, citoplasma o núcleo desencadenando así respuestas específicas dependientes del estímulo inicial. El estudio de mecanismos que permitan modular esta vía son de gran interés debido a que investigaciones indican que fallas en ella favorecen la progresión de tumores (Burboa, 2012; Sáenz, 2015).

3.2.2 Vía de señalización p38 MAPK

La vía p38 MAPKs también conocida como proteínas quinasas activadas por estrés, comprende cuatro isoformas de 38 kDa p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ , en células con actividad inflamatoria como los neutrófilos se sintetiza principalmente p38 α y p38 δ . Esta familia de proteínas puede ser activada por condiciones de estrés en el medio celular, como también por citoquinas inflamatorias y factores estimulantes como LPS, fMLP, PAF, TNF- α , cumpliendo un rol importante en procesos como adhesión, degranulación, apoptosis, liberación de IL8 y citoquinas proinflamatorias, quimiotaxis, estallido respiratorio, etc. (Alemán, 2003; Mócsai et al., 2000; Sáenz, 2015).

Generalmente durante la activación de esta vía participan una gran variedad de MAPKKKs como MLKS, MEK1-4 y ASK1/2 las cuales activan las MAPKKs MEK3, MEK4 y MEK6 que

finalmente fosforilan a p38. p38 genera una gran variedad de respuestas biológicas frente a un determinado estímulo debido a que estas dependen del sustrato fosforilado, como también del sitio en donde se realice este proceso (citoplasma, núcleo u otros orgánulos). Esta vía ha sido utilizada como posible diana terapéutica en el tratamiento de diferentes enfermedades como artritis, por sus funciones en los procesos inflamatorios en los que están involucradas células como los neutrófilos (Alemán, 2003; Burboa, 2012; Rubel, 2012; Sáenz, 2015).

3.3 Extractos vegetales en la regulación de enfermedades inmunológicas

En la actualidad es de gran interés el estudio de extractos vegetales que tengan capacidad de regular la activación de vías de señalización en células inmunológicas como los neutrófilos, debido a que modulan las respuestas de estos frente a un estímulo determinado. A continuación, se mencionan algunas investigaciones que demuestran la importancia de los compuestos presentes en las plantas en la regulación de estos procesos:

Han-Chieh et al. (2007) encontraron que el extracto de etanol de *Evodia rutaecarpa* y sus cuatro componentes bioactivos (deshidroevodiamina, evodiamina, rutaecarpina y sinefrina) tienen actividad antiinflamatoria que podía explicarse por su potencial para inhibir la producción de EROS dependientes de NADPH oxidasa en células como los neutrófilos. Por otro lado, los extractos de *Barleria lupulina* y *Clinacanthus nutans* también poseen efectos antiinflamatorios debido a que inhiben de manera dependiente de la concentración la liberación de mieloperoxidasa y elastasa, la producción del anión superóxido y la quimiotaxis de neutrófilos inducida por fMLP,

posiblemente por que disminuye la actividad de estas células al bloquear diferentes vías de señalización (Wanikiat et al., 2008).

Estudios previos demostraron que los flavonoides presentes en plantas como *Ginkgo biloba* y *Theobroma cacao* modulan la activación de algunas vías de señalización que se desencadenan al ser estimuladas por LPS como las MAPKs, ocasionando una disminución en la liberación de EROS en células fagocíticas como los neutrófilos (Kenny et al., 2009; Pincemail et al., 1987).

Lee et al. (2010) demostraron que el pre y postratamiento con luteolina presente en *Lonicera japónica* posee efectos beneficiosos en la lesión pulmonar aguda inducida por LPS en ratones, debido a que disminuyó la permeabilidad del pulmón y la afluencia de leucocitos a este, sumado a ello atenuó el estallido respiratorio y la quimiotaxis de neutrófilos inducida por fMLP, posiblemente porque bloqueo las cascadas de señalización relacionadas con MEK/ERK y PI3K/Akt vías claves en la activación de este tipo de células.

En el estudio realizado por Zhou et al. (2014) se demostró que el pretratamiento con el dibenzociclooctadieno lignano Schisantherin A aislado de la planta *Schisandra sphenanthera* tiene potentes efectos protectores sobre el síndrome de dificultad respiratoria aguda inducido por LPS en ratones, principalmente porque redujo la actividad de la mieloperoxidasa en células inmunes y el número total de neutrófilos y macrófagos en el fluido bronquioalveolar, además mejoró notablemente los cambios histopatológicos posiblemente porque disminuyo los niveles TNF- α , interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β). Schisantherin A también redujo la activación de

las vías NF- κ B (*nuclear factor kappa B* o Factor nuclear kappa B), ERK, JNK (*c-Jun N-terminal kinase* o Quinasa N-terminal jun) y p38 inducidas por LPS en neutrófilos debido a que posiblemente bloqueo la fosforilación de los sustratos involucrados en el proceso.

Lo anterior revela la importancia de los extractos vegetales en la regulación de la actividad de células inmunes, lo cual es de gran interés debido a que en países como Colombia existen un gran número de especies que han sido poco o no estudiadas y que pueden tener un gran potencial terapéutico (Castro, 2006). *C. candamarcensis* es una planta andina que posee diversas propiedades etnobotánicas muchas de las cuales han sido comprobadas experimentalmente, sin embargo, hacen falta investigaciones que consoliden estos atributos y puedan hacer de ella una planta de interés industrial brindando a futuro un beneficio a la sociedad.

3.3.1 *Carica Candamarcensis* Hook. F. (1875)

C. candamarcensis (sinónimos: *Vasconcellea pubescens*, *Carica pubescens*) pertenece a la familia Caricaceae y es comúnmente conocida como chilacuan, papayo o papayuela de la montaña. Es una planta originaria de los Andes que se distribuye en forma natural desde Panamá hasta Bolivia entre los 2000 y 3000 msnm y como cultivo llega hasta el centro-sur de Chile, siendo cultivada principalmente en localidades costeras protegida contra vientos y heladas (Vidal et al., 2009).

Esta planta se caracteriza por la producción de látex el cual contiene un elevado contenido de papaína que es una enzima proteolítica ampliamente expandida en el mercado debido a su fácil extracción, purificación y producción, además de su gran estabilidad y naturaleza no específica que le permiten degradar diferentes proteínas favoreciendo su uso farmacéutico en el tratamiento de verrugas, mechas, amigdalitis, gripe, gastritis, traumas o inflamaciones producidas por lesiones, preparados para descongestionar las vías respiratorias, elaboración de laxantes y suavizantes faciales, así mismo también se usa con fines industriales en la clarificación de cerveza, curtido de pieles, entre otros (Teixeira, Ribeiro, Gomes, Lopes, & Salas, 2008; Vidal et al., 2009).

Sus frutos de agradable sabor debido a su elevado contenido de azúcares son consumidos directamente y utilizados principalmente en la elaboración de jugos, mermeladas y conservas (Vidal et al., 2009), sumado a esto estudios demuestran que el látex de esta planta posee actividad mitogénica *in vivo* e *in vitro* ayudando en el mejoramiento de quemaduras, además contiene proteasas que pueden ser usadas en la extracción y purificación de ADN (Mena et al., 2011).

3.3.1.1 Antecedentes del tema, potencial terapéutico de Carica candamarcensis Hook. F. (1875)

Existen antecedentes que demuestran la importancia terapéutica de los extractos de *C. candamarcensis*; Estudios previos han demostrado que la fracción proteolítica P1G10 aislada del látex de esta planta estimula la proliferación de las líneas celulares L929 (tejido conectivo de ratón), BHK-21 (riñón de hámster dorado) y MDa-MB231 (adenocarcinoma de mama de mujer)

lo que posiblemente está asociado al incremento de la actividad de la vía ERK 1/2 MAPK (Gomes et al., 2005; Silva et al., 2003). Sin embargo, es importante estudiar la participación de estos extractos en la activación de estas vías en otros tipos de células, debido a que, por los procesos de especialización las respuestas producidas pueden ser diferenciales.

Mena et al. (2011) comprobaron que el extracto acuoso y aceite esencial de la pulpa de frutos maduros de *C. candamarcensis* no poseen efecto mutagénico, genotóxico y citotóxico, aunque es importante realizar más estudios para descartar daños relevantes en el ADN.

Por otro lado, Ralph et al. (2014) demostraron que la fracción P1G10 del látex ejerce un efecto inmunomodulador que ayuda a combatir efectivamente la infección bacteriana causada por *Salmonella typhimurium* en ratones incrementando su probabilidad de supervivencia, además estimula la proliferación y circulación de neutrófilos y leucocitos, relacionado posiblemente con un incremento en la activación de la vía ERK 1/2.

Lemos et al. (2018) encontraron que la fracción CMS-2 derivada de P1G10 de *C. candamarcensis*, modula la expresión de proteínas relacionadas con varios eventos celulares importantes en el proceso de metástasis celular, como la proliferación, supervivencia y motilidad del melanoma metastásico B16-F10 y el melanocito Melan-a, lo cual indica una actividad antimetastásica de esta fracción, ubicándola en la categoría de agente anticancerígeno.

Por lo mencionado anteriormente es de particular interés seguir los estudios con el macerado total y aceite de semillas de frutos maduros de esta planta, pues podrían tener un posible efecto inmunomodulador importante en la disminución de la activación de las vías de señalización MAPK (ERK 1/2 y p38) que juegan un rol importante en la respuesta de los neutrófilos frente a determinados estímulos, que a futuro permitirá el tratamiento de diferentes patologías relacionadas con estas vías.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

✓ Determinar el efecto de los extractos de frutos maduros de *C. candamarcensis* en la fosforilación de ERK1/2 y p38 (MAPK) en neutrófilos aislados de sangre periférica estimulados con LPS de *E. coli* 055:B5.

4.2 Objetivos específicos

✓ Ajustar el protocolo base para realizar un análisis inmunoblot de proteínas ERK1/2 y p38 MAPK de neutrófilos humanos en las instalaciones de la Universidad de Nariño.

✓ Evaluar el efecto del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* en la fosforilación de ERK1/2 y p38 (MAPK) en neutrófilos aislados de sangre periférica estimulados con LPS de *E. coli* 055:B5

✓ Evaluar el efecto del aceite de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis* en la fosforilación de ERK1/2 y p38 (MAPK) en neutrófilos aislados de sangre periférica estimulados con LPS de *E. coli* 055:B5.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño experimental

Para evaluar el efecto de los extractos de frutos maduros de *C. candamarcensis* en la fosforilación de ERK1/2 y p38 (MAPK) se trabajó con 4×10^6 neutrófilos por tratamiento, resuspendidos en 500 μ L de medio HBSS + Ca²⁺ (*Hank's Balanced Salt Solution*) y con 3 concentraciones de macerado total 2,5 (MT1), 1,25 (MT2) y 0,625% (MT3) (con respecto al volumen final) 3 de aceite de semilla 2:100 (AV1), 1:100 (AV2) y 0,5:100 (AV3) μ L aceite de semilla/ μ L de medio. Se realizaron dos tipos de pruebas con los extractos, en la primera, los neutrófilos se incubaron durante 5 minutos a 37 °C para acondicionarlos al medio, posteriormente se incubaron con cada uno de los extractos en las diferentes concentraciones durante 15 minutos. En la segunda prueba, los neutrófilos se acondicionaron al medio, luego se incubaron con cada uno de los extractos en las diferentes concentraciones durante 5 minutos, seguidamente se adiciono 5 μ g/mL de LPS de *E. coli* 055.B5 y se estimuló durante 10 minutos. Para ambos casos la reacción se detuvo por centrifugación a 12000 g durante 1 minutos, después se procedió al aislamiento de proteínas totales y finalmente se realizó un análisis inmunoblot.

Cada ensayo se realizó por triplicado con muestras extraídas de individuos diferentes, en aquellos casos en los que la desviación estándar fue muy amplia se incrementó a 5 repeticiones; además, se contó con un control negativo con HBSS Ca²⁺ y un positivo en el cual se estimularon con LPS de *E. coli* 055.B5 5 μ g/ μ L (Khan et al., 2017).

El detalle de los métodos utilizados para dar cumplimiento a los 3 objetivos planteados se describen a continuación.

5.2 Recolección de los frutos maduros de *C. candamarcensis*

La obtención de las muestras de frutos maduros de *C. candamarcensis* Hook. f. (1875), se realizó mediante un muestreo aleatorio simple a partir de cultivos caseros de zonas rurales del municipio de Pasto departamento de Nariño. Para ello se recolectaron al azar frutos maduros de tamaño variable en por lo menos 12 árboles, verificando que tuvieran una coloración uniforme y que estuvieran libres de patógenos. Posteriormente se empacaron en bolsas plásticas y se almacenaron a 4 °C para su transporte a las instalaciones de la Universidad de Nariño.

5.3 Obtención de extractos de frutos maduros de *C. candamarcensis*

Inicialmente los frutos maduros de *C. candamarcensis* se lavaron con solución de hipoclorito de sodio al 2% para eliminar agentes contaminantes, luego se trabajó las siguientes metodologías para la obtención de cada uno de los extractos, así:

- En el caso del macerado total (MT) los frutos se pesaron y se fragmentaron en trozos pequeños para facilitar su maceración en cápsula de porcelana. El extracto obtenido se

centrifugó a 1000 g durante 30 minutos, y se recuperó el sobrenadante que se filtró en membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en ingles) de 0,45 μ m (Santa Cruz Biotechnology) para asegurar su naturaleza estéril. El filtrado se recolectó en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL los cuales se conservaron a -20°C hasta su posterior uso (Mena et al., 2011). Se preparó macerado total semanalmente con el fin de garantizar su inocuidad y evitar alteraciones en su composición.

- El aceite vegetal de semillas (AV) se obtuvo mediante la técnica de fluidos supercríticos siguiendo el protocolo de Dorado, Hurtado, & Martínez. (2017). Inicialmente las semillas se lavaron y se secaron a 50°C, luego se trituraron y se procedió a realizar la extracción de acuerdo a los parámetros establecidos por Dorado et al. 2017. Este método es similar a la extracción clásica con la particularidad de que se utiliza como agente extractor un fluido supercrítico en lugar de un líquido. Se basa principalmente en el uso de una sustancia, (en este caso dióxido de carbono) por encima de su temperatura y presión crítica. En estas condiciones la sustancia no es ni gas ni líquido, sin embargo posee características de ambos. Para la extracción se conduce el fluido supercrítico a la muestra y posteriormente se libera el compuesto de interés, en este caso el aceite, descomprimiendo el gas mediante el uso de una presión inferior a la crítica. Una vez obtenido el aceite de semilla se filtró en membrana de PVDF de 0,45 μ m (Santa Cruz Biotechnology) para asegurar su naturaleza estéril y se recolectó en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL los cuales se conservaron a -20°C hasta su posterior uso.

Para verificar la inocuidad de ambos extractos, se realizó una siembra de estos en caja Petri con agar nutritivo y se incubó a 37°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se examinaron con el fin de determinar la presencia o ausencia de unidades formadoras de colonias.

5.4 Aislamiento de Neutrófilos

Para realizar los diferentes ensayos se emplearon neutrófilos humanos aislados de sangre periférica de un donante voluntario hombre o mujer que cumplía con los siguientes requisitos: tener entre 20 y 35 años, no estar recibiendo medicación permanente, no haber ingerido alcohol mínimo un mes antes de la donación de sangre, no ser fumador, no presentar enfermedades que puedan producir una respuesta inmune como afecciones infecciosas; a ellos se le explicó la finalidad de la investigación y luego firmaron un formato de consentimiento informado (Anexo 1) acorde con los parámetros de ética de la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Nariño en el marco del proyecto “Evaluación del efecto inmunomodulador de los extractos de frutos maduros de *Carica candamarcensis* asociado a la activación del neutrófilo” código 1061.

Los neutrófilos se aislaron siguiendo el protocolo de Hidalgo et al. (2015) con algunas modificaciones; brevemente, la sangre se obtuvo mediante venopunción y se recolectó directamente en tubos vacutainer ACD (ácido-citrato-dextrosa). El aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica humana se realizó mediante gradiente de Percoll®. Inicialmente la sangre colectada se mezcló con dextrán al 3% en proporción 1:1 invirtiendo el tubo varias veces y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora aproximadamente, hasta que se

observaron claramente 2 fases. Posteriormente, la capa superior se transvaso a un tubo falcón de 15 mL y se centrifugo a 500 g por 6 minutos, el sobrenadante se eliminó mediante aspiración con pipeta de Pasteur, y el pellet que contiene glóbulos rojos residuales, neutrófilos y linfocitos se resuspendió lentamente en PBS citrato (por sus siglas derivadas del inglés *Phosphate Buffered Saline*). A continuación, se preparó una columna de Percoll y se agregó volúmenes iguales de Percoll al 82,5% y luego Percoll al 65%, luego se adiciono la suspensión de células suavemente por las paredes del tubo y se centrífugo a 500 g durante 40 minutos. Finalmente se extrajeron las células de la interface inferior que corresponden a los neutrófilos y se resuspendieron en medio HBSS manteniéndose en hielo hasta su evaluación.

La viabilidad de los neutrófilos se determinó por exclusión con azul tripán al 0,4%, las muestras seleccionadas tuvieron un porcentaje de viabilidad mayor o igual al 90%. Se realizó un recuento celular a las muestras. También se realizó tinción de Wright para determinar la pureza de las muestras, utilizándose aquellas que con purezas iguales o mayores al 90% (Mena et al., 2016)

5.5 Análisis de Western blot

Para determinar las condiciones adecuadas para realizar un análisis inmunoblot de proteínas ERK1/2 y p38 MAPK de neutrófilos humanos se partió del protocolo base de Mena et al. (2014) y se realizaron verificaciones y ajustes en cada una de las etapas del proceso, el proceso con los ajustes se presentan a continuación.

5.5.1 Extracción de proteínas totales

Después de la estimulación de los neutrófilos con los diferentes tratamientos, la reacción se detuvo por centrifugación a 12000 g durante 1 minuto. Posteriormente, las proteínas totales se obtuvieron resuspendiendo el *pellet* de neutrófilos en 60 μ L de tampón de lisis frío (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 50 mM, EGTA 1 mM, NaF 25 mM, NaVO₄ 2 mM, DTT 25 mM, Tritón X-100 1,5%, PMFS 0,1 mM, inhibidores de proteasas (leupeptin, pepstatin, aprotinin 10 μ g/mL) y se mantuvo durante 20 minutos en hielo agitando constantemente en vortex. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 18000 g por 20 minutos a 4° C, se recuperó y transvasó el sobrenadante a un tubo eppendorf de 0,75 μ L, y se conservó a -20° C hasta su análisis.

5.5.2 Cuantificación de proteínas

Las proteínas presentes en la muestra se cuantificaron mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando como proteína estándar albúmina sérica bovina o BSA (*Bovine Serum Albumine*). Para realizar la curva de referencia, se prepararon muestras con 0 (blanco), 1,25, 2,5, 5, 7,5 y 10 μ g/ μ L de BSA, posteriormente se adicionó 1 mL del reactivo de Bradford a cada tubo, y se midió la absorbancia a 595 nm, se verificó la confiabilidad de la curva y para efectos de cuantificación solo se utilizó aquellas que tuviesen un R² superior o igual a 0,95. Para el caso de las muestras a analizar, se tomó 2 μ L de cada una y se adiciono 18 μ L de agua y 1 mL del reactivo de Bradford, finalmente se midió su absorbancia y se extrapoló con la curva de referencia

5.5.3 Separación de proteínas totales mediante electroforesis.

Las proteínas se separaron por electroforesis vertical en geles SDS- poliacrilamida al 12%, mediante el sistema BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra System. El gel separador y el espaciador se prepararon a partir de una solución 30%:0,8% de acrilamida: bisacrilamida con un grosor de 1,5mm. Por cada réplica de los tratamientos se cargaron 100 µg de proteínas totales provenientes de neutrófilos disueltas en buffer de carga 5X (5% de SDS, 50% de glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 50 mM de DTT y 0,125M de Tris-HCl pH 6,8), y se realizó la separación electroforética durante 2 horas a un voltaje constante de 90 V en solución de corrida 25 mM Tris (pH 8,3), 190 mM de glicina y 0,1% de SDS.

5.5.4 Electrotransferencia de proteínas a membranas PVFS

Una vez finalizada la separación electroforética se verificó la carga y separación mediante tinción con azul de coomassie y se procedió a transferir las proteínas a una membrana de PVFS. Para ello sobre el gel a transferir se colocó la membrana, posteriormente, se envolvió por ambos lados con 1 trozo de papel Whatman n°1 y esponjas embebidas en solución o tampón de transferencia (25 mM Tris (pH 8,3), 190 mM glicina, 0,1% SDS, y 20% metanol). Finalmente el montaje se ubicó en una cámara de electrotransferencia que contenía la solución mencionada y se aplicó una intensidad de corriente constante de 200 mA durante 2 horas. Una vez finalizado este periodo, las membranas se utilizaron para inmunodetección.

5.5.5 Inmunodetección

Las membranas se incubaron con 4 mL de solución de bloqueo TBS-Tween 20 (TBS 1X: NaCl 140 mM, Tris 50 mM, Tween-20 0,3% y leche descremada 5%) durante 1 hora, en agitación constante a temperatura ambiente. Después se lavaron 3 veces a temperatura ambiente con TBS-Tween-20 (Tween-20 0.3% en TBS 1X) por 5 minutos cada uno. Posteriormente se incubaron con 4 mL de solución de bloqueo que tenía el anticuerpo específico para cada ensayo (Phospho -p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit mAb #9101 o Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7) Rabbit mAb #9215 diluidos según las recomendaciones del fabricante (*Cell Signaling TECHNOLOGY*) durante toda la noche (12 horas) a 4°C y bajo agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación las membranas se lavaron 3 veces, luego se incubaron con anticuerpo secundario Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody #7074 (*Cell Signaling TECHNOLOGY*) conjugado con peroxidasa en dilución 1:1000 en solución de bloqueo, durante 2 horas bajo agitación constante y a temperatura ambiente. Después, las membranas se lavaron 3 veces y se revelaron por el método de quimioluminiscencia (ECL) utilizando el reactivo *Western Blotting Luminol Reagent* de SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Finalmente, los anticuerpos se removieron de las membranas utilizando solución de stripping (β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7). Para normalizar los resultados las membranas se incubaron inicialmente con el anticuerpo contra β -actina (D6A8) Rabbit mAb #8457 (*Cell Signaling TECHNOLOGY*) y se detectó de manera similar a la descrita anteriormente, debido a que no se pudo visualizar bandas con este anticuerpo, fue necesario trabajar con ERK 1/2 Rabbit mAb 4695S *Cell Signaling TECHNOLOGY* bajo las mismas condiciones señaladas previamente. La densidad de las bandas se determinó con ayuda del software estadístico ImageJ 1.35s.

5.5.6 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos se expresaron en gráficos de barras como media \pm error estándar. El análisis de los datos se efectuó utilizando un test de t o un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de Dunnett en el software estadístico GraphPad Prism v7.0 con un nivel de significancia de 5%.

5.6 Ensayo de supervivencia de neutrófilos

Para garantizar que los resultados obtenidos son derivados de una respuesta de activación de vías de señalización y no de muerte celular se propuso evaluar la supervivencia celular, para ello se trabajó con 5×10^5 neutrófilos resuspendidos en 500 μ L de medio HBSS + Ca^{2+} por ensayo. Inicialmente se incubaron a 37°C durante 5 minutos y se determinó la viabilidad inicial de estos, posteriormente se incubaron con los extractos de frutos maduros de *C. candamarcensis* en las diferentes concentraciones analizadas: Macerado total; 2,5% (MT1), 1,25% (MT2) y 0,625% (MT3). Aceite de semilla; 2:100 (AV1), 1:100 (AV2) y 0,5:100 (AV3) μ L aceite de semilla/ μ L de medio) durante 3 horas, tomando datos de viabilidad cada hora. Los controles positivo y negativo fueron los mismos planteados para los ensayos generales. La viabilidad de los neutrófilos se determinó mediante exclusión con azul tripán 0,4%.

5.7 Actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*

De igual manera y con el fin de contar con elementos adicionales para la discusión se propuso evaluar la actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*, para ello se realizó un ensayo de decoloración con el radical catiónico Acido 2,2'-Azino-bis3-Etilbenzotiazolin-6-Sulfónico (ABTS) siguiendo el método sugerido por Re et al. (1999) con algunas modificaciones. Este método se basa en la capacidad del ABTS para capturar aniones de larga vida. En este caso es oxidado por persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) hasta formar el radical catiónico $ABTS^{+\cdot}$ que se caracteriza por tener una coloración verde-azul intensa, los compuestos que poseen actividad antioxidante reaccionan directamente disminuyendo el color del radical catiónico $ABTS^{+\cdot}$. En esta investigación se realizaron curvas de referencia con Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) y Ácido ascórbico (vitamina C) y posteriormente se hizo la evaluación de 3 concentraciones del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*.

Inicialmente se preparó una solución madre del radical catiónico, disolviendo 50 mg de ABTS (Sigma-Aldrich), en 50 mL de agua desionizada, posteriormente se adiciono 2,45 mg de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y se dejó reaccionar en oscuridad durante 48 horas a 3°C. A partir de esta solución, se prepararon soluciones de trabajo con una absorbancia de $0,750 \pm 0,050$ nm a una longitud de onda de 754 nm para todos los ensayos (Orejuela, 2015).

Para realizar las curvas de referencia, se preparó una solución stock 250 mg/L de metanol, disolviendo 25 mg de ácido ascórbico o Trolox en 100 mL de metanol. A partir de las soluciones madre se prepararon diluciones de 1,5; 3; 6 y 9 mg/L de metanol en el caso de Trolox, y 1; 2,5; 4;

5,5 y 7 mg/L de metanol para ácido ascórbico (Modificado de Orjuela, 2015). Para medir su capacidad antioxidante, a 1,5 mL del radical ABTS^{•+}, se adicionó 0,5 mL de cada una de las diluciones de Trolox o ácido ascórbico; la medición de la absorbancia se realizó cada 30 segundos durante 10 minutos a una longitud de onda de 754 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Para determinar la capacidad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*, se prepararon diluciones al 10 µL/mL (1%), 15 µL/mL (1,5%) y 20 µL/mL (2%); en agua desionizada; posteriormente a 1,5 mL de radical ABTS^{•+} se adicionó 0,5 mL de macerado en cada una de las diluciones evaluadas. La medición de la absorbancia se realizó en las mismas condiciones establecidas para las curvas de referencia. Finalmente se calculó la actividad antioxidante del macerado total de *C. candamarcensis* en equivalente a unidades Trolox (EQTEAC) y en unidades equivalentes a vitamina C (EQTEAC) (Orjuela, 2015).

5.8 Implicaciones éticas

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud Colombiano, en la que se establece una clasificación de las investigaciones según su riesgo para los seres humanos sujetos de investigación (capítulo I, artículo 11), y se estipulan los requisitos éticos para la experimentación con ellos. La presente es una investigación aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Nariño en el marco del proyecto “Evaluación del efecto inmunomodulador de los extractos de frutos maduros de *Carica candamarcensis* asociado a la activación del neutrófilo” código 1061, y catalogada como de riesgo mínimo.

La sangre periférica se extrajo de adultos voluntarios sanos y mentalmente competentes a quienes se les explicó claramente los objetivos del estudio, la naturaleza de los procedimientos, posibles efectos de la intervención o riesgos previsibles. Posteriormente firmaron el consentimiento informado (anexo 1) autorizando su participación en la investigación, con capacidad de libre elección y sin coacción alguna. Las muestras sanguíneas se utilizaron únicamente con fines de investigación. La información obtenida durante el desarrollo del estudio fue de uso exclusivo del personal investigador y se mantendrá en el anonimato al momento de presentar los resultados.

Los frutos maduros de *C. candamarcensis* se recolectaron en cultivos caseros de las zonas rurales del municipio de Pasto, departamento de Nariño, acorde con el decreto 3016 de diciembre de 2013

del Ministerio del Medio ambiente y Desarrollo de Colombia, y la resolución 126 del 23 de febrero de 2015 de Corponariño (Anexo 2)

6. RESULTADOS

6.1 Verificación de la ausencia de bacterias en los extractos de *C. candamarcensis*

Para verificar la ausencia de bacterias en el macerado total y aceite vegetal de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis*, después de la filtración en membrana PVDF de 0,45 μm , se realizó una siembra de estos en caja Petri con agar nutritivo, teniendo como resultado la no presencia de unidades formadoras de colonias (figura 1) en ninguno de los casos.

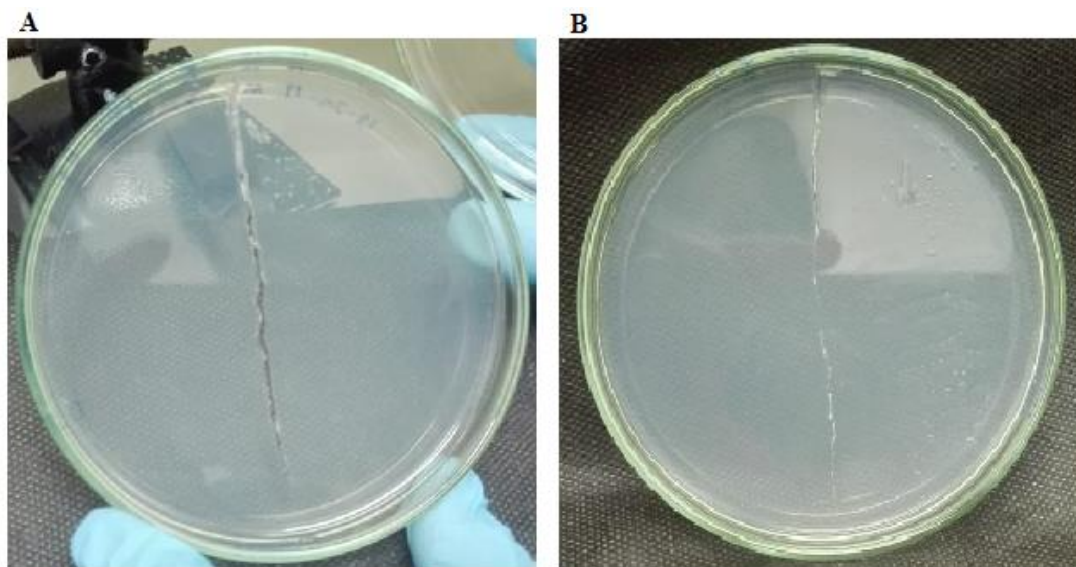


Figura 1: verificación de la ausencia de bacterias de los extractos de *C. candamarcensis* mediante siembra en caja Petri con agar nutritivo. A) Izquierda control (sin siembra), derecha siembra de macerado total. B) Izquierda control (sin siembra), derecha siembra de aceite vegetal de semilla.

6.2 Viabilidad y pureza de neutrófilos.

Los neutrófilos aislados a partir de sangre periférica humana presentaban condiciones adecuadas de viabilidad y pureza, permitiendo realizar los ensayos posteriores (Figura 2)

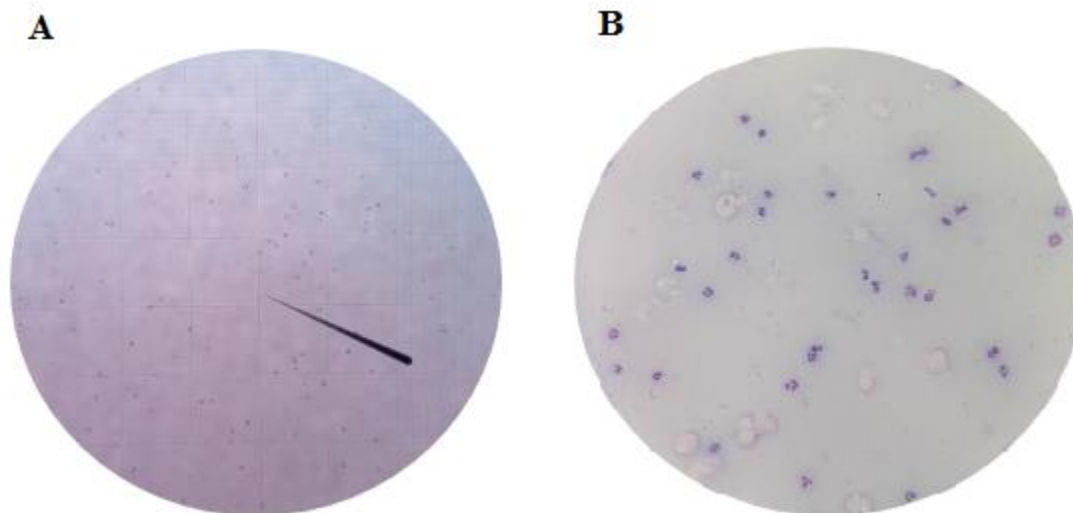


Figura 2: Imágenes de microscopía directa de viabilidad y pureza de neutrófilos aislado de sangre periférica humana. A) Muestras de neutrófilos con una viabilidad superior al 90%, mediante el método de tinción con azul de tripán. B) Pureza de las muestras de neutrófilos superior al 90% mediante tinción de Wright.

6.3 Resultados asociados al cumplimiento del objetivo específico 1

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para realizar un análisis inmunoblot, se siguió el protocolo base de Mena et al., 2014, al cual se le realizaron algunas modificaciones que se mencionan a continuación.

6.3.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas totales inicialmente se tenía planteado el uso de buffer de lisis compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 50 mM, EGTA 1 mM, NaF 25 mM, NaVO₄ 2 mM, DTT 25 mM, Tritón X-100 1,5%, PMFS 0,1 mM, inhibidores de proteasas 10 µg/ml. Sin embargo se utilizó buffer RIPA 1X (de Cell Signaling, contenido: Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 1%, pirofosfato

de sodio 2.5 mM, beta-glicerofosfato de sodio 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 1 µg / ml de leupeptina) al cual se le adicionó inhibidores de proteasas 10 µL/ml (de Cell Signaling, contenido: leupeptin, pepstatin, aprotinin, Bestatin y E64) y PMSF 0,1mM justo antes de su uso.

Después de realizada la extracción de proteínas, estas se cuantificaron mediante el método de Bradford, realizando una curva de referencia con BSA, la cual fue valida cuando el R² fue mayor o igual a 0,98 (figura 3). En general las muestras analizadas tuvieron en promedio 4,49 µg de proteína/µL de muestra, y los valores estuvieron entre 2,260 y 6,773 µg de proteína/µL de muestra, indicando que los reactivos y métodos empleados fueron eficientes.

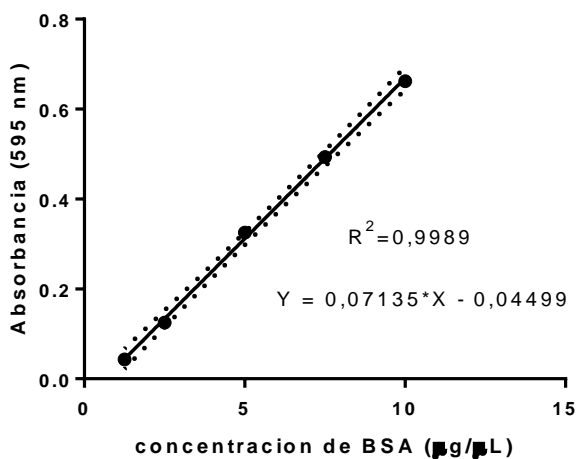


Figura 3: grafica de la curva de referencia realizada con BSA y su ecuación que permite la cuantificación de proteínas presentes en las muestras a analizar. Resultados obtenidos por espectrofotometría en absorbancia de 595 nm

6.3.2 Separación de proteínas totales mediante electroforesis

Para la electroforesis de proteínas inicialmente se siguió la metodología del protocolo de Mena et al. 2014. Sin embargo, debido a que no se obtuvieron buenos resultados bajo estas condiciones,

fue necesario modificar la cantidad de proteína a cargar y la duración de la corrida. Se cargaron en el gel 60, 80 y 100 μ g de proteína y se corrió durante lapsos de tiempo que estuvieron entre 2 y 3 horas a diferente intensidad de corriente (de 80 a 130V). Una vez finalizada la corrida se verificó la carga y separación de proteínas, para lo cual se realizó tinción del gel con azul de coomassie en agitación constante, hasta que se observaron bandas de color azul intenso (figura 4). Teniendo en cuenta estos resultados y con el fin de garantizar una adecuada visualización proteica se determinó cargar 100 μ g de proteína por muestra, realizando la corrida a 80 V, hasta que el buffer de carga llegó al gel separador (entre 30 a 40 minutos), y posteriormente subiendo el voltaje a 110 V hasta que el buffer alcanza el borde inferior del gel separador (2 horas aproximadamente) momento en el cual se dio por finalizada la corrida electroforética.

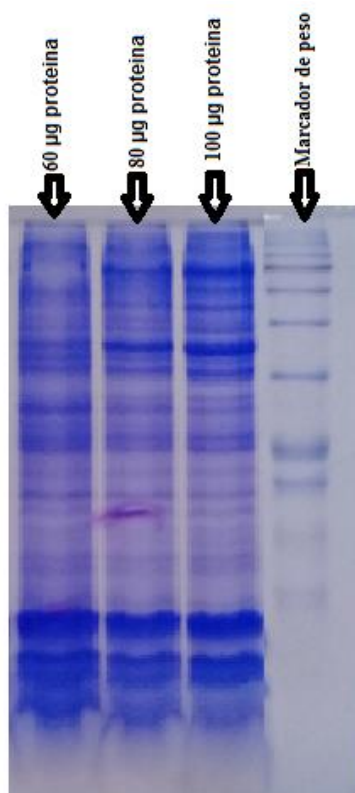


Figura 4: Bandas de proteínas después de la tinción con azul de coomassie y posterior desteñido con solución de metanol al 50%. En la imagen se observa la presencia de proteínas y su correcta separación.

6.3.3. Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF

Teniendo en cuenta que no se usaron membranas de nitrocelulosa, sino de PVDF, fue necesario realizar un pre tratamiento de estas con metanol durante 5 minutos, ya que se caracterizan por ser hidrófobas por lo cual se humedecen con dificultad (Mahmood & Yang, 2012). La modificación anterior permitió una mejor transferencia de las proteínas a la membrana. En los demás pasos del protocolo no se realizó ninguna variación.

Como prueba de que hubo transferencia de proteínas, se verificó la presencia del marcador de peso molecular en la membrana, además se tiñó el gel con azul de coomassie en agitación constante, verificando la no presencia de bandas de coloración azul intensa como se muestra en la figura 5.

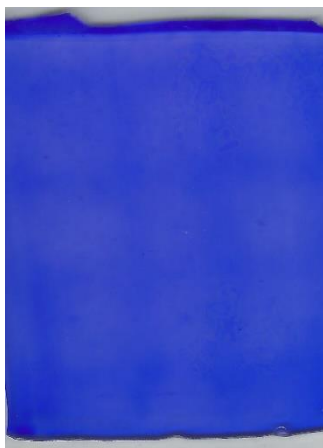


Figura 5: Tinción del gel con azul de coomassie después de la electrotransferencia. Se observa la ausencia de bandas, sugiriendo que las proteínas se transfirieron a la membrana.

6.3.4 Inmunodetección

En el protocolo base para inmunodetección se realizaron modificaciones en el tiempo de revelado de las membranas. Se probaron diferentes tiempos de revelado para cada proteína analizada, observándose bandas claras y definidas con 1 hora de exposición para p-p 38 y p-ERK1/2 y 15 minutos para ERK total.

6.4 Resultados relacionados con el objetivo 2

En cuanto a los resultados del efecto del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* sobre las vías de señalización MAPK, después de la incubación con fosfo ERK 1/2 y con fosfo p 38 se observó la presencia de bandas claras en los controles positivo y negativo, mientras que en los tratamientos con macerado solo en 2 casos se observaron bandas tenues de fosfo ERK 1/2 estando ausentes en los demás (figura 6). Sin embargo, se presentaron inconvenientes con los controles de carga utilizados. Inicialmente se utilizó el anticuerpo contra β -actina, con el cual no se obtuvo ningún tipo de resultados ni en los controles ni en los tratamientos, sugiriendo problemas con el estado del anticuerpo (figura 6). Posteriormente se utilizó ERK total dando como resultado la presencia de bandas solo en los controles (figura 6).

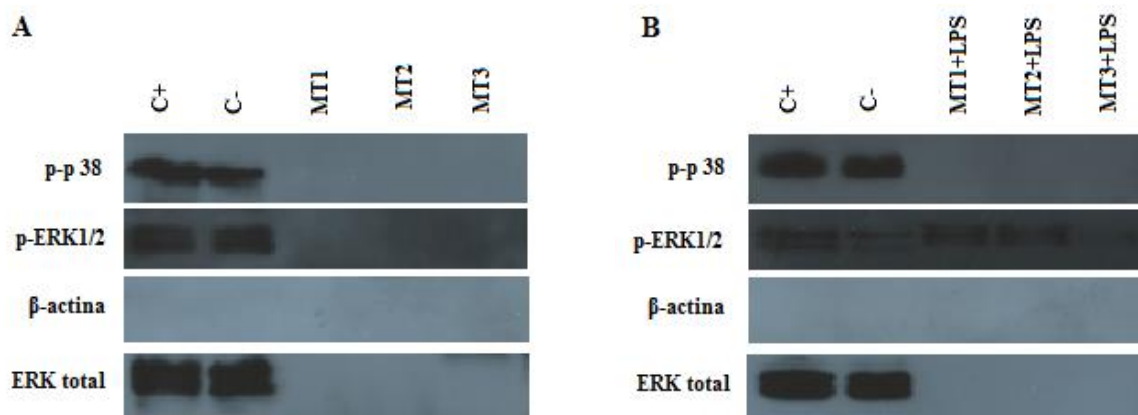


Figura 6: bandas observadas después de la incubación con los anticuerpos y posterior revelado. A) Bandas observadas en los tratamientos con macerado total. B) Bandas observadas en los tratamientos de macerado total + LPS

Posteriormente, se intentó normalizar los resultados se mediante tinción de las membranas con rojo de ponceau (Romero et al., 2010) y con azul de coomassie (Welinder & Ekblad, 2011), sin embargo, no se observó bandeado en los tratamientos ni en los controles, como se observa en la figura 7, haciendo imposible la normalización de los datos con estos métodos.

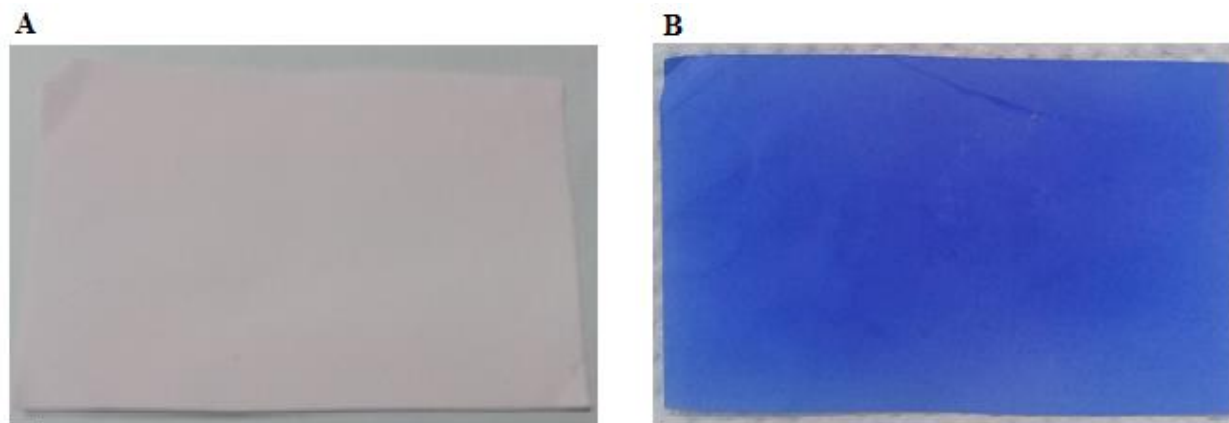


Figura 7: Tinción de membranas. A) Tinción de membranas con rojo de ponceau. B) Tinción de membranas con azul de coomassie. En los 2 casos no se observa bandas de proteínas que permitirán la normalización de los resultados.

Con base en los resultados anteriores realizo nuevamente una corrida electroforética de las muestras, a continuación los geles se tiñeron con azul de coomassie para verificar la presencia de

proteínas, observándose bandas tenues en los carriles de los tratamientos con macerado total en comparación con los controles (figura 8), indicando una posible degradación de proteínas, razón por la cual se decidió incrementar la cantidad del coctel inhibidor de proteasas utilizado para la extracción de proteínas de 1 μL a 10 μL por cada 100 μL de buffer de lisis, sin embargo los resultado obtenidos fueron similares.

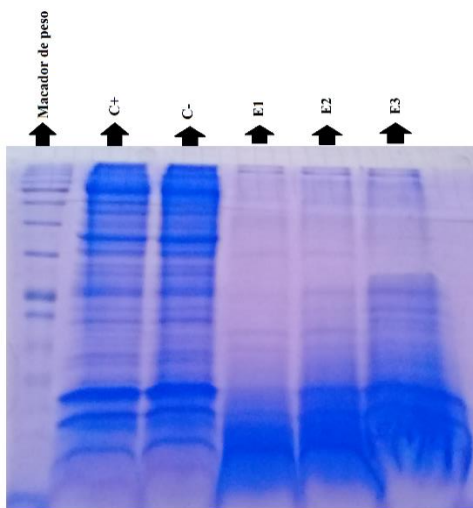


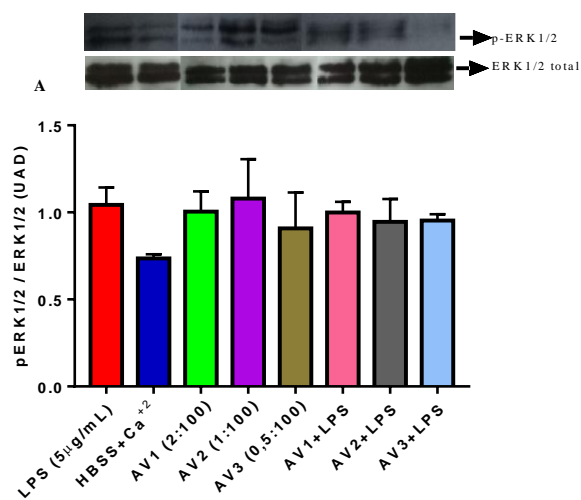
Figura 8: Tinción de geles con azul de coomassie para verificar la presencia de proteínas de neutrófilos tratados con diferentes concentraciones de macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*.

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente, se planteó evaluar la actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* y realizar un ensayo de viabilidad de los neutrófilos tratados con los extractos, los cuales permitieron descartar efectos tóxicos del macerado sobre neutrófilos humanos que pudieran estar influyendo en la obtención y posterior detección de las proteínas objeto de estudio.

Cabe resaltar que las membranas fueron guardadas con la finalidad de normalizar los datos a futuro, cuando se disponga de un control de carga, lo cual permitiría validar los resultados que hasta el momento se han obtenido en esta investigación.

6.5 Resultados relacionados con el objetivo 3

Los resultados acerca del efecto del aceite vegetal de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis* sobre las vías de señalización MAPK se muestran en la figura 9.



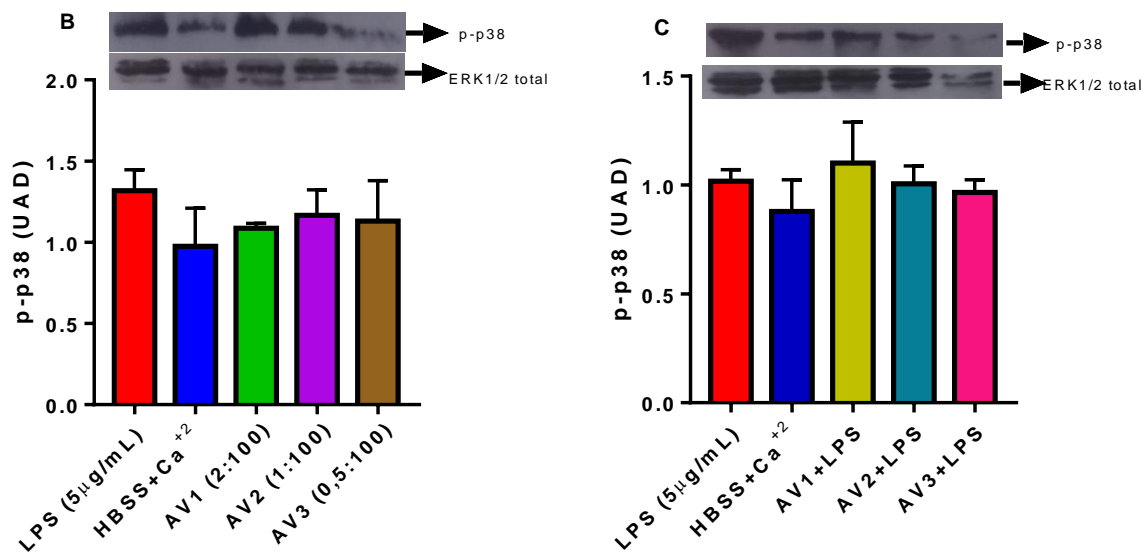


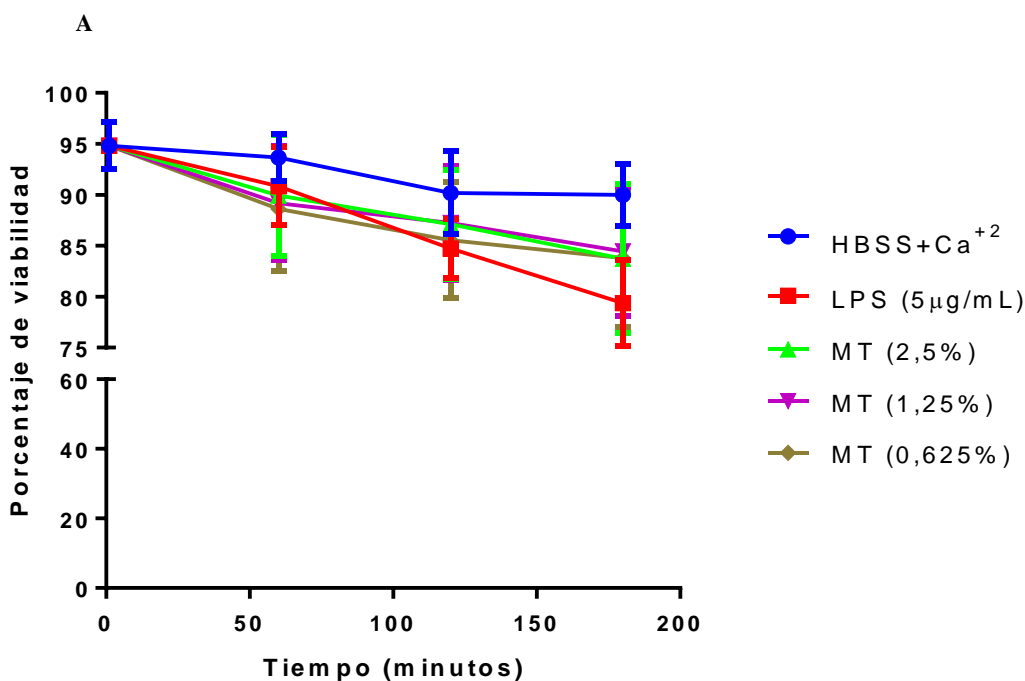
Figura 9: Efecto del aceite vegetal de semillas de fruto maduros de *C. candamarcensis* sobre la fosforilación de las vías de señalización MAPK realizando análisis de densitometría de las bandas presentes en los films. A) Efecto de los diferentes tratamientos sobre la fosforilación de la vía ERK1/2. B) Efecto de los diferentes tratamientos de aceite vegetal de semilla sobre la fosforilación de la vía p38 en neutrófilos humanos. C) Efecto de los diferentes tratamientos de aceite vegetal de semilla sobre la fosforilación de la vía p38 en neutrófilos humanos estimulados con LPS. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, $*p \leq 0,05$ mediante Test Dunnett.

Cabe resaltar que los resultados se normalizaron con ERK total, tanto para p-ERK1/2 como para p-p 38. En cuanto a p-p 38 lo adecuado sería utilizar como control de carga p 38 total o β -actina, sin embargo, por las complicaciones del anticuerpo contra β -actina y la ausencia de bandas en las membranas al ser teñidas con rojo de ponceau y azul de coomassie, se decidió normalizar con ERK total.

6.6 Resultados complementarios

6.6.1 Ensayo de supervivencia de neutrófilos

En cuanto al ensayo de viabilidad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y los demás tratamientos. Sin embargo, se puede observar que las 3 concentraciones de macerado total influyen de manera similar sobre la viabilidad de los neutrófilos, mientras que la viabilidad de neutrófilos con aceite vegetal muestra variaciones más marcadas según la concentración de este. En todos los casos, la viabilidad de los neutrófilos que fueron tratados con los diferentes extractos fue inferior al control negativo y superior al positivo.



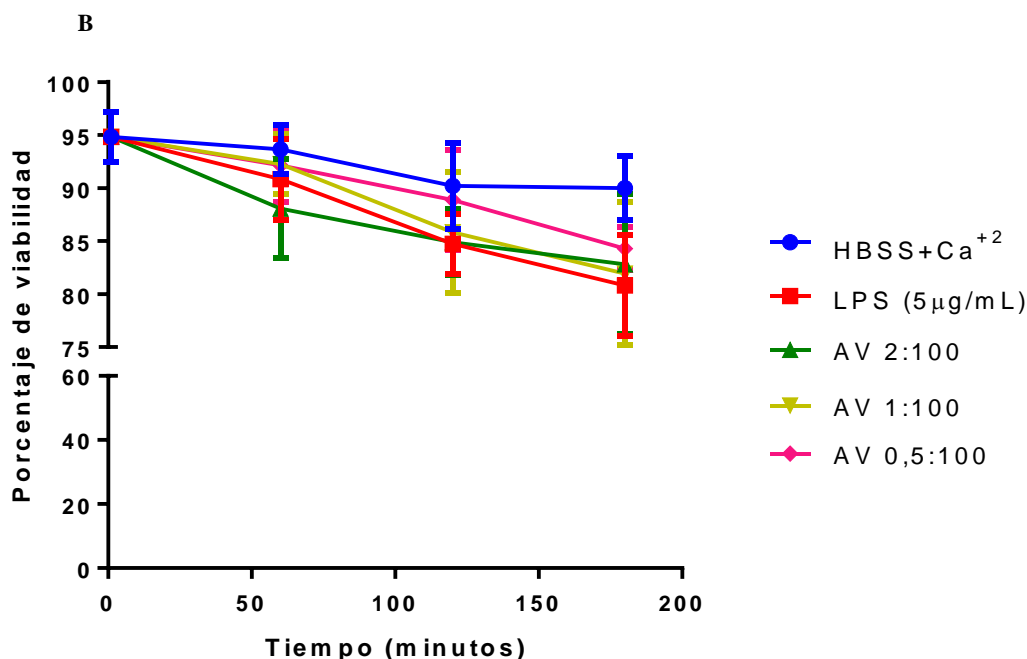


Figura 10: Supervivencia de los neutrófilos humanos tratados con extractos de *C. candamarcensis* A) Efecto de diferentes concentraciones de macerado total sobre la viabilidad de neutrófilos. B) Efecto del aceite vegetal de semilla sobre la viabilidad de neutrófilos humanos. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de 2 vías y se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo (HBSS+Ca²⁺) y el control positivo (LPS 5 µg/mL) a los 180 minutos después de iniciado el ensayo, con un p value = 0,0152

6.6.2 Actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*

En la Figura 11 se muestra la curva de calibración obtenida con Trolox usando diferentes concentraciones (0 mg/L, 1,5 mg/L, 3 mg/L, 6 mg/L y 9 mg/L) y la curva de calibración obtenida con de Ácido Ascórbico (0 mg/L, 1 mg/L, 2,5 mg/L, 4 mg/L, 5,5 mg/L y 7 mg/L). Las curvas tuvieron un $R^2=0,9616$ y $R^2=0,974$ respectivamente, evidenciando la confiabilidad estadística de las mismas.

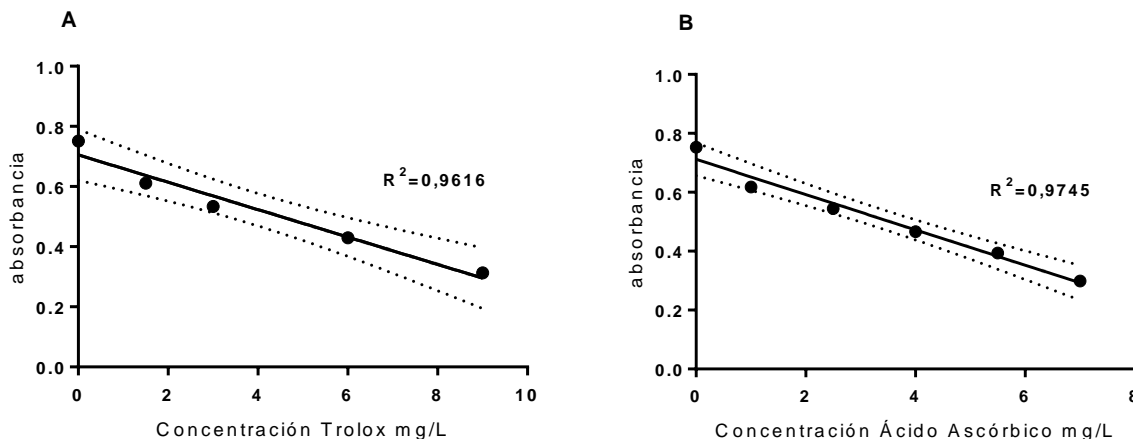


Figura 11: Curvas de Calibración obtenidas mediante el método de decoloración del radical catiónico ABTS, a una longitud de onda de 754nm durante 10 minutos. A. Curva de Calibración de Trolox. B Curva de Calibración de la Vitamina C (Ácido Ascórbico).

Posteriormente se evaluó la capacidad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* en las concentraciones: 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (1%), 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (1,5%) y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (2%); la medición se realizó en las mismas condiciones usadas para generar las curvas de calibración (Protocolo Orejuela, 2015). En la Figura 12 se muestra el comportamiento de la absorbancia durante el tiempo de medición en cada una de las concentraciones evaluadas, confirmando la capacidad antioxidante del macerado, además se evidencia que a mayor concentración mayor inhibición del radical catiónico ABTS evidenciado en la disminución considerable de la absorbancia a través del tiempo.

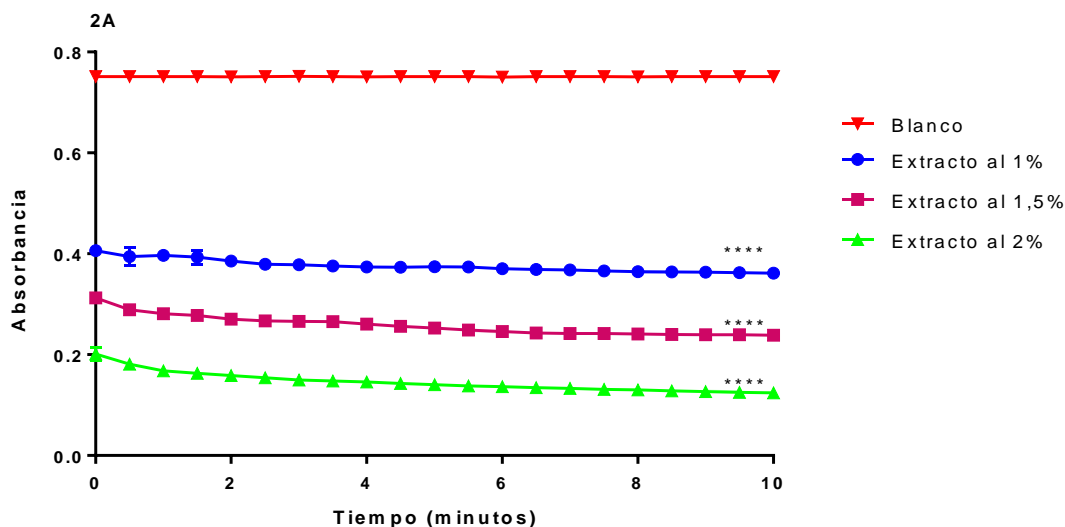


Figura 12: Comportamiento de la reacción del ABTS con las diferentes concentraciones del macerado total de *C. candamarcensis*. Resultados obtenidos por espectrofotometría en absorbancia de 754nm, cada 30 segundos por 10 minutos. Se utilizó como blanco ABTS. Cada línea representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, **** $p \leq 0,0001$ mediante Test de Dunett.

Con base en los resultados anteriores y teniendo en cuenta las ecuaciones derivadas de las curvas de calibración de Trolox y Vitamina C, se determinó para las diferentes concentraciones de macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* la actividad antioxidante en equivalente a Trolox (EQTEAC) y en equivalente a vitamina C (EQVCTEAC). Se encontró que en promedio la actividad antioxidante observada en el macerado total equivale a $0,6978 \mu\text{Mol TEAC/mLFr}$ (Figura 13A) y que la concentración en miligramos de VTEAC por cada mL de fruto maduro de *C. candamarcensis* es equivalente $0,6942 \text{ mg VCTEAC/mLFr}$ (Figura 13B).

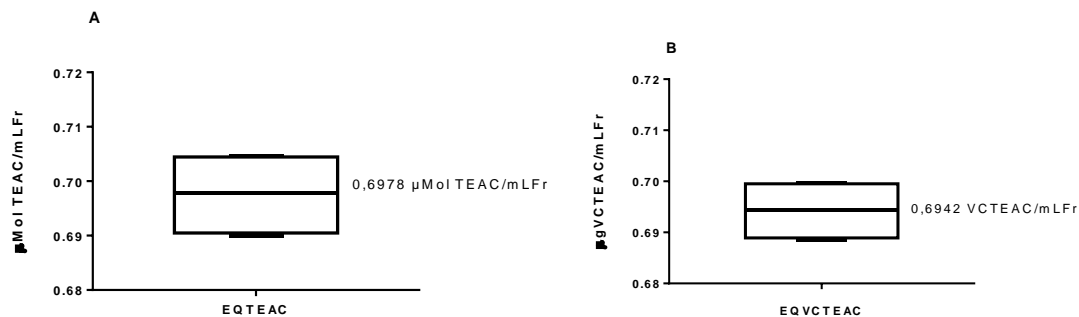


Figura 13. Actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis*. A) Actividad antioxidante en unidades equivalentes a Trolox (EQTEAC) $\mu\text{Mol TEAC/mLFr}$. B). Actividad antioxidante equivalente a Vitamina C (EQVCTEAC) en $\mu\text{gVCTEAC/mLFr}$.

Los resultados de este ensayo fueron sustentados en el en el marco del LIV CONGRESO NACIONAL & V INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, realizado en el Centro de Convenciones de Montería, del 20 -24 de mayo 2019, como ponencia tipo poster (anexo 3)

7. DISCUSIÓN

7.1 Verificación de la ausencia de bacterias en los extractos

La evaluación de la inocuidad de los extractos utilizados en una investigación tiene como objetivo asegurar que estén libres de microorganismo que puedan alterar los resultados obtenidos (Torres, 2006). Extractos no estériles pueden sufrir cambios en su composición debido a factores como el metabolismo de los microorganismos que tiende a transformar las sustancias alterando las propiedades originales de estas más aun cuando se está trabajando con células que hacen parte del sistema inmune y pueden reaccionar rápidamente al estímulo por patógenos presentes en la muestra (Futosi et al., 2013). Además, en la presente investigación al buscar el efecto de los extractos de frutos maduros de *C. candamarcensis* en la fosforilación de vías de señalización MAPK en neutrófilos humanos, la presencia de microorganismos en los extractos puede conllevar a la obtención de resultados erróneos, ya que, se pueden activar estas vías de señalización como mecanismo de respuesta celular para atacar estos organismos, y no por efectos relacionados con los extractos evaluados (Torres, 2006).

7.2 Viabilidad y pureza de neutrófilos

Las adecuadas condiciones de viabilidad y pureza de neutrófilos en las muestras analizadas, influye de manera positiva en la investigación, disminuyendo el riesgo de error en los resultados obtenidos en cada ensayo. Según Segal, (2005), cuando los neutrófilos reconocen un estímulo,

activan diferentes mecanismos (incluida la activación de las vías de señalización MAPK evaluadas en esta investigación) como respuesta al estímulo inicial, que los conduce finalmente a su muerte. Por lo anterior, la baja viabilidad indica que muchos procesos celulares ya han sido activados, por consiguiente, utilizar estas muestras no sería adecuado ya que posiblemente las vías de señalización evaluadas están activadas antes de que se hayan iniciado los respectivos ensayos. Entre los factores que pueden llevar a la obtención de muestras con baja viabilidad celular están la incorrecta aplicación de la metodología de extracción, así como también el uso de muestras sanguíneas de individuos con enfermedades inmunes (Segal, 2005).

Por otro lado, se ha demostrado que otras células como glóbulos rojos y linfocitos también activan las vías de señalización MAPK, en respuesta a estímulos similares a los reportados en neutrófilos (LPS, fMLP, entre otros) (Alarcón, 2010; Etulain, Carestia, Rivadeneyra, Fondevila, & Schattner, 2013). Por lo anterior, el uso de muestras con baja pureza limita la evaluación del efecto de los extractos de *C. candamarcensis* sobre neutrófilos, debido a que, la presencia de otras líneas celulares altera de manera significativa los resultados obtenidos.

7.3. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas es un paso fundamental en investigaciones relacionadas con proteínas, debido a que de su éxito depende la obtención de proteínas conservadas y en cantidad suficiente, que permitan su posterior análisis. El primer paso a considerar es la lisis celular, la cual permite la liberación de los componentes de los diferentes compartimentos intracelulares. Este proceso se debe realizar a bajas temperaturas (4°C), ya que una vez liberadas de la célula las

proteínas se desnaturalizan con mucha facilidad. Un factor que se debe tener en cuenta es que también se liberan diversas proteasas, los cuales sin el tratamiento adecuado empiezan a degradar las proteínas celulares, razón por la cual es importante el uso de inhibidores de proteasas (Tan & Yiap, 2009). En la presente investigación, se utilizó buffer de lisis compuesto por buffer RIPA, coctel inhibidor de proteasas inhibidores y PMFS para garantizar la adecuada calidad y cantidad de proteínas obtenidas.

El buffer permitió la lisis celular de manera eficiente y la solubilización de las proteínas evitando la degradación de estas, gracias a los diferentes compuestos que posee, como es el caso de los agentes quelantes EDTA y EGTA que se unen al Mg^{2+} evitando la degradación de las proteínas por metaloproteinas, además del uso del coctel inhibidor de proteasas que contenía leupeptin (inhibidor de serina y cisteína proteasas, como plasmina, tripsina, papinina y catepsina B; Pepstatina aspartato proteasas), pepstatin (inhibidor de ácido aspártico proteasas), aprotinin (inhibidor de serina proteasas), Bestatin (inhibidor de amino proteasas) y E64 (inhibidor de cisteína proteasa) y PMFS que reacciona con los residuos de serina permitiéndole inhibir la tripsina, la quimotripsina, la trombina y la papaína (Núñez & Encinas, 2011; Tan & Yiap, 2009). Las características de los reactivos mencionadas anteriormente y el protocolo usado permitieron que la extracción de proteínas fuera exitosa, lo cual se verificó mediante la cuantificación de proteínas con el método de Bradford, evidenciando su presencia con concentraciones adecuadas en las muestras analizadas, con un rendimiento proteico promedio de 4,49 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de muestra, permitiendo realizar un adecuado análisis de Western Blot.

7.4 Western Blot

El Western Blot es una técnica analítica, ampliamente utilizada en biología celular y molecular, ya que permite la detección de una determinada proteína en una muestra biológica, esto gracias al uso de anticuerpos que reconocen la proteína de interés mediante la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Además, también se puede confirmar la presencia de modificaciones postranscripcionales como es el caso de la fosforilación, de esta manera se pueden comparar los niveles de proteínas o su estado en una muestra u otra, de allí la importancia de su buen uso, el cual depende del ajuste correcto de los protocolos (de la Fuente, Lozano, & Capdevila, 2007; Mahmood & Yang, 2012; Martínez-Flores et al., 2017).

Una vez realizadas las diferentes modificaciones al protocolo base, se logró la detección de las proteínas objeto de estudio ERK1/2 y p38 mediante la presencia de bandas. Esta técnica demostró ser reproducible, específica y sensible para la detección de estas. Sin embargo es recomendable que los ajustes de esta técnica se realicen en cada laboratorio teniendo en cuenta las condiciones de este y las proteínas que se desee analizar (Kurien & Scofield, 2005).

Para realizar análisis de inmunodetección de las proteínas fosfo-ERK1/2 y fosfo-p38 de neutrófilos se pueden cargar entre 40 a 80 μg de proteína por carril del gel, sin embargo, depende en gran medida de los equipos y reactivos utilizados para su detección (sensibilidad de los anticuerpos primario y secundario, características del gel, membranas, buffer, entre otros) (Alba, 2008; Burboa, 2012; Pérez, 2008). En la presente investigación, el ajuste del protocolo indicó que los mejores resultados se obtuvieron cargando 100 μg de proteína por carril. Aunque la cantidad es superior a la encontrada en la bibliografía, el rendimiento proteico de las muestras analizadas fue

en promedio de 4,49 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y se obtuvo un volumen aproximado de 50 μL en cada una de ellas, siendo suficiente para realizar el análisis inmunoblot, aun en las muestras con menor rendimiento, teniendo en cuenta que la cuantificación proteica estuvo entre 2,26 y 6,773 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

7.4.1 Separación Electroforética

La electroforesis permite la separación de las proteínas mediante la aplicación de un campo eléctrico (Martínez-Flores et al., 2017). En este punto es vital cargar la cantidad correcta de proteínas en el gel, la cual depende de la prevalencia de la proteína de interés en la muestra analizada, así como también de la sensibilidad de los anticuerpos utilizados para su detección. Cuando se carga poca cantidad es posible que el método no detecte la proteína analizada aun cuando esté presente en la muestra, por el contrario la carga de demasiada proteína puede dar lugar a ruido de fondo y ocasionar la unión no específica de los anticuerpos (de la Fuente et al., 2007; Taylor, Berkelman, Yadav, & Hammond, 2013). Lo anterior puede llevar a la obtención de resultados poco confiables, haciendo necesario realizar pruebas preliminares utilizando cantidades seriadas de proteína que permita determinar la cantidad adecuada de proteína a cargar, teniendo en cuenta las características de muestra a analizar y de los materiales y reactivos disponibles (Taylor et al., 2013).

7.4.2 Transferencia

En la presente investigación se utilizó membranas PVDF, debido a que, tienen una elevada capacidad de unión a proteínas y ofrecen una mayor resistencia mecánica en comparación con

otras como las membranas de nitrocelulosa, sin embargo, proporcionan un mayor ruido de fondo y por su naturaleza hidrofóbica se humedecen con dificultad, por lo que requieren de un tratamiento previo con metanol antes de sumergirlas en soluciones acuosas (de la Fuente et al., 2007; Mahmood & Yang, 2012).

Realizar el pre tratamiento con metanol es muy importante, ya que omitirlo puede interferir en el proceso ocasionando que las proteínas no se transfieran a la membrana, tal como ocurrió en ensayos preliminares, en los cuales se comprobó debido a que no hubo transferencia del marcador de peso molecular (de la Fuente et al., 2007).

7.4.3 Inmunodetección

En esta investigación se empleó un método de inmunodetección indirecto, donde se empleó un anticuerpo primario (Phospho -p44/42 MAPK y Phospho-p38) para localizar la proteína de interés, y un anticuerpo secundario (Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody) que permitió su detección mediante el método de quimioluminiscencia. Establecer el tiempo de revelado adecuado para cada proteína objeto de estudio permite la obtención de bandas claras y definidas, este depende de la sensibilidad de los anticuerpos utilizados, la proteína analizada y la cantidad presente en la muestra. El manejo adecuado de los tiempos de detección es importante ya que la intensidad de la señal varía según el tiempo de exposición, produciendo señales leves o nulas cuando se expone por periodos cortos o ruido cuando se expone por periodos muy largos (Mahmood & Yang, 2012).

7.5 Efecto de los extractos de *C. candamarcensis* sobre la fosforilación de vías de señalización MAPK

En la actualidad son de gran interés las investigaciones relacionadas con las propiedades terapéuticas de diferentes extractos vegetales, que permitan la fabricación de productos o fármacos alternativos para el tratamiento de diversas enfermedades, aprovechando los conocimientos empíricos de la sociedad y la gran diversidad de flora que aún no se ha estudiado (Castro, 2006).

C. candamarcensis es una planta originaria de los andes, que se caracteriza por sus propiedades terapéuticas, siendo utilizada tradicionalmente para tratar quemaduras, gripa, gastritis, entre otras patologías (Vidal et al., 2009). Sumado a ello, estudios realizados previamente por Lemos et al. (2018), Mena et al. (2011), Ralph et al. (2014), sugieren un potencial terapéutico de los extractos de esta planta, siendo importante continuar con investigaciones que permitan consolidar sus propiedades.

Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto del macerado total y aceite vegetal de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis* sobre las vías de señalización MAPK en neutrófilos humanos. Los neutrófilos hacen parte de la primera línea de defensa del organismo y participan en el desarrollo de procesos inflamatorios (Borregaard et al., 2007). Las vías de señalización MAPK están íntimamente relacionadas con diferentes mecanismos de respuesta de los neutrófilos frente a un estímulo, siendo importante su regulación, debido a que la inadecuada activación de estas células puede provocar daño celular y enfermedades degenerativas diversas inflamatorias (Castañeda, 2010; Mócsai et al., 2000; Pérez, 2008).

En cuanto al efecto del macerado total, no se pudieron obtener resultados validos con ninguna de las 2 proteínas estudiadas, debido a que, en los controles de carga utilizados (β -actina y ERK total) no hubo presencia de señal, haciendo imposible la normalización de los datos, debido a que, el uso de un control de carga en western blot asegura que se cargó la misma cantidad de proteica en cada carril, que la transferencia de proteínas a la membrana se realizó con la misma eficiencia y que la incubación del anticuerpo y su detección son uniformes en todos los casos (Taylor et al., 2013).

Inicialmente se tenía planteado la normalización con β -actina debido a que es una proteína altamente conservada y se encuentra en elevadas concentraciones en la mayoría de células (Aldridge, Podrebaraca, Greenough, & Weiler, 2008). Sin embargo no se pudo detectar en ninguno de los ensayos, muy posiblemente porque durante su transporte o su conservación no se mantuvo la cadena de frio requerida (-20°C) ocasionando su deterioro. En cuanto a ERK total, se evidenció la presencia de bandas en los controles positivo y negativo, sin embargo, no se observaron en ninguno de los ensayos realizados con macerado total de *C. candamarcensis*.

Otro factor que pudo influir es la posible degradación de proteínas por enzimas proteolíticas presentes en el extracto. Diferentes estudios realizados con *C. candamarcensis* han demostrado que posee diferentes proteínas proteasas, que tienen como función proteger a la planta contra lesiones inducidas por heridas físicas produciendo una barrera frente al ataque de diferentes patógenos. Entre estas proteínas encontramos la papaína presente en el látex de esta planta, la cual tiene una elevada actividad esterasa y proteolítica. Está conformada por diferentes fracciones de

gran interés por sus posibles propiedades farmacéuticas (Baeza, Correa, & Salas, 1990; Teixeira et al., 2008).

La fracción P1G10 derivada del látex de *C. candamarcensis* es rica en cisteína peptidasa con una actividad proteolítica al menos 5 veces mayor que la obtenida a partir de *C. papaya*. Está conformada por alrededor de 14 isoformas, de las cuales CMS2MS2 y CMS2MS3 poseen una elevada actividad mitogénica, debido a que al degradar tejido estimulan el proceso de división celular y remodelación de este (Ralph et al., 2014). Además evidencias demuestran que no posee efectos mutagénicos o genotóxicos cuando se usa tópica o sistémicamente (Anthis et al., 2009; Lemos et al., 2018; Rogério et al., 2013).

En este estudio realizado por Gomez et al. (2010) se evaluó el efecto de P1G10 sobre la quemadura de tercer grado, encontrando que 0.1% de P1G10 acelera la epitelización de manera similar a la sulfadiazina de plata al 1%, posiblemente relacionado con su capacidad para degradar el tejido afectado debido a su elevada actividad proteolítica, induciendo su remodelación. Lemos et al. (2011) confirmaron las acciones curativas de P1G10 (entre 0,1% y 1%) en lesiones de la piel en un modelo de ratón sin pelo, además encontraron que no se produce irritación local o efectos tóxicos sistémicos aun después de un periodo prolongado de uso, esto posiblemente relacionado con su actividad mitogénica.

Por otro lado, diversas investigaciones han demostrado que las enzimas proteolíticas derivadas de plantas, pueden actuar como antitumorales y quimiopreventivos, debido a su gran variedad de actividades biológicas entre las que se encuentran efectos antiinflamatorios, proapoptóticos,

inactivación de citosinas, regulación de la expresión de moléculas de adhesión, inhibición de las proteínas de señalización activadas por mitogénos (Lemos et al., 2018).

Lo anteriormente mencionado está relacionado posiblemente con la degradación de proteínas de neutrófilos durante la lisis celular, indicando posiblemente una elevada actividad proteolítica de las enzimas presentes principalmente en el látex de la cáscara del fruto maduro de *C. candamarcensis* que no pudieron ser inhibidas por el buffer de lisis utilizado, lo cual no permitió el análisis del efecto del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* sobre las vías de señalización MAPK (ERK1/2 y p38) en neutrófilos humanos

Para descartar posibles efectos tóxicos del macerado total sobre los neutrófilos, que estuvieran influyendo en el análisis de inmunoblot, se evaluó la capacidad antioxidante del macerado total, mediante el método de decoloración del radical catiónico ABTS, utilizando las concentraciones similares a las planteadas para evaluar el efecto sobre las vías MAPK. Los resultados evidenciaron que el macerado posee propiedades antioxidantes, indicando que a mayor concentración mayor inhibición del radical catiónico ABTS. Se determinó que la actividad antioxidante en equivalente trolox fue de 0,6978 $\mu\text{Mol TEAC/mLFr}$ y en equivalente a vitamina C de 0,6942 mg VCTEAC/mLFr. Existen evidencias de que extractos de plantas con actividad antioxidante disminuyen respuestas proinflamatorias de neutrófilos como la expresión de TNF α , IL8 e IL7 (Arenas-Chavez et al, 2018), procesos que en neutrófilos pueden estar regulados por la activación de vías de señalización MAPK (Futosi et al., 2013), la ausencia de bandas fosforiladas de ERK1/2

y p38 encontradas en el estudio podrían asociarse al efecto antioxidante detectado en el macerado total.

La capacidad antioxidante de un alimento u extracto está asociada con la presencia de diferentes compuestos, entre los cuales están los compuestos fenólicos, carotenos, antocianinas y ácido ascórbico. (Figueroa et al., 2010). En el estudio realizado por Carrasco & Encina. (2008) se evaluó el contenido de algunos compuestos presentes en 3 frutos maduros de plantas peruanas *C. candamarcensis*, *Physalis peruviana* y *Cyphomandra betacea*, encontrando una mayor cantidad de compuestos fenólicos en *C. candamarcensis*, aproximadamente 167 mg/100 g fruto, además contiene vitamina C (31,41 mg/100g fruto) y una pequeña cantidad de carotenoides (0,71mg/100 g fruto), sugiriendo una relación entre estos y la capacidad antioxidante de *C. candamarcensis*. El macerado total evaluado en esta investigación corresponde a una mezcla compleja, sin embargo, basándose en el anterior estudio y teniendo en cuenta que se trata de la misma especie, muy probablemente estén presentes los compuestos relacionados anteriormente, lo cual explicaría su capacidad antioxidante. No obstante, es necesario profundizar en el tema para determinar que compuestos son los responsables de su potencial antioxidante, ya que pueden tratarse de subespecies debido a la distancia geográfica que las separa.

Estudios previos evidencian la presencia de cumarinas en los extractos de *C. candamarcensis* (Gómez & Morán, 2005). En el estudio de García, Reyes, & Ovalle, (2014) explicó una posible relación entre las propiedades antioxidantes de cumarinas y su efecto en la inhibición de ciertas vías de señalización como las ERK1/2 y p 38 MAPK (García et al., 2014). Resultados similares fueron reportados por otras investigaciones donde se observó la disminución en la fosforilación

MAPK, y la reducción de la expresión génica de COX-2, IL-1 β e IL-6, en diferente tipos celulares entre ellos los neutrófilos; estos efectos pueden asociarse con sus propiedades hipoglicemiantes, antiinflamatorias y a su fuerte efecto antioxidante. Sin embargo su uso indiscriminado puede representar un riesgo para la salud, ya que se han demostrado efectos hepatotóxicos (Gonzales & Orlando, 2008; Yu et al., 2014).

Algunos compuestos como flavonol quercetina y las catequinas que han sido reportados en *Carica papaya* (Rivera-Pastrana, Elhadi, & Gonzalez-Aguilar, 2010; Senthilvel et al., 2013) han evidenciado actividad antioxidante y efectos inhibitorios sobre la vía de MAPK. En el estudio realizado por Chuang et al. (2010) se encontró que el flavonol quercetina atenúa la activación de las vías MAPK ERK1/2 y JNK, además al evaluar la expresión génica de IL-6, IL-1 β , IL-8 y MCP-1 se observó que la secreción de sus respectivas proteínas disminuyó, atenuando la inflamación producida por NF-kB en adipositos humanos. Lo anterior demuestra sus propiedades antiinflamatorias. Por otro lado se ha descrito que las catequinas de *Camellia sinensis*, principalmente la epigallocatequina galato (EGCG) poseen una elevada capacidad antioxidante y modulan la expresión de la hormona resistina producida por las células adiposas, gracias a efectos inhibitorios sobre la vía ERK 1/2, lo cual se demostró mediante los cambios presentados en la cantidad de sustrato fosforilado, encontrando una disminución en la fosforilación de esta vía cuando se trata con EGCG (Liu, Chen, Hung, & Kao, 2005). Además Kim-Park et al. (2016) evaluó el efecto del extracto metanólico de *C. sinensis* y sus principales catequinas, encontrando que inhibían significativamente la actividad de MMP-9 en neutrofilos, asociada a sus potencial antioxidante y posiblemente a la inhibición de algunas vías de señalización que modulan la liberación de MMP-9.

Adicionalmente al evaluar el efecto del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* sobre la viabilidad de neutrófilos humanos, no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo (HBSS+ Ca^{+2}), y los tratamientos con las diferentes concentraciones de macerado total, indicando que no hay efectos negativos sobre la viabilidad en las 3 horas que se realizó el ensayo. Lo anterior, esta posiblemente está relacionado con el efecto protector de los compuestos con capacidad antioxidante presentes en el macerado sobre los neutrófilos (Carrasco & Encina, 2008; Figueroa et al., 2010).

En relación al efecto del aceite vegetal de semillas de frutos maduros de *C. candamarcensis* sobre las vías de señalización MAPK en neutrófilos humanos, se observó un incremento en la fosforilación de ERK1/2 y p38, no dependiente de la concentración. Estos resultados pueden estar relacionados con un proceso conocido como efecto *priming*.

El efecto *priming* está relacionado con la actividad de la NADPH oxidasa y consiste en un proceso mediante el cual los neutrófilos pasan de un estado basal a un estado “*primed*” o “cebado”, que actualmente se conoce como una respuesta mejorada frente a estímulos activadores (Hughes, Stewart, Barclay, & Govan, 1997). Generalmente se ha descrito que los neutrófilos se encuentran en estado de reposo o en estado activado, sin embargo, el estado cebado implica que deben existir algunos estados intermediarios de activación, antes de lograr una activación completa (El-Benna, Dang, & Gougerot, 2008); Hughes et al., 1997). Desde este punto de vista el efecto *priming* indica que los neutrófilos están listos para producir una respuesta frente a un estímulo que permita su activación completa (Miralda, Uriarte, & McLeish, 2017).

Diferentes agentes inducen el estado *priming* en neutrófilos, como es el caso de los agentes inflamatorios fisiológicos como PAF, péptidos formilados como el fMLP en bajas concentraciones, citoquinas proinflamatorias y adipocinas como TNF- α (induce un efecto *priming* intenso), IL-1 β , IL-18 (efecto *priming* leve) y algunos compuestos agonistas de TLR (del inglés *Toll-Like Receptor*) como el LPS (Dewas, Dang, Gougerot, & Benna, 2003; Hughes et al., 1997).

La activación de las vías ERK1/2 y p 38 por parte del aceite vegetal de semillas podría estar relacionada con el efecto *priming* de los neutrófilos, ya que estudios lo han relacionado con la activación parcial de las vías de señalización MAPK, debido que la mayoría de agentes inducen la fosforilación de la tirosina y por ende la activación de estas vías, sin activar totalmente la NADPH oxidasa (Hughes et al., 1997).

Sumado a lo anterior, se demostró que las concentraciones de aceite vegetal de semilla utilizadas en esta investigación no ejercen efectos negativos sobre la viabilidad de los neutrófilos. Relacionando estos resultados con la activación que produce el aceite sobre las vías de señalización, hace pensar que los ácidos grasos que lo componen induce el estado o efecto *priming*, ya que, si estuviera asociado a una activación total de estas células, se hubieran desencadenado diferentes mecanismos de respuesta, como liberación de NETs, estallido respiratorio, apoptosis entre otros, lo cual se hubiera reflejado muy posiblemente en una disminución drástica de su viabilidad (Mócsai et al., 2000; Patiño, 2009).

Los componentes del aceite vegetal de semillas pueden influir de manera diferencial en la fosforilación de p38 y ERK1/2. En el estudio realizado por Masson et al. (2008) Se caracterizaron los componentes presentes en el aceite de semilla de *C. candamarcensis*, encontrando que contiene 72,53% de ácidos grasos monoinsaturados, principalmente ácido oleico (71%), 13,86% de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico 13,16% y linolenico 0,7%) y 13,61% de ácidos grasos saturados como el palmítico (9,53%) y esteárico (3,46%).

Huang et al. (2012) evidenciaron que el laureato y el ácido hexadecanóico (palmítico), activan los receptores NOD, TLR-4 y TLR-2, en parte al inducir fosforilación de las vías ERK, JNK y NF- κ B, resultando en la expresión de COX-2 y TNF- α en macrófagos murinos derivados de la línea RAW264. Además encontraron que activa diferentes vías de señalización corriente abajo del TLR-2 y TLR-4, mediante la activación de ERK, JNK y NF- κ B p65 conduciendo a la síntesis de IL-8 en monocitos humanos. Por otro lado el ácido graso linoléico ácido (9Z,11E)-octadeca-9,11-dienoico, actúa en células dendríticas murinas maduras, induciendo un incremento en la expresión del mRNA y síntesis de IL-10 y del IL-10R, debido a que activa la vía ERK1/2 e inhibe la degradación del I κ B α , dando como resultado la inhibición transcripcional de IL-12 y de otros genes pro-inflamatorios, mediados por la inhibición de la activación de del NF- κ B (Loscher et al., 2005).

Con base en lo anterior se puede evidenciar una posible relación entre los ácidos grasos presentes en el aceite de semilla y la activación de las vías de señalización p 38 y ERK1/2, sin embargo, es necesario caracterizar los componentes del aceite utilizado, debido a que pueden

variar con respecto a los reportados en la literatura, esto podría explicar más claramente el papel de los ácidos grasos sobre estas vías.

8. CONCLUSIONES

- Los ajustes realizados al protocolo de Western blot permitieron la detección de las proteínas objeto de estudio ERK1/2 y p38. Esta técnica demostró ser reproducible, específica y sensible para la detección de estas proteínas.
- El aceite vegetal de semillas de frutos maduros de *Carica candamarcensis* activa la fosforilación de las vías de señalización ERK1/2 y p 38 MAPK en neutrófilos humanos, lo cual está posiblemente relacionado con el efecto priming, que prepara a estas células para producir una respuesta inmediata frente a un estímulo que completa su activación.
- El macerado total de frutos maduros de *Carica candamarcensis* presenta una potencial capacidad antioxidante, relacionada posiblemente con compuestos fenólicos que se encuentran en esta planta.
- El aceite vegetal y el macerado total de frutos maduros de *Carica candamarcesis* no afectan la viabilidad de los neutrófilos indicando la ausencia de efectos tóxicos sobre estas células.

9. RECOMENDACIONES

- Es necesario con los estudios que permitan determinar el efecto del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* sobre la fosforilación de las vías de señalización ERK1/2 y p 38 que permitan el ajuste y normalización de los resultados que se obtuvieron en la presente investigación.
- Se recomienda realizar una caracterización de los compuestos presentes en los extractos de *C. candamarcensis*, que permitan complementar los resultados obtenidos.

10. FINANCIACIÓN

Esta investigación fue financiada por el Sistema de Investigación de la Universidad de Nariño, dentro del macro proyecto titulado “Evaluación del efecto inmunomodulador de los extractos de frutos maduros de *Carica candamarcensis* asociado a la activación del neutrófilo” código 1061 (convocatoria docente).

11. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de actividad antioxidante del macerado total de frutos maduros de *C. candamarcensis* fueron sustentados en el en el marco del LIV CONGRESO NACIONAL & V INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, realizado en el Centro de Convenciones de Montería, del 20 -24 de mayo 2019, como ponencia tipo poster (anexo 3)

12. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, P. (2010). *Efecto de idn 6266, un análogo sintético de andrografolido, sobre las vías de señalización, apoptosis y producción de interleuquina 2 en células t*. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Alba, G. (2008). *Producción de ROS y mecanismos antioxidantes bajo condiciones adversas en neutrófilos humanos: estado hipertensivo y estrés metabólico*. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Aldridge, G., Podrebaraca, D., Greenough, W., & Weiler, I. (2008). The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2), 250–254.
- Alemán, M. (2003). *Papel de los polimorfonucleares neutrófilos en el proceso inflamatorio crónico de la tuberculosis: efecto del Mycobacterium tuberculosis y mecanismos involucrados* (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires.
- Anthi, 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.
- Baeza, G., Correa, D., & Salas, C. (1990). Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51(1), 1–9.
- Barbieri Petrelli, G., Flores Guillén, J., & Vignoletti, F. (2005). El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral*, 17(1), 11–16.
- Borregaard, N., Sørensen, O., & Theilgaard-Mönch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of

- innate immunity proteins. *Trends in Immunology*, 28(8), 340–345.
- Burboa, C. (2012). *Efecto de la estimulación de neutrófilos humanos sobre la activación de células mononucleares de sangre periférica* (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Carrasco, R., & Encina, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de La Sociedad Química Del Peru*, 74(2), 108–124.
- Carus, M. (2014). Métodos de estudio de la inflamación. En F. Blanco, J. Cañete, & J. Pablos (Eds.), *Técnicas de investigación básica en reumatología* (pp. 99–105). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Castañeda, M. (2010). *Identificación de metaloproteinasa 9 (MMP9) por ensayos de Western Blot* (Tesis doctoral). Universidad Veracruzana.
- Castro, S. (2006). *Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Iseritia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana.
- Chakravorty, D., & Kumar, K. (1998). Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria ϕ broblasts favors neutrophil migration and peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1453(1999), 261–272.
- Chuang, C.-C., Martinez, K., Xie, G., Kennedy, A., Bumrungpert, Akkarach Overman, A., Jia, W., & McIntosh, M. (2010). Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human

- adipocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(6), 1511–1521.
- de la Fuente, A., Lozano, J., & Capdevila, E. (2007). Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). *Piel*, 22(5), 252–258.
- Dewas, C., Dang, P., Gougerot, M., & Benna, J. (2003). TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Immunology*, 171(8), 4392–4398.
- Dorado, D., Hurtado, A., & Martínez, H. (2017). Extracción supercrítica de aceite de semillas de papaya (*Carica papaya*): composición y propiedades. *Revista de La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 24(2), 35–45.
- El-Benna, J., Dang, P., & Gougerot, M.-A. (2008). Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in Immunology*, 30(3), 279–286.
- Elejade, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos. *An Med Interna (Madrid)*, 18(326–335), 50–59.
- Etulain, J., Carestia, A., Rivadeneyra, L., Fondevila, C., & Schattner, M. (2013). Mecanismos moleculares involucrados en las respuestas inflamatorias mediadas por plaquetas en acidosis. *Hematología*, 17(1), 15–20.
- Figuroa, C., Henderson, K. J., De La Cadena, R., Colman, R., Muller-Esterl, W., & Bhoola, K. (1992). Immunovisualization of High HK and Low LK Molecular Weight Kininogens on Isolated Human Neutrophils. *Blood*, 79(3), 754–759.
- Figuroa, I., Martínez, M., Rodríguez, E., Colinas, M., Valle, S., Ramirez, S., & Vázquez, C.

- (2010). Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (*Opuntia spp.*) de México. *Agrociencia*, 44(7), 763–771.
- 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.
- Gabelloni, M., Sabbione, F., Iula, L., Keitelman, I., Jancic, C., Giordano, M., & Trevani, A. (2013). Trampas extracelulares de neutrófilos: una novedosa estrategia antiinfecciosa empleando moléculas antimicrobianas largamente conocidas. *Química Viva*, 12(1), 3–13.
- García, D., Reyes, M., & Ovalle, A. (2014). Compuestos bioactivos e inflamación ligada a obesidad. *Revista Chilena de Endocrinología y Diabetes*, 7(1), 21–24.
- Gomes, M., Mello, V., Rodrigues, K., Bemquerer, M., Lopes, M., Faca, V., & Salas, C. (2005). Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. *Planta Medica*, 71(3), 244–248.
- Gómez, D., & Morán, M. (2005). *Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de Carica candamarcensis Hooker filius* (Tesis Doctoral). Universidad de Nariño.
- Gomez, F., Spínola, C., Ribeiro, H., Lopes, M., Cassali, G., & Salas, C. (2010). Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. *Burns*, 36(2), 277–282.
- Gonzales, A., & Orlando, R. (2008). Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutrition & Metabolism*, 5(17), 1–13.
- Han-Chieh, K., Yea-Hwey, W., Kuo-Tong, L., Chi-Ming, C., Chih-Hsiang, C., Wen-Yen, W., ...

- Yuh-Chiang, S. (2007). Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. *European Journal of Pharmacology*, 555(2–3), 211–217.
- Hidalgo, M. A., Carretta, M. D., Teuber, S. E., Zárate, C., Cárcamo, L., Concha, I. I., & Burgos, R. A. (2015). fMLP-Induced IL-8 Release Is Dependent on NADPH Oxidase in Human Neutrophils. *Journal of Immunology Research*, ID 120348, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/120348>
- Huang, S., Rutkowsky, J., Snodgrass, R., Ono, K., Schneider, D., Newman, J., ... Hwang, D. (2012). Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal of Lipid Research*, 53(9), 2002–2013.
- Hughes, J., Stewart, J., Barclay, G., & Govan, J. (1997). Priming of neutrophil respiratory burst activity by lipopolysaccharide from *Burkholderia cepacia*. *Infection and Immunity*, 65(10), 4281–4287.
- Johnson, G., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*, 298(5600), 1911–1912.
- Kenny, T., Shu, S., Moritoki, Y., Keeny, C., & Gershwin, E. (2009). Cocoa Flavanols and Procyanidins Can Modulate the Lipopolysaccharide Activation of Polymorphonuclear Cells In Vitro. *Journal of Medicinal Food*, 12(1), 1–7.
- Khan, M. A., Farahvash, A., Douda, D. N., Licht, J., Grasemann, H., Swezey, N., & Palaniyar, N. (2017). JNK Activation Turns on LPS- and NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. *Scientific Reports*, 7(3409), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03257-z>
- 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.
- Kumar, V., Abbas, A., & Aster, J. (2013). Inflamación y reparación. En V. Kumar, A. Abbas, & J. Aster (Eds.), *Patología humana* (pp. 29–73). Barcelona, España: Elsevier.
- Kurien, B., & Scofield, R. (2005). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293.
- Larocca, N., Moreno, D., Garmendia, J., & De sanctis, J. (2010). Niveles séricos de Metaloproteinasa 9 (MMP-9) y del inhibidor tisular de MMP tipo 1 (TIMP-1) en pacientes venezolanos con asma o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). *Revista Facultad de Medicina*, 33(1), 6–10.
- Lee, E., Kim, J., Kim, H., Lee, J., & Kang, S. (2010). Phenolic constituents from the flower buds of *Lonicera japonica* and their 5-lipoxygenase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 120(134–139).
- Lemos, F., Dittz, D., Santos, V. G., Pires, S., Andrade, H., Salas, C. E., & Lopes, M. (2018). Cysteine Proteases from *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*) Inhibit Melanoma Metastasis and Modulate Expression of Proteins Related to Proliferation, Migration and Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2846), 1–19.
- Lemos, F., Ferreira, L., Cardoso, V., Cassali, G., Salas, C., & Lopes, M. (2011). Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. *European Journal of Dermatology*, 21(5), 722–730.
- Liu, H.-S., Chen, Y.-H., Hung, P.-F., & Kao, Y.-H. (2005). Inhibitory effect of green tea (–)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on the ERK pathway. *Endocrinology and Metabolism*, 290, 273–281.

- Loscher, C., Draper, E., Leavy, O., Kelleher, D., Mills, K., & Roche, H. (2005). Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. *Journal of Immunology*, *175*(8), 4990–4998.
- Mahmood, T., & Yang, P. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429–434.
- Martínez-Flores, K., Salazar-Anzures, A., Fernández-Torres, J., Pineda, C., Aguilar-González, C., & López-Reyes, A. (2017). Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigación En Discapacidad*, *6*(3), 128–137.
- Masson, L., Camilo, C., Gonzalez, K., Caceres, A., Neuza, J., & Torija, E. (2008). New Sources of Oilseeds from Latin American Native Fruits. *Natural Product Communications*, *3*(3), 357–362.
- Mena, J. (2014). *Participación del receptor GRP40/FFAR1 en la activación de vías de señalización intracelular y mecanismos no oxidativos en neutrófilos de bovino* (Tesis Doctoral). Universidad Austral de Chile.
- Mena, J., Embus, C., Rosero, V., Navarro, J., Ortíz, I., & Yépez, M. (2011). Ausencia de efecto citotóxico, mutagénico y genotóxico del extracto acuoso y aceite esencial de *Carica candamarcensis* hook. (Plantae: Caricaceae). *Actualidades Biológicas*, *33*(95), 153–164.
- 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.
- Miralda, I., Uriarte, S., & McLeish, K. (2017). Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil

- Priming. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(217), 1–13.
- Mócsai, A., Jakus, Z., Vántus, T., Berton, G., Lowell, C., & Ligeti, E. (2000). Kinase Pathways in Chemoattractant-Induced Degranulation of Neutrophils: The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activated by Src Family Kinases. *The Journal of Immunology*, 164(8), 4321–4331.
- Núñez, Ó., & Encinas, A. (2011). Inhibidores de la proteasa o inhibidores de la polimerasa en el tratamiento de la hepatitis C crónica. *Terapia de Futuro*, 10(3), 126–132.
- Orejuela, 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)*.
- Patiño, P. (2009). Estructura y función de la respuesta inmune. En P. Rugeles, P. Patiño, & C. Montoya (Eds.), *Inmunología una ciencia activa* (pp. 73–76). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Peakman, M., & Vernagi, D. (2011). Inmunidad innata o natural II: mecanismos celulares. En M. Peakman & D. Vernagi (Eds.), *Inmunología: básica y clínica* (pp. 23–31). Barcelona, España: Elsevier.
- Pérez, F. (2008). *Rol del calcio en la liberación de metaloproteinasa-9 en neutrofilos humanos inducidos por fMLP*. Universidad Austral de Chile.
- Pincemail, J., Thirion, A., Dupuis, M., Braquet, P., Drieu, K., & Deby, C. (1987). Ginkgo biloba extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes. *Experientia*, 43(2), 181–184.
- Piñol, F., & Paniagua, M. (1999). Mediadores bacterianos de la inflamación en la gastritis crónica por *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*, 38(4), 276–283.

- Ralph, M., Silva, A., Laise, D., Oliveira, D., Farias, D., Gomes-Filho, M., ... Lima-Filho, J. (2014). Peptidases from Latex of *Carica candamarcensis* Upregulate COX-2 and IL-1 mRNA Transcripts against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium-Mediated Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–8.
- 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)
- Rivera-Pastrana, D., Elhadi, Y., & Gonzalez-Aguilar, G. (2010). Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage. *Society of Chemical Industry*, 90, 2358–2365.
- Rogério, B., Braga, A., Filho, M., Carvalho-Tavares, J., Agero, U., Graças, M., ... Lopes, M. (2013). The thrombolytic action of a proteolytic fraction (PIG10) from *Carica candamarcensis*. *Thrombosis Research*, 131, 175–182.
- Romero, I., Ocón, B., Martínez, P., Suárez, M., Zarzuelo, A., Martínez, O., & Sánchez, F. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry*, 401(2), 318–320.
- Rubel, C. (2012). *Modulación de la funcionalidad y sobrevida de neutrófilos humanos por fibrinógeno a través de beta sub 2 integrinas: análisis de los caminos transduccionales involucrados* (Tesis Doctoral). Universidad de Buenos Aires.
- Sáenz, F. J. (2015). *Modulación de LXR α por polifenoles y ácido oleico mediada por proteínas quinasas en células fagocíticas humanas*. Universidad de Sevilla. Retrieved from

<https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/26779>

- Segal, A. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, 23, 197–223.
- Senthilvel, P., Lavanya, P., Murugan, Kalavathi Swetha, Rayapadi Parimelzaghan, A., Bolsa, S., Sarveswari, S., Vijayakumar, V., ... Anbarasu, A. (2013). Flavonoid from *Carica papaya* inhibits NS2B-NS3 protease and prevents Dengue 2 viral assembly. *Bioinformation*, 9(18), 889–895.
- Silva, C., Gomes, M., Ferreira, R., Rodrigues, K., do Val, C., Lopes, M., & Salas, C. (2003). A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Planta Medica*, 69(10), 926–932.
- Tan, S., & Yiap, B. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–10.
- Taylor, S., Berkelman, T., Yadav, G., & Hammond, M. (2013). A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Molecular Biotechnology*, 55(3), 217–226.
- Teixeira, R., Ribeiro, H., Gomes, M.-T., Lopes, M., & Salas, C. (2008). The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 956–961.
- Toro, M. (2009). La respuesta inflamatoria. In M. Rugeles, P. Patiño, & C. Montoya (Eds.), *Inmunología una ciencia activa* (pp. 110–114). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Torres, M. (2006). *Análisis microbiológico de materias primas utilizadas en la elaboracion de productos naturales en una industria colombiana*. Pontificia Universidad Javeriana.
- 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>
- Trevani, A., Giordano, M., Salamone, G., Vermeulen, M., Gamberale, R., & Geffner, J. (2004). Modulación de la actividad del neutrófilo en el foco inflamatorio. Mecanismos moleculares involucrados. En G. Rabinovich (Ed.), *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina: un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica* (pp. 128–131). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Trevani, A., Zwirner, N., Geffner, J., & Fainboim, L. (2005). Inmunidad innata: neutrófilos, macrófagos y células natural killer. En L. Fainboim & J. Geffner (Eds.), *Introducción a la inmunología humana* (pp. 61–63). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Vélez, G., Rocha, Y., Arias, A., & López, J. (2016). Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs). *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(1), 43–56.
- Vidal, L., Finot, V., Mora, K., & Venegas, F. (2009). Características Físico-Químicas del Látex de Papayuelo (*Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae). *Información Tecnológica*, 20(6), 93–103.
- Wanikiat, P., Panthong, A., Sujayanon, P., Yoosook, C., Rossi, A., & Reutrakul, V. (2008). Los efectos antiinflamatorios y la inhibición de la respuesta de los neutrófilos por extractos de *Barleria lupulina* y *Clinacanthus nutans*. *Revista de Etnofarmacología*, 234–244.
- Welinder, C., & Ekblad, L. (2011). Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 1416–1419.

Yu, W., Wang, H., Ying, H., Yu, Y., Chen, D., Ge, W., & Shi, L. (2014). Daphnetin attenuates microglial activation and proinflammatory factor production via multiple signaling pathways.

International Immunopharmacology, 21(1), 1–9.

Zhou, E., Lia, Y., Weia, Z., Fu, Y., Lei, H., Zhang, N., ... Xie, G. (2014). Schisantherin A protects lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in mice through inhibiting

NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *International Immunopharmacology*, 22(1), 133–

140.

13. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONANTES DE SANGRE PERIFERICA

Este Formulario de Consentimiento Informado se dirige a hombres y mujeres mayores de edad que de manera voluntaria desean donar 5 ml de sangre para aislar neutrófilos necesarios para el desarrollo de la investigación: “**Evaluación del efecto inmunomodulador de los extractos de frutos maduros de *Carica candamarcensis* asociado a la activación del neutrófilo**”

Nombre del Investigador Principal: Jaqueline Mena Huertas

Nombre de la Organización: Universidad de Nariño

Nombre del Patrocinador: Departamento de Biología – Grupo de investigación Salud Publica
Entidad Financiadora: Vicerrectoría de Investigaciones – CESUN (Universidad de Nariño).

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del Documento completo de Consentimiento Informado

PARTE I: Información General

Introducción

Nos gustaría invitarte a participar en un estudio científico que pretende evaluar algunas propiedades de los extractos de los frutos maduros de “Chilacuan”; este estudio se realizará en la Universidad de Nariño con apoyo científico del Centro de Estudios en Salud y el Departamento de Biología de la Facultad de ciencias de la Universidad de Nariño.

Particularmente, este estudio pretende evaluar el efecto de extractos de frutos maduros de Chilacuan sobre neutrófilos aislados de sangre humana, pues los neutrófilos son las primeras células de defensa de nuestro organismo y el efecto que tengan estas sustancias sobre la liberación de algunas moléculas como la matriz metaloproteinasa 9, podría contribuir a formular a futuro un alimento o fármaco que ayude a tener un mejor manejo de procesos inflamatorios, disminuyendo el riesgo de desarrollo de algunas enfermedades como el cáncer gástrico.

Si no entiende, tiene dudas o necesita alguna aclaración en relación a la naturaleza del estudio no dude en preguntarnos, procuraremos despejar sus inquietudes. Recuerde que tampoco tiene que decidir hoy si desea participar en esta investigación, antes de decidirse puede hablar con alguien y/o consultar sobre el tema de investigación hasta que se sienta completamente seguro(a) de participar. Recuerde que su participación es **voluntaria** así que es usted quien decide participar o no en ella sin que esto traiga ninguna consecuencia adversa.

Si decides participar entonces:

- Inicialmente le preguntaremos sobre su salud general y sus hábitos alimenticios.
- Un profesional de salud tomará una muestra de sangre de aproximadamente 5 ml (una cantidad similar a la que se requiere para análisis de laboratorios), de tu brazo. En el procedimiento se desinfectará la zona de toma de muestra, se realizará un pequeño pinchazo y se extraerá la sangre en un tubo vacutainer con anticoagulante; finalmente, se limpiará nuevamente la zona del pinchazo y se hará presión sobre el para estimular la coagulación.
- La muestra obtenida de sangre será procesada inmediatamente para obtener los neutrófilos presentes en ellas y se harán **exclusivamente las pruebas necesarias para esta investigación**. No se almacenará la muestra ni se utilizará para ningún propósito diferente al de esta investigación.

Riesgos: La toma de sangre normalmente **NO** genera ningún riesgo para la salud. Sin embargo, en casos extremos se podría causar una pequeña perforación venosa que podría generar un hematoma (morado), que normalmente desaparece a los pocos días de la toma de muestra. Si hubiese una complicación adicional, puede acudir a nuestro laboratorio y se remitirá a un profesional de salud que se encargue de valorarlo y medicarlo si es necesario; en estos casos los gastos correrán por cuenta del proyecto de investigación.

Molestias: Generalmente las molestias son menores, son similares a las que se presentan al tomar una muestra de sangre para análisis de laboratorios, esto incluye el pequeño dolor durante el pinchazo de la extracción de sangre, y eventualmente la formación de un pequeño hematoma (morado) de normalmente desaparece a los pocos días de la toma de muestra.

Beneficios: Al participar estaría contribuyendo en el desarrollo de conocimiento científico de una planta regional promisoría como lo es el Chilacuan, adicionalmente los resultados podrían contribuir a futuro para sugerir un nuevo alimento y/o farmacéutico derivado de esta planta con potencial de tratamiento preventivo para evitar el desarrollo de cáncer.

Derecho a negarse o retirarse: Usted no tiene por qué tomar parte en esta investigación si no desea hacerlo. Puede dejar de participar en la investigación en cualquier momento que quiera. Es su elección y todos sus derechos serán respetados

A Quién Contactar: Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea hacer preguntas más tarde, puede contactar cualquiera de las siguientes personas:

- Jaqueline Mena Huertas. Docente Universidad de Nariño. Departamento de Biología. Bloque 3, Cuarto Piso, Ciudad universitaria Torobajo. Pasto. e-mail: jmenahuertas@ymail.com Celular: 3168250375

- María Clara Yépez Ch. Docente Universidad de Nariño. Directora Centro de Estudios en Salud Bloque Tecnológico Primer piso. Ciudad Universitaria Torobajo. Pasto. E-mail :
mcych@udenar.edu.co. Teléfono (52) 7312283

PARTE II: Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación un estudio científico que pretende evaluar algunas propiedades de los extractos de los frutos maduros de “Chilacuan”; este estudio se realizará en la Universidad de Nariño con apoyo científico del Centro de Estudios en Salud y el Departamento de Biología de la Facultad de ciencias de la Universidad de Nariño. Para ello haré donación de 5 ml de sangre de la cual se aislarán neutrófilos para este estudio. He sido informado de que los riesgos son mínimos y pueden incluir solo la formación de un moretón en la zona donde se hace la punción para extraer la sangre. Sé que puede que no haya beneficios directos para mi persona y que no recibiré compensación económica alguna. Se me ha proporcionado el nombre de dos investigadores que pueden ser fácilmente contactados usando el nombre, la dirección, el e-mail y el teléfono que se me ha dado de estas personas.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación como donante de sangre y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera.

Nombre del Participante _____

Documento de Identificación _____

Firma del Participante _____

Fecha _____

Nombre del Investigador _____

Firma del Investigador _____

Fecha _____

Día/mes/año

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado _____ (iniciales del investigador/asistente)

Anexo 2. Permiso de Corponariño para la colecta de material vegetal.

Dpto. Jurídico 398

CORPONARIÑO
CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DE NARIÑO

1299

1 2 0 6

103

San Juan de Pasto,

Señor
CARLOS SOLARTE PORTILLA
C. C. No. 12.970.772 de Pasto
Representante Legal de la Universidad de Nariño
Calle 18 Cra 50 Torobajo- Universidad de Nariño
La Ciudad

FOS-TR-VSD-02-2012
UNIVERSIDAD DE NARIÑO
RECTORIA
08 MAR. 2015
Pa. Jurídico
M.A.

Referencia : CITATORIO para la notificación de la Resolución No. 126 del 19 de Febrero del 2015, por medio de la cual se otorga permiso marco de Recolección de Especímenes Silvestres de la Diversidad Biológica con fines de Investigación Científica no comercial.

EXP : IDB 001-14

La presente para solicitar su comparecencia, dentro de los cinco (05) días hábiles siguientes a la recepción de la presente, en la Calle 25 No. 7 Este - 84 Finca Lope vía la Carolina, en las instalaciones de la Oficina Jurídica de CORPONARIÑO Pasto (N), a fin de notificarse personalmente de la Resolución No. 126 del 19 de Febrero del 2015, por medio de la cual se otorga permiso marco de Recolección de Especímenes Silvestres de la Diversidad Biológica con fines de Investigación Científica no comercial.

En caso de no poder hacerlo, podrá una persona autorizada por usted notificarse, exhibiendo autorización escrita y copia de su cédula de ciudadanía. De no presentarse, se procederá mediante notificación por Aviso. Lo anterior en cumplimiento de lo dispuesto en los artículos 67 y 69 de la Ley 1437 del 2011, Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo.

Atentamente,

T

TERESA ENRIQUEZ ROSERO
Jefe oficina Jurídica

Proyecto Roco M.
Revisó: Teresa E.
Aprobó: N.A.

GESTIÓN DOCUMENTAL
Original: Universidad de Nariño
1ª Copia: Expediente
2ª Copia: Archivo central

MAR 03 2015
Pa. Jurídico

Recibido por: _____

CC No: _____ Expedida en: _____

Cargo o parentesco: _____

Fecha: _____

Hora: _____ Lugar: _____

MAR 23 / 2015
Universidad de Nariño
Oficina de Atención al Ciudadano y Corresponsabilidad
4728

PASTO- CALLE 25 No. 7 ESTE-84 FINCA LOPE VÍA LA CAROLINA - PBX 730882-96 - FAX 7309425
IPALES- CARRERA 1A No. 36-30 AV. PANAMERICANA - TEL. 773000 - FAX 773144
TUMACO- TERMINAL MARITIMO - ISLA EL MORRO - TEL. 7272347 - 7273087 - FAX 7273396
TUQUERRES- CARRERA 13 No. 13-26 - 3ER PISO - TEL. 7280586
LA UNION- BIBLIOTECA AURELIO ARTURO TEL. 7255411 - SOTOMAYOR- CENTRO MINERO - TEL. 7287818
www.corponarino.gov.co

Anexo 3. Certificado de ponente.

**ASOCIACIÓN COLOMBIANA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Hace constar que el trabajo titulado

**ACCB-0138 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL MACERADO TOTAL
DE LOS FRUTOS MADUROS DE *Carica candamarcensis* (L)**

Por los investigadores:

Nelly Paola Ordoñez, Jaqueline Mena Huertas, Nathalia Patiño, Luis Ignacio
Gómez Cumbal

Fue presentado en el marco del LIV CONGRESO NACIONAL &
V INTERNACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, realizado en el Centro
de Convenciones de Montería, del 20 -24 de mayo 2019.


Jesús Ballesteros Correa, PhD.
Presidente del Congreso

