

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS BIOQUIMICAS Y
BIOTECNOLOGICAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA



“Determinación del efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) en línea celular de fibroblastos humanos hDFa, análisis de expresión de genes EGF, FGF, PDGF y su efecto en heridas inducidas en *Rattus norvegicus*”

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCION DEL TITULO DE:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

PRESENTADO POR LA BACHILLER: KAREN YRENE PACO MENDIVIL

ASESOR: ING. JOSE MIGUEL CARPIO CARPIO

AREQUIPA-PERU

2017

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	10
ABSTRACT	12
Introducción	14
CAPITULO I.....	16
1. Objetivos	16
1.1 General.....	16
1.2 Específicos.....	16
2. Hipótesis.....	16
CAPITULO II.....	17
2. Marco teórico	17
2.1 Estructura de la piel	17
2.1.1 Epidermis.....	18
2.1.2 Dermis.....	18
2.1.3 Hipodermis	18
2.2 Herida.....	19
2.3 El proceso de cicatrización	19
2.4 Etapas de la cicatrización de heridas cutáneas	21
2.4.1 Hemostasis e inflamación.....	22
2.4.2 Proliferación	22
2.4.3 Remodelación.....	22
2.5 Fibroblastos y producción de la matriz extracelular	23
2.6 Citocinas.....	25
2.6.1 Familia del factor de crecimiento epidermal (EGF)	27
Expresión de EGF en la cicatrización de heridas.....	27
a)	27
2.6.2 Familia del factor de crecimiento de fibroblastos – FGF	27
a) Expresión de FGF en la curación de heridas de la piel.....	28
2.6.3 Familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	28
a) Expresión de PDGF en el sitio de la herida	29
2.7 Tratamiento	30
2.8 Plantas: uso en tratamiento de heridas	31
Metabolitos secundarios que contribuyen a la cicatrización.....	33
2.9.....	33
2.9.1 Flavonoides y su clasificación	33
a) Flavonas	33
b) Flavonoles.....	34
c) Flavanonas.....	35
2.9.2 El efecto de los flavonoides	35
2.9.3 Taninos	35
2.10 Uso de hidrogeles en tratamiento de heridas.....	35
2.10.1 Geles Hidrófobos:	36
2.10.2 Geles Hidrófilos:.....	36
2.11 Matico	37
2.11.1 Aspectos taxonómicos	38

2.11.2	Descripción botánica del matico.....	39
2.11.3	Principales componentes de " <i>Piper aduncum</i> "	40
CAPITULO III		48
3.	Materiales y métodos	48
3.1	Materiales	48
3.1.1	Materiales de vidrio.....	48
3.1.2	Material biológico.....	48
3.1.3	Equipos	48
3.1.4	Otros.....	49
3.1.5	Materiales Químicos.....	49
3.2	Métodos.....	50
3.2.1	Obtención de extracto etanólico liofilizado de " <i>Piper aduncum</i> "	50
a)	Extracción sólido – líquido continua.....	50
b)	Destilación: uso de rotavapor.....	51
c)	Liofilización	53
3.2.2	Formulación del gel con extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i>	56
3.2.3	Cultivo de línea celular hDFa, fibroblastos dermales adultos humanos.....	57
3.2.4	Extracción de proteínas mediante cromatografía líquida de alta performance de fase reversa RP-HPLC 60	
3.2.5	Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem de péptidos trípticos ..	65
3.2.6	Ensayos basados en MTT: evaluación del extracto etanólico liofilizado y sus fracciones proteicas, sobre la proliferación celular	68
3.2.7	Ensayo para evaluación de migración celular. Técnica del rayado.....	69
3.2.8	Extracción del RNA de fibroblastos y análisis de expresión de cDNA mediante RT- qPCR.....	72
3.2.9	Efecto del extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> en modelo de herida inducida en ratas.....	78
3.2.10	Análisis estadístico	81
CAPITULO IV		82
4.	Resultados y discusión	82
4.1	Extracción de proteínas mediante cromatografía líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC)82	
4.2	Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem de péptidos trípticos	83
4.3	Análisis de las secuencias N-terminales mediante BLAST	83
4.3.1	Proteína K1	84
4.3.2	Proteína K2	85
4.3.3	Proteína K3	85
4.3.4	Proteína K4	86
4.3.5	Proteína K5	87
4.4	Evaluación del extracto etanólico liofilizado y sus fracciones sobre la proliferación celular.....	89
4.5	Determinación de la concentración efectiva media EC ₅₀	94
4.6	Determinación de la concentración media inhibitoria IC ₅₀	97
4.7	Determinación de la migración de fibroblastos mediante la técnica del rayado "Scratch"	99
4.8	Análisis de expresión de cDNA mediante RT qPCR	104
4.9	Ensayo de cicatrización en ratas	115
<p>Para este ensayo se trabajó con tres grupos de estudio: un grupo control sin tratamiento, un grupo que fue tratado con el extracto etanólico liofilizado de <i>Piper aduncum</i> y un grupo que fue tratado con el gel formulado a base del extracto, tal como se detalla en la Tabla 4.17. Los animales fueron sacrificados después de 3 y 7 días después de aplicar los tratamientos. Finalmente se realizó un análisis macroscópico de las heridas inducidas y un estudio histopatológico.</p>		
4.9.1	Análisis macroscópico de la herida.....	115

4.9.2	Estudio histológico de la herida.....	117
4.9.3	Parámetros histológicos para evaluar cicatrización	121
a)	Tipo de tejido en herida.....	121
b)	Angiogénesis.....	121
c)	Reepitelización	122
4.10	Discusión	124
CAPITULO V		127
5. Conclusiones.....		127
CAPITULO VI.....		129
6. Recomendaciones.....		129
REFERENCIAS		131



INDICE DE FIGURAS

CAPITULO II

Figura 2.1 Estructura de la piel.....	17
Figura 2.2 Representación de las diferentes etapas de la reparación de heridas.	20
Figura 2.3 Factores de crecimiento en la curación de heridas.....	24
Figura 2.4 Citocinas en el proceso de cicatrización.	30
Figura 2.5 Ilustración esquemática de estudios de plantas en el proceso de cicatrización ..	32
Figura 2.6 La estructura molecular de algunos grupos de flavonoides	34
Figura 2.7 Ilustración de una hoja de matico	38
Figura 2.8 Matico	40
Figura 2.9. Aduncamida.	43
Figura 2.10.- 1,3 dimethoxy-2-acetoxy-5-allybenzeno (r1=r5=h; r2=r4=och3; r3=oac)- propphenylphenoles.....	43
Figura 2.11 Caryophyllene oxide. Terpeno.....	44
Figura 2.12 Stigmasterol. Esteroide.....	44
Figura 2.13 Methylindaretin. Chalcona.....	45
Figura 2.14.- Pinostrobin . (r1=r2=r4=r5=h; r3=ch3) – flavanona,.....	45
Figura 2.15 Methyl 2,2 –dimethyl-2h-1-benzopyran-6-carboxylate	46
Figura 2.16.-1-(1-methylethyl)-4-methyl-3-cyclohexenyl-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-4- hydroxybenzoate. R=h.....	46
Figura 2.17.- Methyl 4-hydroxy-3,5-bis- (3-methyl-2-butenyl)-benzoate.	47
Figura 2.18.- Tocoferol.....	47

CAPITULO III

Figura 3.1 Equipo Soxhlet.....	51
Figura 3.2 Hojas de <i>Piper aduncum</i>	54
Figura 3.3 Equipo de extracción sólido- líquido	54
Figura 3.4 Evaporador rotatorio. Utilizado para evaporación del solvente.....	55
Figura 3.5 Extracto etanólico liofilizado de <i>piper aduncum</i>	55
Figura 3.6 Formulación de gel con extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i>	57
Figura 3.7 Línea celular de fibroblastos dermales adultos humanos.....	58
Figura 3.8 Evaluación de viabilidad celular por medio del método azul de tripán.	58
Figura 3.9 Medio <i>dulbecco's modified eagle's medium</i> (DMEM).....	59
Figura 3.10 Vista en microscopio invertido de la línea celular de fibroblastos dermales adultos humanos. (hdfa)	59
Figura 3.11 Sistema de cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa- RP-HPLC	61
Figura 3.12 Esquema de cromatograma obtenido después de rp-hplc	62

Figura 3.13.- Representación esquemática de la unión de péptidos y proteínas, a matriz de sílica.....	63
Figura 3.14.- Fase estacionaria: c18 (11)	64
Figura 3.15 Analizadores de masa.....	66
Figura 3.16 Espectrometría de masas en tándem.	67
Figura 3.17 Modelo de herida in vitro. Técnica del rayado	70
Figura 3.18 Placa de cultivo celular (12 pozos).	71
Figura 3.19 DMSO (dimetilsulfóxido) solvente utilizado para realizar las diluciones del extracto etanólico de <i>piper aduncum</i>	71
Figura 3.20 Modelo de herida en cultivo de fibroblastos. Técnica del rayado	72
Figura 3.21 Método trizol.....	73
Figura 3.22 Análisis de la expresión de genes mediante PCR.	74
Figura 3.23 Extracción de RNA	77
Figura 3.24: Kit superscript first-strand	77
Figura 3.25 Tiopental sódico administrado antes de la cirugía.	78
Figura 3.26 Modelo de herida en <i>rattus norvegicus</i>	79

CAPITULO IV

Figura 4.1 Cromatograma HPLC.....	82
Figura 4.2 Alineamiento de la proteína K1	84
Figura 4.3 Alineamiento proteína K2.....	85
Figura 4.4 Alineamiento proteína K3	86
Figura 4.5 Alineamiento proteína K4	86
Figura 4.6 Alineamiento proteína K5.....	87
Figura 4.7 Dominios conservados superfamilia sti	88
Figura 4.8 Estructura tridimensional del inhibidor tipo kunitz	88
Figura 4.9 Porcentaje de proliferación con diferentes tratamientos del extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i>	90
Figura 4.10 Porcentaje de proliferación de fibroblastos a las 24, 48 y 72 horas tratados con el extracto etanólico de <i>Piper aduncum</i> a diferentes concentraciones.	91
Figura 4.11 Porcentajes de proliferación de fibroblastos a las 24, 48 y 72 horas tratados con las proteínas K1 y K2	93
Figura 4.12 Gráfica modelo para determinar EC ₅₀	94
Figura 4.13 Gráfica: log de la concentración de extracto vs el porcentaje de proliferación considerando 24 horas de tratamiento. EC ₅₀ = 103.5 µg/ml	96
Figura 4.14 Gráfica: log de la concentración de extracto vs el porcentaje de proliferación considerando 48 horas de tratamiento. EC ₅₀ = 39.54 µg/ml.	96
Figura 4.15 Gráfica para determinar IC ₅₀ . Log (concentración) – respuesta.....	97

Figura 4.16 Gráficas log de la concentración de extracto vs el porcentaje de proliferación a las 72 horas de tratamiento. $Ic_{50} = 200 \mu\text{g/ml}$ 98

Figura 4.17 Monocapa con ralladura a tiempo cero..... 99

Figura 4.18 a: Se observa la monocapa de fibroblastos después de 24 horas de incubación sin tratamiento. B: monocapa de fibroblastos después de 24 horas con $200 \mu\text{g/ml}$ del extracto etanólico 101

Figura 4.19 a: Se observa la monocapa de fibroblastos después de 24 horas de incubación sin tratamiento..... 101

Figura 4.19 b. Porcentaje de cicatrización de herida (migración) con proteína k1 (10 y 50 $\mu\text{g/ml}$) c. Porcentaje de cicatrización de herida con proteína k2 (10 y 50 $\mu\text{g/ml}$) 103

Figura 4.20 Incremento de la expresión relativa de pdgf después de 1 y 3 horas respectivamente con diferentes dosis de extracto etanólico (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$) y proteínas k1 y k2 (50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$). Las barras indican diferencias significativas $p < 0.05$ comparando con el control..... 112

Figura 4.21 Incremento de la expresión relativa de fgf después de 1 y 3 horas respectivamente con diferentes dosis de extracto etanólico (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$) y proteínas k1 y k2 (50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$). Las barras indican diferencias significativas $p < 0.05$ comparando con el control. 113

Figura 4.22 Incremento de la expresión relativa de egf después de 1 y 3 horas respectivamente con diferentes dosis de extracto etanólico (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$) y proteínas k1 y k2 (50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$). Las barras indican diferencias significativas $p < 0.05$ comparando con el control negativo..... 114

Figura 4.23 Componentes inflamatorios día 3: mayor proporción de polimorfonucleares , seguido de edema y fibrina, además de presencia de hiperemia. Tratamiento 1: extracto etanólico liofilizado de *piper aduncum*. 119

Figura 4.24 Componentes inflamatorios día 7: mayor proporción de macrófagos y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, con moderada producción de fibras de colágeno. tratamiento 2: gel con extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*

Figura 4.25 Componentes inflamatorios día 3: mayor proporción de polimorfonucleares, seguido de edema y fibrina, además de presencia de hiperemia. Tratamiento 2: gel con extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*..... 120

Figura 4.26 Componentes inflamatorios día 7: mayor proporción de macrófagos y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, con moderada producción de fibras de colágeno. Tratamiento 2: gel con extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*. 120

Figura 4.27 Evaluación del proceso de cicatrización de la herida..... 121

Figura 4.28 Evaluación de angiogénesis 122

Figura 4.29 Presencia de reepitelización 122

Figura 4.30 Fibroplasia del tejido..... 123

INDICE DE TABLAS

CAPITULO II

Tabla 2.1 Etapas de reparación de la herida.	21
Tabla 2.2 Se enumeran los factores de crecimiento y citoquinas importantes que participan en la cicatrización de heridas.....	26
Tabla 2.3 Ensayo fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de <i>Piper aduncum</i>	41
Tabla 2.4 Componentes identificados en extractos de <i>Piper aduncum</i> obtenidos por diferentes métodos de extracción y solventes.....	42

CAPITULO III

Tabla 3.1 Grupo de estudio	80
----------------------------------	----

CAPITULO IV

Tabla 4.1 Secuencias n-terminales del extracto etanólico de “ <i>Piper aduncum</i> ”.	83
Tabla 4.2 Tabla de porcentaje de proliferación celular.	89
Tabla 4.3 Valores de p-value obtenidos luego de aplicar la prueba estadística anova con el test de dunnett, para las medias obtenidas de los porcentajes de proliferación. Con un nivel de significancia de 0.05.	90
Tabla 4.4 Tabla de porcentaje de proliferación celular.	92
Tabla 4.5 Valores de p-value, obtenidos luego de aplicar la prueba estadística anova con el test de dunnett, para las medias obtenidas de los porcentajes de proliferación. Con un nivel de significancia de 0.05.	92
Tabla 4.6 Datos de las concentraciones aplicadas en el cultivo HDFA y las medias de los porcentajes de viabilidad para la elaboración de las gráficas de ec_{50}	95
Tabla 4.7 Datos de las concentraciones aplicadas en el cultivo HDFA y las medias de los porcentajes de viabilidad para la elaboración de las gráficas de ec_{50}	98
Tabla 4.8 Tabla con los valores del porcentaje de cicatrización	99
Tabla 4.9 Parámetros obtenidos de la prueba estadística anova con el test de dunnet para las medias de los porcentajes de cicatrización. Con un nivel de significancia de 0.05. Ns: no significativo.	100
Tabla 4.10 Resultados del incremento de la expresión del gen PDGF en cultivo hdfa después de 1 hora de tratamiento.	105
Tabla 4.11 Resultados del incremento de la expresión del gen PDGF en cultivo hdfa después de 3 horas de tratamiento.....	106
Tabla 4.12 Resultados del incremento de la expresión del gen FGF en cultivo hdfa después de 1 hora de tratamiento.	107
Tabla 4.13 Resultados del incremento de la expresión del gen FGF en cultivo hdfa después de 1 hora de tratamiento.	108

Tabla 4.14 Resultados del incremento de la expresión del gen EGF en cultivo HDFA después de 1 hora de tratamiento.	109
Tabla 4.15 Resultados del incremento de la expresión del gen EGF en cultivo hdfa después de 3 horas de tratamiento.....	110
Tabla 4.16 Valores de p-value, obtenidos luego de aplicar la prueba estadística anova con el test de dunnett, para las medias obtenidas del aumento de la expresión de los genes EGF , FGF, PDGF con un nivel de significancia de 0.05.....	111
tabla 4.16 Grupos de estudio	115
tabla 4.18 Análisis macroscópico	116
tabla 4.18 Estudio histológico de la herida.....	118



RESUMEN

Las heridas crónicas y no cicatrizadas representan una elevada incidencia en la población a nivel mundial. El proceso de cicatrización involucra interacciones complejas entre células y diversos factores de crecimiento que estimulan el proceso de reparación. El extracto etanólico de *Piper aduncum* ha sido utilizado a través de los años como cicatrizante en la Amazonia Peruana. Estudios previos evidenciaron su contenido de flavonoides, alcaloides, saponinas y taninos, los que estarían implicados en su función cicatrizante. El presente trabajo permitió evaluar el efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Piper aduncum* y de las proteínas purificadas que contiene en la línea celular de Fibroblastos Dermoales Adultos Humanos (hDFa), así como su efecto *In vivo* en heridas inducidas en ratas (*Rattus Norvegicus*). Para este fin las hojas de *Piper aduncum* fueron colectadas y llevadas a sequedad, luego se obtuvo el extracto etanólico mediante la técnica de extracción sólido-líquido utilizando un equipo Soxhlet, se utilizó como solvente etanol, el extracto fue concentrado y liofilizado. Se purificaron las proteínas contenidas en el extracto mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Fase Reversa RP-HPLC, además mediante espectrometría de masas en tándem de péptidos trípticos (MALDI-TOF-TOF) se identificaron las secuencias *N*-terminales de las 5 proteínas purificadas las que fueron denominadas K1, K2, K3, K4 y K5. Se determinó el efecto del extracto liofilizado y de las proteínas K1 y K2 en la proliferación y migración de fibroblastos en cultivo *In vitro*, obteniéndose un incremento significativo comparado a los controles negativos. Así mismo se analizó la expresión de los factores de crecimiento: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa a tiempo real (RT- qPCR), en fibroblastos, de esta manera se comprobó que el extracto y las proteínas K1 y K2 incrementan la expresión de estos genes relacionados al proceso de cicatrización. Finalmente para los análisis *In vivo* (*Rattus norvegicus*) se aplicó el extracto liofilizado y una formulación en gel en heridas inducidas en ratas, posteriormente se evaluó el proceso de cicatrización mediante análisis histológico; en este ensayo se comprobó que el extracto en

sus formas liofilizada y gel favorecen la reepitelización, la angiogénesis y fibroplasia en las heridas inducidas en ratas comparada con un control negativo. Finalmente los resultados demuestran que el extracto etanólico de *Piper aduncum* y las proteínas K1 y K2 tienen un efecto cicatrizante.

Palabras Clave: Cicatrización de heridas, Piper, proliferación celular, migración celular, espectrometría de masas.



ABSTRACT

Chronic and non-healed wounds represent a high incidence in the world population. The healing process involves complex interactions between cells and various growth factors that stimulate the repair process. The acuoethanolic extract of *Piper aduncum* has been used over the years as a cicatrizant in the Peruvian Amazon. Previous studies evidenced its content of flavonoids, alkaloids, saponins and tannins, which would be involved in its cicatrizant function. The present work allowed to evaluate the healing effect of the Piper aduncum acuoethanolic extract and the purified proteins contained in the Human Adult Dermal Fibroblast cell line (hDFa), as well as its effect in vivo on induced wounds in rats (*Rattus Norvegicus*). To this end the Piper aduncum leaves were collected and dried, then the aqueous-ethanol extract was obtained by the solid-liquid extraction technique using Soxhlet equipment, ethanol as solvent, the extract Was concentrated and freeze-dried. The proteins contained in the extract were purified by the RP-HPLC Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography technique, and by tandem mass spectrometry of tryptic peptides (MALDI-TOF-TOF) the N-terminal sequences of the 5 purified proteins which were named K1, K2, K3, K4 and K5. The effect of the lyophilized extract and the K1 and K2 proteins on the proliferation and migration of fibroblasts in culture were determined in vitro, a significant increase being obtained compared to the negative controls. Expression of growth factors: Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) and Epidermal Growth Factor (EGF) were also analyzed by the Polymerase Chain Reaction technique with real-time reverse transcriptase (RT-qPCR), in fibroblasts, in this way it was verified that the extract and K1 and K2 proteins increase the expression of these genes related to the cicatrization process. Finally, for the in vivo analyzes (*Rattus norvegicus*), the lyophilized extract and a gel formulation were applied to induced wounds in rats, after which the healing process was evaluated by histological analysis; In this trial it was found that the extract in its lyophilized forms and gel favor reepithelialization, angiogenesis and fibroplasia in wounds

induced in rats compared to a negative control. Finally the results demonstrate that the acuoethanolico extract of Piper aduncum and the proteins K1 and K2 have a cicatrizant effect.

Keywords: Wound healing, Piper, cell proliferation, cell migration, mass spectrometry.



Introducción

Las heridas crónicas y no cicatrizadas representan una elevada incidencia en la población a nivel mundial. La cicatrización es un proceso de restauración que consiste en la superposición de eventos que involucran la respuesta inflamatoria, regeneración de la epidermis, contracción de la herida, finalmente, formación del tejido conectivo y remodelación. El tratamiento apropiado de la herida acelera el proceso de cicatrización y previene la infección y cronicidad de esta. (1)

Cada etapa del proceso de cicatrización, está orientada por la expresión de proteínas que controlan los patrones del ciclo celular. El éxito del proceso depende de factores de crecimiento, los que son polipéptidos biológicamente activos que actúan para alterar el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo de una célula diana. Destacan por su actividad en el proceso de cicatrización el Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF) que se libera en la fase inflamatoria, el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), los que intervienen en la fase de proliferación celular. (2) (3)

Varios productos vegetales se han utilizado en el tratamiento de heridas a través de los años. Extractos de hierbas promueven la coagulación de la sangre, combaten la infección y aceleran la curación de heridas. El valor medicinal de estas plantas radica en constituyentes fitoquímicos bioactivos. Estos componentes incluyen diversas familias químicas como alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas, y compuestos fenólicos. Además de estos componentes las plantas son las principales fuentes de péptidos. Los péptidos son moléculas de proteínas de menos de 10 kDa; pueden existir de forma natural o ser derivados de secuencias de proteínas nativas. (4) (5)

En los últimos años, una amplia evidencia científica ha previsto la existencia de péptidos activos biológicos y proteínas derivadas de plantas que podrían tener efectos beneficiosos sobre la salud humana. (6)

Piper aduncum, “matico”, se distribuye a lo largo del Amazonas, muchas de las tribus locales utilizan las hojas de matico como cicatrizante. Estudios detallan que contiene flavonoides,

alcaloides, saponinas, taninos, aceites esenciales y esteroides; los que estarían implicados en su función. (7) (8) (9) (10)

En este trabajo evaluamos el efecto cicatrizante del extracto etanólico y péptidos bioactivos purificados mediante RP-HPLC de *Piper aduncum* en la línea celular hFDa. Debido a que el proceso de cicatrización involucra diversas etapas; se evaluó la expresión de algunos factores de crecimiento que intervienen en cada una de ellas: el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF); Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). Finalmente se evaluará el efecto en heridas inducidas en ratas como modelo experimental, considerando los parámetros de reepitelización, angiogénesis y fibroplasia en el tejido dañado.



CAPITULO I

1. Objetivos

1.1 General

Determinar el efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) en cultivo de fibroblastos humanos hDFa, analizar la expresión de genes FGF, EFG y PDGF y su efecto en heridas inducidas en *Rattus norvegicus*.

1.2 Específicos

- a) Evaluar el efecto del extracto etanólico de *Piper aduncum* en la proliferación y migración de fibroblastos hDFa.
- b) Aislar las fracciones proteicas, contenidas en el extracto etanólico de *Piper aduncum*, mediante RP-HPLC
- c) Determinar la secuencia n-teminal de las fracciones proteicas contenidas en el extracto etanólico de *Piper aduncum*, mediante espectrometría de masas en tamden de péptidos trípticos.
- d) Analizar las secuencias n-terminales de las proteínas aisladas mediante RP-HPLC, utilizando alineamiento local (BLAST).
- e) Analizar la expresión de los genes EGF, FGF y PDGF por RT qPCR en cultivos de fibroblastos, sometidos a diferentes concentración de extracto etanólico de *Piper aduncum* y sus fracciones proteínicas.
- f) Evaluar el efecto del extracto etanólico liofilizado y la formulación en gel, de *Piper aduncum*, en el proceso de cicatrización en heridas inducidas en *Rattus norvegicus*.

2. Hipótesis

Dado que existe información acerca del uso del extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) como cicatrizante en heridas, es posible que promueva la proliferación y migración de fibroblastos humanos en cultivo a nivel *In vitro* por un aumento de la expresión de los genes EGF, FGF, PDGF, y además tenga efecto cicatrizante a nivel *In vivo* en heridas inducidas en *Rattus norvegicus*.

CAPITULO II

2. Marco teórico

2.1 Estructura de la piel

La piel es la cubierta externa del cuerpo, es uno de los órganos más importantes debido a que es la barrera que separa al organismo del medio ambiente externo y lo protege de agresiones mecánicas, químicas, tóxicos, calor, frío, radiaciones ultravioleta y microorganismos patógenos. Además la piel es importante para el equilibrio de fluidos corporales actúa como barrera ante la posible pérdida de agua, mantiene el equilibrio térmico y transmite información externa que accede al organismo por el tacto, la presión, temperatura y receptores del dolor.

La piel tiene tres capas, de origen embriológico totalmente distinto: (11)

- La epidermis.
- La dermis o corion.
- El tejido subcutáneo o también denominado hipodermis o subcutis.

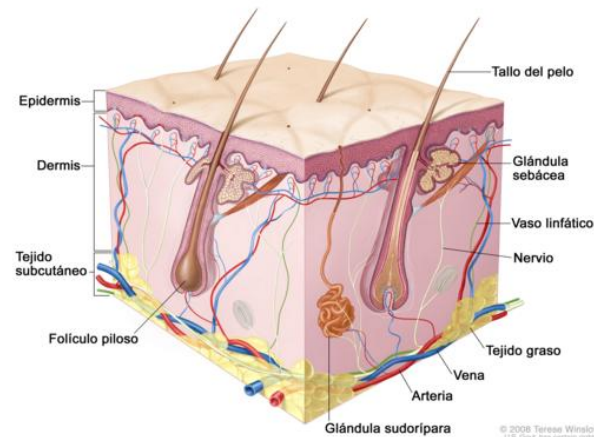


Figura 2.1 Estructura de la piel

Extraído de: www.cancer.gov/espanol/tipos/piel

2.1.1 Epidermis

La epidermis es un epitelio plano poliestratificado y queratinizado que cubre toda la superficial del cuerpo. Es la capa de la piel con mayor número de células y con una dinámica de cambio extraordinariamente grande.(11)

Se encuentra constituida por dos grupos celulares: queratinocitos y células dendríticas. Los queratinocitos a su vez se organizan en las siguientes capas: capa córnea, capa lúcida, capa granulosa, capa espinosa y capa basal. (12)

2.1.2 Dermis

La dermis está situada por debajo de la epidermis y está constituida por tejido conectivo, sustancia fundamental y células. El tejido conectivo a su vez está formado por tres tipos de fibras: Colágenas, elásticas y reticulares. Las fibras colágenas son las más numerosas, la disposición y el grosor de las mismas, varía de acuerdo al nivel en que se encuentran: en la dermis superficial o papilar son fibras delgadas, a diferencia de la dermis media y profunda, donde son más gruesas y se disponen en haces casi paralelos a la superficie de la epidermis. Las fibras elásticas se observan con tinciones especiales de orceína o resorcina-fuccina, son fibras delgadas de 1 a 3 micras de diámetro, el grosor al igual que el de la colágena y varía de acuerdo al nivel en que se encuentran: delgadas en dermis superficial y gruesas en dermis profunda. (12)

2.1.3 Hipodermis

Bajo la dermis se encuentra el tejido hipodérmico, es una capa de sostén o tejido graso subcutáneo que conecta todo lo que está sobre y bajo la dermis con el músculo. Contiene macrófagos, fibroblastos y células cebadas, así como nervios, vasos linfáticos y sanguíneos que irrigan la piel. (12)

2.2 Herida

Se denomina herida al área donde se interrumpe la continuidad anatómica, como celular de las cubiertas externas del cuerpo (piel), mucosas o superficies de órganos. Una herida incluye pérdida local de fluidos, dolor con estímulos neuronales eferentes hacia el cerebro, órganos endocrinos y liberación de productos celulares, los cuales inician una respuesta neuroendocrina y metabólica para favorecer el proceso de cicatrización y curación. La alteración metabólica puede durar meses, semanas e incluso años.

En la actualidad, las heridas ocupan un lugar importante en cuanto a las demandas de atención en un servicio de urgencias. Si bien la mayoría de las heridas cicatrizan por si solas, su reparación y tratamiento reduce infecciones, diversas molestias y secuelas. (13)

2.3 El proceso de cicatrización

Las lesiones que alteran la continuidad de la piel desencadenan un mecanismo de reparación, que es la sustitución de los tejidos destruidos por un nuevo tejido, que es denominado cicatriz o masa de tejido conjuntivo esencialmente fibroso revestido por la epidermis neoformada.

A este proceso se le denomina cicatrización, que es un proceso de reparación de un tejido alterado, dando como resultado final la formación de un tejido cicatrizado o tejido casi igual al existente, previo al daño. La cicatrización de heridas es un proceso dinámico que consiste en cuatro fases continuas, superpuestas, y precisamente programadas. Los acontecimientos de cada fase deben ocurrir de una manera precisa y regulada tal como se observa en la Figura 2.2.

Interrupciones, aberraciones, o prolongación en el proceso puede conducir a la cicatrización retardada de las heridas o una herida crónica que no cicatriza. Es un proceso fisiológico de gran complejidad que tiene la finalidad de restaurar la integridad de la piel y evitar, así, cualquier anomalía en su función barrera, lo cual resulta fundamental para mantener la homeostasis y el bienestar general de cualquier individuo. Todos estos cambios involucran una serie de reacciones celulares y moleculares de gran complejidad. (13)

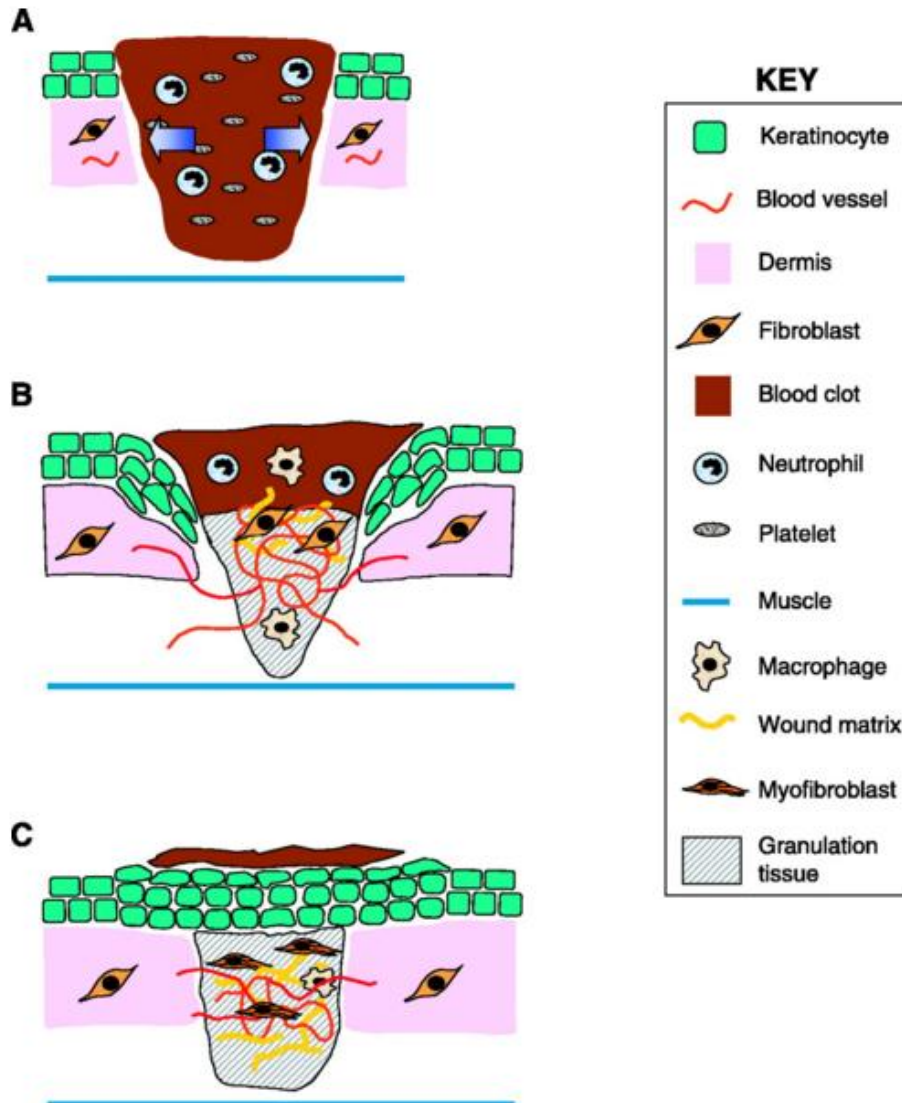


Figura 2.2 Representación esquemática de las diferentes etapas de la reparación de heridas.

A: 12-24 h después de la lesión del área herida se llena con un coágulo de sangre. Los neutrófilos han invadido en el coágulo. **B:** en días 3 a 7 después de la lesión, la mayoría de los neutrófilos han sido sometidos a apoptosis. En lugar de ello, los macrófagos son abundantes en el tejido de la herida en esta etapa de la reparación. Las células endoteliales migran hacia el coágulo; proliferan y forman nuevos vasos sanguíneos. Los fibroblastos migran hacia el tejido de la herida, donde proliferan y la matriz extracelular depósito. El nuevo tejido se llama tejido de granulación. Los queratinocitos proliferan en el borde de la herida y migran hasta la dermis lesionada y por encima de la matriz provisional. **C:** 1-2 semanas después de la lesión de la herida se llena completamente con tejido de granulación. Los fibroblastos se han transformado en miofibroblastos, que conduce a la contracción de la herida y depósito de colágeno. La herida se cubre totalmente con una epidermis nueva.

Extraído de: Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. SABINE WERNER, RICHARD GROSE. *Physiological Reviews* Published 1 July 2003 Vol. 83 no. 3, 835-870

2.4 Etapas de la cicatrización de heridas cutáneas

El proceso de curación de heridas involucra cuatro fases integradas. La hemostasia e inflamación, proliferación y remodelación tisular. La restauración de la piel, es determinada por la acción de diferentes tipos celulares que someten a la proliferación, la diferenciación, la migración y apoptosis para la reconstrucción de la piel, como se puede observar en la Tabla 2.1. (14)

Tabla 2.1 Etapas de reparación de la herida.

Resumen de las etapas de la reparación de heridas

Etapa de la curación	Procesos principales
Hemostasis e inflamación	Hemostasia
	<ul style="list-style-type: none"> La vasoconstricción La formación de coágulo de fibrina
	Inflamación
	<ul style="list-style-type: none"> La liberación de citocinas y factores de crecimiento de plaquetas y células inmunes, y de la matriz interrumpido La invasión de las células inflamatorias (neutrófilos, monocitos-macrófagos)
Proliferación	Dermis
	<ul style="list-style-type: none"> La liberación de factores de crecimiento por los macrófagos y fibroblastos Migración de fibroblastos y la proliferación Síntesis de proteínas de la matriz (fibronectina y colágeno) Angiogénesis
	Epidermis
	<ul style="list-style-type: none"> La migración de queratinocitos, proliferación y diferenciación Las contribuciones de las células madre del folículo piloso Posible contribución de las células madre epidérmicas interfolicular
Remodelación	Reorganización y remodelación de la ECM
	La formación de miofibroblastos
	La contracción de la herida
	Apoptosis de las células

Extraído de: (Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. Cell. Mol Life Sci 2013 Jun; 70 (12): 2059-2081)

2.4.1 Hemostasis e inflamación

La hemostasia, es la primera respuesta a la lesión, evita la pérdida de sangre en el sitio de la herida.

Se inicia una cascada de eventos que terminan finalmente en la coagulación, estos eventos abarcan la constricción vascular, la agregación plaquetaria, desgranulación, y finalmente se forma el coágulo de fibrina.

El coagulo de fibrina, actúa como una matriz provisional para la migración inicial de células inflamatorias al sitio de la herida. Los neutrófilos y monocitos (células inflamatorias), son atraídos al sitio de la herida por citoquinas, que incluyen el Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que son liberados por las plaquetas. Los neutrófilos eliminan bacterias y objetos extraños de la herida, seguidos por los monocitos los que luego se diferencian en macrófagos, durante estos procesos se libera TGF- β y otras citoquinas, de esta manera se estimula el movimiento de fibroblastos y células epiteliales dentro de la herida. (15)

2.4.2 Proliferación

En esta etapa se da la re-epitelización de la epidermis, mediante la reparación de la capa dérmica o mesenquimal subyacente, este proceso va acompañado de la neovascularización. Se sintetizan proteínas de la matriz extracelular (MEC) y se liberan factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β . Durante la fase proliferativa de la reparación de heridas, los fibroblastos producen variantes de la MEC. La invasión de fibroblastos en la herida se ve facilitada por metaloproteinasas de escisión de la matriz extracelular (MMPs). La restauración del epitelio es importante como una función de barrera y se logra por la migración de queratinocitos, proliferación y diferenciación. (15)

2.4.3 Remodelación

La remodelación de la zona de la herida y el cierre de la brecha epitelial cambia las propiedades del tejido. Los fibroblastos de la herida adoptan un fenotipo contráctil.

La reorganización del tejido, implica la degradación y la sustitución de la MEC, en fibronectina y colágeno tipo III con colágeno tipo I, las fibras de colágeno I se organizan en haces, y se lleva a cabo la apoptosis de una variedad de tipos de células en el sitio de la herida. Todos estos procesos dan como resultado la contracción de la herida y la formación del tejido cicatricial. El proceso de remodelación puede continuar indefinidamente, y el tejido de la cicatriz no recupera la fuerza de la piel no lesionada original. (15)

2.5 Fibroblastos y producción de la matriz extracelular

El fibroblasto es la célula más importante del proceso de curación de las heridas, ya que no solo actúa como fábrica en la elaboración de la matriz extracelular, sino también como maquinaria especializada, ya que permite aproximar los bordes de la herida durante la fase madurativa de la cicatrización. Permite la síntesis de colágeno, glucosaminoglucanos y proteoglucanos, así como diversas citocinas y factores de crecimiento que participan en el proceso de cicatrización. Alguno de los factores de crecimiento liberados por diferentes células incluyendo los fibroblastos, son TFG- β , PDGF, EGF, FGF. (15) (16)

En el interior de los fibroblastos se produce la formación de las cadenas de procolágeno, que finalmente se liberan a la matriz extracelular donde tiene lugar su agregación y formación de las fibrillas de colágeno. (15) (16)

En la dermis normal y en las cicatrices maduras, la proporción de colágeno tipo I (80-90%) es mayor que la de colágeno tipo III (10-20%). Por el contrario, en una herida reciente la proporción de colágeno tipo III se incrementa hasta en un 30%. El colágeno formado no sólo sirve para conferir fuerza a la cicatriz, sino que también facilita el movimiento de otras células, como las de los endotelios y los macrófagos.

Los proteoglucanos, cuya síntesis se lleva también a cabo por los fibroblastos, son cadenas de polipéptidos que se unen a los glucosaminoglucanos, de distinta estructura y longitud, como el ácido hialurónico, el dermatansulfato, el condroitinsulfato y el heparinsulfato. Las cadenas de proteoglucanos, unidas a sus correspondientes glucosaminoglucanos resultan clave como mensajeros de información en la interacción entre las células que, a través de

citocinas, factores de crecimiento y otras proteínas solubles, ocurre dentro de la matriz extracelular. Un claro ejemplo de ello es la interacción que existe entre el heparinsulfato y el FGF-2, un potente estimulador de la angiogénesis. En ausencia de heparinsulfato, este factor de crecimiento es incapaz de estimular la célula endotelial. Por otro lado, la expresión de los diferentes glucosaminoglucanos es un proceso dinámico que va oscilando en las distintas fases de la curación de una herida. En un principio predomina la expresión de ácido hialurónico, que rompe las interacciones adhesivas entre las células y la matriz de colágeno con el fin de facilitar la migración de diferentes células. Más tarde aumenta la expresión de condroitinsulfato y dermatansulfato, que resultan fundamentales para asistir la adecuada polimerización de las moléculas de colágeno en fibrillas maduras. (15)

La elastina, componente habitual de la dermis normal, no se produce durante la cicatrización de una herida. La ausencia de este componente de la matriz extracelular de la dermis normal podría explicar la firmeza y la falta de elasticidad de las cicatrices.

En la Figura 2.3 se observan los principales factores de crecimiento relacionados al proceso de curación de heridas, en el presente trabajo de investigación se pretender analizar la migración y proliferación de fibroblastos, así como la expresión de los factores de crecimiento PDGF, EGF, FGF que están involucrados en dicho proceso.

LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA CURACIÓN DE LAS HERIDAS	
Quimiotaxis de los monocitos	PDGF, FGF, TGF- β
Migración de los fibroblastos	PDGF, EGF, FGF, TGF- β , TNF
Proliferación de los fibroblastos	PDGF, EGF, FGF, TNF
Angiogénesis	VEGF, Ang, FGF
Síntesis del colágeno	TGF- β , PDGF, TNF
Secreción de colagenasa	PDGF, FGF, EGF, TNF, TGF- β la inhibe

Figura 2.3 Factores de crecimiento en la curación de heridas.

2.6 Citocinas

La cicatrización es un proceso multicelular, complejo que conlleva a la restauración de la piel. Este proceso involucra diferentes tipos celulares que incluyen fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. Finalmente se origina la respuesta inflamatoria, la formación de nuevo tejido y el cierre de la herida. Cada uno de los procesos es regulado por un conjunto de señales que involucran: citocinas, factores de crecimiento y quimioquinas. (3)

Dentro del conjunto de factores de crecimiento más importantes se encuentra el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la familia de interleuquinas. (3) En la Tabla 2.2 se detallan los factores de crecimiento y su función en el proceso de cicatrización en heridas.

Existe información que detalla que la expresión anormal de los factores de crecimiento se asocia con la alteración de la cicatrización de heridas. Esto indica que para que ocurra una reparación normal, debe existir una expresión correcta de estos genes.

Los factores de crecimiento son polipéptidos biológicamente activos que actúan para alterar el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo de una célula diana. Pueden actuar por mecanismos paracrinos, autocrino, juxtacrino o endocrinos y finalmente alterar el comportamiento celular, por medio de la unión a receptores específicos que se encuentran en la superficie de las células, esta unión desencadena una cascada de señalización que en su punto final permite la unión de factores de transcripción de los promotores de genes que regulan estas proteínas que controlan el ciclo celular, o patrones de diferenciación.

Tabla 2.2 Se enumeran los factores de crecimiento y citoquinas importantes que participan en la cicatrización de heridas con tipos de células y sus respectivos papeles en ambas heridas agudas y crónicas.

Crecimiento Factores	Las células	Herida Aguda	Función	Heridas Crónicas
EGF	Plaquetas Macrófagos fibroblastos	Aumento de los niveles	Reepitelización	Disminución en los niveles
FGF-2	Los queratinocitos mastocitos fibroblastos células endoteliales Las células musculares lisas condrocitos.	El aumento de los niveles de	Formación de tejido de granulación reepitelización formación de la matriz y la remodelación	Disminución en los niveles
TGF-β	Las plaquetas queratinocitos macrófagos linfocitos fibroblastos.	Aumento de los niveles.	Inflamación formación de tejido de granulación reepitelización formación de matriz y remodelación.	Disminución en los niveles.
PDGF	Las plaquetas queratinocitos Los macrófagos Las células endoteliales Fibroblastos.	Aumento de los niveles.	Inflamación formación de tejido de granulación reepitelización formación de matriz y remodelación	Disminución en los niveles.
VEGF	Las plaquetas neutrófilos macrófagos células endoteliales células musculares lisas fibroblastos	Aumento de los niveles	La formación de tejido de granulación	Disminución en los niveles
IL-1	Los neutrófilos monocitos macrófagos queratinocitos.	Aumento de los niveles.	Inflamación reepitelización.	Aumento de los niveles.
IL-6	Los neutrófilos macrófagos.	Aumento de los niveles.	Inflamación reepitelización.	Aumento de los niveles.
TNF-α	Los neutrófilos macrófagos	Aumento de los niveles	Inflamación reepitelización	Aumento de los niveles

Extraído de: (Growth factors and cytokines in wound healing. Wound repair and regeneration. Vol 16, Issue 5. September-October 2008. Page 585-601. Stephan Barrientos, Olivera Stojadinovic.)

2.6.1 Familia del factor de crecimiento epidermal (EGF)

La familia del factor de crecimiento epidermal, comprende el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento transformante α (TGF α), factor de crecimiento epidermal de unión a heparina (HB-EGF), anfiregulina, epiregulina, betacelulina, neuroregulinas. Estos factores de crecimiento se unen a receptores específicos con alta afinidad, la sobreexpresión de alguno de estos factores, en particular el receptor HER2, está relacionada con la progresión de cáncer humano, sin embargo estudios clínicos recientes han demostrado un efecto positivo de EGF, TGF- α , Y HB-EGF en la reparación de heridas. (16)

a) Expresión de EGF en la cicatrización de heridas

El Dr. Stanley Cohn reportó originalmente el factor de crecimiento epidermal (EGF), el cual es secretado por plaquetas, macrófagos y fibroblastos, actúa de manera paracrina sobre los queratinocitos. Estudios In vitro demuestran que EGF aumenta su expresión después de una lesión aguda, acelerando la reepitelización. Un mecanismo a través del cual acelera dicho proceso, es el aumento de la expresión de las queratinas K6 y K16, las cuales participan en la vía de señalización proliferativa. Otros estudios demostraron que la degradación de EGF y EGFR (Receptor del Factor de crecimiento epidermal), es inhibida por la adición de inhibidores de metaloproteinasas (MMP) en úlceras crónicas. Esto sugiere que EGF es susceptible al medio ambiente proteolítico, común en heridas. (17) (16) (18)

Ensayos clínicos terapéuticos, muestran que EGF, aumenta la epitelización, sin embargo es muy importante mantener una concentración continua del factor de crecimiento, y prevenir su degradación.

2.6.2 Familia del factor de crecimiento de fibroblastos – FGF

FGF comprende una familia de factores de crecimiento, los que son polipéptidos estructuralmente relacionados. Estos factores de crecimiento se transducen en señales a través de sus receptores específicos de alta afinidad, los que son tirosina quinasas.

FGF estimula la proliferación de diversas células del mesodermo, ectodermo y también de origen endodermico. FGF, regula la migración, diferenciación de células diana, y estimula la supervivencia celular bajo condiciones de estrés. (17) (16) (18)

Muchos estudios in vivo demuestran que, FGF tiene un papel importante en la reparación de heridas. Además FGF, es mitógeno para varios tipos presentes en el sitio de la herida, incluyendo fibroblastos y queratinocitos. Por tanto FGF, es de gran importancia por contribuir a la cicatrización de heridas, hipótesis corroborada por un número de estudios en los que su aplicación local estimuló la reparación de tejidos.

a) Expresión de FGF en la curación de heridas de la piel

Estudios detallan que FGF puede ser detectado en el sitio de la herida, lo que indica que regula el proceso de cicatrización. Se utilizó modelos animales (ratones) para identificar o localizar FGF en el sitio de la herida. Así mismo la expresión de FGF, durante la cicatrización en herida a nivel de mRNA, se incrementó en queratinocitos.

Tres estudios diferentes, demostraron una correlación entre la reducción de la expresión de FGF y trastornos en el proceso de cicatrización. Así los niveles de mRNA de FGF, se redujeron durante la cicatrización en ratones diabéticos alterados genéticamente comparados con ratones control. Así mismo el deterioro de la curación de heridas, se observó en ratones de edad avanzada, lo que se asoció con niveles reducidos en la expresión de FGF, y una menor respuesta angiogénica en la piel de estos ratones. (17) (16) (18) Por estos motivos, el estudio de la expresión de FGF, es de vital importancia en proceso de cicatrización por estar relacionado con la reparación de heridas.

2.6.3 Familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

PDGF agrupa una familia de factores de crecimiento, homo o heterodímeros, que incluyen: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, y PDGF-DD. Ellos ejercen sus funciones mediante la unión a tres receptores de tirosina quinasa transmembrana diferentes, que son homo o heterodímeros de una cadena α - y una cadena β .

PDGF fue el primer factor de crecimiento demostrado ser quimiotáctico para células que migran en la cicatrización de heridas de la piel, tales como neutrófilos, monocitos y fibroblastos. Además, aumenta la proliferación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular por estas células. Finalmente, estimula los fibroblastos para contraer matrices de colágeno e induce el fenotipo de miofibroblastos en estas células. (17) (16) (18)

Por lo que, PDGF es un factor de gran importancia en la cicatrización de heridas. En efecto una serie de estudios experimentales y clínicos demuestra su efecto benéfico en el tratamiento de heridas. Finalmente fue el primer factor de crecimiento, que se utilizó para el tratamiento de úlceras en humanos.

a) Expresión de PDGF en el sitio de la herida

Una serie de estudios sugieren que PDGF, se libera en grandes cantidades a partir de plaquetas; y se encuentra en el fluido en la herida; sobre todo en las primeras etapas de la lesión. Los patrones de expresión de PDGF, sugieren un mecanismo paracrino, ya que los ligandos se encuentran en la epidermis, y los receptores en la dermis. La expresión de PDGF y sus receptores se vio reducida en heridas de ratones diabéticos alterados genéticamente. Esto indica que PDGF es esencial para la reparación normal de las heridas.

Otros estudios, demostraron que los niveles de PDGF en úlceras dérmicas en humanos, se redujeron fuertemente, por otro lado la sobreexpresión de PDGF podría estar asociado a la patogénesis de cicatrices hipertróficas y queloides, debido al potente efecto de PDGF en la proliferación de fibroblastos y en la producción de la matriz extracelular (MEC).

En la Figura 2.4 se observa una representación esquemática de la expresión de los factores de crecimiento mencionados anteriormente y su rol en las diferentes etapas del proceso de cicatrización de heridas.

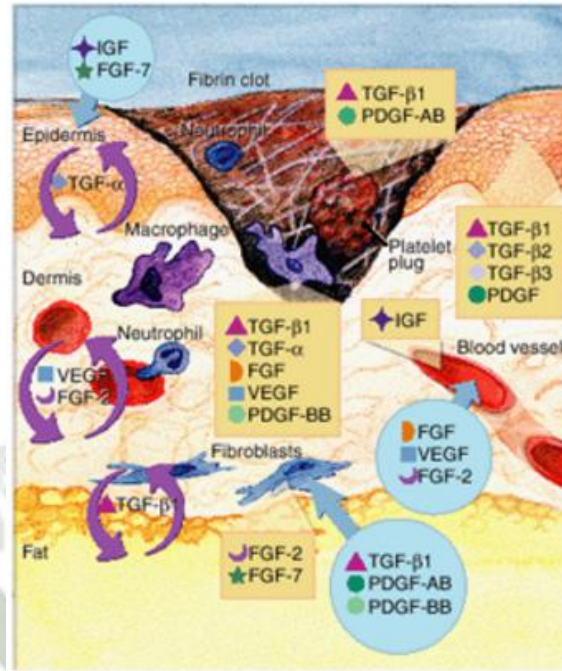


Figura 2.4 Citocinas en el proceso de cicatrización.

Extraído de: (<https://www.rndsystems.com/resources/articles/cytokines-wound-healing>)

2.7 Tratamiento

El tratamiento de las heridas es mucho más eficaz cuando se conoce cómo actuar correctamente para acelerar su cicatrización, pues mientras más rápido se hace, permite comprender el impacto benéfico de algunos medicamentos y los aspectos negativos de otros. Los medicamentos que resultan beneficiosos deben ser utilizados en el tiempo apropiado.

Las citocinas y factores de crecimiento son actualmente utilizados como agentes tópicos de forma exitosa, son necesarios para inducir la cicatrización. Los agentes inflamatorios como los corticoesteroides, la colchicina, la dapsona y los antimaláricos participan en la formación de microtubulos, integrinas de las células polimorfonucleares e interfieren con el procesamiento de los receptores de membrana. Los retinoides tienen efectos sobre la cicatrización, ya que intervienen en la angiogénesis y en el proceso de epitelización, como es la vitamina A necesaria para mantener una epidermis normal, promoviendo la descamación a través de una producción disminuida de queratina, gránulos de queratohialina

y desmosomas; esto se da a nivel de receptores nucleares específicos que facilitan su acción terapéutica y su expresión varía según el tejido. (13) (19)

2.8 Plantas: uso en tratamiento de heridas

Diversos estudios sobre plantas medicinales, a base de hierbas confirmaron que presentan menos efectos secundarios en comparación con los agentes químicos, y son más costo efectivo. (20)

Las plantas tienen el inmenso potencial para la gestión y el tratamiento de las heridas. Un gran número de plantas son utilizadas por la tribu y el folclore en muchos países para el tratamiento de heridas y quemaduras. Estos agentes naturales inducen la curación y regeneración del tejido perdido por múltiples mecanismos. Estos fito-medicamentos no sólo son baratos y asequibles, sino también son seguros. Muchos laboratorios fitosanitarios están concentrando sus esfuerzos para identificar los componentes activos y los modos de acción de diversas plantas medicinales. El valor medicinal de estas plantas radica en fitoquímicos bioactivos constituyentes que producen una acción fisiológica definida en el cuerpo humano. Estos componentes incluyen diversas familias químicas como alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas, y compuestos fenólicos.

El estudio de extractos de hierbas ha sido de gran interés para los científicos ya que permite el descubrimiento de nuevas drogas efectivas. En la Figura 2.5 se detalla el estudio esquemáticos de plantas el cual incluye: métodos de extracción de fitoconstituyentes, formulación de las drogas y modelos de cicatrización de heridas *In vitro* e *In vivo*; etapas que son de importancia para la validación de fármacos herbolarios seguros y efectivos que sean aceptables a nivel mundial para el tratamiento de heridas. (13)

Existe una serie de informes que detallan sus efectos antibacterianos, antiinflamatorios y cicatrizantes aunque la mayoría aún no se ha explorado.

En todo el mundo la medicina tradicional permitió el estudio de hierbas medicinales consideradas como agentes de curación de heridas, y se identificaron compuestos bioactivos que permiten la reepitelización, neovascularización, queratinización, así como se comprobó su efecto antioxidante.(20) (21)

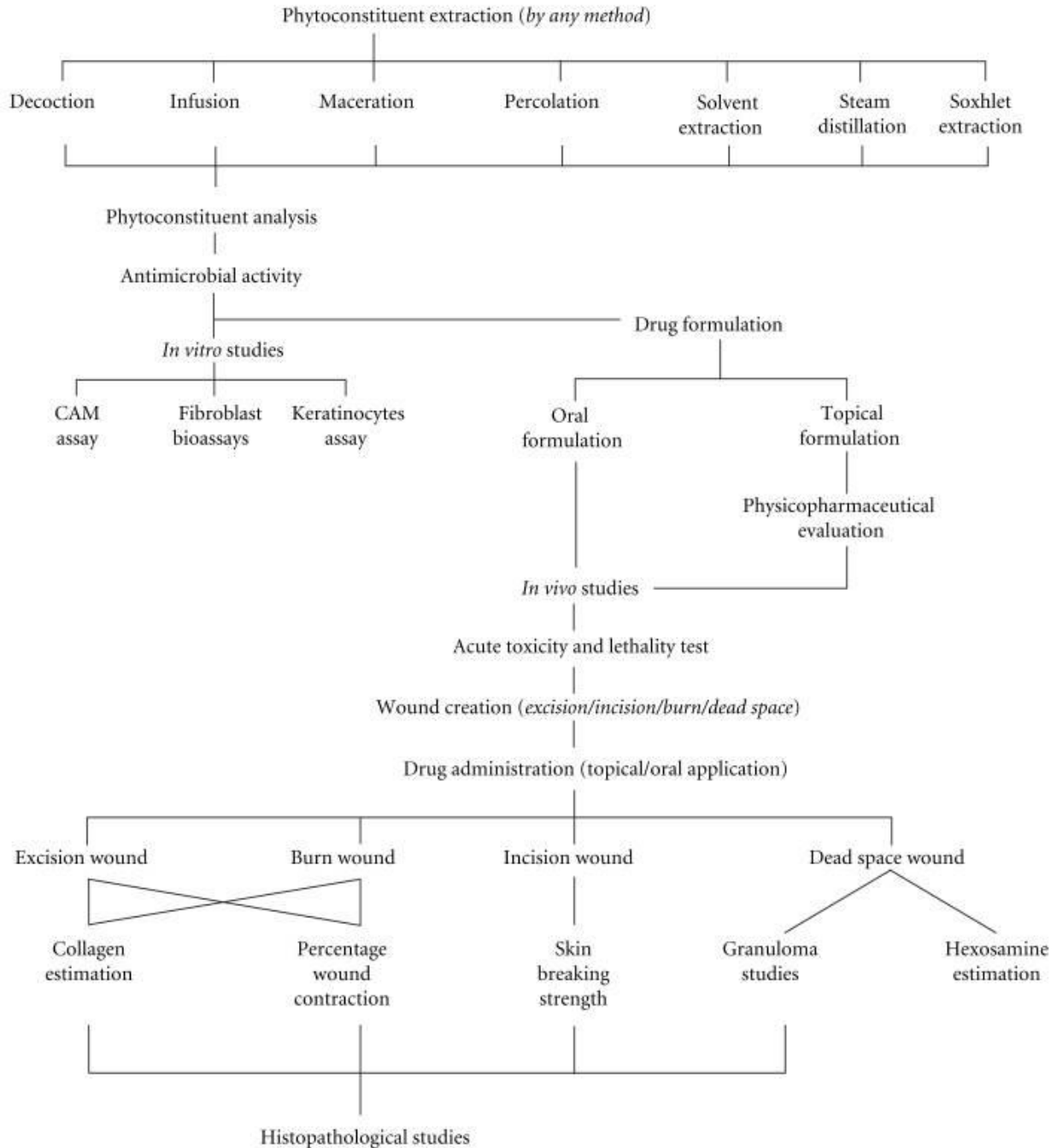


Figura 2.5 Ilustración esquemática de estudios de plantas en el proceso de cicatrización

Extraído de: (Rupesh Thakur, Nitika Kain. Practices in wound healing studies of plants. Evid based complement alternat Med. 2011; 2011: 438056. Published online 2011 May 26)

2.9 Metabolitos secundarios que contribuyen a la cicatrización

2.9.1 Flavonoides y su clasificación

Uno de las mayores clases de compuestos polifenólicos, que provienen de fuentes naturales son los flavonoides. Numerosas plantas medicinales contienen cantidades terapéuticas de flavonoides, que son utilizados como antiinflamatorios, aniespasmódico, antialérgicos. Otros efectos farmacológicos de los flavonoides están relacionados a su capacidad antioxidante, como eliminadores de radicales libres, y además poseen una actividad curativa en heridas. (22)

Los flavonoides son metabolitos secundarios de tipo fenilpropano que generalmente se encuentran como O-glicósidos en sus fuentes naturales, aunque también se encuentran de forma natural como C-glicósidos. Poseen como unidad básica un esqueleto de 15 carbonos provenientes de malonil coenzima A y de p-cumaril coenzima A, donde están involucrados numerosas enzimas. Los flavonoides sin ser metabolitos primarios, se encuentran casi en cualquier vegetal, hay más de 8000 compuestos conocidos de plantas.. (23)

De acuerdo con las variaciones en su estructura química, se reconocen diferentes tipos de flavonoides de los cuales los más importantes desde el punto de vista farmacológico son las flavonas, los flavonoles y las flavanonas. En la Figura 2.6 se observa la clasificación de los flavonoides y sus estructuras químicas. (24)

a) Flavonas

Se caracterizan por tener una estructura plana a causa de un doble enlace en el anillo aromático central. Unas de las flavonas mejor descritas es la quercetina, se encuentra en cebolla, manzana, brócoli. Tienen principalmente acción antioxidante, tonificadora y protectora de los vasos sanguíneos. (24)

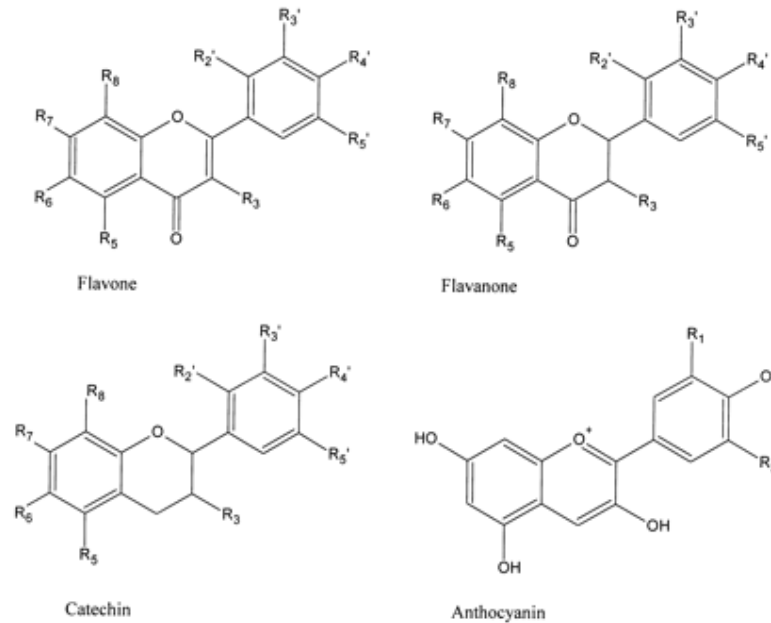


Figura 2.6 La estructura molecular de algunos grupos de flavonoides

Extraído de: Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001;74(4):418-25.

b) Flavonoles

Entre los flavonoles se encuentra el rutósido, que es la base de fármacos utilizados como tónicos y protectores vasculares. El rutósido o denominado también rutina se encuentra en las hojas de algunas especies de eucalipto y otras plantas.

La rutina posee propiedades reconocidas como su capacidad para combatir infecciones bacterianas, propiedades antiinflamatorias y además ayuda a la absorción de la vitamina C, impidiendo la oxidación de la misma, contribuyendo a la actividad cicatrizante. (23)

c) Flavanonas

Las flavanonas más conocidas y utilizadas son los citroflavonoides, presentes en la cáscara de las frutas cítricas en general. Su efecto más importante es la protección vascular. Un ejemplo importante de este grupo es el narigin. (24)

2.9.2 El efecto de los flavonoides

Los flavonoides regulan el uso de vitamina C por parte del cuerpo, de esta manera estimulan su efecto en la cicatrización de heridas. Además tiene efecto antioxidante.(23)

Uno de los efectos más importantes de los flavonoides es la captura de radicales libres de oxígeno. Algunos ensayos experimentales in vitro demostraron que los flavonoides poseen actividad antiinflamatoria, antialérgica y antiviral. (24)

2.9.3 Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos muy astringentes y de gusto amargo. Tienen acción astringente hemostática, antiséptica y tonificante.

Tienen una función cicatrizante, ya que aceleran la curación de las heridas, y detienen el sangrado. La cicatrización se produce por la formación de costras, ya que se unen proteínas con los taninos y generan un medio “seco”; lo cual impide el desarrollo de bacterias. También intervienen en el proceso de coagulación de la sangre y por tanto contribuyen en la curación y restauración de tejido dañado, además de reducir el dolor sobre la piel. (23)

2.10 Uso de hidrogeles en tratamiento de heridas

Los geles son utilizando con más frecuencia en farmacia y en cosméticos por varias propiedades importantes, como su estado semisólido su alto grado de claridad, facilidad de aplicación, remoción y uso. Los geles a menudo proveen una liberación más rápida de la droga, independientemente de la hidrosolubilidad de la droga en comparación con las cremas y pomadas. (25)

La Farmacopea Británica define que los geles consiste en líquidos gelificados mediante agentes gelificantes adecuados, e indican que existen dos clases, a saber:

2.10.1 Geles Hidrófobos:

La base de los geles hidrófobos (oleogeles) por lo general consisten en parafina líquida con polietileno o aceites grasos gelificados con silica coloidal o jabones de aluminio o zinc. (26)

2.10.2 Geles Hidrófilos:

Las bases de los geles hidrófilos (hidrogeles) por lo general consisten en agua, glicerol o propilenglicol gelificado con agentes gelificantes como tragacanto, almidón, carbómero, derivados de la celulosa, polímero de carboxivinilo y silicatos de magnesio y aluminio.

En un gel hidroalcohólico interviene el alcohol y agua, el agente gelificante seleccionado, a la concentración conveniente para tener la consistencia adecuada; además, se requiere la adición de una sustancia higroscópica como la glicerina, el propilenglicol o el sorbitol, que impida la desecación rápida una vez que la preparación se aplica sobre la piel. Estas sustancias actúan, así mismo, mejorando la elasticidad y hace más fácil la extensión del preparado sobre la superficie cutánea. (26)

Los geles pueden prepararse con una cantidad de agentes farmacéuticos, como tragacanto al 2 – 5 %, alginato de sodio al 2 – 10 %, gelatina 2 – 15 %, metilcelulosa 450 3 – 5 %, carboximetilcelulosa sódica 2 – 5 %, carbómero 0.3 – 5 %, o alcoholes polivinílicos al 10 – 20 %. (26)

Otros agentes gelificantes son la metilhidroxietilcelulosa, el polioxietileno-polioxipropileno, la hidroximetilcelulosa y la gelatina. (26)

Deben incorporarse conservadores a los geles, en especial los preparados a partir de fuentes naturales. Los conservadores apropiados, según el uso y el agente gelificante, incluye los parabenos en un 0.2%, el ácido benzoico 0.2 % (si el producto es ácido) y el clorocresol al 0.1 %. (25)

Al proporcionar humedad a la herida, el hidrogel crea un ambiente curativo húmedo, que promueve la granulación y la epitelización. El alto contenido de agua en el hidrogel enfría la herida, produciendo alivio del dolor.

2.11 Matico

Piper aduncum, “matico”, es una planta que pertenece a la familia Piperaceae, Al igual que muchas plantas en la familia de la pimienta, la mayoría de todas las partes del árbol de matico tienen un sabor picante y aroma. A lo largo del Amazonas, muchas de las tribus indias utilizan hojas de matico como un sanador de heridas antiséptico para detener la hemorragia, prevenir infecciones y acelerar la curación. Una de las propiedades que destaca de matico, es el poder cicatrizante.



2.11.1 Aspectos taxonómicos

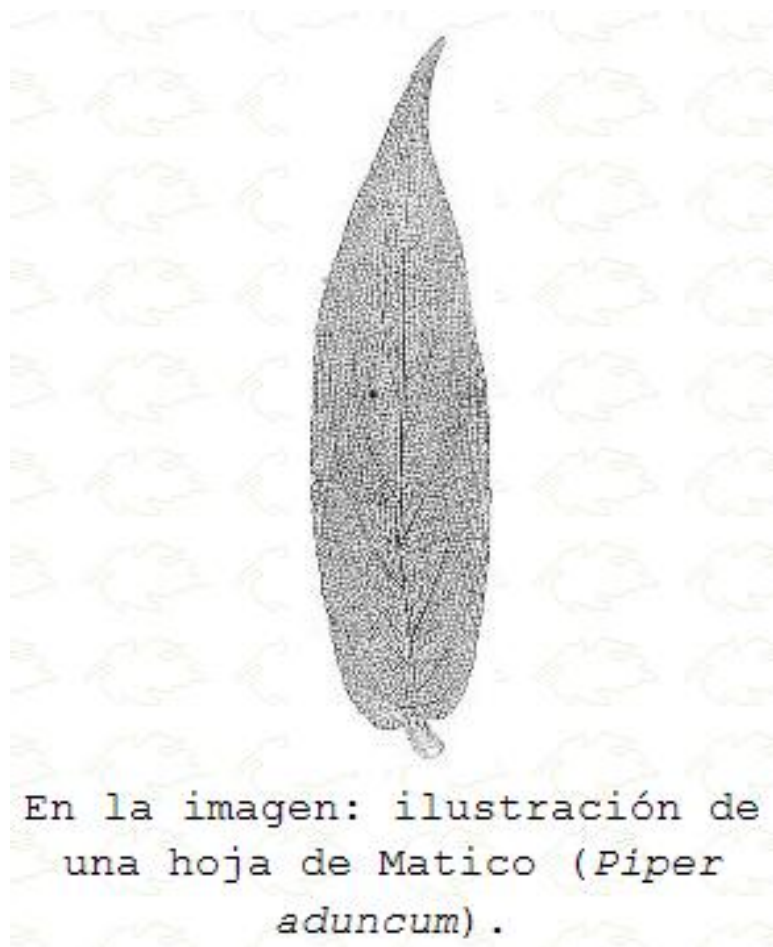


Figura 2.7 Ilustración de una hoja de matico

Extraído de: www.botanical-online.com/pimienta_piper_aduncum.htm

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Especie: Aristiguetia glutinosa o Eupatorium glutinosum

Familia: Piperaceae o Piperáceas.

Nombre común: Matico, Hierba de soldado, palo del soldado, achotlín, cordoncillo.

Nombre científico: *Piper aduncum*.

Sinonimo taxonómico: *Piper angustifolium* Ruiz y Pav.; *Piper celtidifolium* (Ham. Ex Kunth) Desf.; *Piper elongatum* (Poir. Ex vahl) C.DC., *Arthante elongata* Miguel; *Stephensia elongata* Kunth.

Hábitat: originario de Perú y extendida por Sudamérica tropical, Sur de México, el Caribe, la Polinesia y Melanesia.

2.11.2 Descripción botánica del matico

El matico *Piper aduncum* es un arbusto de altura entre 1 y 8 metros ampliamente distribuido en los trópicos americanos.

Su tallo es delgado y erecto, de color amarillento y con pubescencia. Presenta nudos en su tallo, de donde emergen las ramitas de la planta.

Las hojas del matico son pecioladas, simples y alternas. Miden entre 12 y 22 centímetros de largo por 4-9 centímetros de ancho, lampiñas. Ovaladas o elípticas, ápice acuminado y base redondeada. Color verde amarillento, ásperas y con pubescencia en el haz de la hoja, que tiene tacto áspero. Pecíolo de 2-5 milímetros de largo. Presenta nerviaciones pronunciadas, entre 4 y 6 pares por hoja.

La inflorescencia es una espiga floral que nace del nudo de los tallos principales de forma opuesta a las hojas. La espiga mide entre 6 y 16 centímetros de largo.

Las flores son de color blanco y se disponen en forma de espiral a lo largo del raquis. Flores bisexuales aclamídeas (que no tienen perianto) polinizadas por el viento.

Frutos drupas ovoides y aplanados, de color pardo con estigmas sésiles. (27)



**Figura 2.8** Matico

Extraído de: Franz Eugen Köhler, Köhler's Medizinal-Pflanze-243. 1987

2.11.3 Principales componentes de “*Piper aduncum*”

Los componentes de *Piper aduncum* fueron aislados en trabajos anteriores utilizando diversas técnicas de extracción con solventes. La extracción utilizando etanol y agua como solventes es una de las más utilizadas debido a que permite aislar la mayor cantidad de compuestos fitoquímicos. Por lo que para el presente trabajo se realizó una extracción etanólica a partir de las hojas de *Piper aduncum*. (28)

En un trabajo anterior se determinó la cantidad de alcaloides, flavonoides, saponinas y compuestos fenólicos que contiene el extracto etanólico de *Piper aduncum*, estos resultados se detallan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Ensayo fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum*

Reacciones	Metabolito secundario	Cantidad
Dragendorff	Alcaloides	++
Mayer	Alcaloides	++
Shinoda	Flavonoides	+++
Índice de espuma	Saponinas	++
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	++
Olor	Aceites	++
Gelatina	Taninos	++
Liebermann	Esteroides	+
Ninhidrina	Aminoácidos	-
Bortranger	Quinonas	+

(-) = Ausencia; (+) = Poca cantidad; (++) = Regular cantidad; (+++) = Bastante cantidad.

Extraído de: Efecto antihipertensivo del extracto de *Piper aduncum* ‘matico’ sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones

Diversos estudios han permitido la identificación de los componentes de *Piper aduncum*. Sin embargo la composición depende del método de extracción utilizado; además de los compuestos utilizados durante el proceso (solventes etanólicos, acuosos, hexano). En el presente estudio utilizaremos el método de extracción por solventes; y se utilizará una mezcla etanol- agua. Existe amplia información acerca de los componentes en mezclas etanólicas y en aceites esenciales obtenidos de las hojas de *Piper aduncum*. (29) (30)

En la Tabla 2.4 se observan algunas diferencias en la composición de *Piper aduncum*, según el método de extracción utilizado.

Tabla 2.4 Componentes identificados en extractos de *Piper aduncum* obtenidos por diferentes métodos de extracción y solventes.

Compounds	Concentration (%)				
	Ethanol			Hexane	
	Maceration	Ultrasonic	Decoction	Maceration	Decoction
Caryophyllene	6.78	7.56	5.63	6.06	5.51
α -calacorene	-	5.41	-	-	-
γ -elemene	14.48	-	13.49	13.27	14.78
Cis- γ -cadinene	17.16	-	15.39	-	-
Falcarinol	-	6.06	-	-	-
Germacrene D	17.16	-	15.39	17.84	18.93
Linalool	2.44	8.0	1.89	0.74	0.56
Linalool oxide	0.55	4.34	-	-	-
Nerolidol	13.41	18.45	15.24	15.26	15.78
β -elemene	3.12	-	2.68	3.57	3.83
δ -cadinene	6.01	-	5.73	3.51	4.51
α -caryophyllene	7.49	8.25	6.06	6.65	6.26
Total	88.6	58.07	81.5	66.9	70.16

- Not detected.

Extraído de: (Navickiene HMD, Morandim AdA, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo DCB, Telascrea M, et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Química Nova*. 2006;29:467-70)

En muchos trabajos de investigación, se identificaron las estructuras químicas de los componentes de *Piper aduncum*, los que perteneces a grupos de alcaloides, amidas, terpenos, esteroides, chlaconas, dihydrochlaconas, flavononas y otros componentes; en las Figuras 2.9 – Figura 2.18 se detallan algunas de estas estructuras. (29)

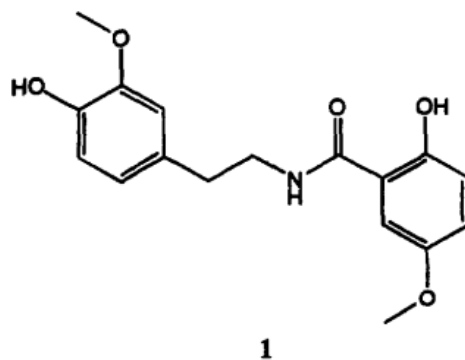


Figura 2.9. Aduncamida.

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673<

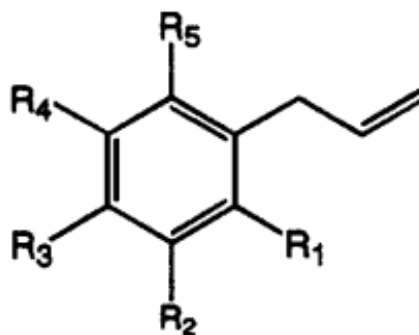
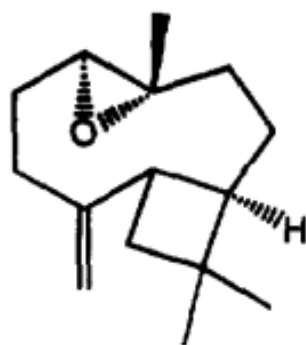


Figura 2.10.- 1,3 Dimethoxy-2-acetoxy-5-allybenzeno (R1=R5=H; R2=R4=OCH3; R3=OAc)-Propphenylphenoles.

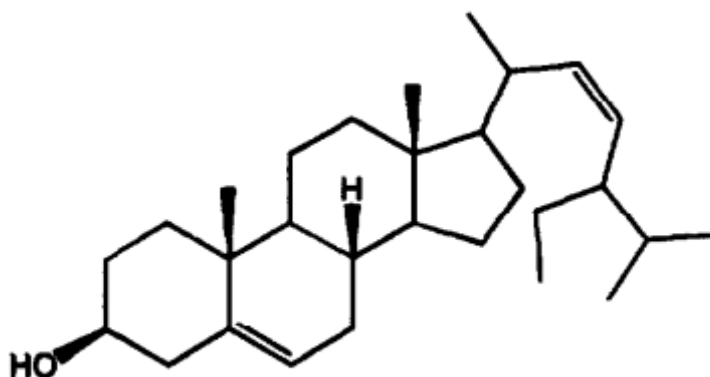
Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)



314

Figura 2.11 Caryophyllene oxide. Terpeno.

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)



391

Figura 2.12 Estigmasterol. Esteroide.

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)

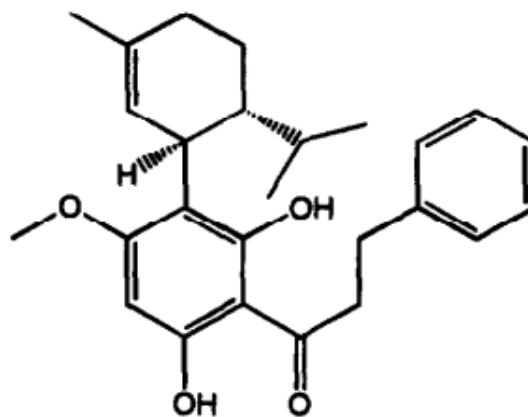


Figura 2.13 Methyllindaretin. Chalcona

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)

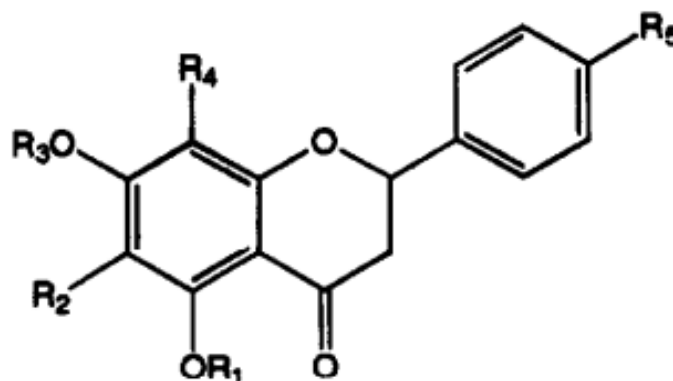


Figura 2.14.- Pinostrobin . (R1=R2=R4=R5=H; R3=CH3) – Flavanona,

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)

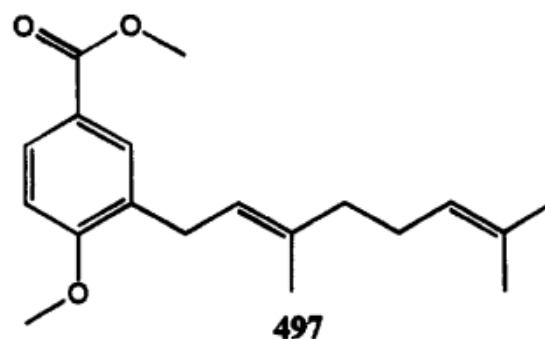


Figura 2.15 Methyl 2,2 –dimethyl-2H-1-benzopyran-6-carboxylate

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)

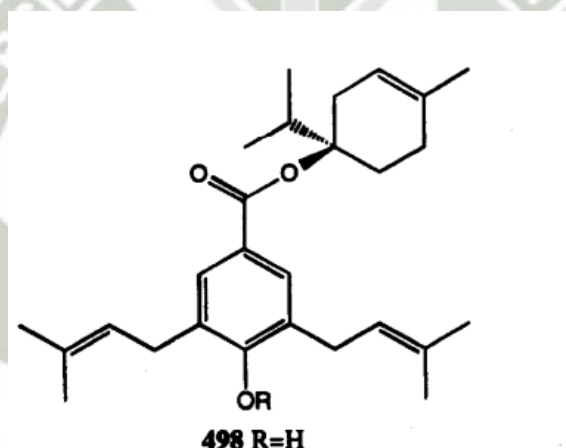


Figura 2.16.-1-(1-Methylethyl)-4-methyl-3-cyclohexenyl-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-4-hydroxybenzoate. R=H

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)

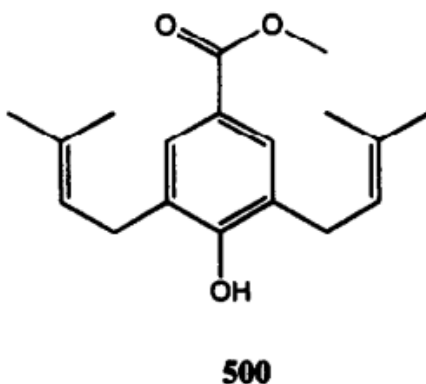


Figura 2.17.- Methyl 4-hydroxy-3,5-bis- (3-methyl-2-butenyl)-benzoate.

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)

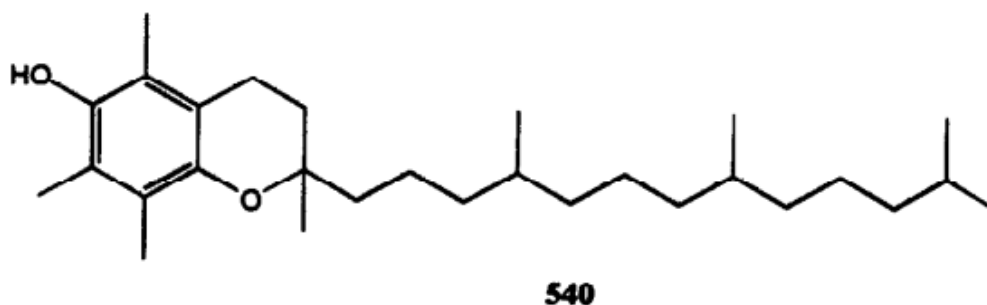


Figura 2.18.- α Tocoferol.

Extraído de: (Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry. 1997;46(4):597-673)

CAPITULO III

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales de vidrio

- Micropipetas
- Pipetas
- Bureta
- Propipeta
- Vasos de precipitado
- Camara de Neubauer
- Placas Petri para cultivo celular
- Placas de 96 pozos para cultivo celular
- Cubreobjetos
- Portaobjetos

3.1.2 Material biológico

- Línea celular de fibroblastos adultos humanos hDFa
- Ratas *Rattus Norvegicus*

3.1.3 Equipos

- Cámara para cultivo celular.
- PCR en tiempo real
- Cámara de flujo laminar
- Centrifuga
- Microscopio de luz invertida
- Microscopio
- Cámara para electroforesis

- Espectrofotómetro
- Balanza
- Refrigerador
- Autoclave
- Estufa
- Termómetro
- Matraz
- Medidor de pH

3.1.4 Otros

- Placas de cultivo celular de 6, 12, 24 pozos (NUNC) 25 piezas de cada una
- Placas Petri de cultivo celular de 100mm de diámetro (NUNC) 40 unidades
- Criotubos de 1.5ml (NUNC) 200 unidades
- Puntas de 1000ul azules (Sigma) 4 bolsas (500 unidades cada una)
- Puntas de 100uL amarillas con filtro (Sigma) 2 bolsas (500 unidades cada una)
- Puntas de 0,5 - 20uL blancas con filtro 2 bolsas (500 unidades cada una)
- Tubos ependorff de 1.5 mL (Sigma) 1000 unidades de cada uno
- Placas para PCR en tiempo real de 96 pozos (RT-PCR)

3.1.5 Materiales Químicos

- Agarosa grado biología molecular
- Tripsina EDTA
- Colagenasa tipo I y tipo III
- Estreptomicina
- Mitomicina
- Suero fetal Bovino
- Tris HCL
- Agua DEPC

- Bicarbonato de sodio
- Super mix PCR (Applied Biosystem)
- 1 Kit Super Script III Reverse transcriptase

3.2 Métodos

3.2.1 Obtención de extracto etanólico liofilizado de “*Piper aduncum*”

La calidad de los extractos vegetales biológicamente activos depende principalmente del método de extracción empleado en su obtención. Resulta evidente también que el procedimiento seguido en estos casos se ve reflejado tanto en el rendimiento del compuesto orgánico de interés como en el de otros metabolitos que pueden en un principio no interesar y que sin embargo, encontrándose presentes en el vegetal, poseen otras potenciales y diversas aplicaciones. (31)

La extracción es una de las operaciones básicas del laboratorio. Se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible.

Se pueden realizar desde los tres estados de la materia, y se llaman de la siguiente manera:

1) Extracción sólido – líquido; 2) extracción líquido – líquido y 3) extracción gas- líquido.

a) Extracción sólido – líquido continua

La extracción sólido- líquido, se emplea cuando la sustancia que se desea extraer está contenida en un material sólido, junto con otros componentes, los cuales deberán ser prácticamente insolubles en el disolvente utilizado. Es muy usada para aislar sustancias naturales de origen vegetal, o bien de mezclas resinosas obtenidas por síntesis. Para esto se suele emplear un aparato Soxhlet, que es un aparato de extracción continua. (31)

La extracción Soxhlet se fundamenta en las siguientes etapas: 1) colocación del solvente en un balón. 2) ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo. 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior. 4) ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón. 5) Se vuelve a

producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón del solvente. En la Figura 3.1 se observan las partes del Equipo Soxhlet. (32)

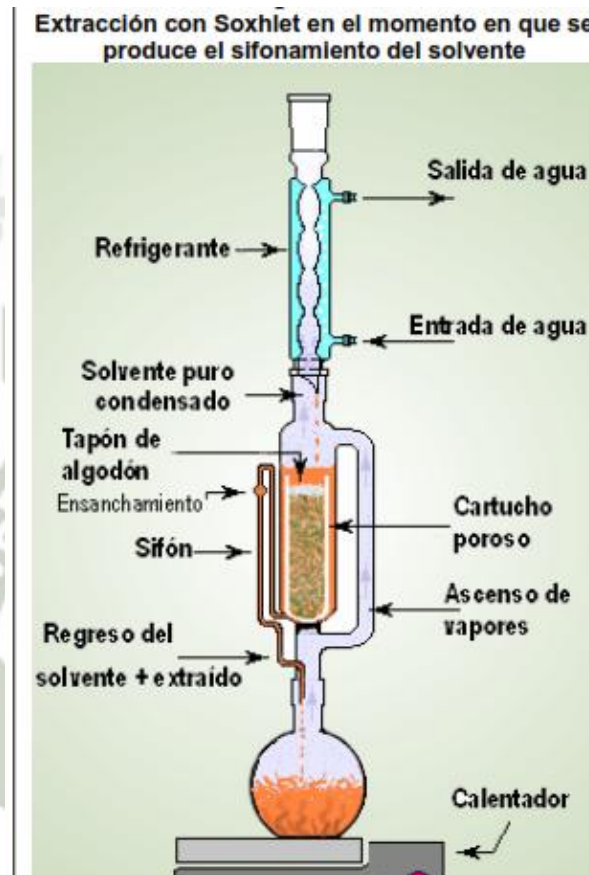


Figura 3.1 Equipo Soxhlet

Extraído de: (Nuñez Carlos E., Extracciones con equipo Soxhlet)

b) Destilación: uso de rotavapor

En la mezcla simple de dos líquidos solubles entre sí, la volatilidad de cada uno es perturbada por la presencia del otro. En este caso, el punto de ebullición de una mezcla al 50%, por ejemplo, estaría a mitad de camino entre los puntos de ebullición de las sustancias puras, y

el grado de separación producido por una destilación individual dependería solamente de la presión de vapor, o volatilidad de los componentes separados a esa temperatura.

Esta sencilla relación fue anunciada por vez primera por el químico francés François Marie Raoult (1830-1901) y se llama ley de Raoult. Esta ley sólo se aplica a mezclas de líquidos muy similares en su estructura química, como el benceno y el tolueno.

En la mayoría de los casos se producen amplias desviaciones de esta ley. Si un componente sólo es ligeramente soluble en el otro, su volatilidad aumenta anormalmente. En el ejemplo anterior, la volatilidad del alcohol en disolución acuosa diluida es varias veces mayor que la predicha por la ley de Raoult.

En la industrialización de productos naturales, tales como la producción de colorantes, la producción de materias primas aromáticas, la obtención de sustancias odoríferas, etc, se utilizan procesos como la extracción sólido-líquido y la extracción líquido-líquido.

En estas operaciones se utilizan grandes cantidades de solventes orgánicos, que luego es necesario eliminar para obtener los extractos o los productos naturales en forma pura. Dichos productos naturales tales como materias, colorantes, principios activos medicinales, esencias, etc., en la mayoría de las veces son sensibles a las temperaturas altas y a la exposición a la luz. En estos casos es conveniente la eliminación del o los solventes utilizados en el proceso de extracción, por evaporación a presiones subatmosféricas, que permite operar a bajas temperaturas. (33)

Para ello el equipo ideal para este tipo de operación técnica, es el evaporador rotativo, denominado rotovapor. En este aparato se utiliza presión reducida que puede ser controlada al nivel requerido para poder realizar la evaporación del solvente a la temperatura deseada. Además la rotación del balón permite que el producto a extraer forme una película de líquido muy fino que se evapora rápidamente, favoreciendo el proceso de evaporación.

Es posible de esta manera obtener productos naturales de la mejor calidad, que conserven todas las propiedades organolépticas, bioquímicas y químicas, sin aditivos de ninguna clase

y sin alteración alguna, con características similares a las que tenían en las materias primas iniciales.

c) Liofilización

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo quitar el agua o algún otro solvente de una disolución, mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida.

Este proceso permite secar productos ya sean orgánicos o inorgánicos, debido a que mantienen su composición cualitativa y cuantitativa. Se realiza en vacío y a bajas temperaturas, este proceso evita la desnaturalización de las proteínas. Así mismo los alimentos y materiales biológicos como células, tejidos, bacterias que son susceptibles a la degradación y a cambios enzimáticos, biológicos y químicos, conservan sus propiedades. Por lo que en el presente estudio se liofilizará el extracto etanólico de *Piper aduncum*; de esta manera se garantiza la conservación de sus propiedades y ofrece un mejor manejo para su aplicación en heridas. (34) (35)

a) Procedimiento

Las hojas de *Piper aduncum* 'matico' fueron colectadas de las ciudad de Arequipa, y certificadas por el herbario Arequipense HUSA de la Universidad Nacional de San Agustín de la ciudad de Arequipa (Ver Anexos). Las hojas fueron llevadas a sequedad, tal como se observa en la Figura 3.2, luego fueron pulverizadas en un mortero. Se pesaron 50 gr. de la muestra pulverizada y se realizó la extracción sólido-líquido en un equipo de extracción: Soxhlet, durante 6 horas utilizando como solvente etanol, en la Figura 3.3 se observa el equipo utilizado. Luego se eliminó el etanol mediante el uso de un rotavapor, el que se observa en la Figura 3.4. Finalmente se liofilizó el extracto obtenido y se almacenó en refrigeración a 4° C hasta su uso, en la Figura 3.5 se observa el extracto etanólico liofilizado el que fue utilizado para los posteriores ensayos.



Figura 3.2 Hojas de *Piper aduncum*.



Figura 3.3 Equipo de extracción Sólido- Líquido



Figura 3.4 Evaporador rotatorio. Utilizado para evaporación del solvente.



Figura 3.5 Extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*

3.2.2 Formulación del gel con extracto etanólico de *Piper aduncum*

Los geles son utilizados con más frecuencia en farmacia y en cosméticos por varias propiedades importantes, como su estado semisólido su alto grado de claridad, facilidad de aplicación, remoción y uso. Los geles a menudo proveen una liberación más rápida de la droga, independientemente de la hidrosolubilidad de la droga en comparación con las cremas y pomadas.

a) Compuestos para la formulación del gel

- Agua destilada.
- Alcohol Comercial de 70°.
- Carbopol 940.
- Extracto liofilizado de *Piper aduncum*
- Metilparabeno.
- Propilparabeno.
- Propilenglicol.
- Trietanolamina.
- Extracto liofilizado de *Piper aduncum*

b) Método de preparación

- Verificar la limpieza de los enseres y materiales necesarios para la fabricación.
- Identificar los componentes a usar.
- Pesar los componentes y rotularlos.
- Disolver el carbopol 940 en alcohol comercial de 70° 40 mL, agitando constantemente. (Solución A)
- Disolver los parabenos en 10 mL de agua junto con el propilenglicol y el extracto de *Piper aduncum*. (Solución B)
- Mezclar las dos soluciones A y B en un vaso de precipitado en agitación constante.

- Adicionar el alcohol comercial de 70° hasta completar un volumen de 100 mL y lograr la uniformidad del gel.
- Adicionar al gel la trietanolamina hasta que el pH sea de 6.5. El gel obtenido se observa en la Figura 3.6.

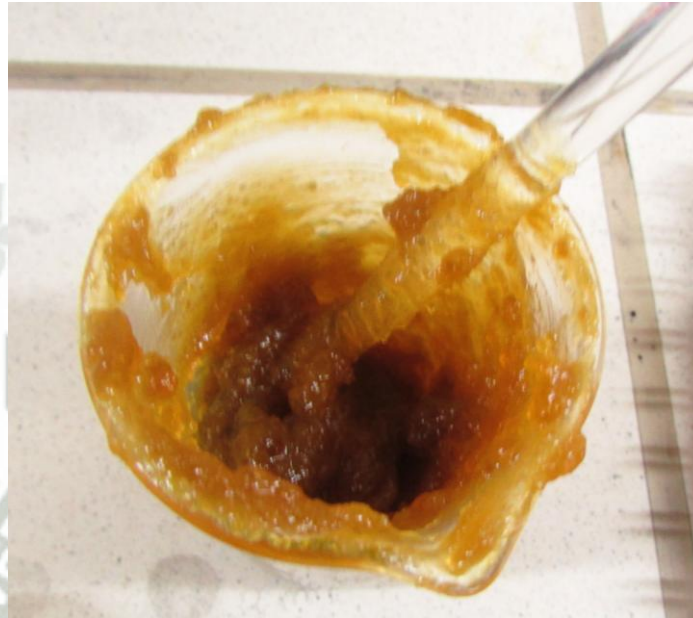


Figura 3.6 Formulación de gel con extracto etanólico de *Piper aduncum*.

3.2.3 Cultivo de línea celular hDFa, fibroblastos dermales adultos humanos.

La línea celular hDFa fue obtenida de Life Technologies (Carlsbad, CA), el vial que contenía las células se observa en la Figura 3.7. Se evaluó la viabilidad celular utilizando el método de tinción con azul de tripán, en la Figura 3.8 se observan las células vistas desde un microscopio.

Las células fueron cultivadas en placas con el medio de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (estreptomina 10 mg, penicilina 10000 unidades, anfotericina 0.23 mg), estos materiales se observan en la Figura 3.9. El cultivo se mantuvo a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células fueron cultivadas en placas hasta confluencia tal como se observa en la Figura 3.10.



Figura 3.7 Línea celular de fibroblastos dermales adultos humanos. Life Technologies (Carlsbad, CA)

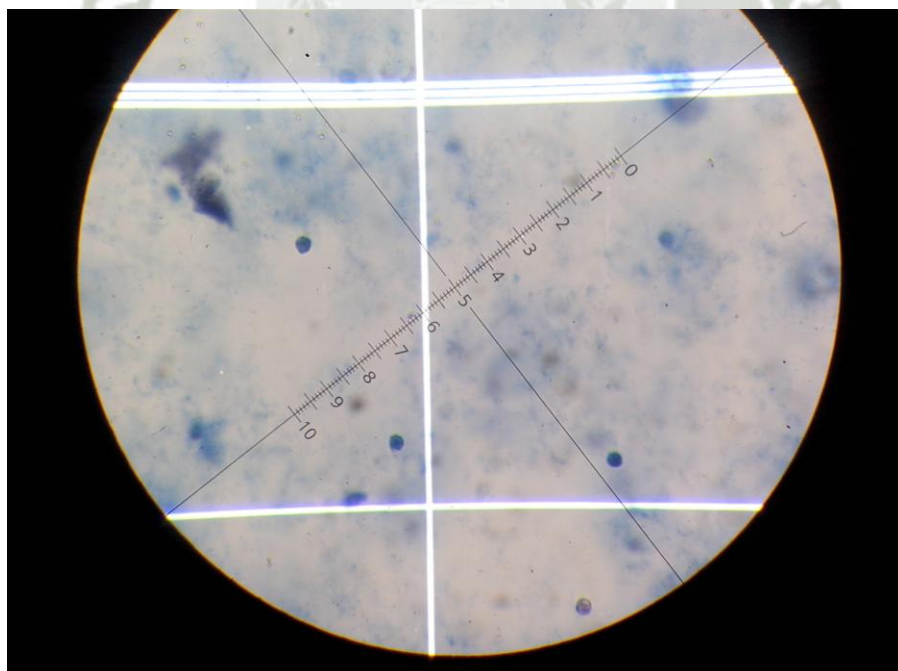


Figura 3.8 Evaluación de viabilidad celular por medio del método Azul de Tripán.



Figura 3.9 Medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (izquierda). Suero bovino fetal (centro). Antibióticos y antimicóticos (estreptomicina/ penicilina) (derecha).

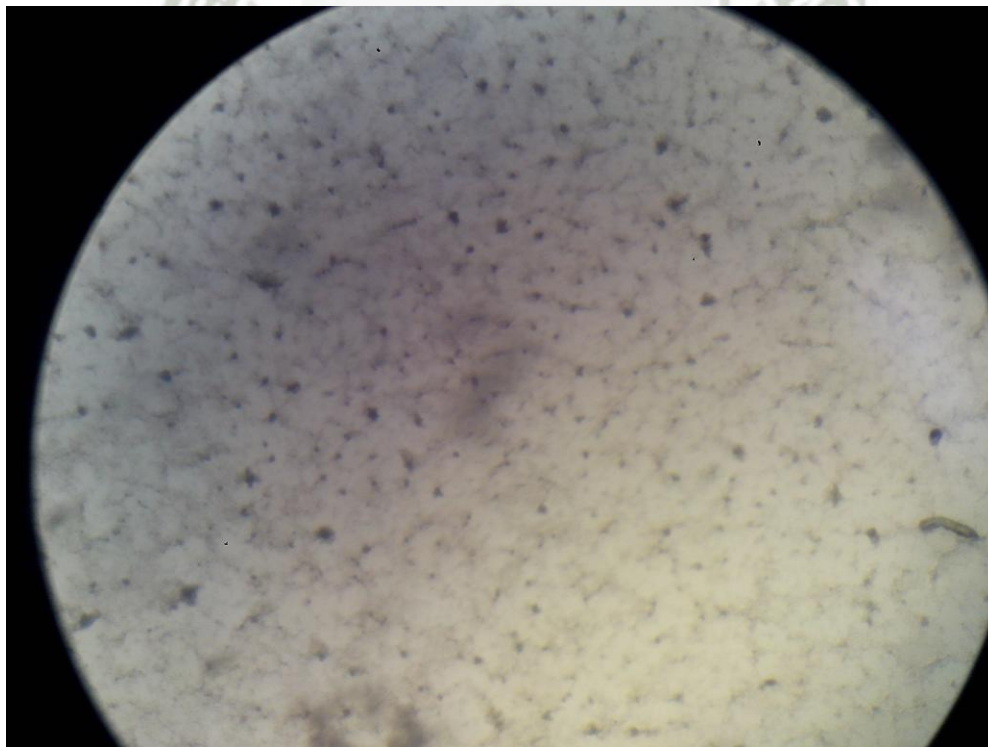


Figura 3.10 Vista en microscopio invertido de la línea celular de fibroblastos dermales adultos humanos. (hDFa)

3.2.4 Extracción de proteínas mediante cromatografía líquida de alta performance de fase reversa RP-HPLC

a) Cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa RP-HPLC

La cromatografía está basada en procesos de migración diferencial, en donde componentes de una muestra son retenidos de forma selectiva por una fase estacionario (matriz); luego son eluidos de forma secuencial, mediante un cambio en la polaridad de la fase móvil. En la cromatografía de fase reversa (RPC) si utiliza una matriz hidrofóbica, que usualmente es un grupo funcional octadecilo u octilo y una fase móvil polar.

La cromatografía de fase reversa se ha convertido en una herramienta indispensable para la separación de biomoléculas como proteínas y péptidos. (36)

En la actualidad, la RPC se usa de manera generalizada para separar los siguientes grupos de biomoléculas:

- Proteínas y péptidos de origen natural
- Proteínas y péptidos recombinantes
- Péptidos obtenidos por digestión enzimática
- Péptidos sintetizados químicamente
- Oligonucleótidos sintéticos

b) Separación e identificación de Péptidos y aminoácidos.

En la separación de aminoácidos y péptidos mediante fase reversa la resina más comúnmente empleada posee una cadena lineal de 18 carbonos y se denomina como C₁₈.

Dado que la resolución de los aminoácidos mediante RPC requiere de sistemas de HPLC, es frecuente referirse al sistema como C₁₈-HPLC.

La muestra se aplica a la columna en solución acuosa acidificada con ácido trifluoroacético, un ácido orgánico volátil y que se requiere muy puro. Para mejorar la solubilidad de los péptidos formados por aminoácidos muy apolares se añade al solvente un 10 a 20% de acetonitrilo. Para eluir de la columna los aminoácidos más apolares es necesario aumentar la concentración de acetonitrilo en el sistema. Esto se hace en forma gradual durante la elución, lo cual permite una gran resolución en la separación de las moléculas. El sistema C₁₈-HPLC requiere una mezcladora de solventes, un inyector, y una bomba que inyecta líquido a la columna. Generalmente las columnas de sílica requieren alta presión para que el flujo de líquido sea adecuado, se requiere una mezcladora para variar la proporción de solvente en la fase móvil y el inyector permite la aplicación de la muestra. En la Figura 3.11 se observan las partes del sistema de cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa, RP-HPLC.

(37)

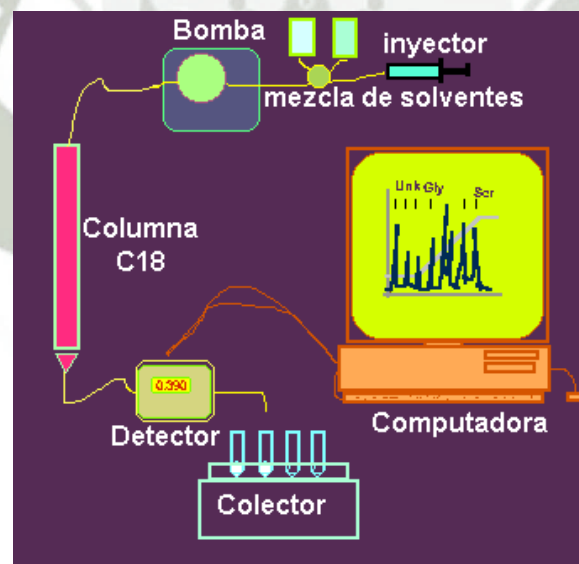


Figura 3.11 Sistema de Cromatografía Líquida de Alta eficacia de Fase Reversa- RP-HPLC

Extraído de: (<http://depa.fquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPrpc.html>)

A la salida de la columna se coloca un detector (generalmente de absorción ultravioleta o de fluorescencia) y si se desea recuperar las moléculas que eluyen de la columna, se requiere un colector. En el análisis y la cuantificación de aminoácidos, la recuperación de la muestra es innecesaria; pero cuando se separan péptidos producto de la fragmentación de una proteína para propósitos de secuenciación, el colector es indispensable.

En los sistemas modernos la formación del gradiente de acetonitrilo y el análisis de la información obtenida se realizan mediante una computadora acoplada al equipo; lo que permite estandarizar la cromatografía, identificar la naturaleza, los picos eluidos y cuantificar su contenido. Un cromatograma típico luce como se observa en la Figura 3.12.

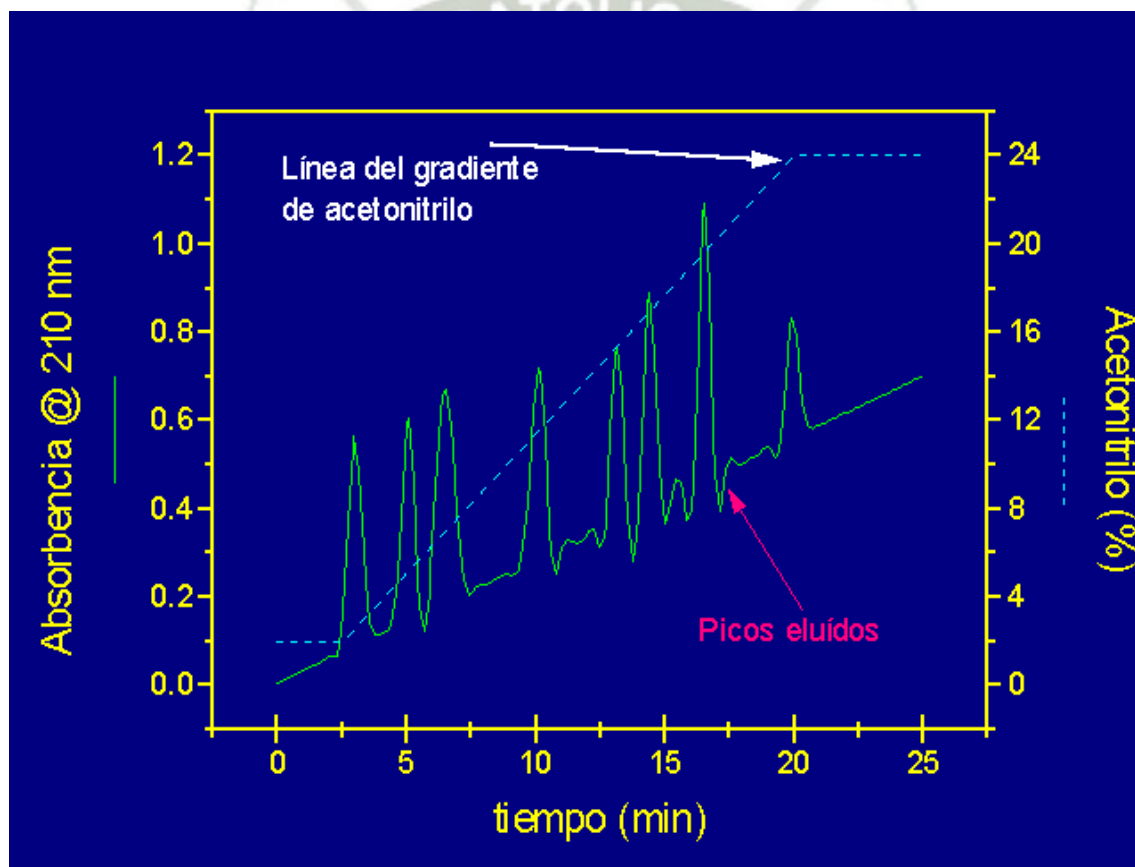


Figura 3.12 Esquema de cromatograma obtenido después de RP-HPLC

Extraído de: (<http://depa.fquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPPrpc.html>)

Los picos se relacionan según su "tiempo de retención" con estándares, que permiten identificar los aminoácidos presentes en la mezcla. La cantidad relativa de cada uno de ellos se determina calculando el área bajo la curva del pico correspondiente.

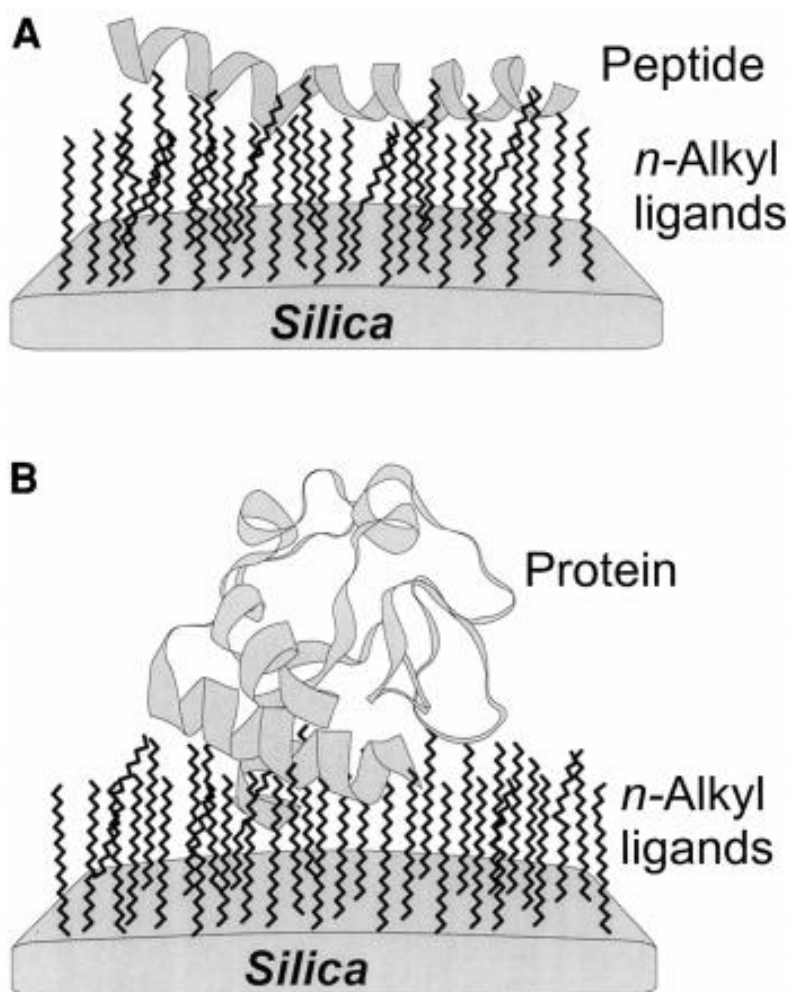


Figura 3.13.- Representación esquemática de la unión de péptidos y proteínas, a matriz de sílica

Extraído de: Aguilar MI. HPLC of peptides and proteins. Method and Protocols.

Para el presente estudio se utilizó una columna u-Bondapack C18; en la Figura 3.14 se observa la estructura de la Sílica y su perfil de selectividad.

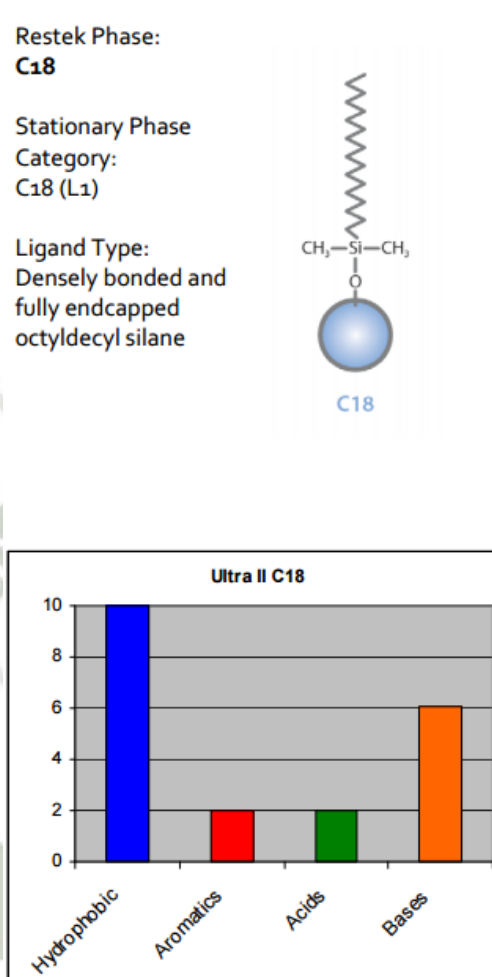


Figura 3.14.- Fase estacionaria: C18 (L1)

Extraído de: http://www.restek.com/pdfs/150-5_rp-selectivity.pdf

c) Procedimiento

Las fracciones proteínicas fueron purificadas en una columna u-Bondapack C18 (0,78 X 30 cm) preparativa, previamente equilibrada con ácido trifluoroacético 0.1% pH= 3.5 (Tampón A) acoplada a un sistema de HPLC de fase reversa. El sistema cromatográfico usado es de HPLC-PDA 991 (waters), equipado con dos bombas (waters) modelo 510/B, un inyector

automático de muestras U6K con un lazo o asa de 2,0 ml de capacidad. Inicialmente, la elusión de las muestras es realizada a través de un gradiente lineal con Acetonitrilo 66% (Tampón B), que fue modificado para la optimización de la purificación de las fracciones. Las fracciones fueron monitoriadas a 280 nm. Este procedimiento fue realizado por el servicio de laboratorio de la empresa Camposol.

3.2.5 Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem de péptidos trípticos

La espectrometría de masas (mass spectrometry MS), empezó con el análisis de biomoléculas a través de técnicas de ionización ; como la desorción de campo eléctrico (FD), la desorción de plasma (PD) y la ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB). Estas técnicas permiten la ionización de moléculas termolábiles de gran tamaño, como péptidos, proteínas, produciendo una degradación parcial. Otras técnicas más recientes que utilizan ionización suave son el electrospray (ESI), y la desorción por láser asistida por matriz (MALDI). (38) Las muestras pueden ser introducidas directamente a la fuente de iones del espectrofotómetro en una sonda. Una vez que la muestra se encuentra en la fuente de iones, las moléculas son ionizadas, para lo que la sustancia es bombardeada con un rayo de electrones. Los fragmentos positivos que se producen (cationes y cationes radicales) se aceleran en vacío a través de un campo magnético y son distribuidos en base a la relación carga/masa (m/z). Debido a que la mayor parte de los iones producidos en el espectrómetro conlleva una carga positiva, por tanto el valor de la relación m/z es equivalente al peso molecular del fragmento. (39)

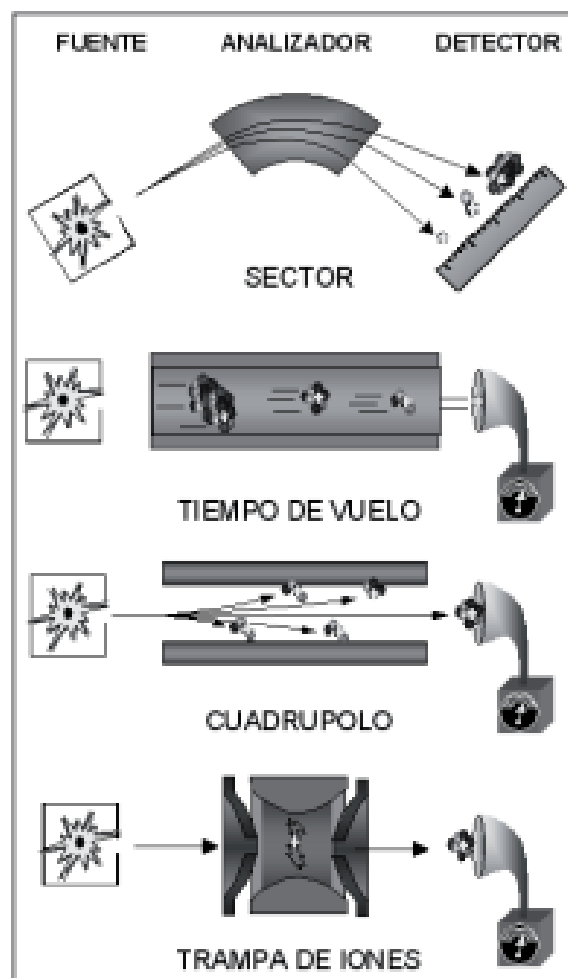


Figura 3.15 Analizadores de masa

Extraído de: (Abian Joaquín, Montserrat Carrascal, et. Al. Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en proteómica. Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB, Instituto de Investigacions Biomèdiques de Barcelona IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona.)

a) Espectrometría de masas en tándem de péptidos trípticos

En 1995 John Yates III, describe una estrategia para identificar proteínas a gran escala, mediante los espectros de masas en tándem, los que se obtuvieron del ion correspondiente a uno de los péptidos de digestión de la proteína y finalmente su comparación con espectros teóricos derivados de secuencias anotadas en bases de datos.

Este procedimiento puede aplicarse a la identificación de una proteína aislada mediante electroforesis en gel, o de una mezcla compleja de proteínas mediante el análisis exhaustivo de una colección de péptidos obtenido después de su digestión. (39) (38)

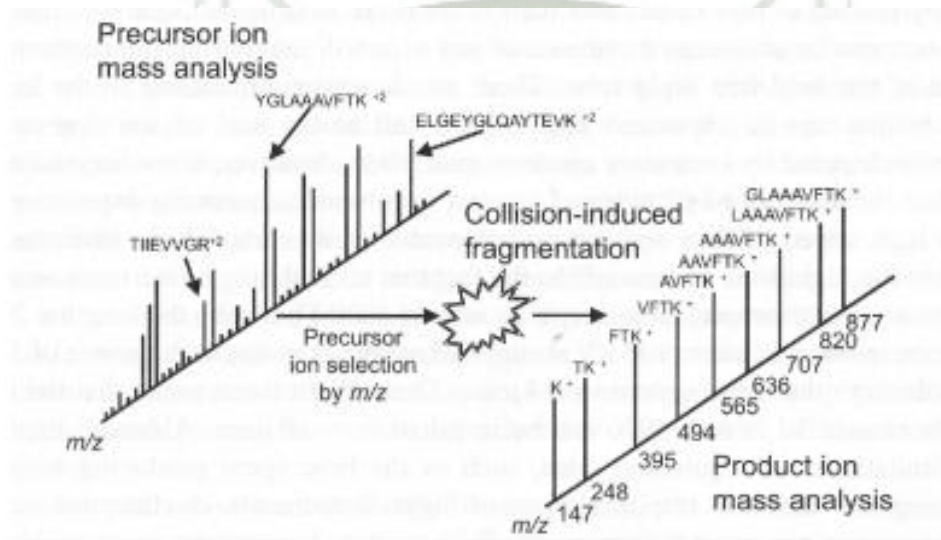


Figura 3.16 Caracterización estructural de un ion seleccionado en base a su masa por espectrometría de masas en tándem. El análisis de masa del ion precursor determina la m/z del péptido ionizado de interés. Ese ion se selecciona en base a su masa en la primera etapa del análisis y se activa por colisión con una molécula de gas neutral para inducir la reacción de fragmentación. Los iones producidos de la reacción de fragmentación se analizan en la segunda etapa del análisis de masa para producir un espectro de iones producidos.

Extraído de: (Camilo Ayala B., Rubén H. Regil. Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas. Métodos en bioquímica. Instituto de biotecnología. UNAM)

b) Procedimiento

Los picos de proteínas provenientes de la purificación vía HPLC de fase reversa, se sometieron a reducción (ditiotreitól 10 mM), alquilación (50 mM yodoacetamida y se analizaron por MALDI-TOF-TOF en un Espectrómetro de Masa AB Sciex 4800 (Applied Biosystems). Cada proteína se mezcló con un volumen igual de ácido α -ciano-hidroxicinámico saturado (en 50% de acetonitrilo, 0,1% TFA), en una placa de 384 pocillos Opti-TOF, se secaron, y se analizaron en el modo reflector positivo. Los espectros fueron adquiridos utilizando 1.500 disparos y una intensidad del láser de 3000. Se seleccionaron de forma automática Los diez iones precursores más intensos y sus espectros de fragmentación TOF/TOF fueron adquiridos utilizando 500 tiros a una intensidad del láser de 3900. La calibración externa en cada ejecución se realizó con normas CalMix® (ABSciex) avistados en el mismo plato. Para la identificación de proteínas en espectros resultantes se realizaron búsquedas en la base de datos UniProt / SwissProt usando ProteinPilot® v.4 y el algoritmo Paragon® (ABSciex) en $\geq 95\%$ de confianza, o interpretada de forma manual. Pocas secuencias de péptidos con puntajes más bajos de confianza se buscaron manualmente utilizando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para la similitud de proteínas y la asignación de la familia de proteínas.

3.2.6 Ensayos basados en MTT: evaluación del extracto etanólico liofilizado y sus fracciones proteicas, sobre la proliferación celular

a) Ensayos basados en MTT

La técnica colorimétrica que emplea el colorante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio) se utiliza en una gran variedad de ensayos como proliferación, citotoxicidad, viabilidad, etc., a través del análisis de la actividad mitocondrial celular. Ya que el MTT es un colorante de color amarillo soluble en agua, que es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales como lactato deshidrogenasa de células viables, pero no por

las muertas formando un producto de formazán de color púrpura que es insoluble en agua. El número de células es determinado de manera indirecta por la reducción del MTT, ya que aplicando la ley de Beer, la absorbancia es directamente proporcional al número de células.

(40)

b) Procedimiento

Las células hDFa, fueron cultivadas en placas de 96 pozos; con una densidad de 2×10^4 células por pozo. El extracto etanólico liofilizado se disolvió en DMSO (dimetilsulfoxido); (50, 100, 200, 250 $\mu\text{g/ml}$) y fue agregado al cultivo. Las proteínas purificadas K1 y K2 fueron disueltas en agua y añadidas al cultivo (1, 10, y 50 $\mu\text{g/mL}$).

Para evaluar la proliferación, se disolvió MTT en PBS a una concentración de 5 mg/mL . . El cultivo fue incubado a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Una vez terminado el tiempo de incubación se adicionó 20 μL de la solución de MTT y se incubó en oscuridad por 4h a 37°C . Finalmente se eliminó el MTT, se leyó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic modelo Genesys 10 y se determinó el porcentaje de proliferación. Se construyeron las curvas para determinar los valores de IC_{50} y EC_{50} .

3.2.7 Ensayo para evaluación de migración celular. Técnica del rayado.

a) Fundamento técnica rayado

Los ensayos que se han realizado en cultivo de células se han realizado durante muchos años para estimar la migración y las tasas de proliferación de diferentes células. Estos ensayos generalmente implican primero el crecimiento de una monocapa de células confluyente. Luego se rompe un área pequeña, un grupo de células quedan destruidas o desplazadas por una línea a través de la capa. La brecha abierta es inspeccionada microscópicamente, el tiempo en que las células se mueven dentro del área dañada es monitoreada. Esta “curación” puede tomar

varias horas o días, dependiendo del tipo de célula, y las condiciones de cultivo. Para que el ensayo tenga éxito el cultivo debe llegar a una confluencia mínima del 80 por ciento. (41)

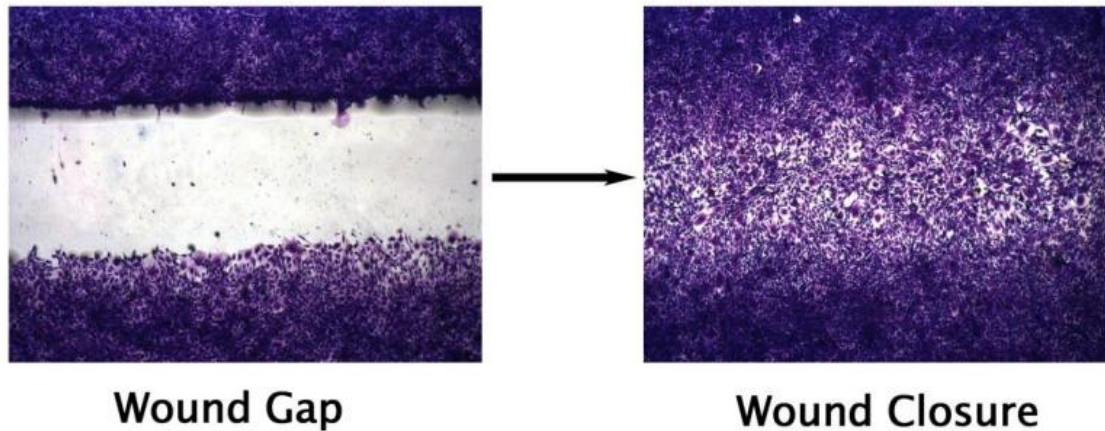


Figura 3.17 Modelo de herida In vitro. Técnica del rayado

Extraído de: (<http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/CBA-120-wound-healing-assay.pdf>)

b) Procedimiento

Las células se cultivaron hasta confluencia y se realizó una "herida", introducida por el raspado con una punta de pipeta. Las células en el borde de la herida polarizan y migran hacia el espacio de la herida.

El cultivo fue tratado con diferentes concentraciones del extracto etanólico (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$); así como diferentes concentraciones de las proteínas K1 y K2 (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Se trabajó por triplicado para cada tratamiento. Este ensayo se llevó a cabo en placas de 6 pozos, en donde se sembraron los fibroblastos, y dejaron crecer hasta confluencia, se aplicaron los diferentes tratamientos y finalmente se cuantificó la migración de los fibroblastos después de 24, 48 y 72 horas con el Software WinScratch de Ibidi. Se evaluó el porcentaje de migración de fibroblastos hacia el centro de la herida. (41)

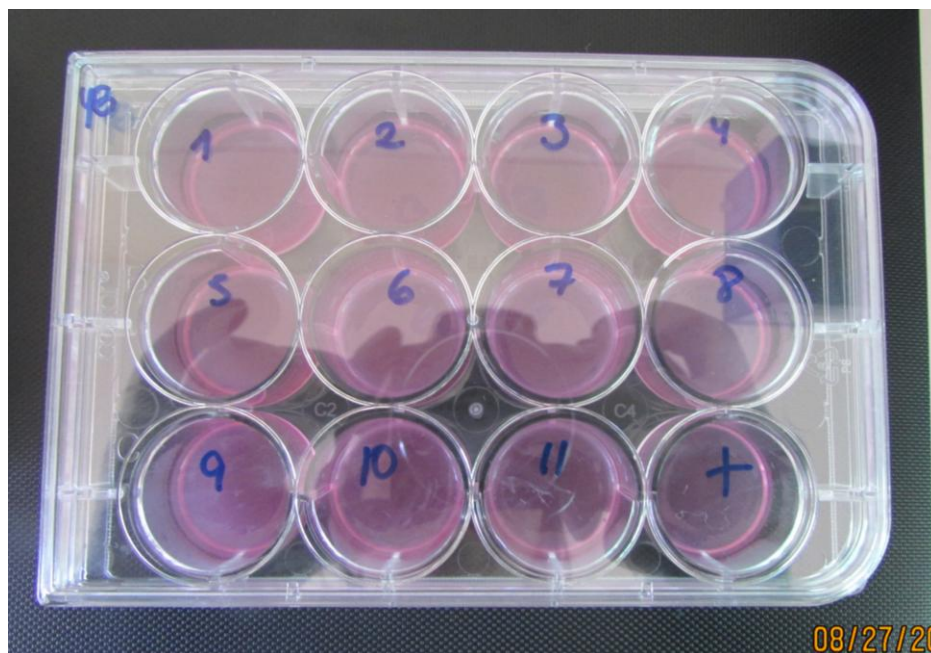


Figura 3.18 Placa de cultivo celular (12 pozos).



Figura 3.19 DMSO (Dimetilsulfóxido) Solvente utilizado para realizar las diluciones del extracto etanólico de *Piper aduncum*

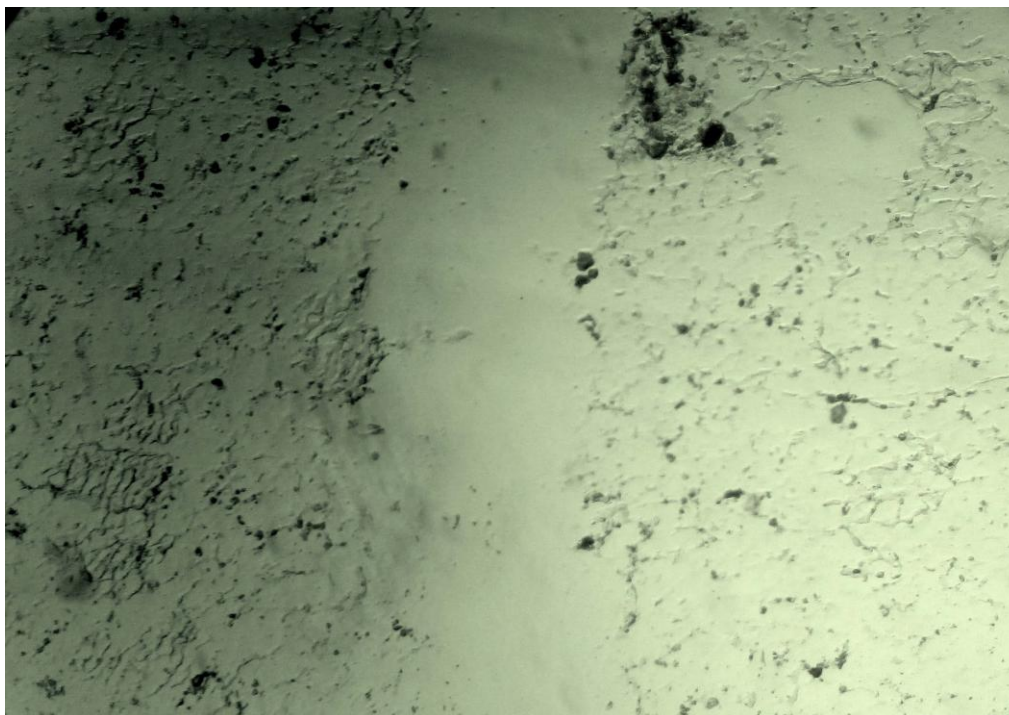
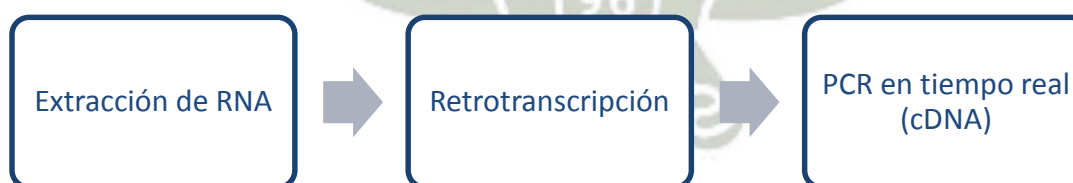


Figura 3.20 Modelo de herida en Cultivo de fibroblastos. Técnica del rayado

3.2.8 Extracción del RNA de fibroblastos y análisis de expresión de cDNA mediante RT- qPCR

Para el análisis de la expresión de genes, se siguieron los siguientes procedimientos:



a) Extracción de RNA – método trizol

En los organismos celulares el ARN es la molécula encargada de dirigir la síntesis de proteínas, pues aunque el ADN es el que contiene la información que determina la estructura de estas, no puede actuar solo y se vale del ARN para traducir esta información y producir las proteínas necesarias para el desarrollo y actividades de la célula. La mayor dificultad en la extracción del ARN es evitar la contaminación con RNAsas, enzimas muy estables que no requieren cofactores para su función. Por lo tanto, se deben tratar las soluciones y los materiales con dietil-piro carbonato (DEPC), el cual inactiva las ribonucleasas por modificación covalente. (42)

El trizol es un reactivo listo para utilizarse en el aislamiento de ARN de células y tejidos, es una solución mono-fásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del RNA, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares ha demostrado estabilidad hasta por 12 meses a temperatura ambiente sin embargo se recomienda almacenarlo a temperatura de 2-8°C para un óptimo rendimiento. (42)

La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en tres fases, tal como se observa en la Figura 3.21, una de ellas acuosa y la otra orgánica, el RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa y puede ser recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, una vez removida la fase acuosa el ADN y las proteínas en la muestra pueden ser recuperadas por precipitaciones secuenciales de la misma.

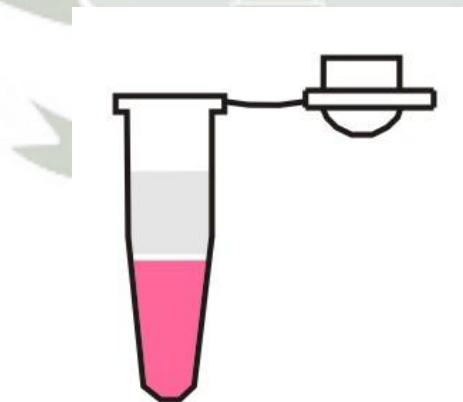


Figura 3.21 Método Trizol Se generan 3 fases, la inferior (fenol/cloroformo), la interfase, y la fase superior acuosa que contiene el RNA.

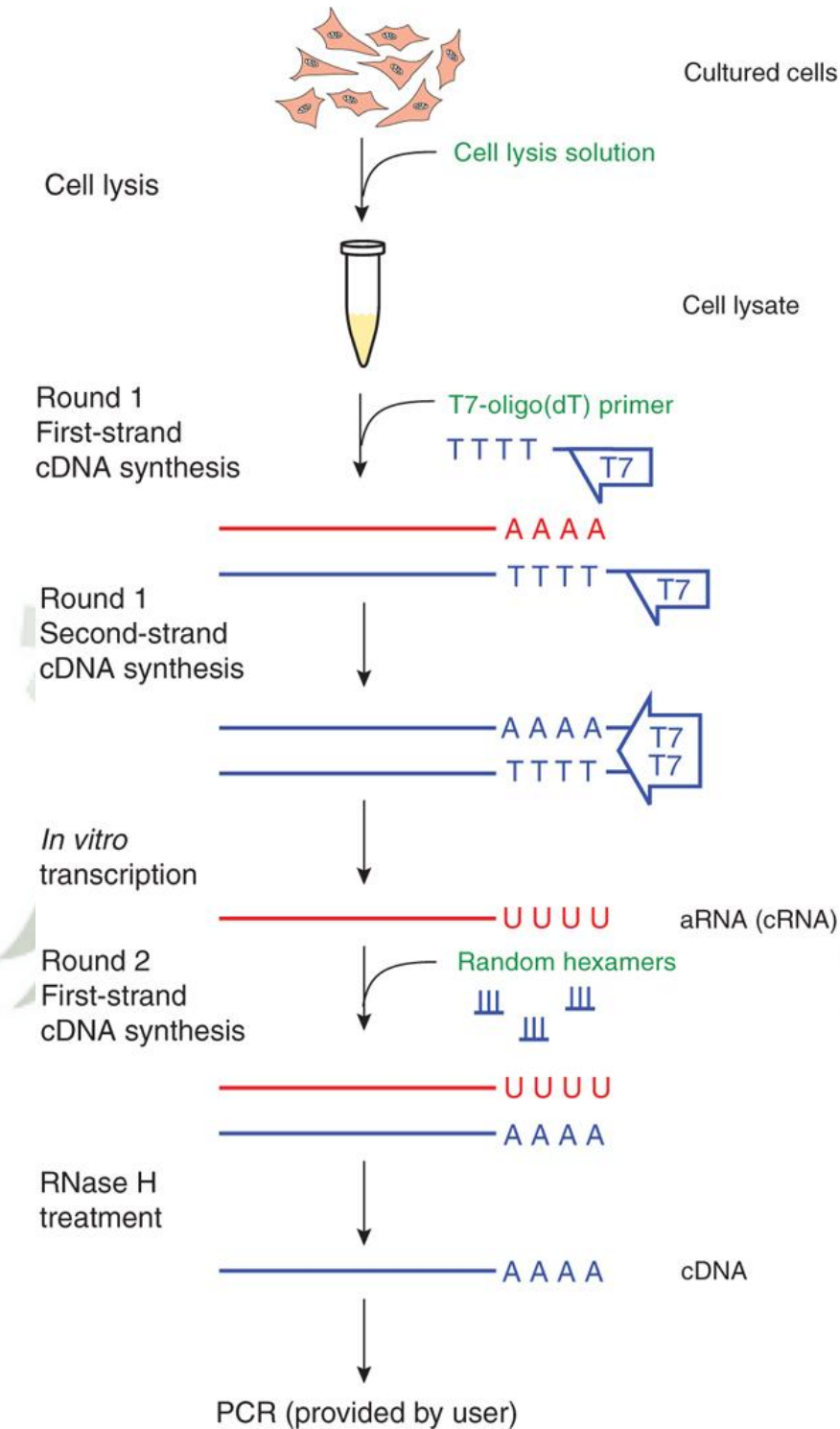


Figura 3.22 Análisis de la expresión de genes mediante PCR.

Extraído de: (http://www.nature.com/nmeth/journal/v6/n8/fig_tab/nmeth.f.261_F1.html)

b) Síntesis de cDNA a partir de RNAm

La transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite sintetizar DNA complementario (cDNA) a moléculas de RNA usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El cDNA obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de RNA. En la Figura 3.22 se detalla el procedimiento para la obtención de cDNA a partir de células en cultivo.

c) PCR en tiempo real (RT-qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer"). La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real. La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que

queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando. (42) (43) (44)

d) Procedimiento

El cultivo celular (hDFa) fue tratado con diferentes concentraciones del extracto etanólico (50, 100 y 200 µg/mL); y diferentes concentraciones de las proteínas K1 y K2 (10 y 50 µg/mL). Se trabajó por triplicado para cada tratamiento. Este ensayo se llevó a cabo en placas de 12 pozos, en donde se sembraron los fibroblastos, y dejaron crecer hasta confluencia, se aplicaron los diferentes tratamientos y se dejó incubar en diferentes tiempos (1 y 3 horas). Finalmente se extrajo el RNA total del cultivo, mediante el método de trizol. Se utilizó el reactivo RNazolRt. El RNAm obtenido fue transformado a cDNA utilizando el kit Super Script III Reverse Transcriptase de Life Technologies (Carlsbad, CA); se utilizó el Equipo Eppendorf Mastercycler realplex. Para evaluar la pureza de RNA; se consideró la relación 260/280. Luego se procedió a amplificar el cDNA utilizando primers para los genes EGF, FGF y PDGF. Las secuencias de los primer utilizados fueron:

- Gen EGF: forward: 5CAATGCAACCAACTTCATGG3,
reverse: 5AAGCTTCGCTCCATTACCTG3,
- Gen FGF: forward: 5CTCTTTCAGCATTACAC3,
reverse: 5TCCCCTAACACA ACTTAC3
- Gen PDGF: forward: 5´CACACCTCCTCGCTGTAGTATTTA3,
reverse: 5´GTTATCGGTGTAAATGTCATCCAA3´
- Gen GADPH: forward: 5´GAAGGTGAAGGTCGGAGTC3,
reverse: 5´GAAGATGGTGATGGGATT´3.

Se utilizó gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa GADPH como gen de referencia.

La amplificación se realizó utilizando qPCR. Finalmente para la cuantificación se utilizó el método de cuantificación relativa del $2^{-\Delta\Delta C_t}$.



Figura 3.23 Extracción de RNA

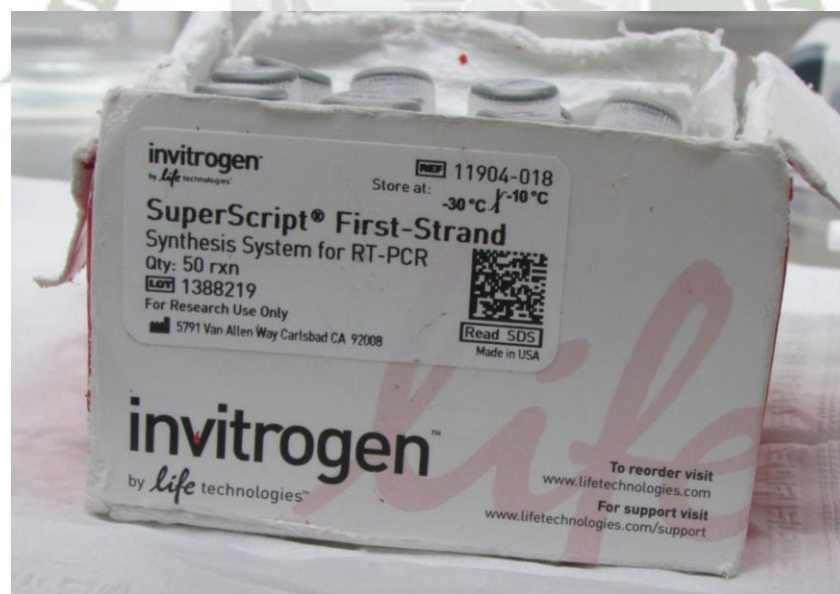


Figura 3.24: Kit SuperScript First-Strand utilizado para la retrotranscripción de RNA.

3.2.9 Efecto del extracto etanólico de *Piper aduncum* en modelo de herida inducida en ratas

a) Animales

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Católica de Santa María.

Se trabajó con ratas *Rattus norvegicus*, con peso entre 250 – 300 gr.

Los animales fueron alojados y mantenidos con alimentación normal y agua a voluntad individual.

Se aplicó tiopental sódico antes de la cirugía.

Las intervenciones quirúrgicas se llevaron a cabo en condiciones estériles utilizando tiopental sódico 50 mg/kg.

Los animales fueron observados de cerca, fueron reemplazados en el caso de que alguno presentó signos de infección. (45) (46)

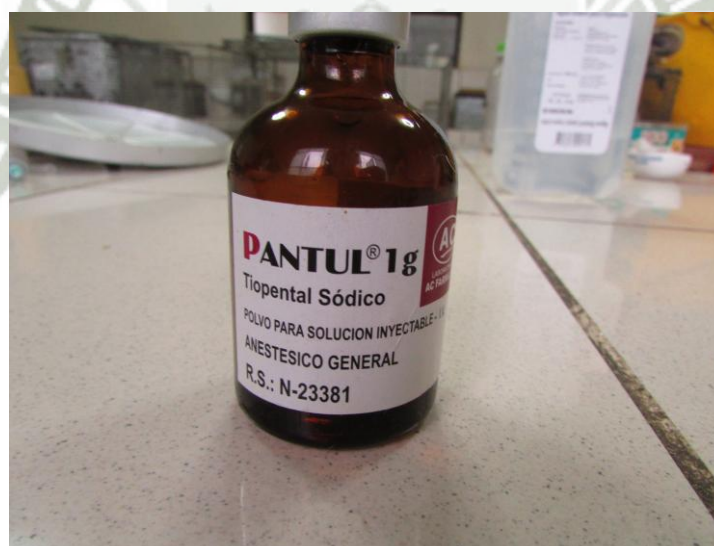


Figura 3.25 Tiopental sódico administrado antes de la cirugía.

b) Modelo de herida

Los animales fueron anestesiados antes y durante la creación de las heridas. La piel dorsal de los animales se afeitó con una maquinilla eléctrica. Se realizó una escisión de 1 cm de longitud con un bisturí afilado, la profundidad se realizó hasta la hipodermis.



Figura 3.26 Modelo de herida en *Rattus norvegicus*

c) Tratamientos

• **Tratamiento 1**

Después de la creación de la herida, se aplicó tópicamente el extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum* sobre la herida afectada una vez al día.

Los animales fueron sacrificados después de 3 y 7 días de infligir la herida con una inyección intraperitoneal de tiopental de sodio con 100 mg/kg de peso corporal.

• **Tratamiento 2**

Después de la creación de la herida, se aplicó tópicamente el gel con el extracto de *Piper aduncum* sobre la herida afecta una vez al día.

Los animales fueron sacrificados después de 3 y 7 días de infligir la herida con una inyección intraperitoneal de tiopental de sodio con 100 mg/kg de peso corporal.

Tabla 3.1 Grupo de estudio

Grupo 1	Grupo control: los animales no recibieron tratamiento. Se trabajó por triplicado.
Grupo 2	Aplicación tópica de: extracto etanólico liofilizado de <i>Piper aduncum</i> sobre la herida afectada una vez al día. Se trabajó por triplicado.
Grupo 3	Aplicación tópica de: gel con el extracto de <i>Piper aduncum</i> sobre la herida afecta una vez al día. Se trabajó por triplicado.

d) Examen macroscópico de las heridas

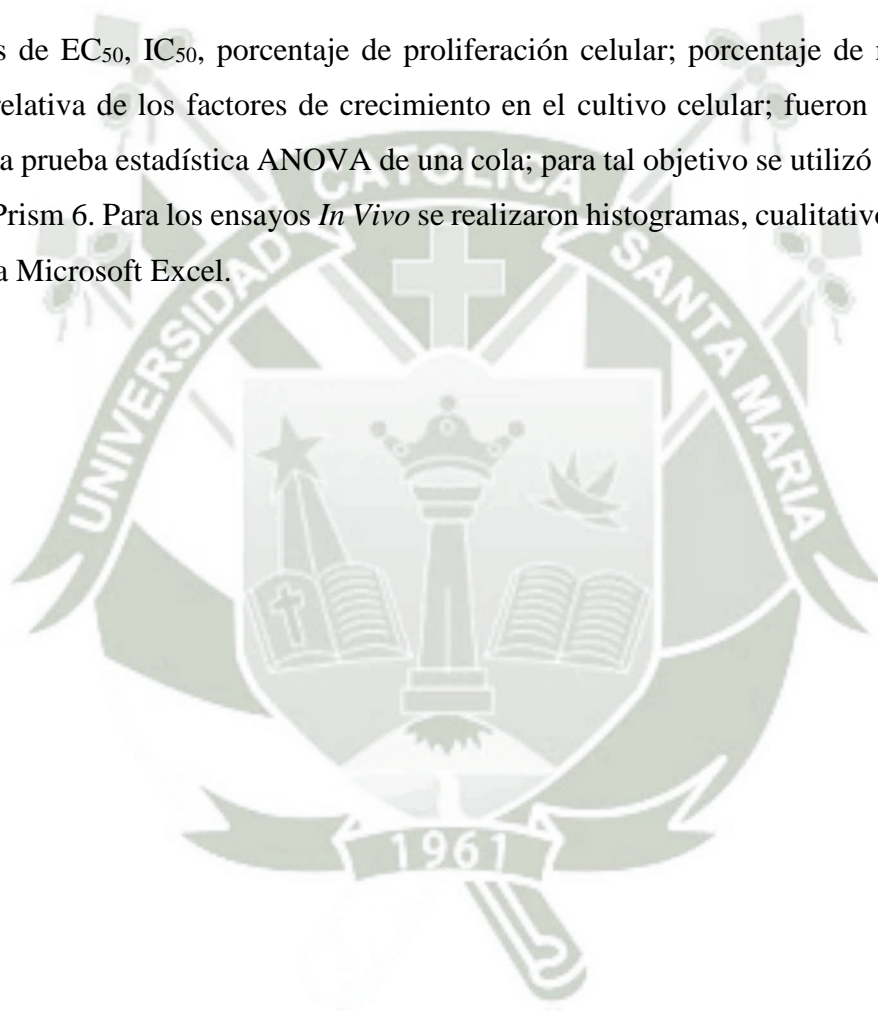
La herida fue examinada en los días 3, 7 y 14 después de la lesión. La lesión de las heridas se examinó utilizando los siguientes criterios: color, exudados, inflamación de la superficie de la herida, y la consistencia de los tejidos que rodean la herida.

e) **Análisis histopatológico**

Los tejidos fueron obtenidos en los días 3 y 7 de los dos grupos de animales con la incisión de la herida; fueron procesados para el estudio histológico.

3.2.10 **Análisis estadístico**

Los valores de EC_{50} , IC_{50} , porcentaje de proliferación celular; porcentaje de migración y expresión relativa de los factores de crecimiento en el cultivo celular; fueron comparados utilizando la prueba estadística ANOVA de una cola; para tal objetivo se utilizó el Software GrapdPad Prism 6. Para los ensayos *In Vivo* se realizaron histogramas, cualitativos, se utilizó el programa Microsoft Excel.



CAPITULO IV

4. Resultados y discusión

4.1 Extracción de proteínas mediante cromatografía líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC)

El extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*, fue purificado utilizando una columna u-Bondapack C18. Esta columna posee una moderada hidrofobicidad y una alta polaridad, en el cromatograma obtenido (λ 280 nm.) se observaron 5 picos bien definidos tal como se observa en la Figura N°4.1.

El sistema eluyente permitió purificar los 5 compuestos obtenidos con una buena resolución. Debido a la naturaleza hidrofóbica de la fase estacionaria (sílica C18) y a su larga cadena de residuos hidrofóbicos permite la captura de péptidos o pequeñas moléculas. En general las proteínas más grandes, es probable que tenga más residuos hidrofóbicos, y por tanto interactúan fácilmente con la columna, sin embargo, péptidos más pequeños o proteínas pequeñas requieren cadenas más largas de residuos hidrofóbicos. (47)

Los compuestos aislados (5 picos) fueron liofilizados y su identificación se realizó mediante la técnica de Bradford, basada en la unión del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* a las proteínas. Esta unión altamente sensible permitió la identificación de los compuestos eluidos.

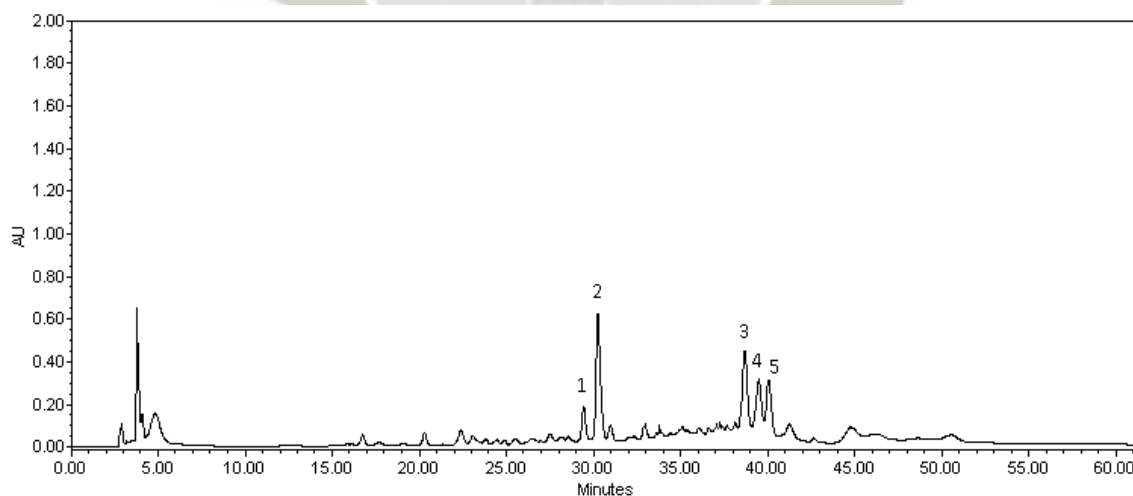


Figura 4.1 Cromatograma RP-HPLC. 5 picos de elución de diferentes proteínas

Los picos de proteínas obtenidos; fueron denominados arbitrariamente: K1, K2, K3, K4 y K5 para los posteriores ensayos.

4.2 Identificación de proteínas por espectrometría de masas en tándem de péptidos trípticos

Las proteínas K1, K2, K3, K4 y K5 aisladas mediante RP-HPLC fueron liofilizadas y posteriormente se realizó su identificación mediante la secuenciación del extremo N-terminal utilizando la técnica de espectrometría de masas en tándem de péptidos trípticos, metodología que se encuentra detallada en la página 65.

Las secuencias de las porciones N-terminales de las 5 proteínas K1, K2, K3, K4 y K5 se especifican en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Secuencias N-terminales del extracto etanólico de “*Piper aduncum*”.

K1	EPLLDSEGELVENG GTYYIVPA
K2	VLVDGNGEPLVNGGSAYYILS
K3	KELLSDGDILRNGGTYYILPALR
K4	VLLDGNGEVVQNGGTYYLL
K5	QPLVDLEGNLVENG GTYYLLP

4.3 Análisis de las secuencias N-terminales mediante BLAST

La vida de cada proteína empieza en el extremo N-terminal, durante la iniciación de la traducción del ARNm en proteínas. Los extremos N-terminales son los primeros en salir de los ribosomas al citosol. La secuenciación N-terminal es un método de elección para varios tipos de aplicaciones de análisis estructural de proteínas, una de las aplicaciones es la identificación de proteínas aisladas de especies, en la que la mayor parte del genoma aún no fue identificado. (48)

Después de obtener las secuencias N- terminales de las proteínas K1, K2, K3, K4 y K5, se realizó su identificación utilizando el programa informático BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Este programa permite el alineamiento de secuencias de tipo local comparando una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentran en las bases de datos. Las secuencias N-terminales fueron comparadas contra las proteínas no redundantes (nr) de la base de datos. Finalmente se seleccionó la proteína con el más alto porcentaje de identidad, de esta manera se verifican los sitios idénticos (aminoácidos) para ambas proteínas.

4.3.1 Proteína K1

Después de realizar el alineamiento de la secuencia N-terminal de la proteína K1 se encontró la proteína homóloga: Trypsin inhibitor 1^a, AltName: Full=WT-1 (Psophocarpus tetragonolobus)

Sequence ID P10821.1

Identidad: 86 %

E-value: 2e-08

RecName: Full=Trypsin inhibitor 1A; AltName: Full=WTI-1A [Psophocarpus tetragonolobus]
Sequence ID: [sp|P10821.1|IT1A_PSOTE](#) Length: 172 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 21 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
55.4 bits(123)	2e-08	18/21(86%)	18/21(85%)	0/21(0%)

Query 1 EPLLDSEGELVENGTTYIVP 21
EPLLDSEGELV NGTTY P
Sbjct 1 EPLLDSEGELVRNGTTYLLP 21

Figura 4.2 Alineamiento de la proteína K1 con la proteína inhibidora de tripsina 1A.

Se encontraron 18 posiciones idénticas en el alineamiento; del total de 21 aminoácidos que corresponden a la secuencia N-terminal de la proteína K1.

4.3.2 Proteína K2

Después de realizar el alineamiento de la secuencia N-terminal de la proteína K2 se encontró la proteína homóloga: Cadena alfa del inhibidor de tripsina tipo Kunitz (Beta vulgaris subsp. Vulgaris)

Sequence ID:XP_010693620

Identidad: 78 %

E-value : 0.58

PREDICTED: kunitz-type trypsin inhibitor alpha chain-like [Beta vulgaris subsp. vulgaris]
Sequence ID: [ref|XP_010693620.1|](#) Length: 205 Number of Matches: 1

Range 1: 31 to 47 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
36.3 bits(78)	0.58	14/19(74%)	15/19(78%)	2/19(10%)

```
Query 1 VLVDGNGEPLVNGGSAYYI 19
      VL D +GEPLVNGG YYI
Sbjct 31 VL-DTDGEPLVNGG-QYYI 47
```

Figura 4.3 Alineamiento Proteína K2

Se encontraron 14 posiciones idénticas en el alineamiento; del total de 19 aminoácidos que corresponden a la secuencia N-terminal de la proteína K2.

4.3.3 Proteína K3

Después de realizar el alineamiento de la secuencia N-terminal de la proteína K3 se encontró la proteína homóloga: Trypsin inhibitor; Short=EcTI; Contains: RecName: Full=Trypsin inhibitor alpha chain; Contains: RecName: Full=Trypsin inhibitor beta chain [Enterolobium contortisiliquum]

Identidad: 100 %

E-value: 1e-16

Range 1: 1 to 24 [GenPept](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Positives
79.1 bits(179)	1e-16	24/24(100%)	24/24(100%)
Query 1	KELLDSGDILRNGGTYIIPALR	24	
	KELLDSGDILRNGGTYIIPALR		
Sbjct 1	KELLDSGDILRNGGTYIIPALR	24	

Figura 4.4 Alineamiento Proteína K3

Todas las posiciones fueron idénticas; del total de 24 aminoácidos que corresponden a la secuencia N-terminal de la proteína K3.

4.3.4 Proteína K4

Después de realizar el alineamiento de la secuencia N-terminal de la proteína K4 se encontró la proteína homóloga: Inhibidor de tripsina DE-3, (Erythrina corallodendron)

Sequence ID: P68170.1

Identidad: 100 % E-value : 1e-12

RecName: Full=Trypsin inhibitor DE-3, partial [Erythrina corallodendron]

Sequence ID: [sp|P68170.1|IDE3_ERYCO](#) Length: 20 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 19 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previ

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
62.6 bits(140)	1e-12	19/19(100%)	19/19(100%)	0/19(0%)
Query 1	VLLDGNGEVVQNGGTYILL	19		
	VLLDGNGEVVQNGGTYILL			
Sbjct 1	VLLDGNGEVVQNGGTYILL	19		

Figura 4.5 Alineamiento Proteína K4

Todas las posiciones fueron idénticas; del total de 19 aminoácidos que corresponden a la secuencia N-terminal de la proteína K4.

4.3.5 Proteína K5

Después de realizar el alineamiento de la secuencia N-terminal de la proteína K5 se encontró la proteína homóloga: Chymotrypsin inhibitor (Erythrina variegata)

Sequence ID. P34952.1

Identidad: 100 %

E-value : 1e-13

Todas las posiciones fueron idénticas; del total de 21 aminoácidos que corresponden a la secuencia N-terminal de la proteína K5.

RecName: Full=Chymotrypsin inhibitor ECI [Erythrina variegata]

Sequence ID: [sp|P34952.1|ECI_ERYVA](#) Length: 179 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 21 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previo

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
70.2 bits(158)	1e-13	21/21(100%)	21/21(100%)	0/21(0%)

```

Query 1  QPLVDLEGNLVENGTTYLLP 21
          QPLVDLEGNLVENGTTYLLP
Sbjct 1  QPLVDLEGNLVENGTTYLLP 21
    
```

Figura 4.6 Alineamiento Proteína K5.

Luego del análisis y búsqueda de secuencias homólogas mediante alineamiento local se encontró un dominio conservado en común para las 5 proteínas aisladas del extracto, tal como se observa en la Figura 4.7

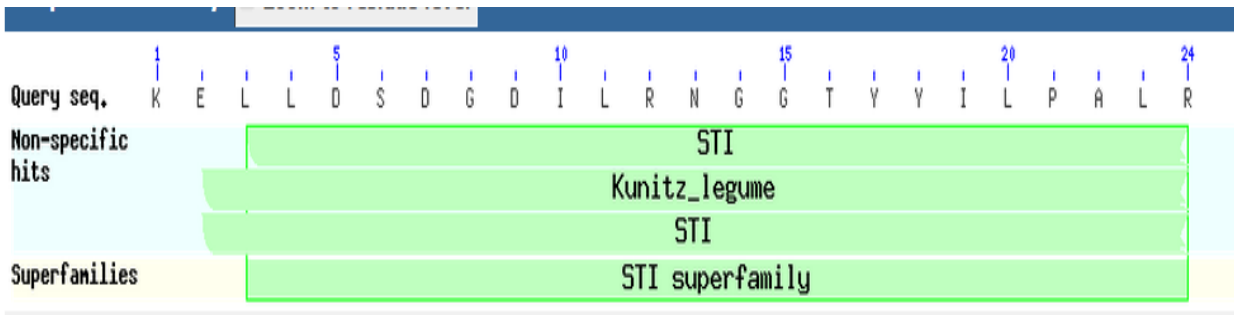


Figura 4.7 Dominios conservados Superfamilia STI

Este dominio pertenece a la superfamilia STI (Inhibidores de tripsina) los que son inhibidores de proteasas, debido a que se unen con alta afinidad a sus sitios activos. El plegamiento del dominio es común en interleuquinas y factores de crecimiento de fibroblastos, plegamiento que es denominado “trébol” por su estructura. (50)

Esta familia de inhibidores de proteasas tiene una estructura en común llamada “Kunitz”, la que se puede observar en la Figura 4.8.

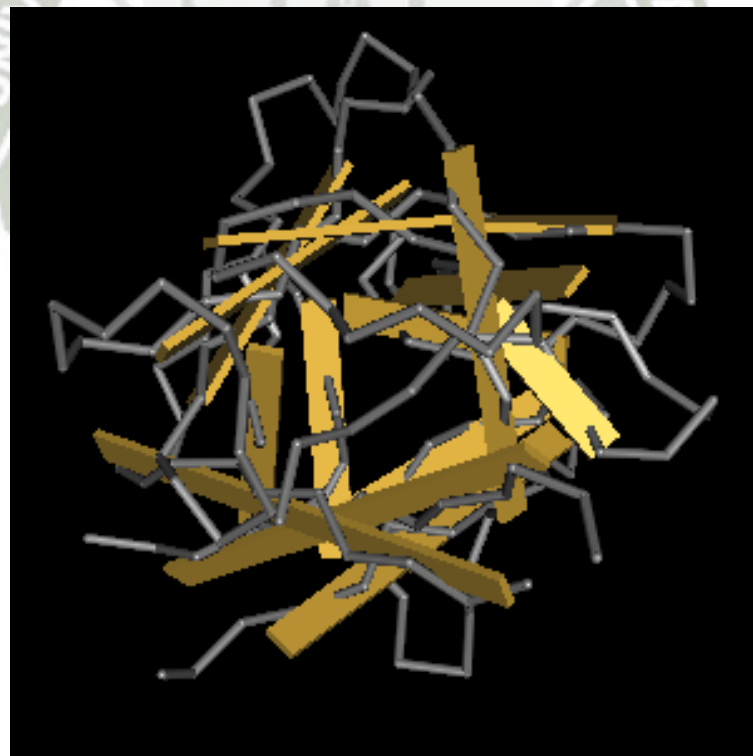


Figura 4.8 Estructura tridimensional del inhibidor tipo Kunitz

4.4 Evaluación del extracto etanólico liofilizado y sus fracciones sobre la proliferación celular

El cultivo celular de fibroblastos fue tratado con diferentes concentraciones del extracto etanólico liofilizado (10, 50, 100, 200 y 250 µg/ml) y con diferentes concentraciones de las proteínas K1 y K2 (1, 10, 50 µg/ml). Después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento se determinó el porcentaje de proliferación, mediante la técnica que utiliza el colorante MTT. Debido a que el número de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido es posible determinar el porcentaje de proliferación mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Proliferación} = \frac{\text{OD de células tratadas}}{\text{OD de células no tratadas}} * 100$$

OD: Densidad óptica.

Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado y se trabajó con dos controles negativos uno de ellos sin tratamiento y el otro fue tratado con DMSO. La tabla N° 4.2 contiene las medias de los porcentajes de proliferación obtenidos luego de aplicar las diferentes concentraciones del extracto.

Tabla N° 4.2 Tabla de porcentaje de proliferación celular.

Porcentaje de proliferación celular							
Tiempo de tratamiento (Horas)	Tratamiento						
	Control	DMSO	Extracto 10 ug/ml	Extracto 50 ug/ml	Extracto 100 ug/ml	Extracto 200 ug/ml	Extracto 250 ug/ml
24	100	97	103	125	126	147	137
48	100	99	103	143	156	158	127
72	100	98	92	85	131	84	64

* La tabla muestra las medias de los porcentajes de proliferación celular obtenidos de las muestras evaluadas por triplicado

Se aplicó la prueba estadística del Test de Dunnett y la prueba paramétrica ANOVA, con el Software Graph Prism y se obtuvo los valores de P-Value que se encuentran en la Tabla 4.3

Tabla 4.3 Valores de p-value obtenidos luego de aplicar la prueba estadística ANOVA con el Test de Dunnett, para las medias obtenidas de los porcentajes de proliferación. Con un nivel de significancia de 0.05.

	P- Value 24 horas	P – Value 48 horas	P-Value 72 horas
Control vs. DMSO	0.2378	0.3818	0.324
Control vs. Extracto 10 ug/ml	0.2378	0.2378	0.3144
Control vs. Extracto 50 ug/ml	0.0248	0.0146	> 0.9999
Control vs. Extracto 100 ug/ml	0.0229	0.0107	0.0286
Control vs. Extracto 200 ug/ml	0.0133	0.0103	0.9999
Control vs. Extracto 250 ug/ml	0.0169	0.0229	0.6517

Se observaron algunas diferencias significativas en el porcentaje de proliferación celular después de aplicar las diferentes concentraciones del extracto, tal como se observa en el Figura 4.9 y 4.10.

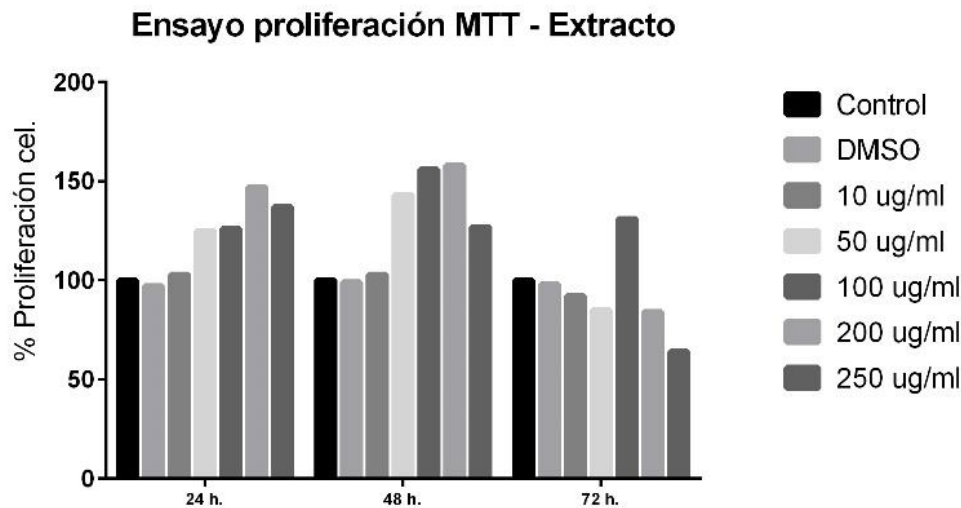


Figura 4.9 Porcentaje de proliferación con diferentes tratamientos del extracto etanólico de *Piper aduncum*

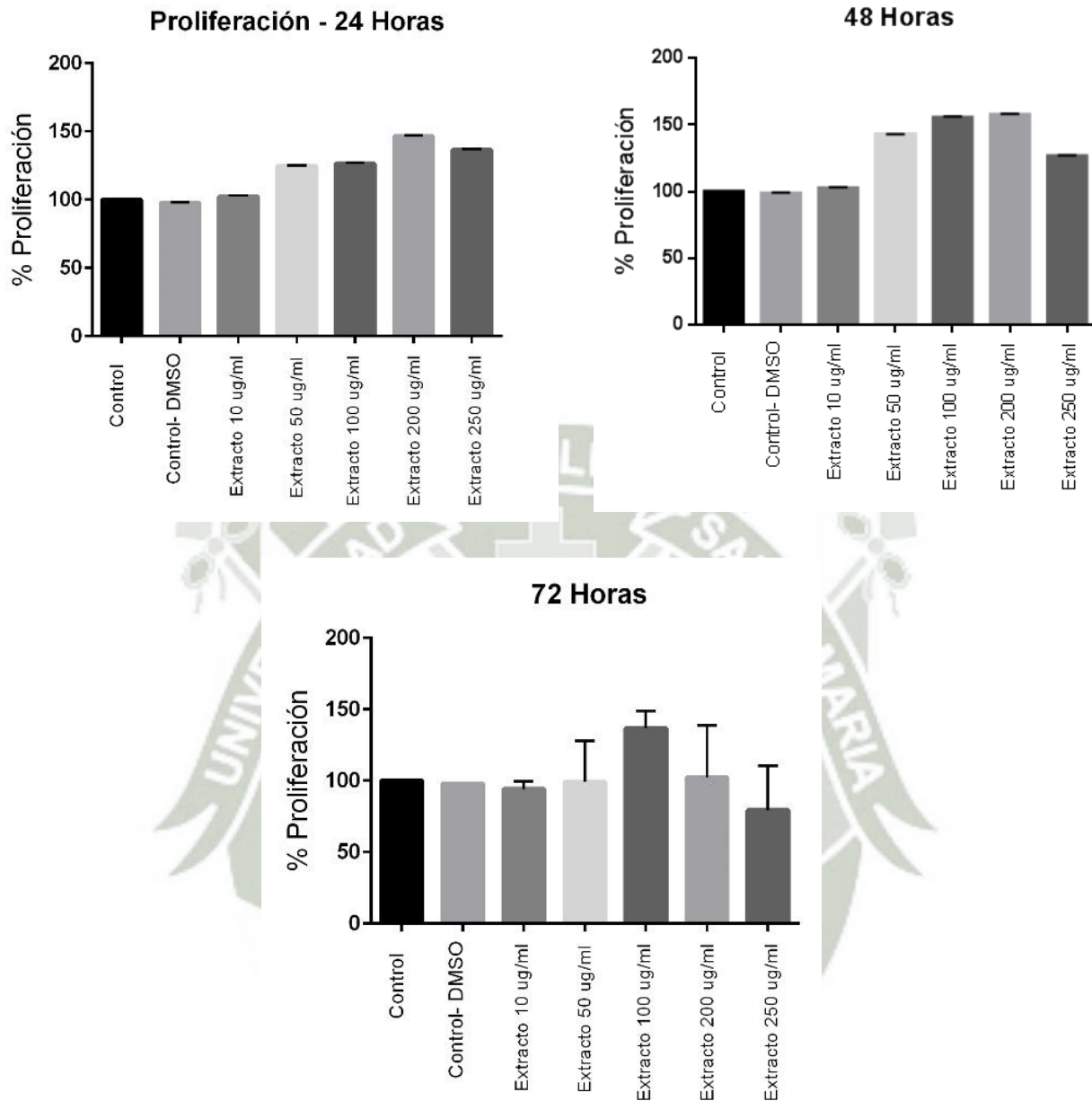


Figura 4.10 Porcentaje de proliferación de fibroblastos a las 24, 48 y 72 horas tratados con el extracto etanólico de *Piper aduncum* a diferentes concentraciones.

Así mismo el cultivo celular de fibroblastos fue tratado con diferentes concentraciones de las proteínas K1 y K2 (1, 10, 50 µg/ml). Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado y se trabajó con dos controles negativos uno de ellos sin tratamiento y el otro fue tratado con

DMSO. La Tabla N° 4.4 contiene las medias de los porcentajes de proliferación celular obtenidos luego de aplicar las diferentes concentraciones de las proteínas K y K2.

Tabla N° 4.4 Tabla de porcentaje de proliferación celular.

Porcentaje de proliferación celular								
Tiempo de tratamiento (Horas)	Tratamiento							
	Control	DMSO	Proteína K1 1 ug/ml	Proteína K1 10 ug/ml	Proteína K1 50 ug/ml	Proteína K2 - 1 ug/ml	Proteína K2 10 ug/ml	Proteína K2 50 ug/ml
24	100	98	113	177	189	224	210	189
48	100	99	160	71	78	69	86	62
72	100	99	104	84	44	89	73	84

* La tabla muestra las medias de los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de las muestras evaluadas por triplicado
Para comparar los porcentajes de proliferación celular obtenidos entre los diferentes tratamientos y el control negativo se aplicó la prueba estadística del Test de Dunnett y la prueba paramétrica ANOVA, con el Software Graph Prism y se obtuvo los valores de P-Value que se encuentran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Valores de p-value, obtenidos luego de aplicar la prueba estadística ANOVA con el Test de Dunnett, para las medias obtenidas de los porcentajes de proliferación. Con un nivel de significancia de 0.05.

	P-Value 24 horas	P- Value 48 horas	P-Value 72 horas
Control vs. DMSO	0.3947	0.3947	0.3947
Control vs. Proteína K1- 1 ug/ml	0.0543	0.0008	0.0051
Control vs. Proteína K1 -10 ug/ml	0.0086	0.0024	0.0008
Control vs. Proteína K1-50 ug/ml	0.0008	0.0261	0.0008
Control vs. Proteína K2-1 ug/ml	0.0008	0.002	0.0008
Control vs. Proteína K2-10 ug/ml	0.0008	0.0008	0.0008
Control vs. Proteína K2-50 ug/ml	0.0008	0.0047	0.0008

Se observaron algunas diferencias significativas en el porcentaje de proliferación celular después de aplicar las diferentes concentraciones del extracto comparados con el control negativo sin tratamiento, tal como se observa en el Figura 4.11.

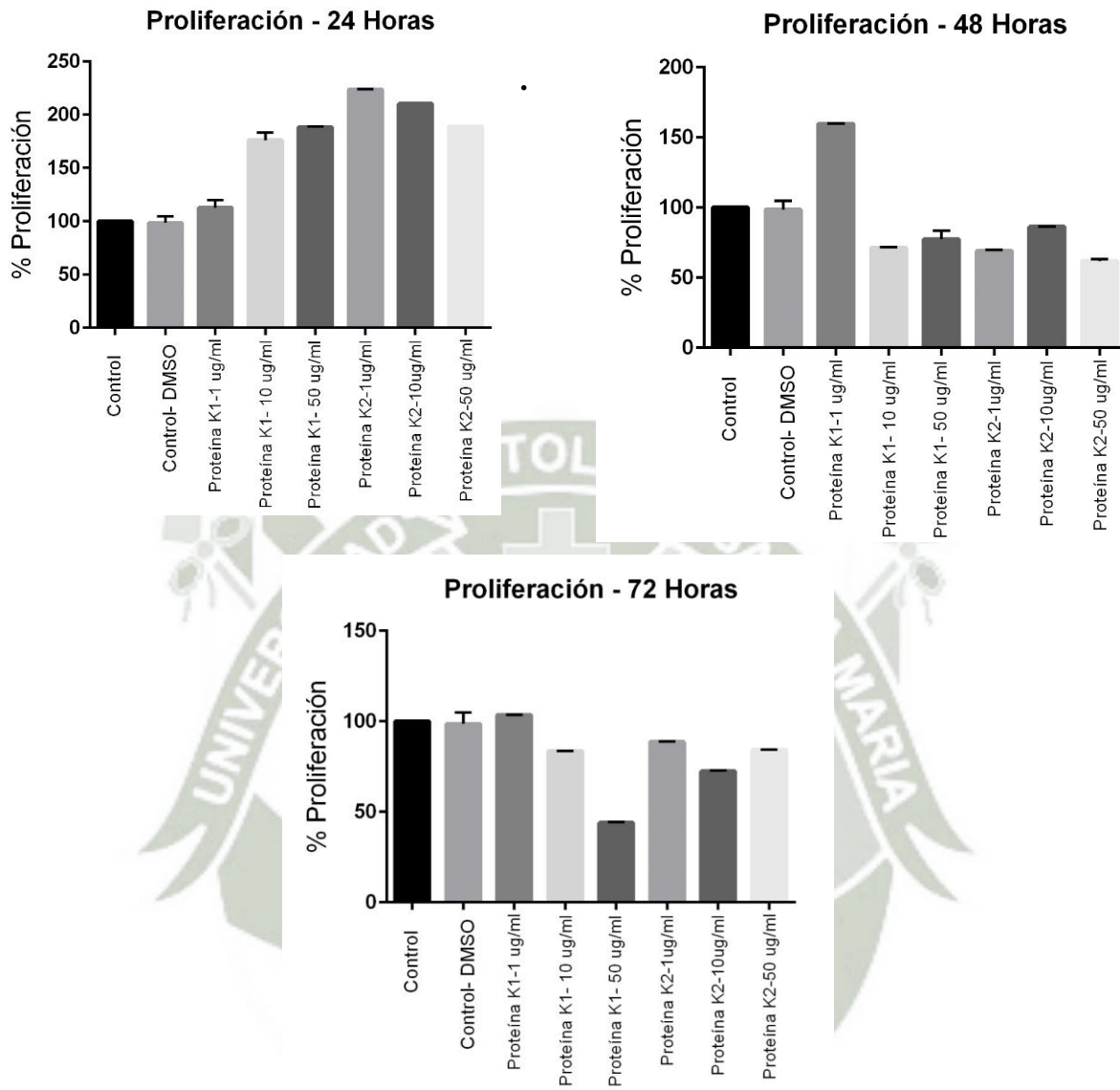


Figura 4.11 Porcentajes de proliferación de fibroblastos a las 24, 48 y 72 horas tratados con las proteínas K1 y K2 a diferentes concentraciones comparadas con el control negativo, sin tratamiento.

4.5 Determinación de la concentración efectiva media EC₅₀

Para determinar la concentración efectiva media EC₅₀ se utilizó el software Graph Pad. Este software utiliza el modelo matemático expresado en la siguiente ecuación:

$$y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{(Log EC_{50} - Log (Concentración del agonista))})}$$

Y: Porcentaje de proliferación de fibroblastos en cultivo

Bottom: Porcentaje de proliferación menor

Top: Porcentaje de proliferación mayor

EC₅₀: Concentración efectiva media

Esta ecuación con los correspondientes datos experimentales, se debe mostrar como el modelo de la Figura 4.12.

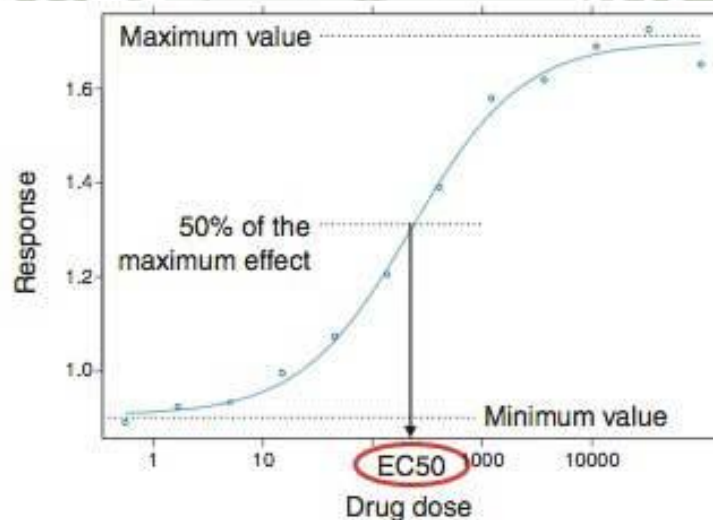


Figura 4.12 Gráfica modelo para determinar EC₅₀.

Donde el eje Y es la respuesta que en este caso es el porcentaje de proliferación de fibroblastos y el eje X es el logaritmo de la concentración del extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*.

De la ecuación 1, por ajuste de los datos obtenidos experimentalmente llevado a cabo por el software, se obtuvo el valor de EC_{50} .

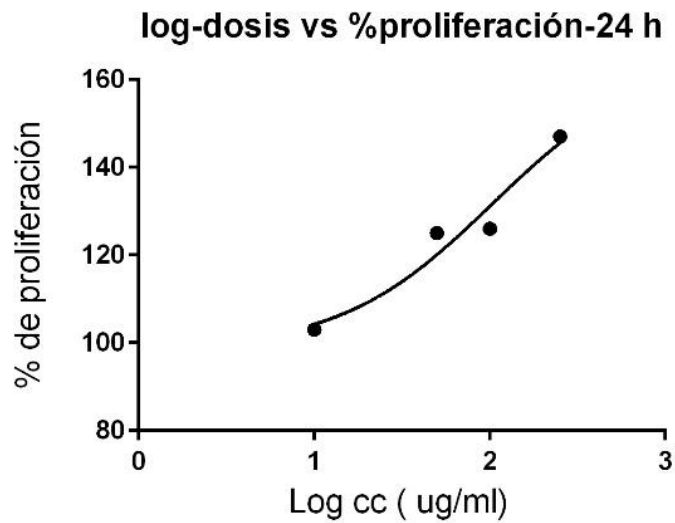
Se determinó el porcentaje de proliferación de fibroblastos utilizando las concentraciones de 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ del extracto etanólico de *Piper aduncum* y se obtuvo el valor de EC_{50} después de 24 y 48 horas después de aplicar los tratamientos, estos datos se observan en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6 Datos de las concentraciones aplicadas en el cultivo hDFa y las medias de los porcentajes de viabilidad para la elaboración de las gráficas de EC_{50} .

Concentración del extracto ($\mu\text{g/ml}$)	Logaritmo de la Concentración	Porcentaje de viabilidad celular (%) - 24 horas	Porcentaje de viabilidad celular (%) - 48 horas
0	0	100	100
10	1.0	103	103
50	1.7	125	143
100	2.0	126	156
200	2.3	147	158

Los datos de las medias de los porcentajes de viabilidad celular en función del logaritmo de las concentraciones fueron graficados y se obtuvo el valor de la concentración efectiva media EC_{50} utilizando el software Graph Pad, estos gráficos se observan en las figuras 4.13 y 4.14. El valor de la concentración efectiva media EC_{50} fue 103.5 $\mu\text{g/mL}$ después de 24 horas y 39.54 $\mu\text{g/mL}$ después de 48 horas.

Estos resultados indican que a partir de estas concentraciones existe un efecto agonista del extracto en la proliferación de fibroblastos, por lo que para posteriores ensayos fueron tomados en cuenta dichas concentraciones.



*Fueron

Figura 4.13 Gráfica: Log de la concentración de extracto vs el porcentaje de proliferación considerando 24 horas de tratamiento. **EC50 = 103.5 μ g/ml**

consideradas las medias de los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de las muestras evaluadas por triplicado en el cultivo hDFa.

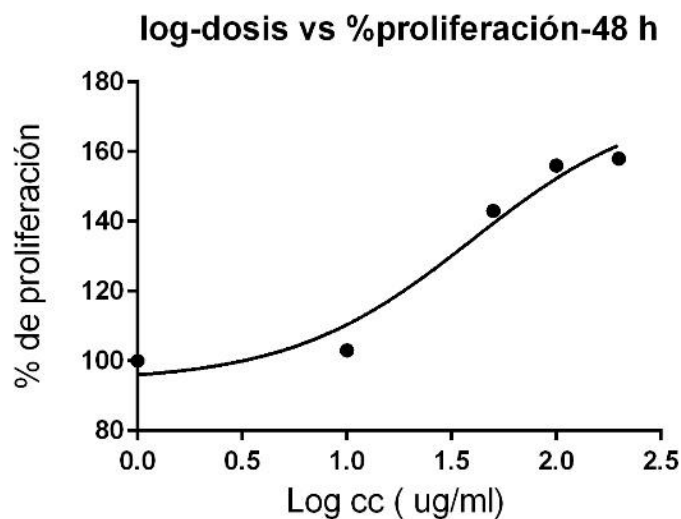


Figura 4.14 Gráfica: Log de la concentración de extracto vs el porcentaje de proliferación considerando 48 horas de tratamiento. **EC50 = 39.54 μ g/ml.**

*Fueron consideradas las medias de los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de las muestras evaluadas por triplicado en el cultivo hDFa.

4.6 Determinación de la concentración media inhibitoria IC₅₀

Para determinar la concentración media inhibitoria IC₅₀ se utilizó el software Graph Pad. Este software utiliza el modelo matemático expresado en la siguiente ecuación:

$$y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{(X - Log IC_{50})})}$$

Y: Porcentaje de proliferación de fibroblastos en cultivo

Bottom: Porcentaje de proliferación menor

Top: Porcentaje de proliferación mayor

IC₅₀: Concentración media inhibitoria

Esta ecuación con los correspondientes datos experimentales, se debe mostrar como el modelo de la Figura 4.15 que para este ensayo relaciona el logaritmo de la concentración del extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum* con el porcentaje de proliferación de fibroblastos (respuesta).

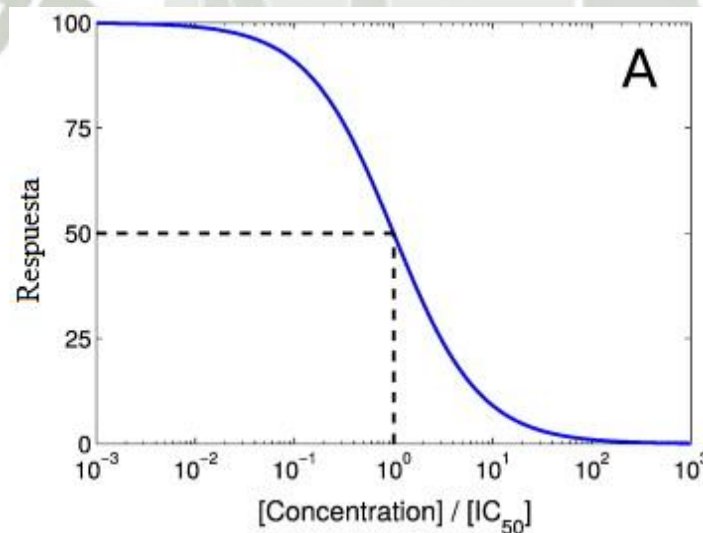


Figura 4.15 Gráfica para determinar IC₅₀. Log (concentración) – Respuesta.

Se determinó el porcentaje de proliferación de fibroblastos utilizando las concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/ml}$ del extracto etanólico de *Piper aduncum* y se obtuvo el valor de IC_{50} después de 72 horas de aplicar el tratamiento, los datos se observan en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Datos de las concentraciones aplicadas en el cultivo hDFa y las medias de los porcentajes de viabilidad para la elaboración de las gráficas de EC_{50} .

Concentración del extracto ($\mu\text{g/ml}$)	Logaritmo de la Concentración	Porcentaje de viabilidad celular (%) - 72 horas
50	0	85
100	2.0	131
200	2.3	84
300	2.5	64
400	2.6	58

El valor de IC_{50} obtenido por el software Graph Pad fue de 200 $\mu\text{g/mL}$. La gráfica 4.16 expresa los resultados obtenidos por el software. Así mismo se debe considerar que el valor de IC_{50} indica la concentración en la que la dosis administrada empieza a ser citotóxica para el cultivo celular de fibroblastos, por tanto para posteriores ensayos se consideraron concentraciones menores a este valor (200 $\mu\text{g/mL}$).

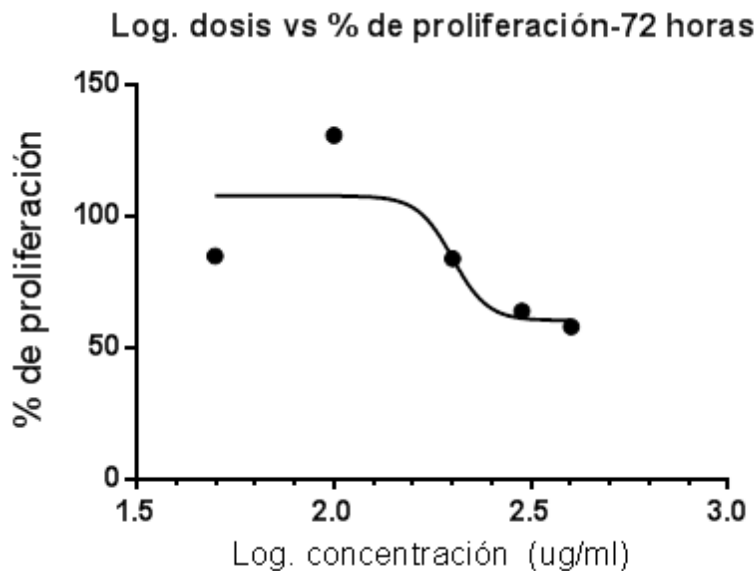


Figura 4.16 Gráficas Log de la concentración de extracto vs el porcentaje de proliferación a las 72 horas de tratamiento. IC_{50} = 200 $\mu\text{g/ml}$.

4.7 Determinación de la migración de fibroblastos mediante la técnica del rayado “Scratch”

Para determinar la migración de fibroblastos en cultivo se utilizó la técnica del rayado, que utiliza una punta de pipeta para realizar una herida en la monocapa de células tal como se observa en la figura 4.17, de esta manera se puede observar la migración de los fibroblastos hacia el centro de la monocapa a través del tiempo.

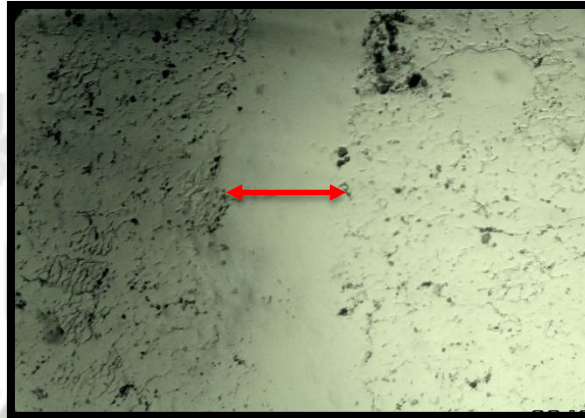


Figura 4.17 Monocapa con ralladura a tiempo cero. La flecha indica la distancia de la herida.

Se realizaron ralladuras en las monocapas de los fibroblastos en cultivo y fueron incubados durante 24, 48 y 72 horas con diferentes concentraciones de los diferentes tratamientos (extracto, proteína K1 y proteína K2).

Luego se cuantifico la migración de fibroblastos hacia el centro de la herida inducida utilizando el software de análisis de imágenes: “Win Scratch”, el cual proporcionó los porcentajes de cicatrización que se detallan en la tabla 4.8.

Tabla N° 4.8 Tabla con los valores del porcentaje de cicatrización

Porcentaje de cicatrización								
Tiempo (Horas)	Tratamiento							
	Control negativo-DMSO	Extracto 50 ug/ml	Extracto 100 ug/ml	Extracto 200 ug/ml	Proteína K1-10 ug/ml	Proteína K1-50 ug/ml	Proteína K2-10 ug/ml	Proteína K2-50 ug/ml
24	14	17	24	25	15	21	13	15
48	43	46	50	60	43	52	41	50
72	63	64	72	74	60	68	62	81

* La tabla muestra las medias de los porcentajes de cicatrización celular obtenidos de las muestras evaluadas por triplicado.

Se aplicó la prueba estadística ANOVA con el test de Dunnett con el Software Graph Prism para obtener los valores de P-Value que se encuentran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9 Parámetros obtenidos de la prueba estadística ANOVA con el Test de Dunnet para las medias de los porcentajes de cicatrización. Con un nivel de significancia de 0.05. ns: no significativo.

	24 horas		48 Horas		72 Horas	
	Significancia	P-Value	Significancia	P-Value	Significancia	P- Value
Control negativo-DMSO vs. Extracto 50 ug/ml	ns	0.4556	ns	0.2571	ns	0.9612
Control negativo-DMSO vs. Extracto 100 ug/ml	ns	0.1525	**	0.0056	**	0.0011
Control negativo-DMSO vs. Extracto 200 ug/ml	**	0.0052	****	< 0.0001	***	0.0003
Control negativo-DMSO vs. Proteína K1-10 ug/ml	ns	0.9212	ns	> 0.9999	ns	0.2571
Control negativo-DMSO vs. Proteína K1-50 ug/ml	*	0.047	**	0.0011	*	0.0356
Control negativo-DMSO vs. Proteína K2-10 ug/ml	ns	> 0.9999	ns	0.6013	ns	0.9612
Control negativo-DMSO vs. Proteína K2-50 ug/ml	ns	0.9212	**	0.0056	****	< 0.0001

Se observaron diferencias significativas entre los grupos en los que se aplicaron los tratamientos y el control negativo. En la figura 4.18A se observa el grupo control (sin tratamiento) y se observa que sólo algunos fibroblastos migraron al sitio de la herida, además la monocapa no fue restaurada en su totalidad, sin embargo cuando el cultivo fue tratado con 200 µg/mL del extracto etanólico después de 24 horas de incubación se observó un aumento significativo en la cicatrización con respecto al control sin tratamiento como se observa en la figura 4.18 B.

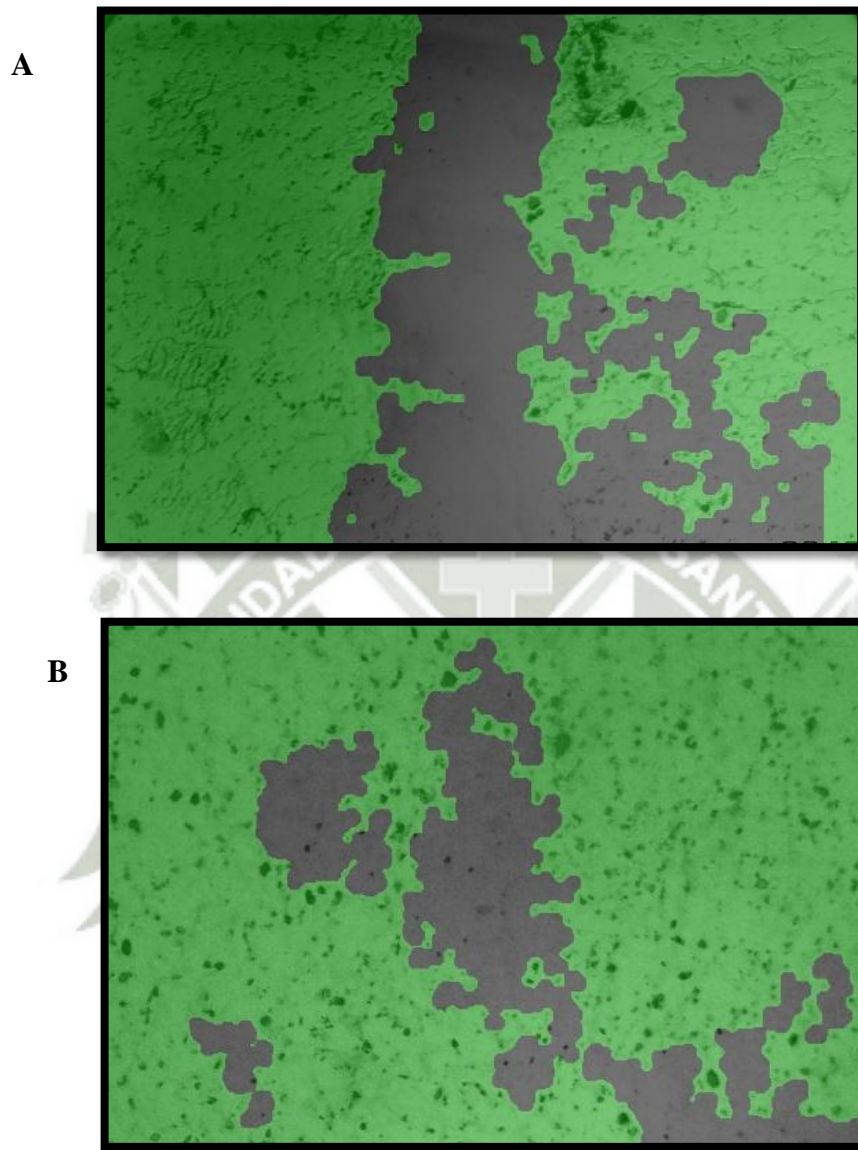


Figura 4.18 A: Se observa la monocapa de fibroblastos después de 24 horas de incubación sin tratamiento. B: Monocapa de fibroblastos después de 24 horas con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto etanólico

Las diferentes dosis del extracto (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no causaron efecto citotóxico sobre la monocapa de fibroblastos, sin embargo se observó un aumento en la migración de fibroblastos con respecto al control sin tratamiento como se observa en la figura 4.19A.

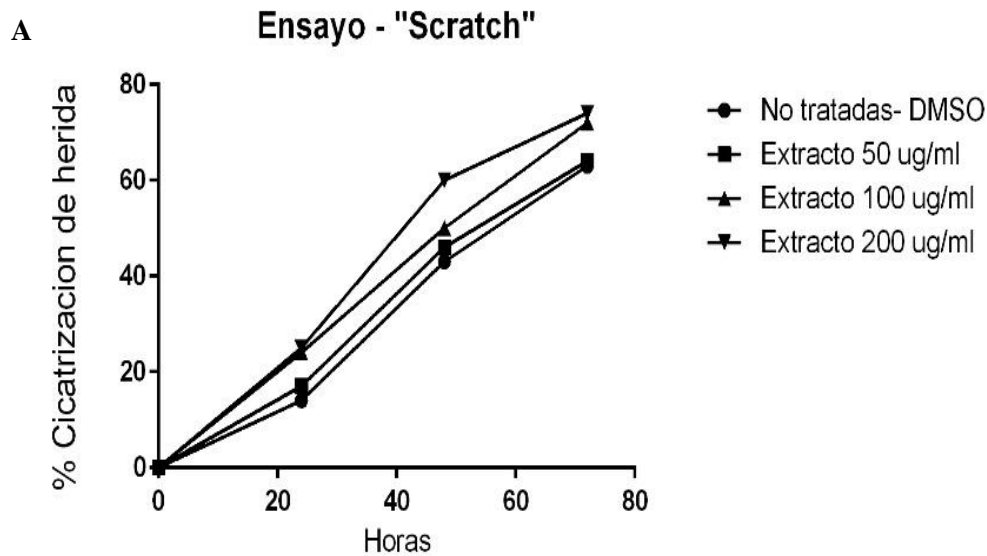


Figura 4.19 A. Migración de fibroblastos después de 24, 48 y 72 horas de incubación. A: Porcentaje de cicatrización de herida (migración) con el extracto acuoetanólico (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Así mismo se evaluó el efecto de las proteínas K1 y K2 (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la monocapa de fibroblastos. Se evaluaron las distancias de migración celular al centro de la herida después de 24, 48 y 72 horas después de aplicados los tratamientos, los resultados se observan en la figura 4.19 B, y C.

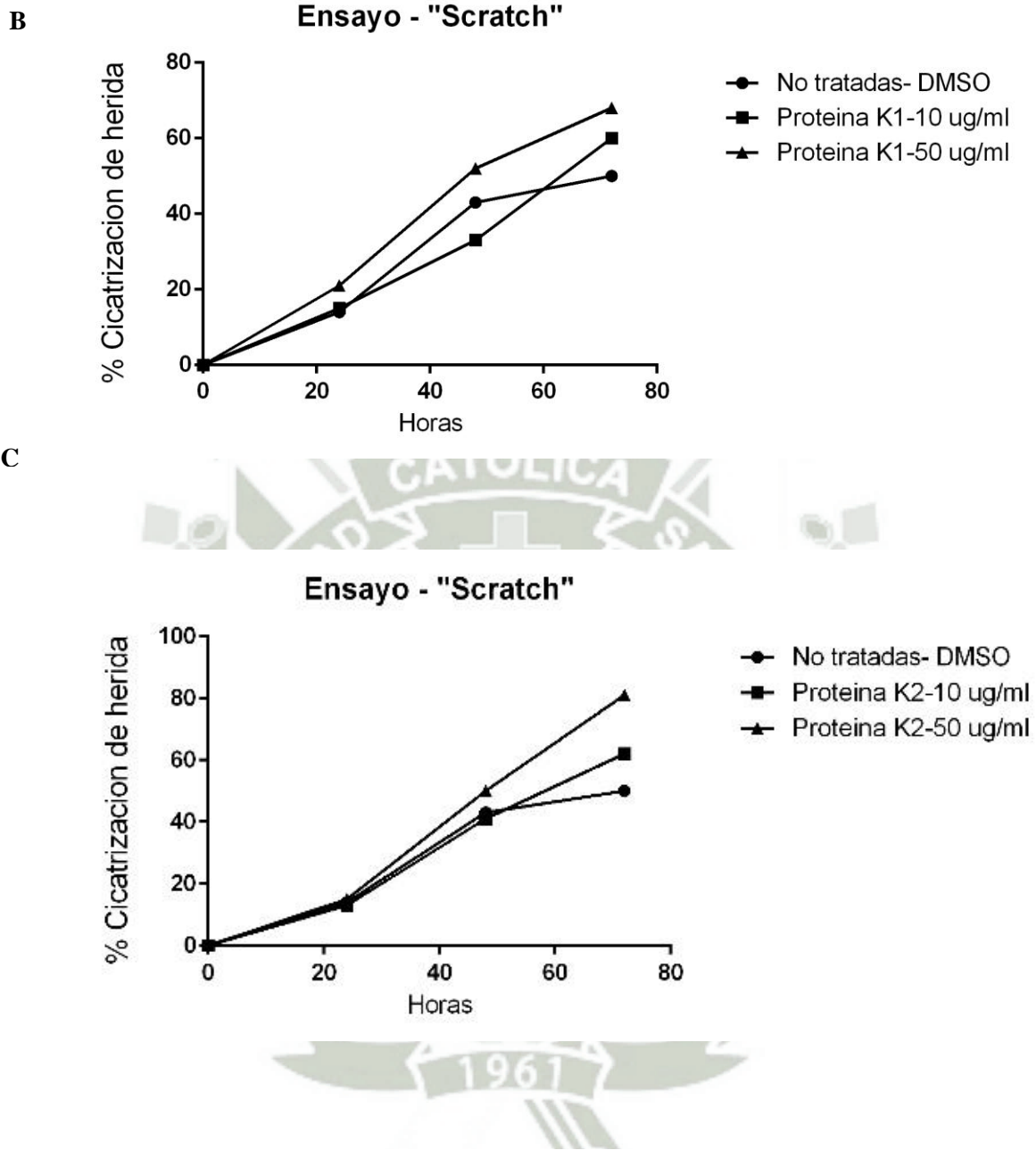


Figura 4.19 B. Porcentaje de cicatrización de herida (migración) con proteína K1 (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) C. Porcentaje de cicatrización de herida con proteína K2 (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

4.8 Análisis de expresión de cDNA mediante RT qPCR

Luego de aplicar los diferentes tratamientos en el cultivo de fibroblastos durante 1 y 3 horas, se realizó la extracción de RNAm el cual fue llevado a cDNA para cuantificar la expresión de los genes EGF, FGF y PDGF mediante la técnica de RT- qPCR. Esta técnica proporciona los valores de Ct, los cuales se encuentran detallados en las tablas 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 y 4.13.

Las muestras fueron evaluadas por duplicado y los protocolos detallados se encuentran en anexos así como las gráficas obtenidas luego de la amplificación de los genes mediante la técnica de RT-qPCR.

Para el análisis de la expresión de los genes EGF, FGF, y PDGF se utilizó el método del ddCt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de Livak Schmittgen, y se utilizó el gen de referencia: gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa GADPH.¹⁷

Con los valores obtenidos de Ct se aplicaron las fórmulas para el cálculo de la expresión génica que se detallan a continuación:

$$Expresion = 2^{-\Delta\Delta Ct} \dots\dots\dots (1)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ctm - \Delta Ctc \dots\dots\dots (2)$$

$$\Delta Ctm = (Ct gen target - Ct gen referencia) Con tratamiento... (3)$$

$$\Delta Ctc = (Ct gen target - Ct gen referencia) Sin tratamiento..... (4)$$

De esta manera se obtuvo el valor del incremento de la expresión de los genes PDGF, FGF y EGF que se detalla en las tablas 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 y 4.15.

Tabla N°.4.10 Resultados del Incremento de la Expresión del gen PDGF en cultivo hDFa después de 1 hora de tratamiento.

Tratamiento	Dosis (µg/ml)	Gen	Tiempo de tratamiento (Horas)	Ct	Incremento de la expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	100	GADPH	1	22.82	0.3
	100	PDGF	1	27.78	
	100	PDGF	1	27.39	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	200	GADPH	1	22.83	1.0
	200	PDGF	1	26.09	
	200	PDGF	1	27.14	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	250	GADPH	1	23.33	2.4
	250	PDGF	1	27.9	
	250	PDGF	1	28.94	
Proteína K1	50	GADPH	1	24.21	1.6
	50	PDGF	1	25.38	
	50	PDGF	1	27.75	
Proteína K1	100	GADPH	1	23.23	4.5
	100	PDGF	1	30.94	
	100	PDGF	1	27.55	
Proteína K2	50	GADPH	1	20.93	1.3
	50	PDGF	1	28.84	
	50	PDGF	1	28.12	
Proteína K2	100	GADPH	1	23.23	8.0
	100	PDGF	1	27.23	
	100	PDGF	1	27.76	

Tabla N°.4.11 Resultados del Incremento de la Expresión del gen PDGF en cultivo hDFa después de 3 horas de tratamiento.

Tratamiento	Dosis (µg/ml)	Gen	Tiempo de tratamiento (Horas)	Ct	Incremento de la expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	100	GADPH	3	23.68	1.2
	100	PDGF	3	28.31	
	100	PDGF	3	27.27	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	200	GADPH	3	23.96	3.6
	200	PDGF	3	28.97	
	200	PDGF	3	30.32	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	250	GADPH	3	22.85	1.3
	250	PDGF	3	26.73	
	250	PDGF	3	27.5	
Proteína K1	50	GADPH	3	23	2.0
	50	PDGF	3	28.19	
	50	PDGF	3	27.53	
Proteína K1	100	GADPH	3	22.66	2.6
	100	PDGF	3	27.38	
	100	PDGF	3	28.4	
Proteína K2	50	GADPH	3	23.42	8.7
	50	PDGF	3	32.43	
	50	PDGF	3	42.75	
Proteína K2	100	GADPH	3	23.58	2.2
	100	PDGF	3	28.57	
	100	PDGF	3	26.41	

Tabla N° .4.12 Resultados del Incremento de la Expresión del gen FGF en cultivo hDFa después de 1 hora de tratamiento.

Tratamiento	Dosis (µg/ml)	Gen	Tiempo de tratamiento (Horas)	Ct	Incremento de la expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	100	GADPH	1	20.14	2.8
	100	FGF	1	29.89	
	100	FGF	1	26.52	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	200	GADPH	1	16.56	0.5
	200	FGF	1	23.12	
	200	FGF	1	22.1	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	250	GADPH	1	15.88	21.2
	250	FGF	1	26.32	
	250	FGF	1	27.39	
Proteína K1	50	GADPH	1	18.42	15.1
	50	FGF	1	33.55	
	50	FGF	1	27.67	
Proteína K1	100	GADPH	1	20.12	1.5
	100	FGF	1	27.91	
	100	FGF	1	26.73	
Proteína K2	50	GADPH	1	18.44	0.0
	50	FGF	1	38.4	
	50	FGF	1	27.66	
Proteína K2	100	GADPH	1	19.22	5.8
	100	FGF	1	30.87	
	100	FGF	1	25.79	

Tabla N°.4.13 Resultados del Incremento de la Expresión del gen FGF en cultivo hDFa después de 1 hora de tratamiento.

Tratamiento	Dosis (µg/ml)	Gen	Tiempo de tratamiento (Horas)	Ct	Incremento de la expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	100	GADPH	3	20.37	2.4
	100	FGF	3	24.59	
	100	FGF	3	24.34	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	200	GADPH	3	21.27	5.3
	200	FGF	3	26.44	
	200	FGF	3	25.91	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	250	GADPH	3	30.75	0.2
	250	FGF	3	19.23	
	250	FGF	3	27.39	
Proteína K1	50	GADPH	3	13.96	1.5
	50	FGF	3	25.99	
	50	FGF	3	27.21	
Proteína K1	100	GADPH	3	19.3	5.7
	100	FGF	3	26.77	
	100	FGF	3	24.65	
Proteína K2	50	GADPH	3	19.23	0.7
	50	FGF	3	26.54	
	50	FGF	3	28.31	
Proteína K2	100	GADPH	3	18.06	5.0
	100	FGF	3	25.39	
	100	FGF	3	27.7	

Tabla N° .4.14 Resultados del Incremento de la Expresión del gen EGF en cultivo hDFa después de 1 hora de tratamiento.

Tratamiento	Dosis (µg/ml)	Gen	Tiempo de tratamiento (Horas)	Ct	Incremento de la expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	100	GADPH	1	23.01	5.7
	100	EGF	1	36.22	
	100	EGF	1	32.35	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	200	GADPH	1	23.72	5.6
	200	EFG	1	29.77	
	200	EGF	1	32.2	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	250	GADPH	1	24.91	6.5
	250	EGF	1	30.12	
	250	EGF	1	34.64	
Proteína K1	50	GADPH	1	31.79	1.9
	50	EGF	1	40.34	
	50	EGF	1	34.62	
Proteína K1	100	GADPH	1	24.56	1.1
	100	EFG	1	37.67	
	100	EGF	1	35.76	
Proteína K2	50	GADPH	1	24.6	1.2
	50	EGF	1	29.67	
	50	EGF	1	31.2	
Proteína K2	100	GADPH	1	23.92	7.1
	100	EGF	1	28.6	
	100	EGF	1	34.61	

Tabla N°.4.15 Resultados del Incremento de la Expresión del gen EGF en cultivo hDFa después de 3 horas de tratamiento.

Tratamiento	Dosis (µg/ml)	Gen	Tiempo de tratamiento (Horas)	Ct	Incremento de la expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	100	GADPH	3	23.93	1.6
	100	EFG	3	27.4	
	100	EGF	3	29.39	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	200	GADPH	3	23.25	3.1
	200	EGF	3	31.2	
	200	EGF	3	29.66	
Extracto etanólico <i>Piper aduncum</i>	250	GADPH	3	22.32	5.1
	250	EGF	3	33.44	
	250	EGF	3	31.48	
Proteína K1	50	GADPH	3	24.36	12.5
	50	EFG	3	33.24	
	50	EGF	3	32.32	
Proteína K1	100	GADPH	3	30.42	9.5
	100	EGF	3	36.34	
	100	EGF	3	28.44	
Proteína K2	50	GADPH	3	23.91	7.9
	50	EFG	3	36.88	
	50	EGF	3	34.13	
Proteína K2	100	GADPH	3	23.2	4.7
	100	EGF	3	37.79	
	100	EGF	3	41.03	

Finalmente se aplicó la prueba estadística ANOVA con el test de Dunnett, para comparar el incremento de la expresión de los genes PDGF, FGF y EGF entre los grupos que fueron tratados y el grupo control, considerando un nivel de significancia de 0.05. De esta manera se obtuvieron los valores de p-value que se encuentran detallados en la tabla 4.16.

Tabla N° 4.16 Valores de p-value, obtenidos luego de aplicar la prueba estadística ANOVA con el Test de Dunnett, para las medias obtenidas del aumento de la expresión de los genes EGF , FGF, PDGF Con un nivel de significancia de 0.05.

Tratamiento	EGF		FGF		PDGF	
	P - Value 1 Hora	P - Value 3 Hora	P - Value 1 Hora	P - Value 3 Hora	P - Value 1 Hora	P - Value 3 Hora
Control - DMSO vs. Extracto 100 ug/ml	< 0.0001	< 0.0001	0.0449	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Control - DMSO vs. Extracto 200 ug/ml	< 0.0001	< 0.0001	0.8907	< 0.0001	0.0034	< 0.0001
Control - DMSO vs. Extracto 250 ug/ml	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Control - DMSO vs. Proteína K1 -50 ug/ml	0.0002	< 0.0001	< 0.0001	0.0022	< 0.0001	< 0.0001
Control - DMSO vs. Proteína K1- 100 ug/ml	0.5012	< 0.0001	0.892	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Control - DMSO vs. Proteína K2 -50 ug/ml	0.114	< 0.0001	0.3899	0.0109	< 0.0001	< 0.0001
Control - DMSO vs. Proteína K2 -100 ug/ml	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Se observaron diferencias altamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control, estos resultados se observan en las figuras 4.20, 4.21 y 4.22.

Se observó un incremento significativo de la expresión del gen PDGF; después de una hora de incubación con los tratamientos (extracto, proteína K1 y proteína K2).

Después de una hora de incubación, hubo diferencias altamente significativas en la expresión relativa de PDGF, siendo 8 veces mayor respecto al control con la proteína K2 (100 µg/mL).

Así mismo la proteína K1 (100 µg/mL) aumento la expresión de PDGF en 4.5 veces como se observa en la figura 4.20.

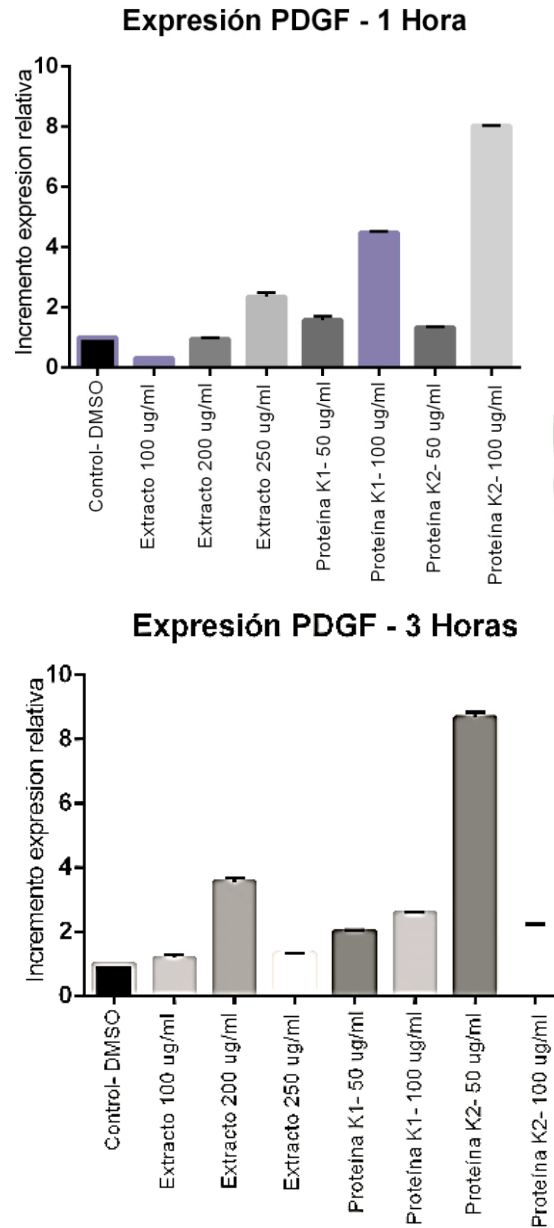


Figura 4.20 Incremento de la expresión relativa de PDGF después de 1 y 3 horas respectivamente con diferentes dosis de extracto etanólico (100 µg/ml, 200 µg/ml y 250 µg/ml) y proteínas K1 y K2 (50 µg/ml, 100 µg/ml). Las barras indican diferencias significativas $p < 0.05$ comparando con el control.

Se observó un incremento significativo de la expresión del gen FGF; después de una hora de incubación con los tratamientos (extracto, proteína K1 y proteína K2).

Después de una hora de incubación con el extracto (250 µg/mL), hubo diferencias altamente significativas en la expresión relativa de FGF, siendo 21 veces mayor respecto al control. Así

mismo la proteína K1 (50 µg/mL) incremento la expresión de FGF, siendo 15 veces mayor respecto al control, como se observa en la figura 4.21.

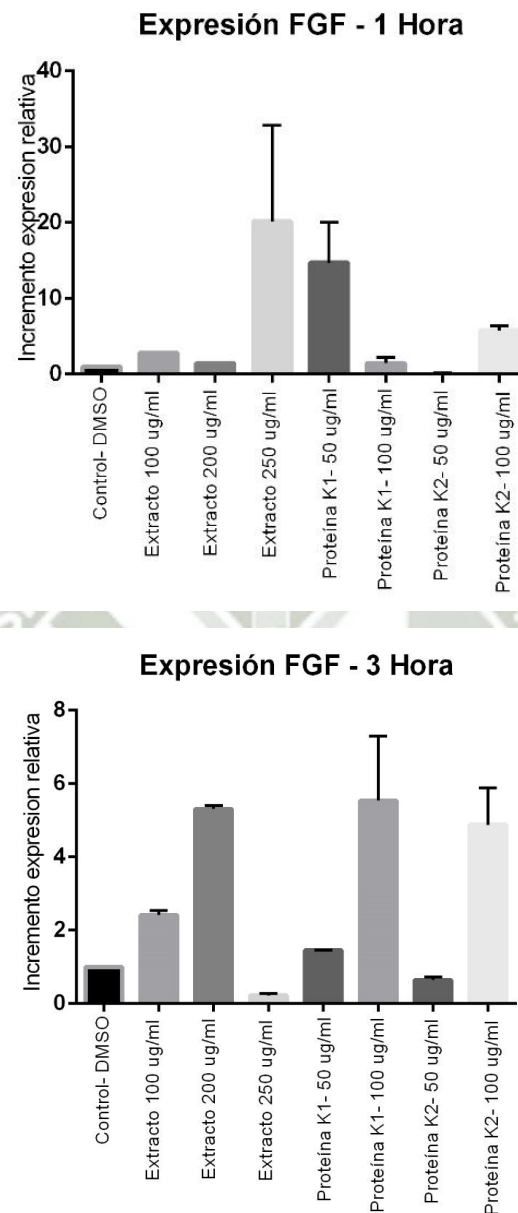


Figura 4.21 Incremento de la expresión relativa de FGF después de 1 y 3 horas respectivamente con diferentes dosis de extracto etanólico (100 µg/ml, 200 µg/ml y 250 µg/ml) y proteínas K1 y K2 (50 µg/ml, 100 µg/ml). Las barras indican diferencias significativas $p < 0.05$ comparando con el control.

Se observó un incremento significativo de la expresión del gen EGF después de una hora y tres horas de incubación con las diferentes concentraciones del extracto y de las proteínas.

Se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de EGF, siendo 6 veces mayor respecto al control cuando fue tratada con el extracto (250 $\mu\text{g/ml}$). Así mismo la proteína K1 (50 $\mu\text{g/ml}$) incrementó la expresión de EGF en 2 veces después de 1 hora de tratamiento y en 12 veces después de 3 horas de tratamiento respecto al control negativo, tal como se observa en la figura 4.22.

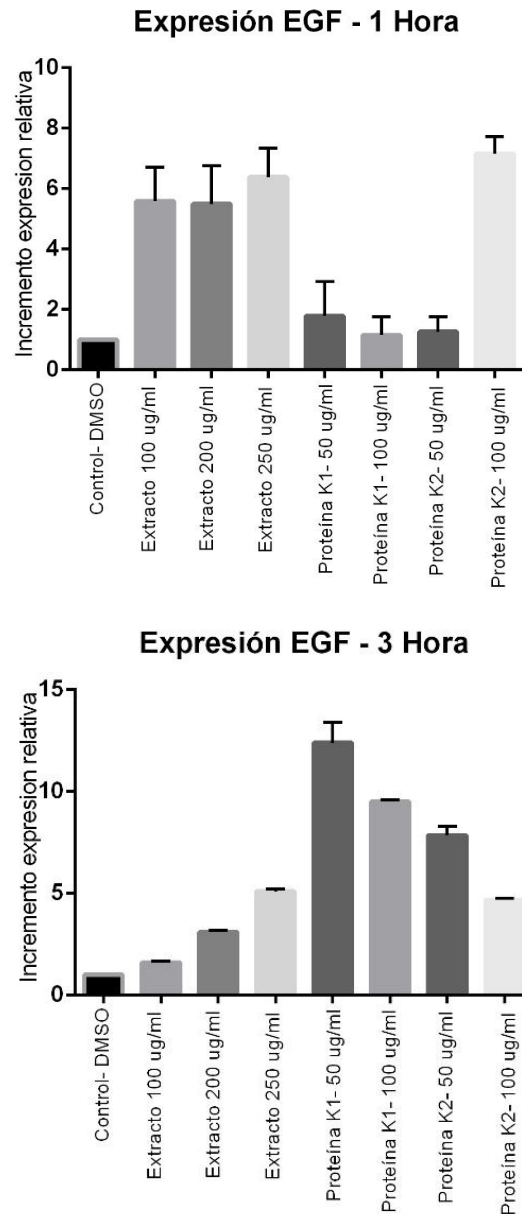


Figura 4.22 Incremento de la expresión relativa de EGF después de 1 y 3 horas respectivamente con diferentes dosis de extracto etanólico (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ y 250 $\mu\text{g/ml}$) y proteínas K1 y K2 (50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$). Las barras indican diferencias significativas $p < 0.05$ comparando con el control negativo.

4.9 Ensayo de cicatrización en ratas

Para este ensayo se trabajó con tres grupos de estudio: un grupo control sin tratamiento, un grupo que fue tratado con el extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum* y un grupo que fue tratado con el gel formulado a base del extracto, tal como se detalla en la Tabla 4.17. Los animales fueron sacrificados después de 3 y 7 días después de aplicar los tratamientos. Finalmente se realizó un análisis macroscópico de las heridas inducidas y un estudio histopatológico.









Tabla 4.16 Grupos de estudio

Grupo 1	Grupo control: los animales no recibieron tratamiento. Se trabajó por triplicado.
Grupo 2	Aplicación tópica de: extracto etanólico liofilizado de <i>Piper aduncum</i> sobre la herida afectada una vez al día. Se trabajó por triplicado.
Grupo 3	Aplicación tópica de: gel con el extracto de <i>Piper aduncum</i> sobre la herida afecta una vez al día. Se trabajó por triplicado.

4.9.1 Análisis macroscópico de la herida

Para el análisis macroscópico de la herida, se tomaron fotografías y se observaron los bordes, así como la formación de costra y presencia de tejido inflamado. En la Tabla 4.18 se observan las fotografías obtenidas y se puede comparar las diferencias en el proceso de cicatrización entre los diferentes tratamientos aplicados.

Tabla 4.18 Análisis macroscópico

	TRATAMIENTO 1 Extracto etanólico liofilizado de <i>Piper</i> <i>Aduncum</i>	CONT ROL NEGATIVO	TRATAMIENTO 2 Gel con extracto etanólico liofilizado de <i>Piper Aduncum</i>	CONTROL NEGATIVO
DIA 3				
DIA 7				

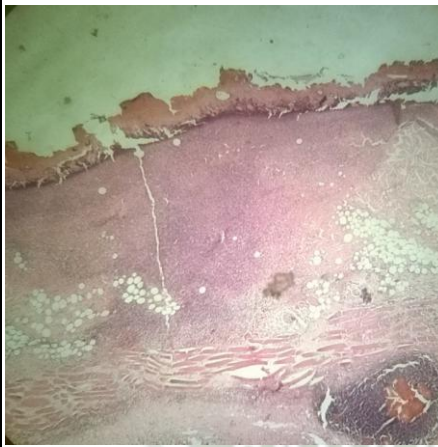

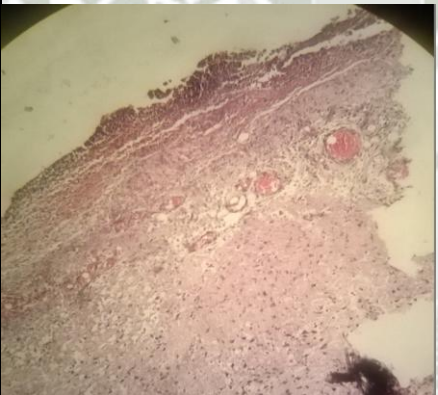


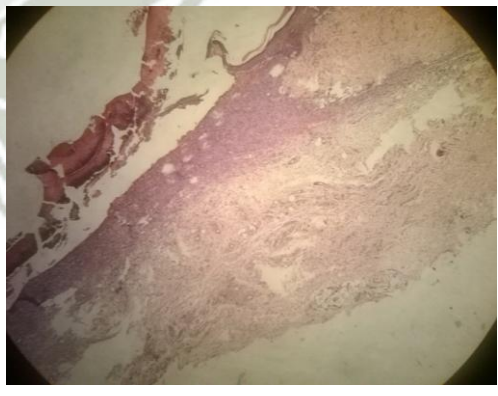
4.9.2 Estudio histológico de la herida

Se tomaron biopsias de los 3 grupos experimentales y estas muestras fueron procesadas para estudio histopatológico.

El estudio histológico mediante observación microscópica permite obtener variables de respuesta cualitativas como la presencia de polimorfonucleares, edema, fibroblastos, miofibroblastos y fibras de colágeno. Además se tuvo en cuenta algunos parámetros histológicos para evaluar cicatrización como: tipo de tejido en herida, angiogénesis, reepitalización y fibroplasia. En la tabla 4.18 se observan las imágenes de los cortes histológicos después de aplicar los diferentes tratamientos. Así mismo en la Figura 4.23 y 4.24 se puede observar la diferencia en los cortes histológicos después de 3 y 7 días de aplicado el tratamiento con el extracto liofilizado de *Piper aduncum*.

En la Figura 4.25 se observa la presencia de neovascularización de tejidos cicatriciales, este proceso es clave debido a que permite el transporte de células y mediadores, además que es una evidencia de que el proceso se encuentra en una fase de formación de tejido granular y que promueve la migración de células. Finalmente en la Figura 4.25 y 4.26 se observa la diferencia en los cortes histológicos después de 3 y 7 días de aplicado el tratamiento con el gel formulado a base del extracto.

Tabla 4.18 Estudio histológico de la herida

	DIA 3	DIA 7
<p>Tratamiento 1</p> <p>Extracto etanólico liofilizado de <i>Piper Aduncum</i></p>		
<p>Tratamiento 2</p> <p>Gel con extracto etanólico liofilizado de <i>Piper Aduncum</i></p>		
<p>CONTROL NEGATIVO</p>		

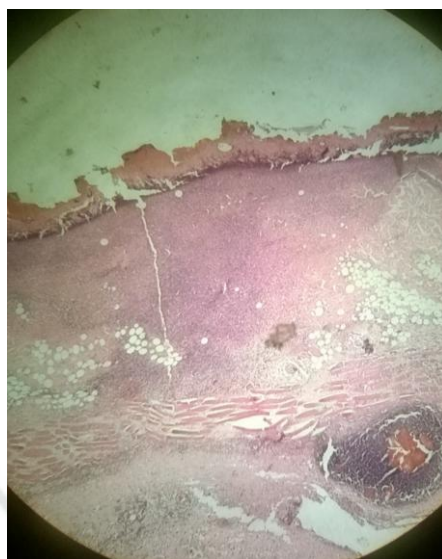


Figura 4.23 Componentes inflamatorios día 3: mayor proporción de polimorfonucleares , seguido de edema y fibrina, además de presencia de hiperemia. Tratamiento 1: Extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*.

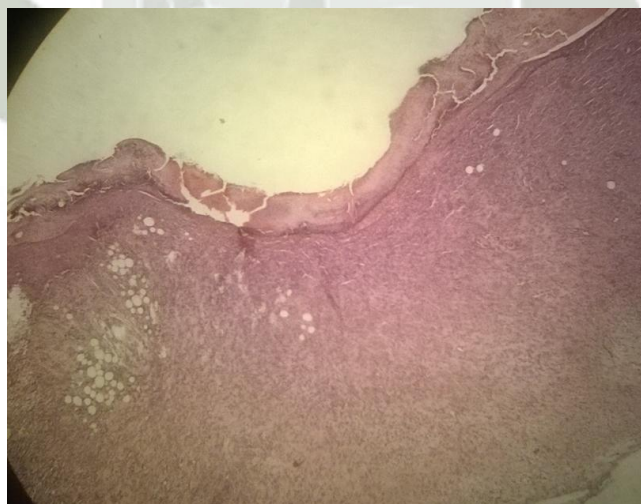


Figura 4.24 Componentes inflamatorios día 7: Mayor proporción de macrófagos y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, con moderada producción de fibras de colágeno. Tratamiento 2: Gel con extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*.

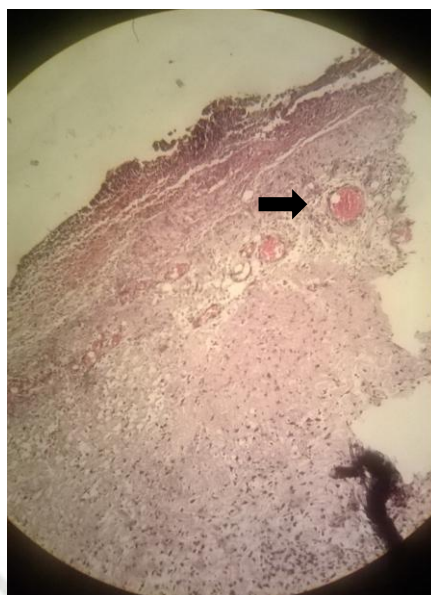


Figura 4.25 Componentes inflamatorios día 3: mayor proporción de polimorfonucleares, seguido de edema y fibrina, además de presencia de hiperemia. Tratamiento 2: Gel con extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*.

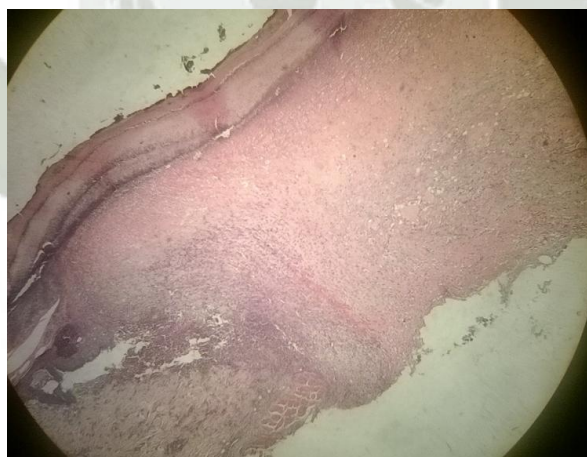


Figura 4.26 Componentes inflamatorios día 7: Mayor proporción de macrófagos y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, con moderada producción de fibras de colágeno. Tratamiento 2: Gel con extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum*.

4.9.3 Parámetros histológicos para evaluar cicatrización

a) Tipo de tejido en herida

Mediante análisis histológicos de los cortes de la herida se identificó el tipo de tejido presente. Se dieron puntuaciones de 1 a 4 conforme a la restauración de la herida y se observaron diferencias en los diferentes tratamientos (gel y extracto) respecto al control negativo (sin tratamiento). Los resultados se observan en la figura 4.27

La presencia de tejido granulomatoso supurativo después de 7 días de aplicarse el tratamiento indica que existe restauración de la herida, siendo mayor al ser comparada con el control negativo sin tratamiento en el que se observó tejido fibrino supurativo.

Tipo	Valor
Sero fibrino supurativo	1
Fibrino supurativo	2
Granulomatosa	3
Granulomatoso supurativo	4

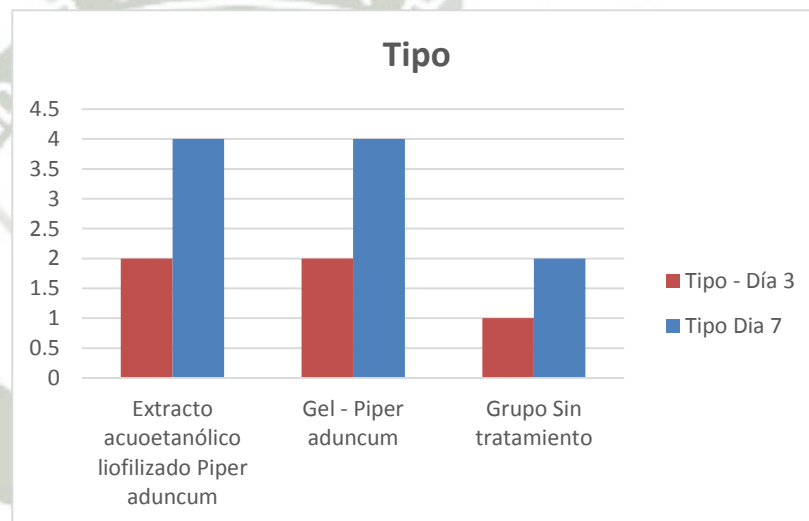


Figura 4.27 Evaluación del proceso de cicatrización de la herida con los diferentes tratamientos.

b) Angiogénesis

En los grupos en los que se aplicó el gel y el extracto etanólico liofilizado hubo presencia de angiogénesis moderada. Sin embargo el grupo que no recibió tratamiento presentó angiogénesis leve tal como se observa en la figura 4.28.

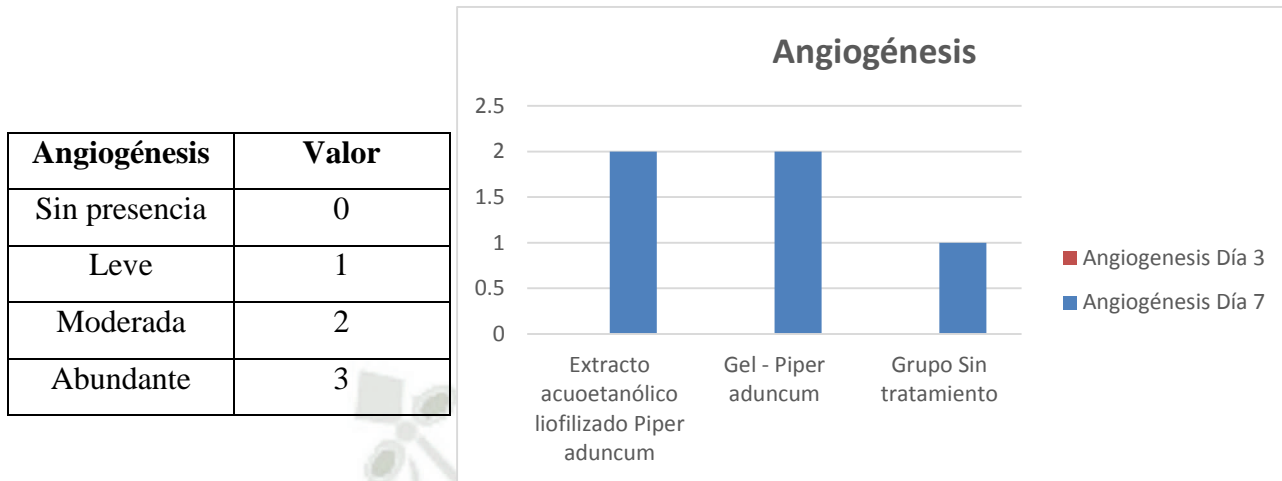


Figura 4.28 Evaluación de angiogénesis

c) Reepitelización

Después de 3 días de inducir herida no hubo reepitelización del tejido dañado. Sin embargo el día 7 en el grupo en el que se aplicó el gel hubo reepitelización moderada, como se observa en la figura 4.29. En el grupo en el que se aplicó el extracto acuotético liofilizado se observó reepitelización leve al igual que en el grupo que no recibió tratamiento.

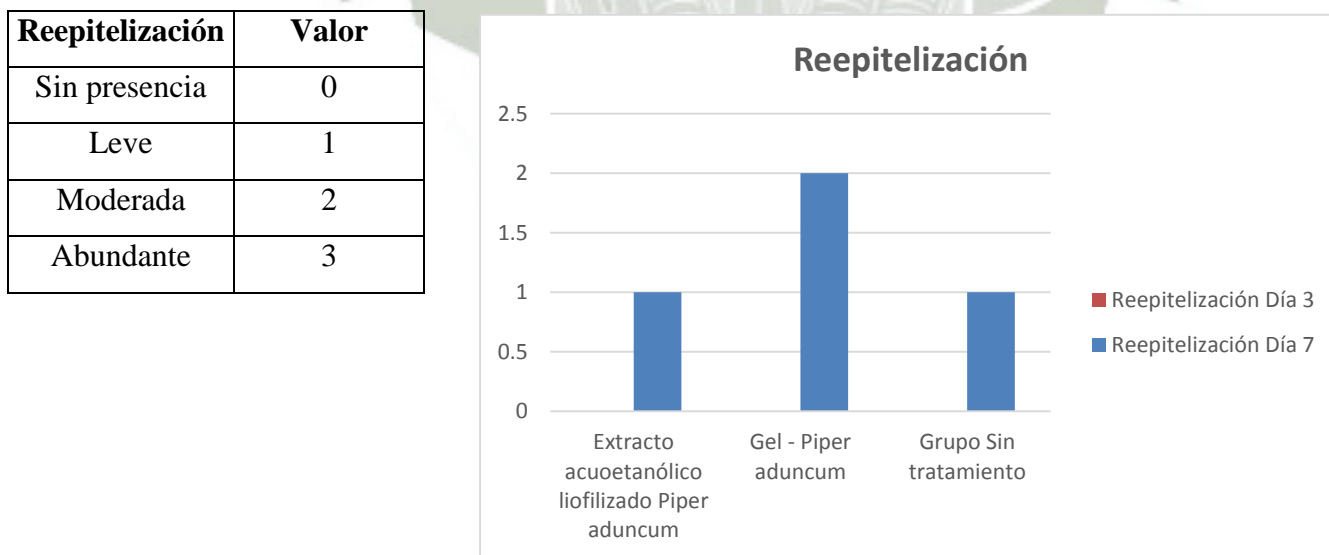


Figura 4.29 Presencia de reepitelización

a) Fibroplasia

Después de 3 días de aplicar los tratamientos no se observó fibroplasia en ninguno de los grupos de estudio.

En los grupos que recibieron tratamientos (gel y extracto etanólico) hubo presencia de fibroplasia abundante en el día 7, comparado al control negativo en el que se observó fibroplasia leve, tal como se observa en la figura 4.30

Fibroplasia	Valor
Sin presencia	0
Leve	1
Moderada	2
Abundante	3

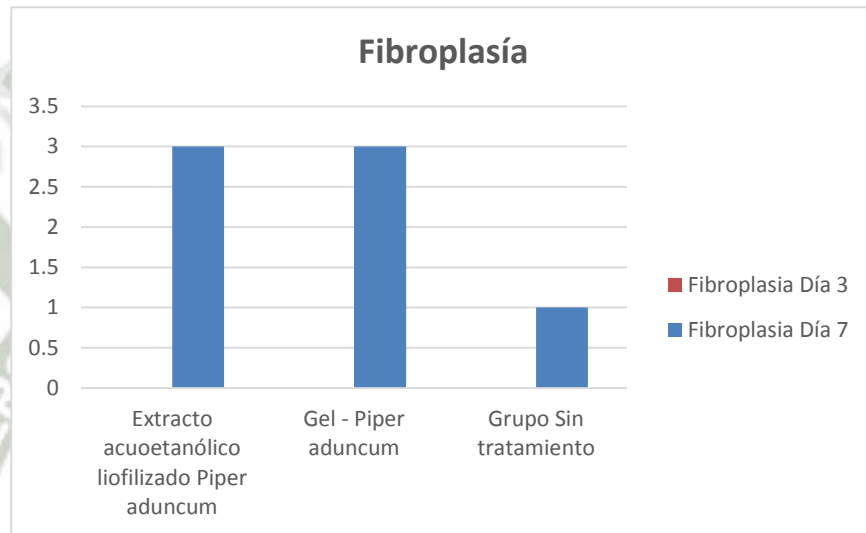


Figura 4.30 Fibroplasia del tejido

4.10 Discusión

La cicatrización es un proceso complejo que involucra diversas etapas en las cuales intervienen diferentes poblaciones celulares así como factores de crecimiento. Existe información que ofrece la medicina tradicional sobre el efecto cicatrizante de *Piper aduncum*, sin embargo no existen estudios que demuestren su efecto cicatrizante a nivel *In vitro* así como su efecto en la expresión de factores de crecimiento que intervienen en dicho proceso.(46)

Los componentes de *Piper Aduncum* se han identificado en estudios previos, dentro de los compuestos están presentes terpenos, alcaloides, flavonoides, flavanonas, flavonas, entre otros compuestos, sin embargo no se realizó un estudio que permita aislar e identificar proteínas o péptidos como potenciales compuestos bioactivos. Por estas razones en este trabajo se evaluó el efecto del extracto y proteínas purificadas sobre la migración, proliferación y expresión relativa de factores de crecimiento en cultivo celular de fibroblastos (hDFa). (27) (28) (29) (30)

Las cinco proteínas aisladas mediante RP-HPLC poseen un dominio en común ampliamente conservado el cual pertenece a la superfamilia “STP” de tipo Kunitz (Inhibidores de tripsina), los cuales son inhibidores de proteasas. Las proteínas de la familia Kunitz se unen con alta afinidad a sitios activos de proteasas y poseen un plegamiento característico, el cual fue encontrado también en factores de crecimiento (FGF) e interleuquinas (IL-1 β). Las proteasas en situaciones de herida ocasionan la degradación de la ME (Matriz Extracelular) y de otras proteínas como factores de crecimiento, en consecuencia se produce una prolongación de la fase inflamatoria lo que impide que la herida avance hacia la fase proliferativa. Por estas razones las proteínas que se encuentran en el extracto etanólico de *Piper aduncum* podrían favorecer el proceso de cicatrización al tener actividad inhibitoria sobre las proteasas. (49) (50) (51) (52)

Durante la formación de tejido de granulación en una herida, se liberan factores de crecimiento para estimular la migración y proliferación de fibroblastos al sitio de la herida. El extracto etanólico de *Piper aduncum* aumentó significativamente la migración y proliferación de fibroblastos en cultivo comparado a un control no tratado. En ambos

ensayos se observó un efecto dosis-dependiente para los tratamientos (extracto, proteína K1, proteína K2) considerando 24 horas de incubación. Las proteínas K1 y K2 mostraron los mayores porcentajes de proliferación de fibroblastos después de 24 horas de tratamiento (Figura N° 4.11). Sin embargo cuando se considera 48 y 72 horas de incubación se observó un efecto citotóxico en la proliferación celular. (Figura N° 4.11), por tal motivo para posteriores ensayos se recomienda determinar el valor de IC₅₀ de ambas proteínas. (53)

En el ensayo de migración celular (Técnica del rayado) para todos los casos se observó un efecto dosis dependiente. La proteína K2 (50 µg/mL) tuvo un efecto altamente significativo en la migración (Figura N° 4.20). La técnica del rayado presenta algunas ventajas por ser sencilla, rápida y fácil de interpretar; sin embargo se debe tomar en cuenta algunos inconvenientes: existen variaciones en el ancho de la herida inducida siendo este parámetro crítico en la evaluación de la migración de fibroblastos. Además algunas células permanecen adheridas en la placa después de la inducción de la herida. Por éstos motivos se recomienda utilizar nuevas técnicas que no presenten variación significativa en el tamaño de la herida, una de estas técnicas es ECIS (Detección de la impedancia eléctrica de la célula-sustrato). (54)

Por otro parte en el presente estudio se utilizó la prueba de RT-qPCR en tiempo real para evaluar los efectos del extracto etanólico de *Piper aduncum* y las proteínas K1 y K2 en los niveles de expresión de los factores de crecimiento FGF, EGF y PDGF. Los datos obtenidos demostraron que los tratamientos (extracto, proteína K1, proteína K2) aumentaron significativamente la expresión génica de PDGF, FGF y EGF. Sin embargo el efecto de las proteínas K1 y K2 en la expresión, después de 3 horas tuvo un aumento altamente significativo comparado al efecto del extracto. (Figuras N° 4.21, 4.22 y 4.23). En este ensayo se utilizó el gen GADPH como referencia; sin embargo para posteriores ensayos se recomienda utilizar otros genes ya que algunos trabajos describen que la expresión de GADPH es alterada en el proceso de cicatrización. (55)

Los resultados *In vivo*, demostraron que el extracto acuoso de *Piper aduncum* en sus dos formas: liofilizado y gel aumentaron la reepitelización, fibroplasia y angiogénesis, eventos relacionados al proceso de cicatrización. Se recomienda considerar

el tamaño de la herida de forma homogénea para cada uno de los controles, así mismo es importante realizar un análisis cuantitativo de los componentes inflamatorios, polimorfonucleares, macrófagos y fibroblastos.

Los efectos sinérgicos de las mezclas de componentes bioactivos contenidos en extractos de plantas pueden explicar su importancia. (56) Por tal motivo en este estudio se demostró que el extracto etanólico de *Piper aduncum* aumentó la proliferación, migración de fibroblastos humanos e incrementó la expresión de los genes FGF, EGF y PDGF eventos que demuestran su efecto cicatrizante.

Sin embargo los resultados más resaltantes, ponen en evidencia que las proteínas K1 y K2 tienen efecto potencial en la cicatrización, obteniéndose diferencias altamente significativas comparadas a los controles. Estos resultados respaldan la hipótesis de que péptidos activos y proteínas derivadas de plantas tienen efectos beneficiosos en la salud humana y en este caso en el proceso de cicatrización. (57)

La identificación de péptidos bioactivos a partir de extractos de plantas, es clave para el diseño de nuevas terapias para la curación de heridas agudas y crónicas. En un futuro la combinación de varios péptidos permitirá desarrollar una nueva clase de terapia que tenga implicancias en la cicatrización. (58)

Futuras investigaciones deberán establecer los mecanismos de actividad de las proteínas y péptidos de esta manera se podrá demostrar que pueden estimular respuestas celulares en lesiones *In vivo*. Finalmente la investigación de plantas nativas, extractos, o fracciones proteicas aun es incipiente, por lo que se convierte en un área de interés para futuras investigaciones.

CAPITULO V

5. Conclusiones

Primera

Se obtuvo el extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum* y se aislaron 5 proteínas que fueron denominadas K1, K2, K3, K4 y K5 mediante la técnica de RP-HPLC, finalmente se obtuvieron las secuencias N-terminales de las proteínas mediante espectrometría de masas en tándem, las secuencias fueron las siguientes: K1: EPLLDSEGEVLVNGGTYIYP; K2: VLVDGNGEPLVNGGSAYIILS, K3: KELLDSGDILRNGGTYIILPALR, K4: VLLDGNGEVVQNGGTYIIL y K5: QPLVDLEGNLVNGGTYIILP.

Segunda

Mediante alineamiento local (BLAST), se encontró un dominio conservado en común para las 5 proteínas purificadas, el cual pertenece a la superfamilia “STP” de tipo Kunitz (Inhibidores de tripsina), los cuales tienen actividad como inhibidores de proteasas.

Tercera

El extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum* y las proteínas K1 y K2 incrementaron significativamente la proliferación y migración de fibroblastos hDFa en cultivo *In vitro* comparados con un control negativo sin tratamiento.

Cuarta

El extracto etanólico liofilizado de *Piper aduncum* y las proteínas K1 y K2 incrementaron significativamente la expresión de los genes EGF, FGF y PDGF en fibroblastos hDFa comparados con un control negativo sin tratamiento.

Quinta

El extracto etanólico de *Piper aduncum* en su forma liofilizada y gel estimuló la angiogénesis, reepitelización y fibroplasia de tejido en heridas inducidas en *Rattus norvegicus* comparado con un control negativo (sin tratamiento).



CAPITULO VI

6. Recomendaciones

- La biodiversidad de compuestos vegetales, y la información empírica que ofrece la medicina natural sobre sus posibles efectos benéficos en la salud, requieren un estudio científico basado en evidencias que refuercen esta hipótesis. En los últimos años el desarrollo y uso de diversas técnicas en biología molecular, análisis fisicoquímicos y bioinformáticos permiten comprobar los efectos de extractos de plantas en diversos tipos celulares. Así mismo, el aislamiento e identificación de compuestos contenidos en estos extractos, como potenciales compuestos bioactivos, es un punto crítico para el desarrollo de nuevos fármacos. Por tal motivo, se recomienda investigar la función de otros componentes bioactivos contenidos en extractos de plantas.
- En este trabajo se identificaron 5 proteínas, sin embargo sólo se evaluó el efecto de las proteínas K1 y K2 las que fueron seleccionadas de manera aleatoria, se recomienda evaluar el efecto de las proteínas K3, K4 y K5.
- Para determinar el efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Piper aduncum*, se utilizaron técnicas moleculares *In vitro*, en cultivo de fibroblastos humanos actualmente existen otras técnicas que podrían establecer de manera más precisa el efecto en la migración y proliferación de fibroblastos.
- Para establecer la migración de fibroblastos se utilizó la técnica del rayado, ésta técnica presenta algunas ventajas por ser sencilla, rápida y fácil de interpretar; sin embargo se debe tomar en cuenta algunos inconvenientes: existen variaciones en el ancho de la herida inducida siendo este parámetro crítico en la evaluación de la migración de fibroblastos.
- Los niveles de expresión de los genes EGF, FGF y PDGF fueron determinados utilizando el gen de referencia GADPH, se recomienda para posteriores estudios utilizar otro gen de referencia.

- El análisis de las secuencias N-terminales, se realizó mediante alineamiento local, el que permitió identificar un dominio estructural en común para las 5 proteínas aisladas, el dominio Kunitz; sin embargo, se recomienda identificar toda la secuencia de aminoácidos de cada proteína, y realizar un análisis bioinformático exhaustivo que permita identificar motivos estructurales, que podrían estar relacionados con la función de dichas proteínas.



Referencias

1. Mancebo Dorvigny B, Sánchez Perera LM, Díaz Aguirre S, Bulnes Goucohea C, Regalado AI, Escobar Medina A, et al. Efecto cicatrizante de la pasta de clorofila-caroteno de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre heridas abiertas asépticas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2011;16:24-33.
2. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research*. 2009;37(5):1528-42.
3. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Perspective Article: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):585-601.
4. Basto CV. Cicatrize: Proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. *Investigaciones Andinas*. 2009;12(2010):100.
5. Thakur R, Jain N, Pathak R, Sandhu SS. Practices in Wound Healing Studies of Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011:17.
6. Malaguti M, Dinelli G, Leoncini E, Bregola V, Bosi S, Cicero A, et al. Bioactive Peptides in Cereals and Legumes: Agronomical, Biochemical and Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(11):21120.
7. Sharma S, Verma HN, Sharma NK. Cationic Bioactive Peptide from the Seeds of *Benincasa hispida*. *International Journal of Peptides*. 2014;2014:12.
8. Taylor L. Technical Data Report for Matico (*Piper aduncum*, *angustifolium*). Carson City: 2006.
9. Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli M, Andreotti E, et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2009;27(1):39-48.
10. Arroyo J, Hañari R, Tinco A, Baca D, Domínguez L, Buendía J. Efecto antihipertensivo del extracto de *Piper aduncum* ‘matico’ sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones. 2013. 2013;73(4):6.
11. Perez JM. La piel: Estructura y funciones. Universidad de Cantabria ed.
12. Franco GN. Histología de la piel. *Rev Fac Med UNAM* 2003;46(2003):130-3.

13. Alegria OH. Determinación del efecto cicatrizante del extracto etanólico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón. México, D.F.: Instituto Politécnico Nacional; 2010.
14. Guo S, DiPietro L. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*. 2010;89(3):219-29.
15. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;70(12):2059-81.
16. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiological Reviews*. 2003;83(3):835-70.
17. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2008;16(5):585-601.
18. Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;0:2-11.
19. Esteva E. El tratamiento de heridas. *OFFARM*. 2006:54-60.
20. Hosein Farzaei M, Abbasabadi Z, Reza Shams-Ardekani M, Abdollahi M, Rahimi R. A comprehensive review of plants and their active constituents with wound healing activity in traditional Iranian medicine. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*. 2014;26(7):197-206.
21. Biswas TK, Maity LN, Mukherjee B. Wound healing potential of *Pterocarpus santalinus* linn: a pharmacological evaluation. *The international journal of lower extremity wounds*. 2004;3(3):143-50.
22. Ambiga S, Narayanan R, Gowri D, Sukumar D, Madhavan S. EVALUATION OF WOUND HEALING ACTIVITY OF FLAVONOIDS FROM *IPOMOEA CARNEA* Jacq. *Ancient Science of Life*. 2007;26(3):45-51.
23. Vargas KFR. Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de berro (*Nasturtium officinale*) y llantén (*Plantago major*) en ratos (*Mus musculus*). Riobamba- Ecuador: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo 2012.
24. Nijveldt RJ, Boelens PG. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001;74(4):418-25.
25. Remington. *The Science and practice of pharmacy*. 2003;20.

26. Alman BA. Tecnología Faracéutica. Síntesis E, 2001. https://www.u-cursos.cl/usuario/c25b93f7ec03b9603ab499e3f1f7c8eb/mi_blog/r/Tecnologia.Farmaceutica_2_medilibros.com.pdf
27. La cromatografía de Fase Reversa [Available from: <http://depa.fquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPrpc.html>.
28. Arroyo J, Hañari R, Tinco A, Baca D, Domínguez L, Buendía J. Efecto antihipertensivo del extracto de Piper aduncum ‘matico’ sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2012;73:275-80.
29. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*. 1997;46(4):597-673.
30. Navickiene HMD, Morandim AdA, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo DCB, Telascrea M, et al. Composition and antifungal activity of essential oils from Piper aduncum, Piper arboreum and Piper tuberculatum. *Química Nova*. 2006;29:467-70.
31. Nuñez CE. Extracciones con equipos Soxhlet. 2008. <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>
32. René CLFRJ. Extracción consolventes de artemisina y otros metabolitos de Artemisia annua L. silvestre. Servicio de Difusión de la Creación Intelectual (SeDiCI) UNdLP, editor2007.
33. Bernardi A. Destilados y Rotavapor.
34. Skrabanja AT, de Meere AL, de Ruitter RA, van den Oetelaar PJ. Lyophilization of biotechnology products. *PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA*. 1994;48(6):311-7.
35. Teagarden DL, Baker DS. Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;15(2):115-33.
36. Esquivel S. LLI. Cromatografía de fase reversa: Universidad Nacional Autónoma de México.
37. Aguilar MI. HPLC of peptides and proteins. *Method and Protocols*.
38. Abian J CM, Gay M. Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica*. 2008;2.
39. Breton A HR, editor. Secuenciacion de proteinass por espectrometria de masas. *Métodos en Bioquímica ed*.

40. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
41. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007;2(2):329-33.
42. Extracción de ARN [Available from: <https://biologiamolecularinteractiva.files.wordpress.com/2013/01/laboratorio-no-4-extraccion-de-arn.pdf>].
43. Cultek. PCR en Tiempo Real [Available from: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Q-PCR-Introduccion.pdf>].
44. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.
45. Santamaría Bedón EJ. Comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de malva (*Malva sylvestris* L.) y aguacate (*P. americana*) en ratones (*Mus musculus*) 2014.
46. Zare Z. SV, Zavalaga Z, Et. al. Estudio del efecto cicatrizante del *Piper angustifolium* sobre lesiones inducidas en ratones diabeticos. *Resúmenes de investigaciones Forjando*.51
47. Andrew G. Reverse Phase HPLC Basics for LC/MS [Available from: <http://www.ionsource.com/tutorial/chromatography/rphplc.htm#The Column>].
48. Speicher KD, Gorman N, Speicher DW. UNIT 11.10 N-Terminal Sequence Analysis of Proteins and Peptides. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]*. 2001;Chapter:Unit-11.0.
49. Onesti S, Brick P, Blow DM. Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. *Journal of molecular biology*. 1991;217(1):153-76.
50. Murzin AG, Lesk AM, Chothia C. beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *Journal of molecular biology*. 1992;223(2):531-43.
51. Consenso internacional. Funcion de las proteasas en el diagnóstico de heridas. Revisin de un grupo de trabajo de expertos. Londres: Wounds International. 2011.
52. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*. 2004;378(Pt 3):705-16.
53. Schreier T, Degen E, Baschong W. Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low

molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing. *Research in experimental medicine Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie*. 1993;193(4):195-205.

54. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschlager M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation research*. 2013;752(1):10-24.

55. Turabelidze A, Guo S, DiPietro LA. Importance of Housekeeping gene selection for accurate RT-qPCR in a wound healing model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2010;18(5):460-6.

56. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2009;16(2-3):97-110.

57. Homayouni-Tabrizi M, Asoodeh A, Abbaszadegan MR, Shahrokhbadi K, Nakhaie Moghaddam M. An identified antioxidant peptide obtained from ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysate shows wound healing properties. *Pharmaceutical biology*. 2015;53(8):1155-62.

58. Demidova-Rice TN, Geevarghese A, Herman IM. Bioactive peptides derived from vascular endothelial cell extracellular matrices promote microvascular morphogenesis and wound healing in vitro. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2011;19(1):59-70.

