



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Modulación de la expresión transcripcional de
citoquinas de respuesta inmune innata y adaptativa en
células mononucleares de sangre periférica humana
tratadas con fucoidan de *Lessonia trabeculata* Villouta
& Santelices 1986**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Christian ELUGO GUEVARA

ASESOR

Mg. Erasmo Honorio COLONA VALLEJOS

Lima, Perú



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Elugo, C. (2019). *Modulación de la expresión transcripcional de citoquinas de respuesta inmune innata y adaptativa en células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con fucoïdan de Lessonia trabeculata Villouta & Santelices 1986*. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

- Código ORCID del asesor: **0000-0001-9759-288X**
- DNI del autor: **74308529**
- Grupo de investigación: **“MODULANS” (UNMSM)**
- Institución que financia parcial o totalmente la investigación: **Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM (VRIP)**
- Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación: **Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Cercado de Lima, Lima-Perú.**
Coordenadas geográficas: **12°03'30"S 77°05'00"O**
- Año o rango de años que la investigación abarcó: **2018**



Universidad Nacional Mayor De San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 15.20 horas del 03 de mayo de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo de **CHRISTIAN ELUGO GUEVARA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 003-EPMP-2018, el titulado expuso su tesis: **“MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE CITOQUINAS DE RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA TRATADAS CON FUCOIDAN DE *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices 1986”** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** a **CHRISTIAN ELUGO GUEVARA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17.00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 03 de mayo de 2019.

Dra. LIBERTAD ALZAMORA GONZALES
(PRESIDENTA)

Mg. ERASMO COLONA VALLEJOS
(ASESOR)

Dra. EGMA MAYTA HUATUCO
(MIEMBRO)

Blga. OLGA RIOFRIO VARGAS
(MIEMBRO)

Dedicatoria

A toda persona que persigue el sueño no solo de engrandecerse, sino de engrandecer a su nación a través de la ciencia observando en la naturaleza, el detalle más grande de perfección.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a Dios por estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida, por no dejarme caer y vencer antes las adversidades y permitirme disfrutar junto a mis familiares y personas que más estimo.

A mi madre Rosemary, por todo el apoyo incondicional durante todos estos años de mi vida, por la paciencia y el amor; por sostenerme y ayudarme en todo este periodo de universitario, quedaré siempre en deuda.

A mi hermana Blanca y a mi padre Christian, por apoyarme y animarme siempre a seguir mis ideales y poder culminar con este proceso.

A mis segundos padres y abuelos Norka y Rolando, por estar presente en los momentos más difíciles, por el cariño, el amor y el respeto. Gracias por enseñarme a ser perseverante y un hombre de bien para la sociedad. Estaré eternamente agradecido por la compañía y la paciencia. Muchísimas gracias.

A mis hermanos y tíos Melssy, Percy y Guillermo, por brindarme todo el apoyo incondicional en muchos aspectos de mi vida, por las lecciones y consejos y por ayudarme a ser perseverante en todos estos años de carrera y poder concluir con mi tesis. Muchas gracias.

A mis tíos y tías, en especial a mi tía Katty, por darme un apoyo incondicional y ser una buena consejera en los momentos difíciles, por enseñarme el valor de la familia y el respeto que debe de existir en todo momento. Mil gracias.

A mi asesor, el Prof. Erasmo Colona Vallejos, por ser un verdadero maestro, en muchas ocasiones un padre, un amigo y un guía durante toda esta difícil e interesante etapa llena de aprendizajes; por tener mucha paciencia y enseñarme que no importa cuántas veces uno puede caer, la idea es que cuando uno se levante, sea una persona diferente. Muchas gracias por haber confiado en mí y dejarme muchas lecciones de vida.

A la Dra. Libertad Alzamora Gonzales, por ser una guía, excelente maestra, consejera y por haber confiado en mí en toda esta etapa de aprendizaje. Así mismo, por haberme dado la oportunidad de pertenecer al Laboratorio de Inmunología, donde empezó este gran reto y por permitirme ser profesor invitado

en los cursos de Inmunología e Inmunopatología. Siempre estaré agradecido por todo ello y más.

Al Mg. Jorge Chávez Pérez y a Eder Apumayta Suárez, del Laboratorio de Fitoquímica y Biología Vegetal del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la UNALM por la caracterización fitoquímica del material biológico para la realización de esta tesis. Muchísimas gracias.

A la empresa PSW S. A., por la extracción del alga y la elaboración del extracto de fucoidan en esta tesis. Muchas gracias.

Al Blgo. Luis Herrera Arrasco, por guiarme, ayudarme y aumentar mis conocimientos en temas de Biología Molecular requeridos en mi tesis. Muchas gracias.

A mis colegas y compañeros del Laboratorio de Inmunología: Andrés, Dora, Mary Rosa y Mónica. Muchas gracias por darme ánimos a concluir con la tesis, compartir experiencias juntos y enseñarme lo importante que es trabajar en equipo.

A mis compañeros y ahora colegas de la promoción "Jonas Edward Salk". Siempre estaré eternamente agradecido por la compañía de cada uno durante estos 5 años de carrera y compartir inolvidables momentos, por darme ánimo y ayudarme a ser perseverante y a poder concluir con la tesis. Muchas gracias amigos.

A mi mejor amiga Brenda, pese a no estar en todo momento juntos, muchas gracias por enseñarme que, a pesar de la distancia, la verdadera amistad se mantiene. Muchas gracias por animarme a concluir con este trabajo y mi carrera.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Mecanismos de defensa del sistema inmunitario	3
2.1.1. Respuesta inmune innata	3
2.1.2. Respuesta inmune adaptativa.....	4
2.1.3. Células mononucleares de sangre periférica o PBMC	5
2.1.4. Citoquinas.....	6
2.1.4.1. Citoquinas de respuesta inmune innata.....	7
2.1.4.1.1. Interleucina o quimiocina 8 (IL-8 o CXCL8).....	7
2.1.4.1.2. Interleucina 12 (IL-12).....	8
2.1.4.1.3. Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β).....	8
2.1.4.2. Citoquinas de respuesta inmune adaptativa	9
2.1.4.2.1. Interleucina 2 (IL-2)	9
2.1.4.2.2. Interleucina 10 (IL-10).....	9
2.2. <i>Lessonia trabeculata</i>	11
2.2.1. Taxonomía	11
2.2.2. Morfología externa	11
2.2.3. Hábitat y distribución.....	12
2.2.4. Rol e importancia	13
2.3. Metabolitos de origen natural de las algas pardas	14
2.3.1. Fucoidan	16
2.3.1.1. Estructura y naturaleza química	16
2.3.1.2. Actividad biológica.....	19
2.3.2. Actividad de inmunomoduladores sobre la expresión transcripcional de citoquinas	19
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22

IV. MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1. Material biológico.....	23
4.2. Elaboración de la solución de fucoidan de <i>Lessonia trabeculata</i> y <i>Fucus vesiculosus</i>	23
4.3. Obtención de PBMC para cultivo celular	24
4.4. Evaluación de la citotoxicidad mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	27
4.5. Evaluación de la expresión de ARN transcripcional de citoquinas IL-2, IL-8, IL-10, IL-12 y TGF- β	28
4.5.1. Tratamiento con diferentes concentraciones del extracto de fucoidan.....	28
4.5.2. Extracción del ARN total.....	29
4.5.3. Evaluación de la integridad del ARN	31
4.5.4. Obtención de ADNc a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)	32
4.5.5. Amplificación del ADNc por PCR convencional	32
4.5.6. Electroforesis en gel de agarosa	34
4.5.7. Cuantificación densitométrica.....	34
4.6. Análisis estadístico	35
V. RESULTADOS	36
VI. DISCUSIÓN	41
VII. CONCLUSIONES	48
VIII. RECOMENDACIONES	49
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
X. ANEXOS	62

ABREVIATURAS

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

Caco-2: Línea celular de cáncer de colon humano

CD4: Linfocito Th

CD8+: Linfocito T citotóxico

CD: *Cluster of differentiation* o Cúmulo de diferenciación, moléculas marcadoras encontradas en la superficie celular

CD14: Glicoproteína de membrana anclada por GPI, propia de los monocitos y de sus precursores

cm: Centímetros

CR-3: Receptor de complemento

CXCL: Quimiocina ligando

DC: Célula dendrítica

DMSO: Dimetilsulfóxido

FCPS: Familia de polisacáridos sulfatados

FFv: Fucoïdan de *Fucus vesiculosus*

FLt: Fucoïdan de *Lessonia trabeculata*

h: Horas

IMARPE: Instituto del Mar del Perú

IFN: Interferón

IL: Interleuquina o interleucina

IL-10R: Receptor de la IL-10

IL-12R: Receptor de la IL-12

IRE: Elemento sensible al hierro

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

JAK: Quinasa Janus

LB: Linfocito B

LPS: Lipopolisacárido

LT: Linfocito T

LT- α : Linfotoxina α

MAPKs: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

min: Minutos

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NF- κ B: Factor de transcripción. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

N: Organismo haploide

NK: Células *Natural Killer*

NO: Óxido nítrico

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino

pb: Pares de bases

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*. Medio de cultivo celular

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RAW 264.7: Línea celular de macrófagos

seg: Segundos

SBF: Suero bovino fetal

SMADs: Factores de transcripción que transducen señales de la superfamilia de la citoquina TGF- β

SO₃⁻: Bisulfito

SR: Receptor *Scavenger*

STAT: Factor de transcripción y transductor de señales y activador de transcripción.

TBE: Buffer Tris-Borato-EDTA

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral β

Th: Linfocito T *helper* (colaborador)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TLR-4: Receptor tipo Toll 4

THP-1: Línea celular monocítica humana derivada de un paciente con Leucemia monocítica aguda.

TYK: Proteína tirosina quinasa

VC: Viabilidad celular

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de las citoquinas de respuesta inmune innata: IL-8, IL-12 y TGF- β y de las citoquinas de respuesta inmune adaptativa: IL-2 e IL-10.....	10
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la especie <i>L. trabeculata</i> Villouta & Santelices (1986) (Guiry & Guiry, 2016).....	11
Tabla 3. Servicios y funciones relacionadas al recurso “huiró”.	14
Tabla 4. Estructuras de fucoidanos reportadas en diferentes algas pardas de los órdenes Laminariales, Fucales y Chordariales.....	18
Tabla 5. Concentración de ARN Total de PBMC tratadas y no tratadas con fucoidan.....	31
Tabla 6. Master Mix para la PCR convencional	33
Tabla 7. Protocolo de temperatura y tiempo en la PCR convencional	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Población de células del sistema inmunitario derivadas de un progenitor común en la médula ósea: célula madre hematopoyética multipotencial.	6
Figura 2. Morfología del esporofito de <i>L. trabeculata</i> Villouta & Santelices. ...	12
Figura 3. Principales especies de macroalgas de importancia comercial en el Perú.....	13
Figura 4. Mecanismo propuesto responsable de la bioactividad del fucoidan.. ..	21
Figura 5. Preparación del fucoidan de <i>L. trabeculata</i>	23
Figura 6. Preparación del fucoidan comercial de <i>F. vesiculosus</i>	24
Figura 7. Proceso de obtención de PBMC.....	25
Figura 8. Recuento de células mononucleares en cámara de Neubauer.....	26
Figura 9. Cultivo de PBMC humanas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF y 10% de antibióticos a las 24 horas.....	26
Figura 10. Ensayo de la reducción metabólica del MTT.....	28
Figura 11. Extracción del ARN total mediante la separación entre componentes celulares y el material genómico empleando el kit innuPREP RNA Mini Kit. ...	29
Figura 12. Flujoograma del protocolo de extracción de ARN a partir de cultivos de PBMC. Adaptado de InnuPREP RNA Mini Kit.....	30
Figura 13. Integridad del ARN extraído.. ..	32
Figura 14. Amplificación del ADNc por la PCR convencional en el termociclador Bioer Technology (versión 2009-1.6).. ..	34
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa.....	35
Figura 16. Evaluación de la citotoxicidad de FLt y FFv en cultivo de PBMC..	36
Figura 17. Efecto de FLt y FFv sobre la expresión transcripcional de la IL-8 durante 48 horas.	37
Figura 18. Análisis de la expresión transcripcional del ARNm IL-12p40 en cultivo de PBMC estimuladas con FLt, FFv y LPS durante 48 h.	38
Figura 19. Evaluación de la expresión transcripcional de la citoquina TGF- β en cultivo de PBMC estimuladas con FLt, FFv y LPS durante 48 h.	39

Figura 20. Análisis de la expresión transcripcional del ARNm IL-10 en PBMC estimuladas con FLt, FFv y LPS..... **40**

RESUMEN

Las citoquinas son polipéptidos que participan en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. En algunas enfermedades, el desequilibrio entre citoquinas anti y pro-inflamatorias se convierte en un proceso perjudicial para el hospedero. Debido a esto, la inmunomodulación (inmunoestimulación o inmunosupresión) constituye un tratamiento alternativo en el control de dichas enfermedades. El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión transcripcional de citoquinas moduladoras de la respuesta inmune innata y adaptativa en células mononucleares humanas (PBMC) tratadas con fucoidan del alga parda *Lessonia trabeculata*. El fucoidan de *Lessonia trabeculata* fue proporcionado por la empresa PSW S.A y caracterizado fitoquímicamente por el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Las PBMC se trataron con diferentes concentraciones de fucoidan de *Lessonia trabeculata* (FLt, 80.84% pureza) y como controles se emplearon fucoidan de *Fucus vesiculosus* (FFv, 95% pureza) y lipopolisacárido de *E. coli*. La citotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Para evaluar la expresión transcripcional de las citoquinas de la inmunidad innata: IL-8, IL-12 (p35 y p40) y TGF- β y las citoquinas de inmunidad adaptativa: IL-2 e IL-10 se empleó la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR convencional). El tratamiento de cultivos de PBMC a las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de FLt y FFv no ocasionó efecto citotóxico; por el contrario, FLt a 100 $\mu\text{g/ml}$ incrementó significativamente el porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin fucoidan ($p < 0.05$). Respecto a la expresión transcripcional, el tratamiento con FLt a 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ incrementó el ARNm IL-10 ($p < 0.0001$) y ARNm IL-12p40 ($p < 0.05$) respectivamente en relación al control sin fucoidan. Se concluye que el fucoidan de *L. trabeculata* a 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ modula la expresión transcripcional de IL-12 de inmunidad innata e IL-10 de inmunidad adaptativa.

PALABRAS CLAVE

Lessonia trabeculata, fucoidan, PBMC, expresión transcripcional, citoquinas e inmunomoduladores

ABSTRACT

Cytokines are polypeptides that participate in the regulation of immune and inflammatory responses. In some diseases, the imbalance between anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines results in a harmful process to the host. Due to this, immunomodulation (immunostimulation or immunosuppression) constitutes an alternative treatment for the control of said diseases. The main objective of the present study was to evaluate the transcriptional expression of modulating cytokines of the innate and adaptive immune response in human mononuclear cells (PBMC) treated with fucoidan from the brown alga *Lessonia trabeculata*. The fucoidan of *L. trabeculata* was provided by the PSW S.A company and phytochemically characterized by the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of the National Agrarian University La Molina. The PBMC were treated with different concentrations of fucoidan from *Lessonia trabeculata* (FLt, 80.84% purity) and as controls the fucoidan from *Fucus vesiculosus* (FFv, 95% purity) and lipopolysaccharide (LPS) were used. The cytotoxicity was evaluated through the metabolic reduction assay of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole (MTT) bromide. The transcriptional expression of the cytokines of innate immunity: IL-8, IL-12 (p35 and p40) and TGF- β and adaptive immunity cytokines: IL-2 and IL-10 was assessed through a conventional polymerase chain reaction (conventional PCR). The treatment of cultures of PBMC at concentrations of 10 and 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of FLt and FFv did not show cytotoxic effect; on the contrary, FLt at 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ significantly increased the percentage of cell viability with regard to the negative control ($p < 0.05$). Regarding to the transcriptional expression, the treatment with FLt at 10 and 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ increased the mRNA IL-10 ($p < 0.0001$) and mRNA IL-12p40 ($p < 0.05$) respectively in relation to the negative control. It was concluded that the fucoidan of *L. trabeculata* at 10 and 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ modulates the transcriptional expression of IL-12 of innate immunity and IL-10 of adaptive immunity.

KEYWORDS

Lessonia trabeculata, fucoidan, PBMC, transcriptional expression, cytokines and immunomodulators

I. INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata y adaptativa se constituye en componentes de un sistema integral encargado de defender al hospedero en el que funcionan conjuntamente numerosas células y moléculas dentro de las cuales se encuentran las citoquinas o interleucinas (IL) (Abbas et al., 2015). Estas moléculas son polipéptidos que actúan como mediadores críticos de la comunicación para el sistema inmune y la defensa del hospedero contra los patógenos. Pueden ser producidas por leucocitos y otras células en respuesta a la infección o al daño celular cuando la integridad de la célula se encuentra comprometida. Además, estos polipéptidos actúan a través de una serie de vías de señalización conservadas que modulan el metabolismo celular y la programación transcripcional de genes de otras citoquinas con la finalidad de mejorar la respuesta inmune (O'Shea et al., 2018).

En algunas enfermedades autoinmunitarias, se presenta una respuesta inmune descontrolada y desequilibrio entre citoquinas anti y pro-inflamatorias, dando como resultado un proceso inflamatorio que termina dañando algunas estructuras del hospedero (Morel, 2014). En este contexto, existe la necesidad de entender cómo el sistema inmunológico puede ser modulado mediante el uso de inmunoestimulantes o inmunosupresores que se empleen en el control de las enfermedades. Así, en algunos casos y dependiendo de la enfermedad (inmunosupresión, estrés, infecciones crónicas, entre otras.) la finalidad de la inmunomodulación será incrementar o reducir (enfermedades autoinmunitarias) la intensidad de la respuesta inmune (García-Hernández et al., 2009).

El tratamiento convencional de múltiples enfermedades infecciosas, autoinmunes y del cáncer, que son recurrentes en la población mundial, han presentado inconvenientes como la resistencia a los quimioterápicos y efectos colaterales que pueden afectar directamente a la inmunidad llevando al paciente a recaídas e incluso la muerte (Perez, 2009).

La medicina tradicional provee de información importante para la ciencia en la búsqueda de nuevos medicamentos, así como productos naturales aislados de plantas y algas que pueden estimular significativamente a las células del sistema inmunológico, adicionalmente, estos productos tienen una alta eficacia sobre el control de enfermedades (Prieto-González, 2004). Numerosos estudios han

demostrado que el fucoidan, polisacárido sulfatado presente en las paredes celulares de las algas pardas, posee diferentes propiedades biológicas (antitumorales, antivirales y antiinflamatorias) que están relacionadas a su composición química (Hahn et al., 2012) las cuales han tenido efectos significativos (Li et al., 2008); sin embargo, el fucoidan de todas las algas pardas no presentan la misma actividad.

Actualmente, algunos estudios demuestran que el fucoidan de ciertas especies de algas pardas, puede reducir la expresión del ARNm de las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α o incrementar la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Borazjani et al., 2017) las cuales están involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa respectivamente. Además, se ha reportado que puede suprimir la expresión de ARNm de la quimioquina proinflamatoria IL-8 (Mizuno et al., 2009).

Dentro de la megabiodiversidad presente en las zonas marítimas de nuestra región, el Perú cuenta con praderas de macroalgas pardas al sur del litoral marino y entre ellas se encuentra *Lessonia trabeculata* (IMARPE, 2012).

En el Perú, algunos estudios con el fucoidan de *L. trabeculata* han sido realizados por el grupo de investigación MODULANS de la UNMSM, liderado por la Dra. Libertad Alzamora Gonzales, determinando el efecto inmunoestimulante sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) en células mononucleares de sangre periférica (datos recolectados por intercomunicación con el Mg. Erasmo Colona V., parte del grupo de investigación) y la actividad citotóxica sobre la línea celular Hep-2 (Horna, 2018). Sin embargo, no se han reportado estudios sobre el efecto modulador del fucoidan de *L. trabeculata* en la expresión transcripcional de citoquinas en cultivos de células mononucleares sanguíneas humanas.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad inmunomoduladora del fucoidan de *L. trabeculata* sobre la expresión transcripcional de citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa en células mononucleares humanas a fin de establecer bases científicas para su uso en el consumo humano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Mecanismos de defensa del sistema inmunitario

Los seres humanos, como todos los organismos, poseen mecanismos para defenderse contra la infección por lo que una forma especializada de defensa del hospedero es la inmunidad. En los mamíferos, los mecanismos de defensa pueden ser pasivos o activos. La defensa pasiva adopta la forma de barreras naturales mecánicas o químicas que obstaculizan la infección como, por ejemplo, la piel (barrera mecánica), que evita el acceso de microbios al tejido subyacente y el ácido gástrico (barrera química) en el estómago que puede matar muchos microbios que podrían ingerirse con el alimento. Por otro lado, la defensa activa es desencadenada por respuestas inmunitarias que comprenden diversos mecanismos efectores que son inducidos por infección, y que permiten eliminar el microbio. Esto, a su vez, lleva a una respuesta, que involucra la interacción de células y moléculas para producir diferentes mecanismos efectores que a menudo pueden eliminar la infección (MacPherson & Austyn, 2013). Estas moléculas, como por ejemplo las citoquinas, son cruciales para mantener la homeostasis inmunitaria, promover la respuesta a la infección, resolver la inflamación y promover la memoria inmunológica (Kelly et al., 2017).

Así, la respuesta inmunológica puede dividirse en dos formas: innata y adaptativa.

2.1.1. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa contra las infecciones o patógenos. Una característica definitoria de la inmunidad innata es su inicio rápido, así como su presencia antes de la exposición microbiana y desarrollo previo a la respuesta inmunitaria adaptativa. En contraste con esta última, la respuesta inmune innata se dirige hacia componentes estructurales específicos e invariables de microbios conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos, o *PAMPs*. Estos *PAMPs* incluyen componentes de la pared celular microbiana y ácidos nucleicos que interactúan con potentes y efectivos receptores de reconocimiento de patrones (*PRRs*) para iniciar respuestas inflamatorias (McDonald & Levy, 2018).

La respuesta inmune innata se inicia cuando las células del sistema inmunitario innato como los PMN (polimorfonucleares), los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas (*DC*) se enfrentan a patógenos. Los monocitos/macrófagos y las células NK pueden mediar esta respuesta y mejorarla a través de la expansión y reducción de sus poblaciones celulares, la regulación de la expresión de genes implicados en el reconocimiento y la presentación de patógenos y finalmente, secretar citoquinas que aumentan la actividad antimicrobiana. La interacción y reconocimiento de las moléculas microbianas (por ejemplo, lipopolisacáridos, ADN, ARN, entre otras.) a través de los *PRRs*, expresados por una variedad de células, activan las vías de señalización que conducen a la producción de factores secretados, incluidas las citoquinas tales como el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, entre otras y las quimiocinas o quimioquinas (por ejemplo, la IL-8/CXCL8) que participan en la respuesta inflamatoria (McDonald & Levy, 2018).

2.1.2. Respuesta inmune adaptativa

Si la inmunidad innata no reduce la infección o elimina al patógeno, más adelante puede generarse la respuesta adaptativa. Células y moléculas como los linfocitos T y B y anticuerpos respectivamente se vuelven más eficaces en el transcurso de la infección, pero la inmunidad adaptativa también puede llevar a un estado de resistencia duradera a la reinfección, generando memoria inmunitaria. Los dos tipos principales de linfocitos, células B y T, tienen receptores altamente discriminatorios para componentes o antígenos microbianos, *BCR* (receptor de células B) y *TCR* (receptor de células T), éstos reconocen antígenos de diferentes maneras. Los *BCR* se unen a diferentes tipos de antígeno, como carbohidratos o glucoproteínas en su forma nativa, no plegada. En contraste, los *TCR* por lo general reconocen péptidos pequeños, como resultado de la degradación de proteínas microbianas en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*) sobre la superficie de otras células (esto es, como complejos de péptido-*MHC*). Cuando ciertos alotipos *MHC* se unen a auto-péptidos particulares de moléculas antigénicas blanco críticas es posible el desarrollo de autoinmunidad y por ende la enfermedad autoinmune (MacPherson & Austyn, 2013).

Un gran número de citoquinas son producidas por linfocitos activados. La función de estas moléculas, en muchas ocasiones, no se logra entender con facilidad; sin embargo, las producidas por subpoblaciones de células T CD4 (aunque las células T CD8 e incluso las células B también secretan citoquinas) como por ejemplo las Th1 y Th2 probablemente son algunas de las que se entienden mejor (MacPherson & Austyn, 2013).

2.1.3. Células mononucleares de sangre periférica o PBMC

Las células del sistema inmunitario derivan de un progenitor común en la médula ósea. Estos progenitores se dividen comúnmente en células mieloides y linfoides. Las células mieloides incluyen a los monocitos y sus descendientes y a los granulocitos como los neutrófilos y los basófilos. Las células linfoides se componen principalmente de células B, células T y células NK o “asesinas naturales” (Bolen et al., 2011) (Figura 1).

La mayoría de los estudios de expresión genómica se basan en el análisis de células mononucleares de sangre periférica total (PBMC). Las PBMC están compuestas por un conjunto de células que se derivan de un progenitor común en la médula ósea (Figura 1). Estas células pueden variar ampliamente sus proporciones entre individuos, pero las células T y las células B juntas, en general, representan aproximadamente el 75% de las PBMC, mientras que las células NK y los monocitos alrededor del 10 y 15% respectivamente. Los tipos de células restantes, como las células dendríticas, son mucho más raros y representan <1% del total de PBMC (Autissier et al., 2010).

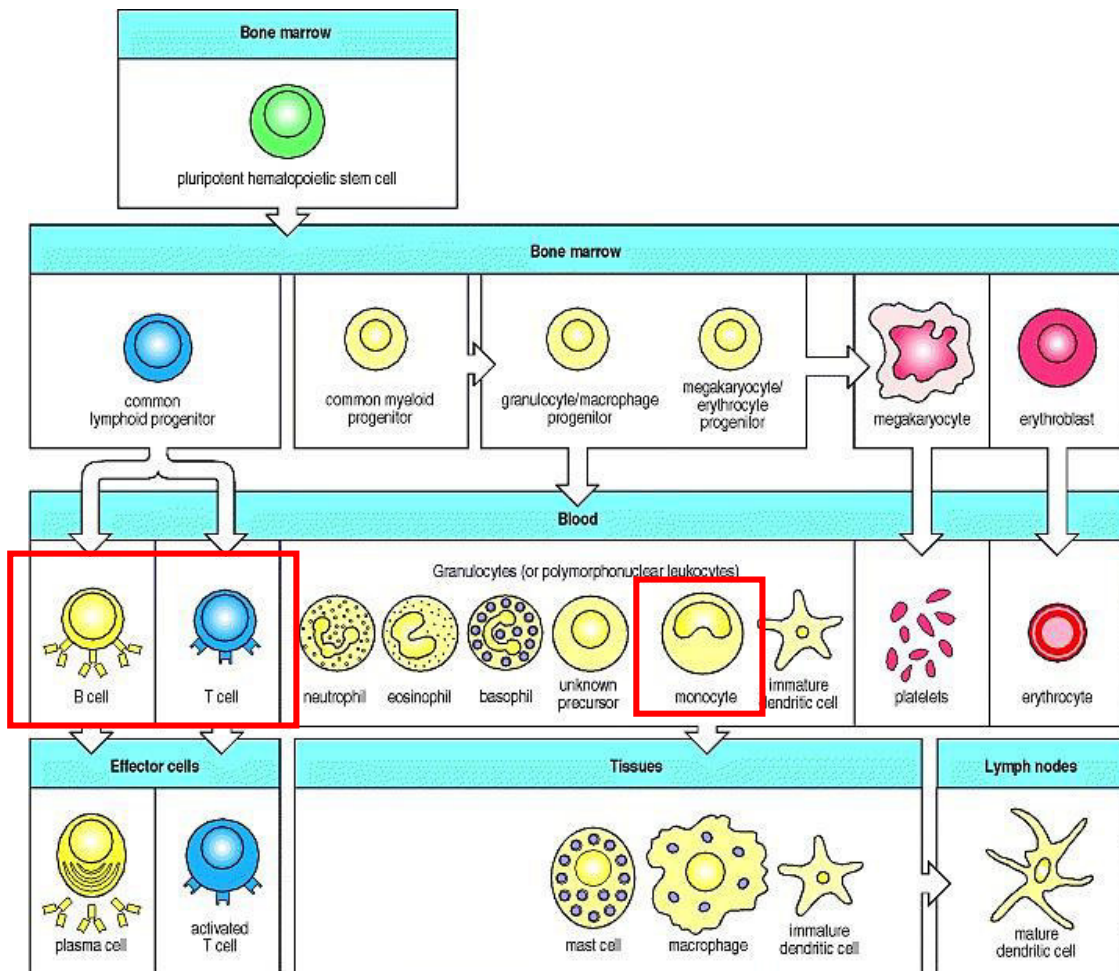


Figura 1. Población de células del sistema inmunitario derivadas de un progenitor común en la médula ósea: célula madre hematopoyética multipotencial. En los recuadros rojos se señalan a los componentes de las PBMC. Por Janeway, C. A. Jr, Travers, P., Walport, M., et al. (2001).

2.1.4. Citoquinas

Las citoquinas o citocinas, desempeñan funciones fundamentales en el control del desarrollo y las funciones de una variedad de células inmunes y no inmunes participando, además, en la intercomunicación celular. Son de particular interés, debido a su importancia en la regulación del sistema inmunitario, su papel en la patogénesis de la enfermedad y, cada vez más, en los tratamientos.

Las citocinas se definen operativamente como polipéptidos (secretados por leucocitos como, por ejemplo, PBMC; entre otras células) que actúan principalmente en las células hematopoyéticas, cuyos efectos incluyen la modulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Estos polipéptidos actúan a través de una serie de vías de señalización conservadas que modulan el metabolismo celular y la programación transcripcional de genes de otras

citoquinas con la finalidad de mejorar la respuesta inmune. La síntesis de citoquinas es un proceso transitorio porque el ARN mensajero de la mayoría de las citoquinas es inestable en el tiempo, lo que regula la producción de citoquinas. Por otro lado, la producción de ciertas citoquinas también está regulada por un proceso postraducciona (O'Shea et al., 2018).

La actividad desregulada de citoquinas se reconoce como un componente crítico de los trastornos autoinflamatorios. Esto es demostrado por los estudios de asociación de todo el genoma en los que las citoquinas y sus receptores representan importantes alelos de riesgo compartidos entre múltiples enfermedades autoinmunes (Cotsapas & Hafler, 2013). Es por ello, que actualmente muchos tratamientos y blancos de fármacos se enfocan en la síntesis y secreción de citoquinas para controlar el desequilibrio en las enfermedades o trastornos autoinflamatorios.

2.1.4.1. Citoquinas de respuesta inmune innata

2.1.4.1.1. Interleucina o quimiocina 8 (IL-8 o CXCL8)

La IL-8 fue descrita por grupos independientes con diferentes nombres: factor activador de neutrófilos, péptido activador de neutrófilos de origen monocito y factor quimiotáctico de neutrófilos derivado de monocitos. Russo et al., (2010), demostraron que la producción de IL-8 en monocitos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) indujo la migración de neutrófilos, considerándose como neutrófilo específico.

Varios estudios han demostrado que IL-8 puede ser liberado por una amplia variedad de células después de la estimulación apropiada, incluidos los monocitos, las células endoteliales, los linfocitos T, los fibroblastos, células tumorales, células epiteliales, hepatocitos, macrófagos y células sinoviales y queratinocitos. A su vez, los dos receptores de IL-8 conocidos como CXCR1 y CXCR2, se expresan en una amplia variedad de leucocitos, incluidos los neutrófilos, los monocitos, las células T CD8+ y los mastocitos. Este es un punto relevante ya que muchas estrategias terapéuticas basadas en IL-8 se dirigen solo a enfermedades neutrofílicas, pero el potencial de tales terapias se extiende más allá de los neutrófilos (Russo et al., 2014) (Tabla 1).

2.1.4.1.2. Interleucina 12 (IL-12)

IL-12 es un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas unidas por disulfuro, IL12p35 e IL12p40, derivadas de dos genes distintos. Es secretada por células dendríticas y macrófagos residentes en el tejido en respuesta a señales exógenas o endógenas (O'Shea et al., 2018). La IL-12 es una citoquina predominantemente proinflamatoria secretada por células presentadores de antígenos (CPA o APC) en respuesta a la detección de componentes microbianos por los receptores tipo Toll. La función más notoria de la IL-12 es la inducción del factor de transcripción T-bet y el control de la diferenciación de las células T vírgenes en células Th1 productoras de IFN- γ . Así mismo, es un potente inductor de IFN- γ por las células asesinas naturales (NK) y las células linfoides innatas (ILC) (Krummen et al., 2010).

Las señales del heterodímero a través del receptor de IL-12 (IL-12R), que comprende las subunidades IL-12R β 1 e IL-12R β 2, estimula la actividad del receptor Janus kinase 2 (JAK2) y la tirosina quinasa 2 (TYK2), lo que conduce a la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción 4 (STAT4). El promotor IL-12p40 es complejo y contiene sitios NF- κ B, elementos de respuesta de interferón (IRE) y sitios de unión ETS. Al igual que con otros genes de citoquinas, la remodelación de nucleosomas es importante en la regulación de IL-12 (O'Shea et al., 2018) (Tabla 1).

2.1.4.1.3. Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)

El TGF- β es parte de una gran familia de proteínas que comprende 33 miembros que pueden dividirse desde el punto de vista estructural resultando en las subfamilias de las TGF- β , las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), los factores de crecimiento y diferenciación, las activinas, la hormona nodal y la antimülleriana. En mamíferos, la subfamilia de citoquinas TGF- β consta de tres isoformas: TGF- β 1 (isoforma más abundante producida por plaquetas, células T reguladoras y monocitos), TGF- β 2 y TGF- β 3 que, en un primer momento, se expresan como dímeros unidos por disulfuro biológicamente inactivos que se escinden para formar dímeros activos. En translocación en el retículo endoplásmico, el péptido líder N-terminal se escinde y la proteína madura se genera posteriormente por un segundo evento de escisión que libera una pro-

región N-terminal. La pro-región puede permanecer asociada con la región biológicamente activa C-terminal, inhibiendo su actividad (Kelly et al., 2017; O'Shea et al., 2018) (Tabla 1).

Aunque es más conocido como un regulador crucial de las respuestas de las células T, el TGF- β desempeña un papel vital en la regulación de las respuestas mediadas por prácticamente todas las células inmunes innatas y adaptativas, incluidas las células dendríticas, B, NK, células linfoides innatas y los granulocitos (Kelly et al., 2017).

2.1.4.2. Citoquinas de respuesta inmune adaptativa

2.1.4.2.1. Interleucina 2 (IL-2)

Es una de las primeras citoquinas que se ha estudiado intensivamente, se produce principalmente por las células T activadas y es un factor de crecimiento autocrino (efecto sobre la misma célula que lo produjo) prototípico que se requiere para la progresión de la fase G1 a la fase S en las células T activadas *in vitro*, determina la magnitud de las respuestas de las células T y las células NK, aumenta la actividad citolítica de las células T y NK e induce la secreción de IFN- γ (O'Shea et al., 2018).

Así mismo, la IL-2 es un factor de crecimiento e inductor del cambio de clase para las células B y posee gran importancia en la programación de células T CD8+ de memoria que experimentan una expansión secundaria en infecciones virales (Williams et al., 2006; O'Shea et al., 2018) (Tabla 1).

2.1.4.2.2. Interleucina 10 (IL-10)

La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria clave producida principalmente por células Th2, además de células B activadas, macrófagos activados, queratinocitos y células epiteliales bronquiales. Aunque la mayoría de las células hematopoyéticas detectan IL-10 a través de la expresión del receptor de IL-10 (IL-10R), estudios recientes han demostrado que los macrófagos son las principales células diana de los efectos inhibitorios de IL-10 (Shouval et al., 2014; Zigmund et al., 2014) (Tabla 1).

Muchas de las bases moleculares de las actividades antiinflamatorias de la IL-10 aún permanecen desconocidas (Grütz, 2004). Por lo tanto, comprender el

papel de la IL-10 en la regulación de los procesos metabólicos es de gran importancia para interpretar cómo actúa en el control de las respuestas inflamatorias y para descubrir reguladores moleculares clave que controlen los procesos involucrados en la resolución de la inflamación (Ip et al., 2017).

Tabla 1. Principales características de las citoquinas de respuesta inmune innata: IL-8, IL-12 y TGF- β y de las citoquinas de respuesta inmune adaptativa: IL-2 e IL-10

Citoquina	Respuesta inmunitaria involucrada	Señalización de expresión	Fuente celular	Células blanco	Acción	Fenotipo "Knockout"
IL-8 / CXCL8	Innata		Monocitos, células endoteliales, linfocitos T, fibroblastos, macrófagos, queratinocitos, entre otras.	Neutrófilos y monocitos	quimioatrayente	
IL-12		JAK2, TYK2, STAT4	Macrófagos, DC, células B	Células T y células NK	Diferenciación Th1, proliferación, citotoxicidad	Diferenciación inefectiva a Th1, susceptibilidad a infecciones bacterianas
TGF- β		SMADS	Células T, macrófagos y otras células	Células T, macrófagos y otras células	Inhibe el crecimiento y activación, promueve a Th17	
IL-2	Adaptativa	JAK1, JAK3, STAT5	Células T, células NK, células NKT	Células T, B, NK y macrófagos	Proliferación, citotoxicidad por secreción de IFN- γ , producción de anticuerpos	Linfoproliferación
IL-10		JAK1, TYK2, STAT3	Células Th2, otras células	macrófagos	Decrece la expresión de MCH de clase II y la presentación antigénica	Respuesta inflamatoria exagerada y desarrollo de enfermedades autoinmunes

Nota. Adaptada de O'Shea et. al. (2018) y Russo et al. (2014).

2.2. *Lessonia trabeculata*

2.2.1. Taxonomía

L. trabeculata (Phaeophyta) es un alga parda perteneciente al orden Laminariales. En el Perú, recibe algunos nombres comunes tales como “aracanto palo”, “palo blanco” y en Chile recibe el nombre de “huero palo” (Mogollón, 2016). En la Tabla 2 se presentan los datos taxonómicos.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *L. trabeculata* Villouta & Santelices (1986) (Guiry & Guiry, 2016).

Dominio	Eukaryota
Reino	Chromista
División:	Phaeophyta
Clase	Phaeophyceae
Subclase	Fucophycidae
Orden	Laminariales
Familia	Lessoniaceae
Género	<i>Lessonia</i>
Especie	<i>Lessonia trabeculata</i> Villouta & Santelices (1986)

2.2.2. Morfología externa

L. trabeculata muestra una amplia variabilidad morfológica. Las especies adultas pueden medir más de 2 m de longitud y su estructura morfológica consta de un disco de fijación del cual surgen un número variable de estípites (raramente hasta 50), cada una de las cuales se ramifican dicotómicamente conformando frondas que se continúan dividiendo de la misma forma en las porciones más apicales. Poseen al menos dos láminas que son planas, anchas, lisas y de forma lanceolada con márgenes lisos y a veces denticulados (Santelices, 1989) (Figura 2). Las plantas juveniles (de menos de 50 cm) generalmente tienen los hapterios no fusionados, los estipes cortos y aplanados y muchas frondas anchas y con márgenes claramente dentados. A medida que la planta envejece se produce una

reducción en el número de hapterios de los discos y en el número de estipes y ramas (Santelices, 1989).

Esta especie presenta alternancia de fases heteromórficas incluyendo el esporofito (2N, diploide) que corresponde a la planta y el gametofito (N, haploide) que está reducido a filamentos microscópicos (Vasquez, 2009).

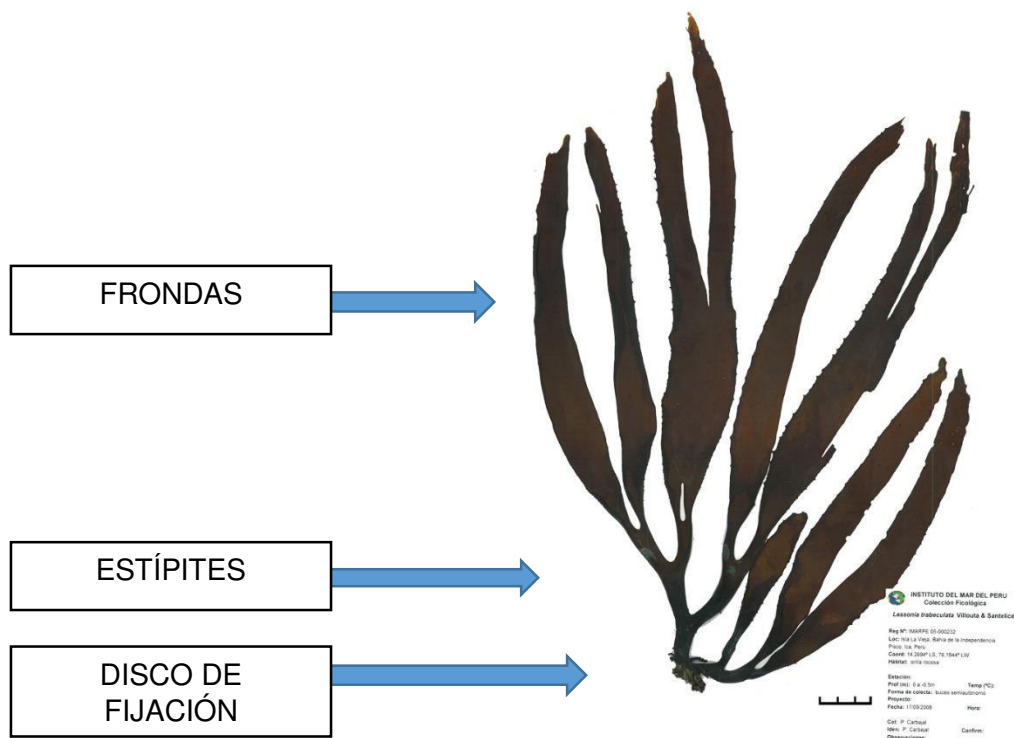


Figura 2. Morfología del esporofito de *L. trabeculata* Villouta & Santelices. Se señalan las principales estructuras del esporofito: frondas, algunos estípites y parte del disco de fijación. Por Carbajal, P. (2008).

2.2.3. Hábitat y distribución

Esta alga habita en ambientes submareales rocosos expuestos y semiexpuestos formando bosques discretos densos de extensiones variables en profundidades entre los 4 y 25 m junto con otras especies de algas.

L. trabeculata es endémica de las costas del Pacífico Este del Hemisferio Sur, extendiéndose desde la caleta La Grama (9°46' LS) en Ancash, Perú (Benavente y Aguirre, 1994) hasta Puerto Montt, Chile (40°LS) siendo reconocida además en Chiloé (Westermeier 1981), Magallanes y la costa Atlántica (Westermeier, datos no publicados).

En el Perú esta macroalga ha sido reportada con mayor frecuencia en las regiones de Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna (Vásquez, 2009) (Figura 3).

MACROALGAS COMERCIALES DEL LITORAL DEL PERÚ

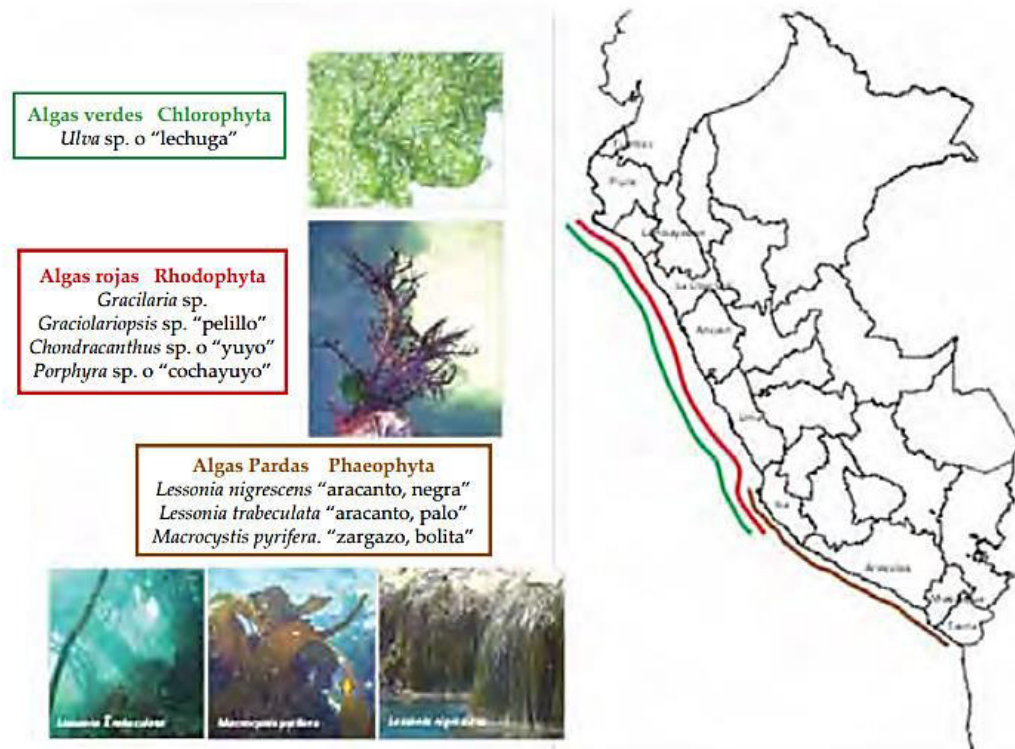


Figura 3. Principales especies de macroalgas de importancia comercial en el Perú. La línea verde indica la distribución de algas verdes (Chlorophyta); la línea roja, la distribución de algas rojas (Rodophyta) y la línea marrón, la distribución de algas pardas (Phaeophyta). Por Zavala, J. Instituto del Mar Peruano, IMARPE (2012).

2.2.4. Rol e importancia

L. trabeculata es considerada una especie importante de las comunidades bentónicas en donde cumple un rol ingeniero y estructurador (Jones et al., 1997). Los huirales permiten la coexistencia de una gran cantidad de invertebrados, peces y otras algas, estableciendo un hábitat para todos ellos donde se pueden encontrar áreas de desove, sustrato de asentamiento de larvas de numerosas especies, sectores de crianza de juveniles y zonas de refugio contra la predación, corrientes de fondo y el embate de las olas (Subsecretaria de Pesca de Chile, 2010).

Desde el punto de vista económico, la creciente importancia de este recurso ha llevado a niveles de explotación creciente (IMARPE, 2012). Las algas tienen una importancia social relevante, pues la recolección se realiza por pescadores artesanales y sus familias, quienes dependen total o parcialmente de estos recursos (Westermeyer et al., 1993) (Tabla 3)

En el Perú, durante la última década, esta alga fue objeto de una incipiente explotación directa, teniendo como método de extracción el buceo y la posterior recolección por orilla (IMARPE, 2008).

Tabla 3. Servicios y funciones relacionadas al recurso “huairo”

SERVICIOS	FUNCIONES
Extractivo	
➤ Pesca	➤ Estructurador de hábitat como praderas (refugio para asentamiento y reclutamiento de mariscos de explotación comercial).
➤ Industria química producción de alginatos	➤ Soporte global de vida.
➤ Alimento natural en cultivos de abalones	➤ Rol importante en la regulación de la dinámica física, costera y en el efecto erosivo de las olas en la costa.
No extractivo	
➤ Investigación	➤ Refugio contra la predación. corrientes de fondo y oleaje.
➤ Educación	➤ Áreas de desove.
	➤ Áreas de asentamiento larval.
	➤ Áreas de crianza de juveniles.

Nota. Recuperado de Vera (2014).

2.3. Metabolitos de origen natural de las algas pardas

Durante las últimas décadas hasta la actualidad, las algas marinas están siendo reconocidas como fuente potencial de nuevos compuestos bioactivos (Moo-Puc et al., 2009; Quitral et al., 2012). Así mismo, en estos últimos años, el descubrimiento de metabolitos con actividades biológicas de macroalgas ha aumentado significativamente. Sin embargo, a pesar del intenso esfuerzo de investigación realizado por instituciones académicas y empresariales, se han identificado o desarrollado pocos productos con potencial (Smit, 2004).

En el metabolismo de las algas pardas se producen reacciones bioquímicas para sintetizar moléculas complementarias a sus funciones vitales, obteniéndose

como productos intermediarios metabolitos secundarios altamente bioactivos. Los metabolitos secundarios son subproductos de rutas metabólicas normales que se sintetizan dependiendo de condiciones externas tales como ataques de patógenos, predadores, cambios térmicos o lumínicos, deficiencias nutricionales o presencia de otros organismos (Payyavula et al., 2012).

Un beneficio muy importante lo resaltan las poblaciones de Japón y Corea cuyo consumo diario promedio de 14.2 g (Fukuda et al., 2007) y 6.6 g (Kim et al., 2000) de algas marinas se asoció con la baja mortalidad por cáncer de pulmón y páncreas en hombres y por cáncer de pulmón y enfermedad cerebrovascular en mujeres (Iso & Kubota, 2007).

Las algas pardas como *Lessonia nigrescens* de distribución intermareal y *L. trabeculata* de distribución submareal se utilizan mayormente como materia prima para la extracción de alginatos (IMARPE, 2015) que, en general, se encuentran en gran cantidad (aproximadamente 40 % en peso seco) en la matriz extracelular de las algas pardas. El alginato cumple, principalmente, una función estructural pues brinda resistencia mecánica y flexibilidad a la vez. Así mismo, presenta una buena capacidad de gelificación que es aprovechada en diversas industrias, tales como la textil (McHugh et al., 2015), la alimentaria (Brownlee et al., 2009) y la farmacéutica (Andersen et al., 2012).

Otras macromoléculas muy interesantes son los polisacáridos sulfatados, como los galactanos (algas rojas), los ulvanos (algas verdes) y los fucoidanos (algas pardas) que se pueden obtener de diversos organismos marinos. Se ha identificado una amplia gama de potenciales proactivos para su uso en aplicaciones médicas, farmacéuticas y biotecnológicas (Sithranga & Kathiresan, 2010). Los polisacáridos sulfatados presentes en diferentes especies de algas pardas han sido reportados en diferentes estudios por exhibir actividades biológicas muy interesantes como vasodilatación (Park et al., 2008); anticoagulante (Ari-vulsevan et al., 2011); antiviral (Sinha et al., 2010); antitumoral (Khanavi et al., 2010); inmunomoduladora (Hwang et al., 2010); anti-inflamatoria (Yoon et al., 2009); antivascular (Dias et al., 2008); antioxidante (Kim et al., 2010); antiherpética (Lee et al., 2010) y hepatoprotectiva (Josephine et al., 2008).

Generalmente, las actividades biológicas de estas moléculas presentes en las algas marinas, están relacionadas al peso molecular, tipo de azúcar, contenido de sulfato, el tipo de enlace o puentes y su geometría molecular (Vischuk et al., 2011). Se ha reportado que el patrón de sulfatación distribuido en los polisacáridos puede regular su especificidad funcional (bioactividad) (Karmakar et al., 2009).

2.3.1. Fucoïdan

El término fucoïdan se refiere a un grupo de polisacáridos sulfatados que contienen porcentajes sustanciales de L-fucosa y grupos éster sulfato. Estas moléculas son componentes de varios géneros de algas pardas (*Fucus*, *Laminaria*, *Sargassum*, *Lessonia*, entre otras) y algunos invertebrados (como los pepinos y erizos de mar). En un inicio, cuando este polisacárido fue aislado por primera vez de algas pardas marinas por Kylin en 1913, fue denominado "fucoïdin". Sin embargo, actualmente de acuerdo a las reglas de la IUPAC, se ha denominado como "fucoïdan" (Berteau & Mulloy, 2003), pero algunas veces es llamado también fucan, fucosan o fucan sulfatado.

Esta macromolécula se sintetiza en los dictiosomas en el aparato de Golgi, teniendo como precursor a la fucosa. El fucoïdan se encuentra involucrado en la biosíntesis de la pared celular en el talo de las algas pardas, organizando su arquitectura dinámica, formada a su vez por una red de polisacáridos sulfatados compuesta por alginatos y polifenoles. Además, interviene en el intercambio de sales y agua, ya que los ambientes costeros tienden a variar en cortos periodos de tiempo, por lo tanto, los organismos de estos hábitats ajustan su potencial osmótico (Deniaud et al., 2017; Skriptsova, 2015).

Este grupo de polisacáridos sulfatados es un punto de interés de muchos investigadores debido a sus numerosas propiedades bioactivas como antibacterial, anticoagulante, antitumoral, inmunomoduladora, antioxidante, antiinflamatoria, antitrombótica, hepatoprotectora, antialérgica, entre otras más (Cumashi et al., 2007; Tanaka et al., 2011; Li et al., 2008).

2.3.1.1. Estructura y naturaleza química

Desde 1913, después del descubrimiento del fucoidan por Kylin, las estructuras de los fucoidanos de distintas algas pardas están siendo deducidas y aún sometidas a procesos de investigación con resultados prometedores y también paradójicos con respecto a su bioactividad.

En general, el fucoidan es una molécula compleja que consiste básicamente en una cadena lineal principal de poli- $\alpha(1\rightarrow3)$ -L-fucopiranososa o de L-fucopiranosilos alternados con uniones $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow4)$ que en cualquier caso pueden estar sustituidos con sulfato o acetato, además de tener ramas laterales que contienen fucopiranosas u otras unidades de glicosilo, como el ácido glucurónico. Varias de las estructuras de fucoidan reportadas en la literatura también están constituidas por otros monosacáridos, como glucosa, galactosa, xilosa y/o manosa (Ale et al., 2011).

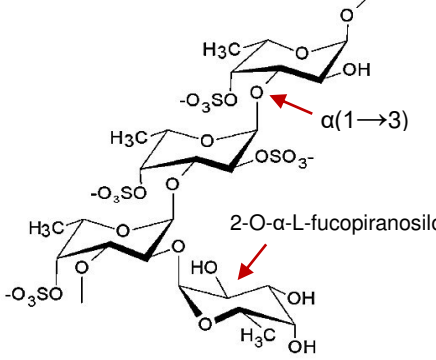
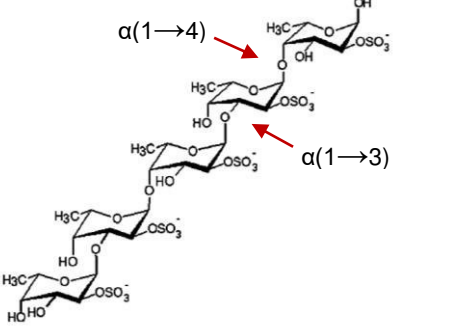
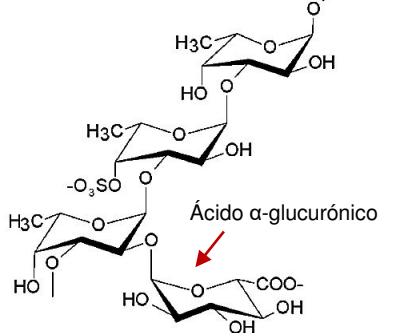
Las variaciones en las propiedades estructurales reportadas de los fucoidanos de diferentes especies de algas pardas confirman su biodiversidad natural como lo demuestran las estructuras encontradas en diferentes órdenes Fucales, Laminariales y Chordariales (Tabla 4).

En el orden Fucales, por ejemplo, *Fucus evanescens* y *Fucus serratus* presentan la estructura típica: poseen una gran proporción de residuos de L-fucopiranososa $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow4)$, que pueden estar sustituidos con sulfato (SO_3^-) en C-2 y C-4 (Cumashi et al., 2007) (Tabla 4).

Mientras que en el orden Laminariales, se muestra que el fucoidan aislado de *Laminaria saccharina* se constituye principalmente de unidades de L-fucopiranososa unidas mediante enlace $\alpha(1\rightarrow3)$, pero con sulfato tanto en C-2 como en C-4, o solo en C-4 y también puede presentar sustituyente 2-O- α -L-fucopiranosilo en C-2 (Tabla 4). En el fucoidan de *Chorda filum*, las unidades estructurales son similares y consiste en una columna vertebral de poli- $\alpha(1\rightarrow3)$ -L-fucopiranososa sulfatada principalmente en C-4, a veces en la posición C-2 y con algunos de los residuos de fucosa unidos mediante $\alpha(1\rightarrow3)$ siendo 2-O-acetilados (Usov et al., 1998; Chizhov et al., 1999). Qu et al, 2014, realizaron un análisis en la composición química del fucoidan de distintas algas pardas, incluyendo al de *L. trabeculata* (Laminariales). Se observó que presentaba un 66.38% de azúcar total,

21.53% de fucosa y 16.39% de proteína y un peso molecular de 105 KDa (KiloDaltons).

Tabla 4. Estructuras de fucoidanos reportadas en diferentes algas pardas de los órdenes Laminariales, Fucales y Chordariales

Especies de algas	Orden	Estructura molecular del fucoidan
<i>Laminaria saccharina</i>	Laminariales	
<i>Fucus serratus</i>	Fucales	
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	Chordariales	

Nota. Recuperada de Marcel (2013).

Así, los fucoidanos extraídos de especies de algas pardas del mismo orden tienen una composición diferente; a su vez, desde un punto de vista estructural,

no pueden categorizarse o predecirse de acuerdo con el orden algal. Por lo tanto, los datos estructurales publicados para los fucoidanos de algas confirman que no existe una estructura básica consistente de "fucoidan" (Ale & Meyer, 2013).

2.3.1.2. Actividad biológica

La actividad biológica de los fucoidanos depende de la especie de alga, las características de composición y estructura, el contenido (densidad de carga), la distribución y la unión de las sustituciones de sulfato y la pureza. Por lo tanto, el proceso de extracción empleado para los fucoidanos es crucial para mantener la integridad estructural y las características estructurales relevantes requeridas para la actividad biológica específica (Ale & Meyer, 2013).

Estos polisacáridos sulfatados son conocidos por exhibir un amplio rango de actividades fisiológicas y biológicas (Cumashi et al., 2007; Li et al., 2008) como, por ejemplo: actividad anti-inflamatoria (Choi et al., 2010) e inmunomoduladora (Hwang et al., 2010), antiviral (Hemmingson et al., 2006), anticoagulante, antitumoral y antimetastásica (Alekseyenko et al., 2007; Rioux et al., 2007), entre otras.

2.3.2. Actividad de inmunomoduladores sobre la expresión transcripcional de citoquinas

Los agentes inmunomoduladores son productos de origen natural o sintético empleados para estimular o suprimir la respuesta inmunológica en un hospedero. Estos son usados en tratamientos complementarios para combatir algunas inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunitarias e infecciosas, alergias y el cáncer (Dhama et al., 2015). Muchos estudios *in vitro* revelan que el fucoidan de las pardas es capaz de incrementar o reducir la expresión del ARNm de algunas citoquinas.

Wang et al. (1994), demostraron el efecto modulador del fucoidan de *Laminaria japonica* (Laminariales) sobre los macrófagos y linfocitos T de ratones inmunosuprimidos. Así mismo, se reportó que es capaz de inducir la producción de interleuquina 1 (IL-1) e interferón- γ (IFN- γ) *in vitro* y mejorar las funciones de los linfocitos T, células B, macrófagos y células asesinas naturales (células NK) (Yang et al., 1995).

Se ha observado que el tratamiento con 100 µg/ml del extracto del alga parda *Ecklonia cava*, redujo significativamente la expresión de ARNm de citoquinas tipo Th1 como TNF-α e IFN-γ, mientras que incrementó los niveles de expresión del ARNm de citoquinas tipo Th2 como IL-4 e IL-10 respecto a células no tratadas (Ahn et al., 2007). Lee et al. (2012), demostraron que el fucoidan extraído de esta misma especie, redujo la expresión de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-6 e IL-1β en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS.

La IL-8 es un marcador de inflamación importante en procesos y enfermedades de naturaleza inflamatoria, como ocurre en algunas ocasiones a nivel del intestino. En el 2009, Mizuno et al., observaron que la adición de 500 µg/ml de fucoidan de *L. japonica* a un co-cultivo de células Caco-2 y macrófagos RAW264.7 (estimulados con LPS), suprimió la expresión de ARNm de IL-8 en Caco-2.

Fang et al. (2015), reportaron que el tratamiento de macrófagos murinos con 200 µg/ml de un polisacárido extraído de *L. japonica* incrementó los niveles de expresión de citoquinas IL-6, IL-1β, IL-10 y TNF-α de manera dosis dependiente. Además, comprobaron que la expresión de ARNm de las citoquinas mencionadas se incrementó en 116%, 297%, 27% y 407% respectivamente, en comparación con aquellas sin tratamiento.

Borazjani et al. (2017), reportaron que 50 µg/ml de la fracción número 2 (F2), de polisacáridos sulfatados de *Sargassum angustifolium*, incrementó la expresión de ARNm de IL-1β, IL-6 y TNF-α. Además, observaron que el incremento de la expresión del ARNm de la IL-10 (de manera dosis dependiente) suprimió la excesiva y descontrolada liberación de óxido nítrico (NO) a través de la vía de citoquinas anti-inflamatorias. Contrariamente Li et al. (2017), determinaron que el tratamiento de macrófagos derivados de células THP-1 con 100 ng/ml de fucoidan de *F. vesiculosus* redujo notoriamente la secreción y transcripción de IL-1β, IL-6 y TNF-α.

Ale et al. (2011) propusieron que la interacción macrófago-fucoidan a través de receptores de membrana como receptor tipo Toll-4 (TLR-4), marcador de diferenciación CD14, el receptor de complemento 3 (CR-3) y receptores

“scavenger” (SR) (Takahashi, 1983), produce la activación de rutas de señalización intracelular que involucran a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) induciendo la transcripción y expresión de citoquinas (Teruya et al., 2009; Aisa et al., 2005). La activación de estos macrófagos induce la producción de IL-12 estimulando el desarrollo de las células T. Estas células a su vez producen IL-2, la cual estimula la proliferación de células NK y la producción de IFN- γ (Figura 4).

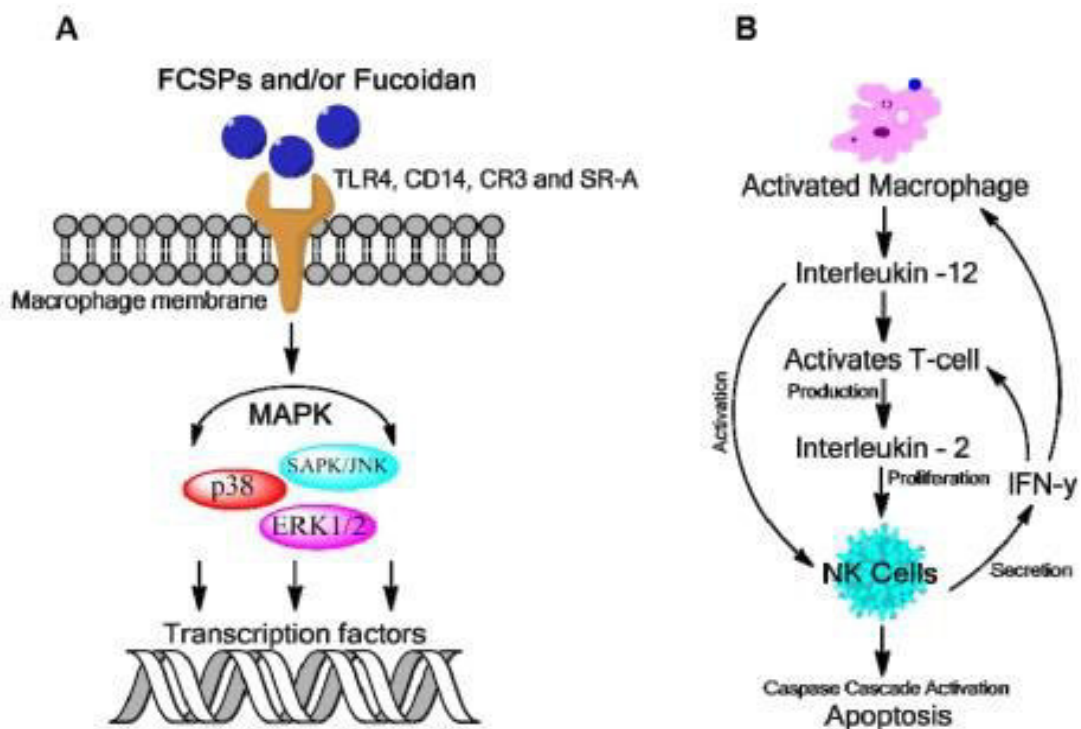


Figura 4. Mecanismo propuesto responsable de la bioactividad del fucoidano. A. activación de macrófagos por una familia de polisacáridos sulfatados conteniendo fucosa (FCSPs) mediado a través de un receptor específico de membrana. B. Activación de macrófagos conlleva a la producción de citoquinas como IL-12, IL-2 e IFN- γ . Por Ale et al. (2011).

En nuestro país, no se conocen reportes sobre el uso del fucoidano de *L. trabeculata* como agente inmunomodulador de la expresión transcripcional de citoquinas y los pocos estudios al respecto, solo se conocen en el ámbito científico.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

El fucoidan del alga parda *Lessonia trabeculata* modula la expresión transcripcional de las citoquinas IL-8, IL-12 y TGF- β de respuesta inmune innata e IL-2 e IL-10 de respuesta inmune adaptativa en células mononucleares de sangre periférica humana.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión transcripcional de citoquinas moduladoras de la respuesta inmune innata y adaptativa en células mononucleares humanas (PBMC) tratadas con fucoidan del alga parda *Lessonia trabeculata*.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la citotoxicidad y determinar la concentración del fucoidan de *L. trabeculata* que produzca la disminución o el incremento de la actividad citotóxica sobre PBMC.
2. Determinar la expresión transcripcional de citoquinas IL-8, IL-12 y TGF- β moduladoras de respuesta inmune innata.
3. Determinar la expresión transcripcional de citoquinas IL-2 e IL-10 moduladoras de la respuesta inmune adaptativa.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

La colecta de los ejemplares de la especie *L. trabeculata* se realizó en la Bahía de San Nicolás ubicada a 15°15'21.0" Latitud Sur y 75°14'31.0" Longitud Oeste, distrito de Marcona, provincia de Nazca, Ica, Perú. Los especímenes se identificaron taxonómicamente en el Herbario de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) "A. Weberbauer" (Anexo 5).

El procesamiento de los ejemplares hasta la obtención del extracto rico en fucoidan (80.84%) se llevó a cabo en la empresa PSW S. A. La caracterización fitoquímica del extracto conteniendo fucoidan y trazas de otros metabolitos secundarios (polifenoles, terpenos, cardenólidos y taninos) se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UNALM.

4.2. Elaboración de la solución de fucoidan de *Lessonia trabeculata* y *Fucus vesiculosus*

El fucoidan del alga parda *L. trabeculata* (FLt) se resuspendió en medio RPMI 1640 sin suero bovino fetal (SBF) y se preparó una concentración de 15 mg/ml para luego ser almacenado a 4°C hasta su uso (Figura 5).

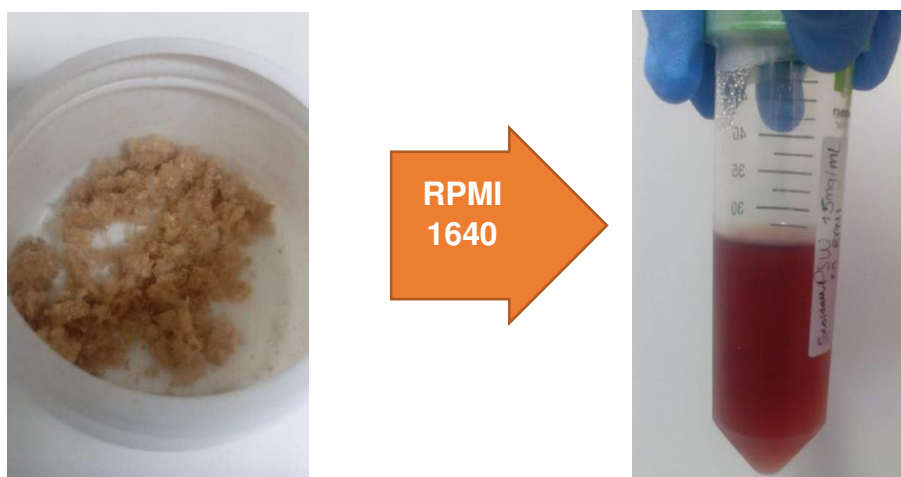


Figura 5. Preparación del fucoidan de *L. trabeculata*. El liofilizado del extracto de fucoidan se disolvió en medio RPMI 1640 sin SBF hasta obtener una concentración de 15 mg/ml. La solución de fucoidan se almacenó a 4°C hasta su uso.

La preparación del fucoidan comercial de *F. vesiculosus* (FFv) se realizó siguiendo el mismo procedimiento anterior con el medio RPMI 1640 sin suplementar (Figura 6) a una concentración de 20 mg/ml. Por otro lado, para la preparación del lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) se empleó el medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF, obteniendo una concentración de 10 mg/ml.



Figura 6. Preparación del fucoidan de *F. vesiculosus*. El liofilizado se disolvió en medio RPMI 1640 sin SBF para obtener una concentración de 20 mg/ml. La solución se almacenó a 4°C hasta su uso.

El fucoidan de *Fucus vesiculosus* (Fucoïdan Sigma, F8190) (FFv) con grado de pureza ($\geq 95\%$) y el lipopolisacárido de *Escherichia coli* (O55:B5) (LPS) se utilizaron como controles de la modulación de la expresión génica a nivel transcripcional y como control negativo PBMC en medio RPMI-1640.

4.3. Obtención de PBMC para cultivo celular

El aislamiento de PBMC se realizó a partir de una sangría parcial de una persona saludable previo consentimiento informado y siguiendo las pautas del manual de Procedimientos de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (INS) del Ministerio de Salud (MINSa) (Zurita, 2013). La cantidad de sangre obtenida se diluyó con la misma cantidad de una solución PBS-1X (v/v). La mezcla obtenida se distribuyó en tubos de centrifuga con 5 ml de Ficoll® (*MP Biomedicals LSM™ Lymphocyte Separation Medium*, 1.077 g/ml de densidad) manteniendo la proporción 5:4 respectivamente y teniendo cuidado de no mezclar ambas fases, luego se realizó una centrifugación a 1550-1560 rpm durante 25 min. Terminada la centrifugación, se retiró el anillo conteniendo a las células mononucleares y se

transfirió a un tubo conteniendo la solución PBS-1X. Luego, se realizaron dos lavados: el primero con la solución de PBS-1X a 1200 rpm durante 10 min y el segundo con el medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF (Anexo 1) a 1000 rpm durante 5 min, finalmente el *pellet* se resuspendió en RPMI 1640 suplementado (Figura 7).

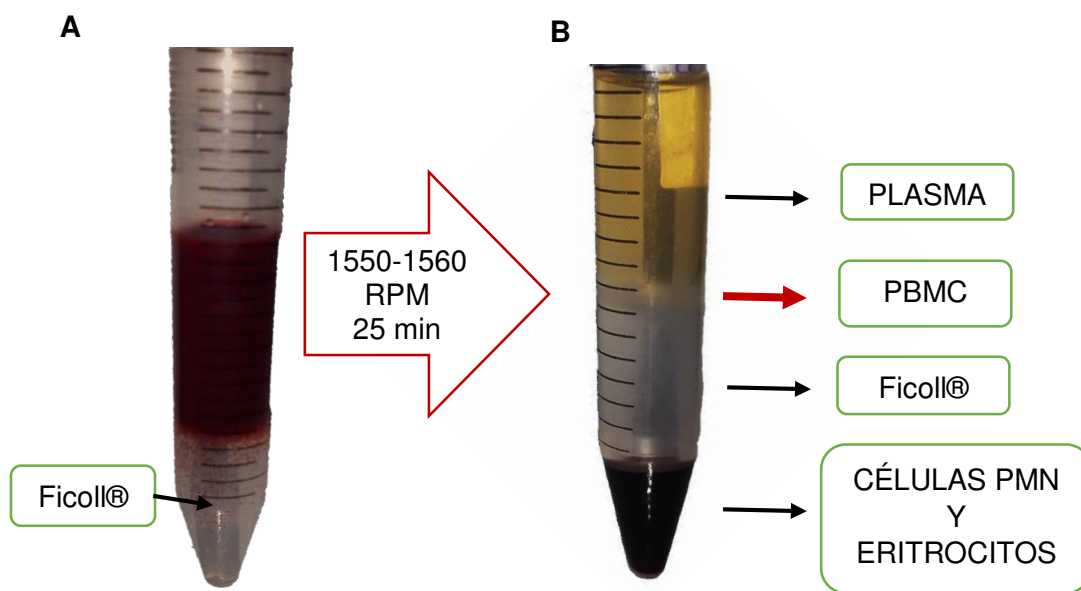


Figura 7. Proceso de Obtención de PBMC. El proceso de separación de las células mononucleares se realizó mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad empleando Ficoll®. A. Tubo conteniendo la sangre diluida (1:2) en PBS y Ficoll® (proporción 5:4 respectivamente). B. Obtención del “anillo” de PBMC posterior a la centrifugación. Las células se colectaron, se diluyeron en PBS-1X para sus posteriores lavados y se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado.

Se realizó un recuento celular empleando una cámara de Neubauer (Figura 8), posteriormente las PBMC se sembraron en medio RPMI 1640 suplementado en una placa de 24 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/pocillo por triplicado de tratamiento. Finalmente se incubó a 37°C en 5% de CO_2 (condiciones estándar de cultivo) durante toda la noche o “*overnight*” para facilitar la adherencia de los monocitos y evitar el estrés celular (Figura 9).

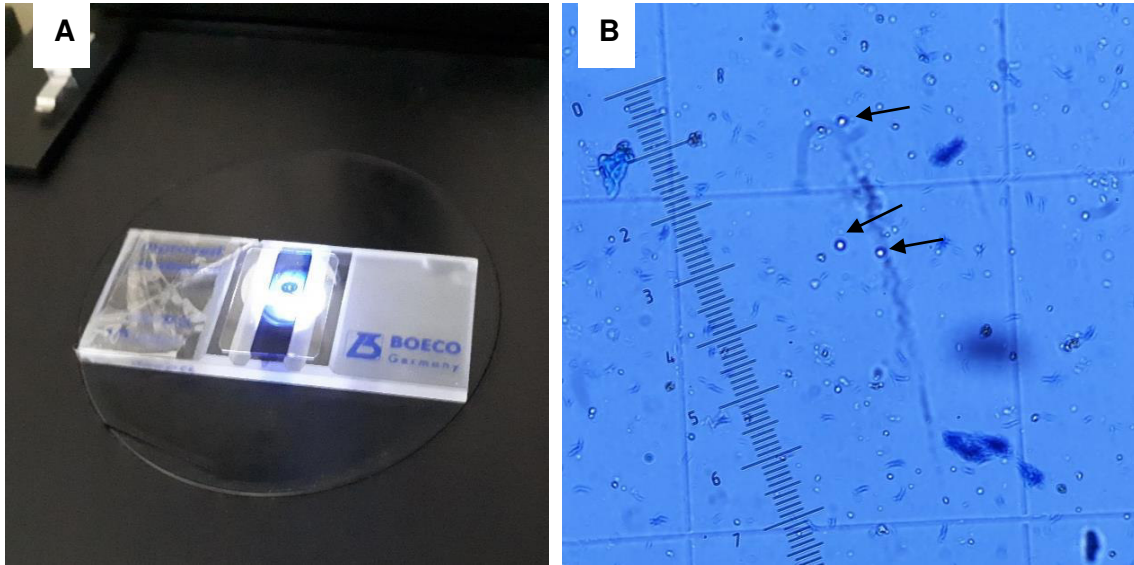


Figura 8. Recuento de células mononucleares en cámara de Neubauer. **A.** Cámara de Neubauer con una alícuota de suspensión de PBMC en azul de Tripán 0.4%. **B.** Se observan algunas células mononucleares en diferentes cuadrantes a 10x. La lectura se realizó en un microscopio de objetivo invertido.



Figura 9. Cultivo de PBMC humanas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF y 10% de antibióticos a las 24 horas. Las flechas rojas y azules señalan a monocitos en su forma clásica estirada y linfocitos cultivados *in vitro* respectivamente (x400).

4.4. Evaluación de la citotoxicidad mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Es importante determinar la viabilidad celular luego de la exposición a los tratamientos con el fucoidan el cual puede tener ningún o alto nivel de citotoxicidad, es decir, ocasionar una perturbación metabólica o daños a la integridad de las células en estudio y esto depende de la concentración y tiempo de exposición. Para evaluar la viabilidad de las PBMC, se realizó el ensayo de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Mosmann, 1983).

En primer lugar, se cultivaron las PBMC con FLt y FFv a concentraciones 10 µg/ml y 100 µg/ml y sin fucoidan. La placa se incubó a condiciones estándar de cultivo durante 48 h. Luego de la incubación, se agregó 20 µl del MTT (5 mg/ml disuelto en medio RPMI 1640 sin suplementar (Anexo 2) a cada pocillo de la placa y se incubó durante 4 h a condiciones estándar de cultivo. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se añadió 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) incubándose durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (Figura 10).

La intensidad del color hacia el violeta es directamente proporcional a la viabilidad celular. Finalmente, la absorbancia se leyó en un lector de micro placas *SINNOWA* a una longitud de onda de detección de 492nm y 630 nm de referencia. El porcentaje de viabilidad celular se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%Viabilidad = \frac{D.O \text{ células tratadas}}{D.O \text{ células control}} \times 100\%$$

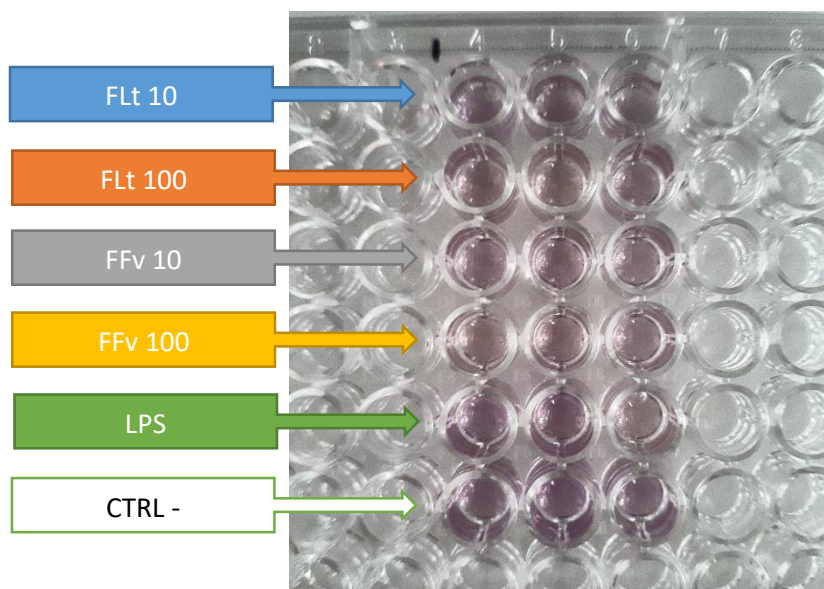


Figura 10. Ensayo de la reducción metabólica del MTT. Posterior a la obtención de PBMC y la aplicación de los tratamientos con fucoidan FLt, FFv, LPS y medio RPMI (CTRL-, control negativo) durante 48 horas, se adicionó el reactivo de MTT. Luego de 4 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂ con el reactivo, se adicionó el DMSO incubándose finalmente durante 30 min. La intensidad del color hacia el violeta es directamente proporcional con la viabilidad celular. Es decir, a mayor reducción del MTT por las PBMC, mayor intensidad del color violeta. MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. PBMC: células mononucleares de sangre periférica humana. FLt: fucoidan de *L. trabeculata*, FFv: fucoidan de *F. vesiculosus*. LPS: Lipopolisacárido, DMSO: dimetil sulfóxido, CTRL-: control negativo (cultivo sin fucoidan).

4.5. Evaluación de la expresión de ARN transcripcional de citoquinas IL-2, IL-8, IL-10, IL-12 y TGF- β

4.5.1. Tratamiento con diferentes concentraciones del extracto de fucoidan

Se colocó en una microplaca de 24 pocillos, un volumen de 500 μ l de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF con una concentración de 2×10^6 células/ml y se incubó en “*overnight*” a 37°C en 5% CO₂ con la finalidad de lograr una total adherencia. Posteriormente, se añadió 500 μ l de FLt por triplicado. Adicionalmente se usaron como controles positivos cultivos tratados con FFv a las concentraciones de 10 y 100 mg/ml y LPS a 10 μ g/mL. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Finalmente, la placa se incubó durante 48 horas a condiciones estándar de cultivo y luego, se procedió a la extracción del ARN total.

4.5.2. Extracción del ARN total

Para obtener el *pellet* celular de las PBMC tratadas, a las cuales se les aplicó los procedimientos de extracción según el *innuPREP RNA mini kit* (AnalytikJena), se procedió a retirar el sobrenadante de cada pocillo del triplicado de tratamiento y se transfirió a un microtubo (correspondiente a cada pocillo del tratamiento) para centrifugarlos a 10000 rpm durante 5 min a 10°C. De esta forma, las PBMC suspendidos en el sobrenadante quedarán en el fondo del microtubo para luego aplicarles los procedimientos de extracción y así obtener el ARN total de las PBMC. A continuación, se agregó 200 µL del buffer de lisis del *kit* a cada pocillo y a su microtubo correspondiente, de esta forma se obtuvo un volumen de 400 µL por pocillo el cual se reunió finalmente en un solo microtubo donde, en pasos iniciales, se separó a través de un filtro el material genómico de interés del resto de componentes celulares (Figura 11) y posteriormente se continuó con las instrucciones del kit de extracción que se detalla en la Figura 12.

La concentración de ARN obtenido se cuantificó mediante el fluorómetro *Qubit 3.0* (*Invitrogen*[™]) (Tabla 5).

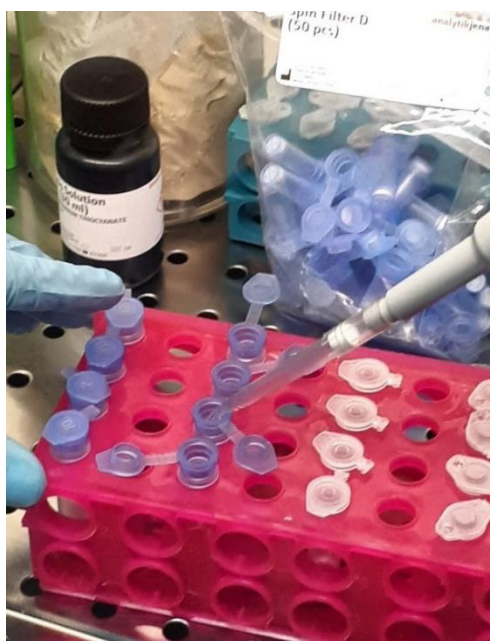


Figura 11. Extracción del ARN total mediante la separación entre componentes celulares y el material genómico empleando el *innuPREP RNA Mini Kit*.

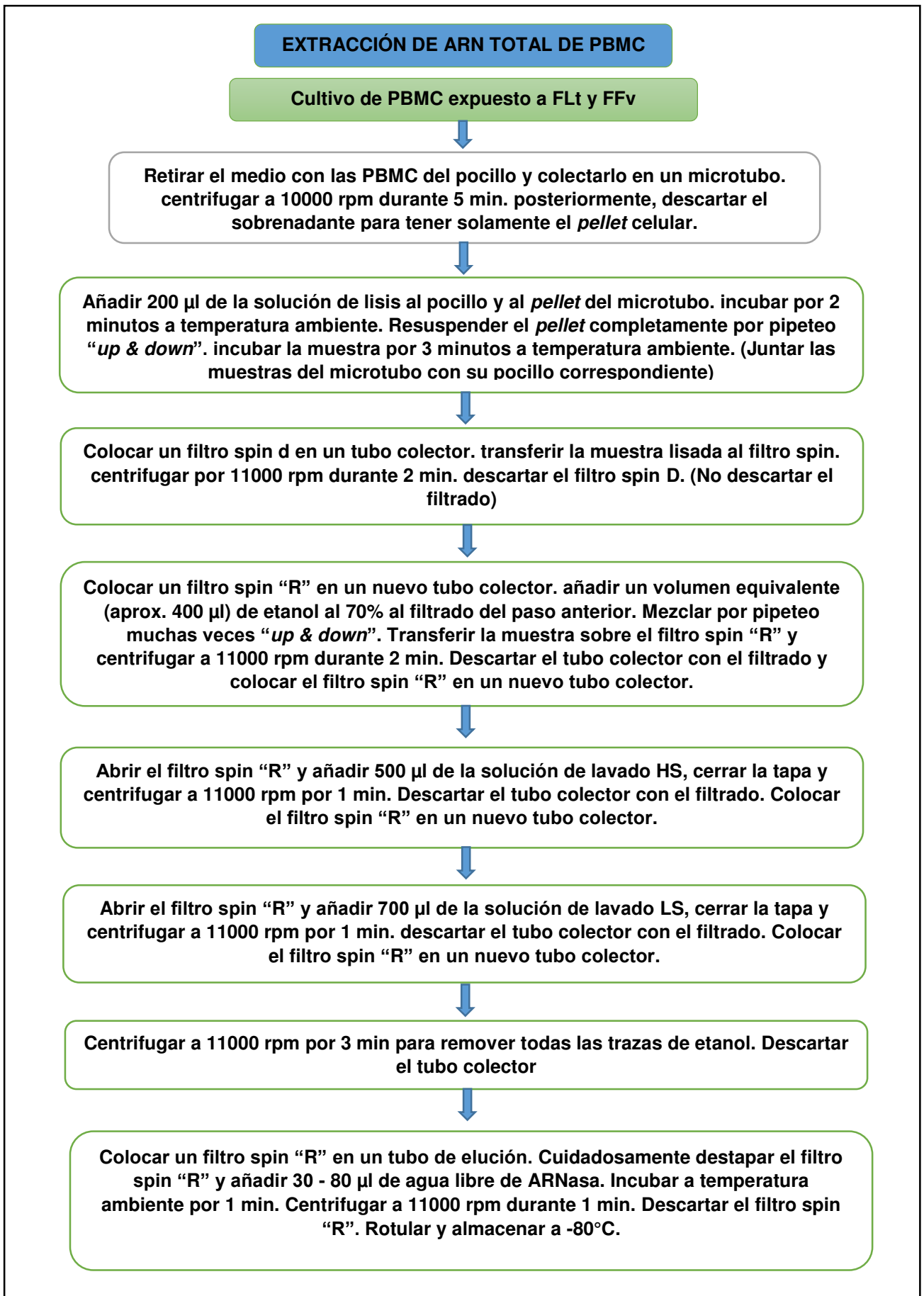


Figura 12. Flujograma de extracción de ARN a partir de cultivos de PBMC. (Adaptado de *InnuPREP RNA Mini Kit*)

Las concentraciones obtenidas de cada triplicado de tratamiento fueron llevadas a una concentración final de 50 ng/ml para proceder con la obtención de ADNc.

Tabla 5. Concentración de ARN Total de PBMC tratadas y no tratadas con fucoidan

TRATAMIENTO ($\mu\text{g/ml}$)	CONCENTRACIÓN (ng/ml)
FLt 10	70.3
FLt 100	87.3
FFv 10	66.6
FFv 100	63.6
LPS 10	75.2
Control negativo	71.9

4.5.3. Evaluación de la integridad del ARN

Después de la extracción y cuantificación del ARN extraído se evaluó su integridad para proceder con seguridad a los diferentes ensayos que requieren el material genómico. Para este propósito, se procedió a colocar en un microtubo 6 μl del ARN extraído, 4 μl de formamida y 2 μl de *buffer* de carga. Posteriormente se incubó la mezcla a 60°C durante 3 min. Luego, se pasó a enfriar rápidamente en hielo y finalmente se procedió a la electroforesis en gel de agarosa al 1.7% en *buffer* 1X TBE (Anexo 3) a 100 V durante 60 min. El ARN extraído se guardó a – 80 °C hasta su uso.

Luego de la electroforesis en gel de agarosa al 1.7% durante 1 h, la imagen revelada en el fotodocumentador (*ENDURO™ GDS*) mostró el óptimo estado del ARN extraído tal como se presenta en la Figura 13.

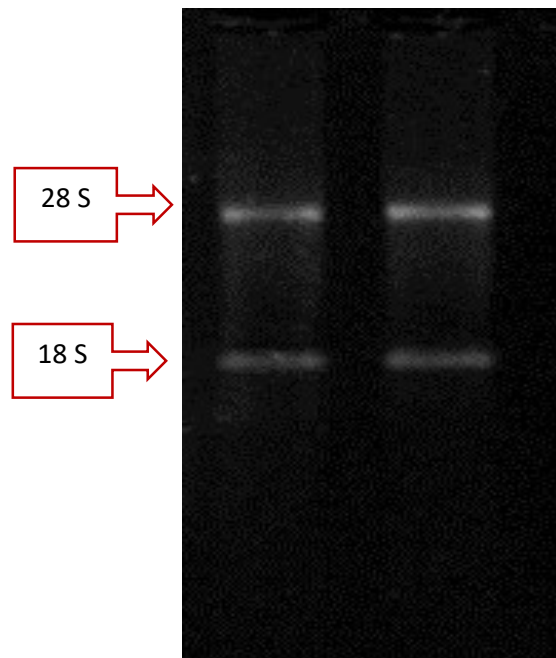


Figura 13. Integridad del ARN extraído. Se observan 2 bandas correspondientes al ARN de una célula eucariótica 28 S y 18 S. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7%, 1X TBE.

4.5.4. Obtención de ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Para este propósito, se usó el *OneScript cDNA Synthesis kit (ABM)* siguiendo sus especificaciones. Se colocó 10 µl de ARN total, 1 µl de Oligo dt, 1 µl de *Random Primers*, 1 µl de dNTP mix y 1.5 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente, se incubó a 65°C durante 1 min, luego se colocó en hielo durante 1 min adicional y pasó a centrifugación a 10000 rpm durante 1 min. Finalmente se añadió 4 µl de 5X *RTBuffer*, 0.5 µl de *RNasa Off Ribonucleasa* y 1 µl de *RTasa* para obtener un volumen final de reacción de 20 µl. Las muestras fueron colocadas en un termociclador *Bioer Technology* (versión 2009-1.6) (Figura 14) y pasaron por periodos de incubación de 25°C durante 10 min., 50°C durante 15 min. y 85°C durante 5 min para terminar la reacción. El ADNc obtenido se congeló a -20°C hasta su uso en la PCR convencional.

4.5.5. Amplificación del ADNc por PCR convencional

La amplificación de las secuencias de ADNc correspondientes a las 5 citoquinas (IL-2, IL8, IL-10, IL-12 y TGF-β) se realizó empleando el *Platinum PCR SuperMix (Invitrogen)*. Se colocó 1 µl de ADNc, 1 µl de *Primer Forward* y 1 µl del

Primer Reverse de la citoquina a analizar en 17 μ l de *Platinum PCR SuperMix* para obtener 20 μ l (Tabla 6). Las muestras fueron colocadas en el termociclador *Bioer Technology* (versión 2009-1.6) siguiendo el proceso indicado en la Tabla 7.

Los *primers* empleados en la presente investigación para la amplificación y posterior detección de la expresión transcripcional de las citoquinas (IL-2, IL-8, IL10, IL-12p35, IL-12p40 y TGF- β) y la β -actina se diseñaron considerando otros estudios científicos y el programa *Primer-BLAST*. Las secuencias de los *primers* se adjuntan en el Anexo 4.

Tabla 6. *Master Mix* para la *PCR* convencional

Reactivos stock	Volumen por reacción
<i>Platinum PCR SuperMix</i>	17 μ l
<i>Primer F</i> (500 nM)	1 μ l
<i>Primer R</i> (500 nM)	1 μ l
Muestra de ADNc (50 ng/ml)	1 μ l
Volumen final	20 μ l

Tabla 7. Protocolo de temperatura y tiempo en la *PCR* convencional

Programa para la amplificación	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	30 seg
Hibridación	57 °C	30 seg
Extensión	72 °C	45 seg
Extensión final	72 °C	7 min

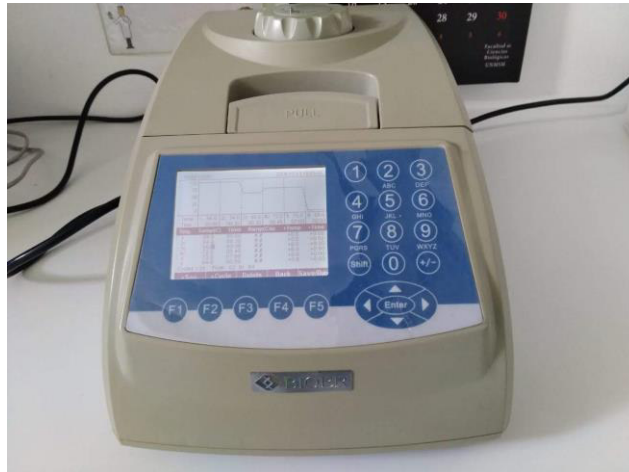


Figura 14. Amplificación del ADNc por la PCR convencional en el termociclador Bioer Technology (versión 2009-1.6). Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

4.5.6. Electroforesis en gel de agarosa

Con la finalidad de analizar el ADN amplificado mediante la PCR convencional, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.7% p/v conteniendo el colorante *SYBR Green* (Invitrogen™). Se empleó la disolución Tris-Borato-EDTA 1X (1X TBE, Anexo 3) como *buffer* para la corrida electroforética y para la migración de los amplificados se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 60 min (Figura 15). Las bandas obtenidas en el gel se detectaron mediante el uso de un fotodocumentador *ENDURO™ GDS*.

4.5.7. Cuantificación densitométrica

Con el propósito de realizar un análisis semicuantitativo, las bandas o fragmentos amplificados se fotografiaron mediante el software del fotodocumentador *ENDURO™ GDS* para proceder con la cuantificación densitométrica empleando el programa *ImageJ 1.49i* (NIH, USA). La proporción de las densidades de ARNm de las citoquinas IL-2, IL-8, IL-10, IL-12 (p35 y p40) y TGF- β versus la densidad de ARNm de β -actina fueron calculadas para cada concentración y sus respectivos controles. De esta forma se normalizó con los valores correspondientes a la cantidad del gen “*housekeeping*” o gen endógeno β -actina.



Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa. Fuente de poder a voltaje constante de 100 V durante 60 min. Laboratorio de Inmunología, FCB, UNMSM.

4.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en las pruebas se realizó mediante el software *GraphPad PRISM®* versión 5.00 (Trial) aplicando el análisis con ANOVA mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett y Tukey para el caso de los resultados de la evaluación de citotoxicidad y la evaluación de la expresión transcripcional del ARNm de las citoquinas respectivamente; $p < 0.05$ y $p < 0.0001$ representan diferencias significativas.

V. RESULTADOS

5.1. Evaluación de la citotoxicidad del fucoïdan mediante la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Los resultados de la citotoxicidad del polisacárido sulfatado sobre el cultivo de PBMC expuestas durante 48 h a FLt y FFv se muestran mediante la prueba de viabilidad celular (VC) en la Figura 16. El análisis con ANOVA determinó que no existen diferencias significativas entre el tratamiento con FLt 10 (94% VC) y las células sin tratamiento o control negativo (100% VC) ($p > 0.05$); mientras que, el tratamiento con la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de FLt presentó una marcada diferencia significativa en relación al control negativo ($p < 0.05$) incrementando la viabilidad celular hasta un 112%. Por otro lado, el tratamiento con FFv 100 $\mu\text{g/ml}$ aumentó significativamente la viabilidad de las PBMC ($p < 0.0001$).

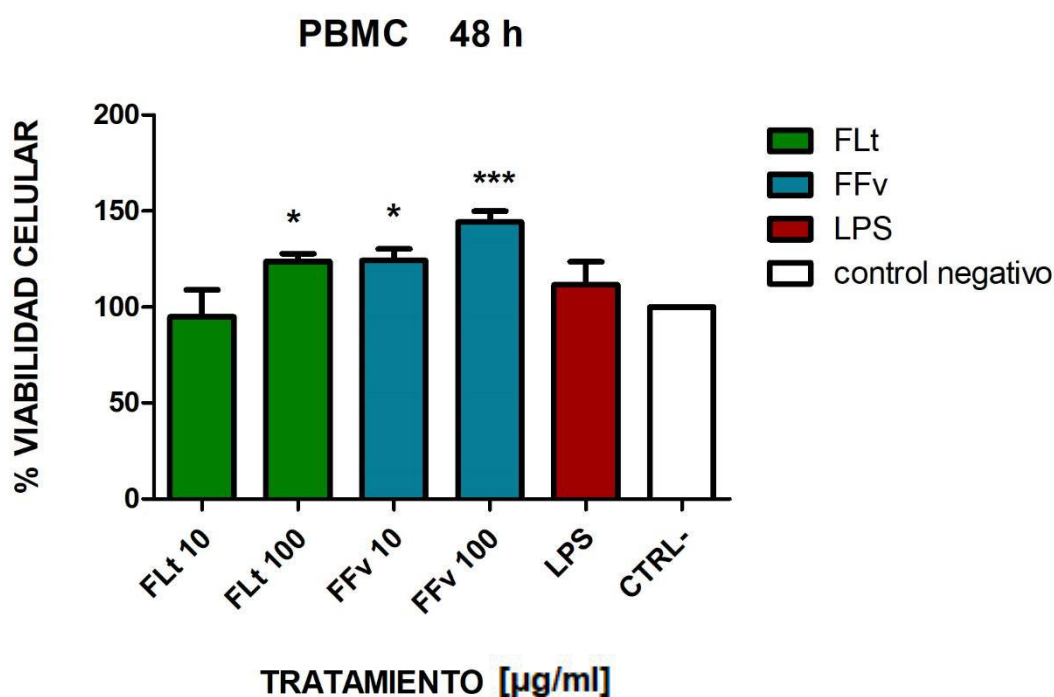


Figura 16. Evaluación de la citotoxicidad de FLt y FFv en cultivo de PBMC. El análisis estadístico con ANOVA a través de la prueba de comparación múltiple de Dunnett (*Dunnett's Multiple Comparison Test*) determinó que no existe diferencia significativa entre el tratamiento con FLt 10 $\mu\text{g/ml}$ y el cultivo sin tratamiento o control negativo ($p > 0.05$). Por otro lado, se observó que existen diferencias significativas de los tratamientos con FLt 100 $\mu\text{g/ml}$, FFv 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ respecto al control negativo ($p < 0.05$) evidenciándose un incremento en la viabilidad celular en 112%, 124% y 144% respectivamente. FLt: fucoïdan de *L. trabeculata*, FFv: fucoïdan de *F. vesiculosus*, LPS: Lipopolisacárido, CTRL-: control negativo. Los resultados representan la media y desviación de los experimentos por triplicado. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

5.2. Evaluación de la expresión de ARN transcripcional de citoquinas

5.2.1. Citoquinas de respuesta inmune innata

En la Figura 17 se muestra la expresión del ARNm de la IL-8 en células mononucleares tratadas con FLt, FFv, LPS y no tratadas. Los tratamientos con FLt y FFv no presentaron diferencias significativas respecto al control negativo ($p > 0.05$) mientras que el tratamiento con LPS elevó significativamente el nivel de la expresión transcripcional del ARNm IL-8 ($p < 0.0001$).

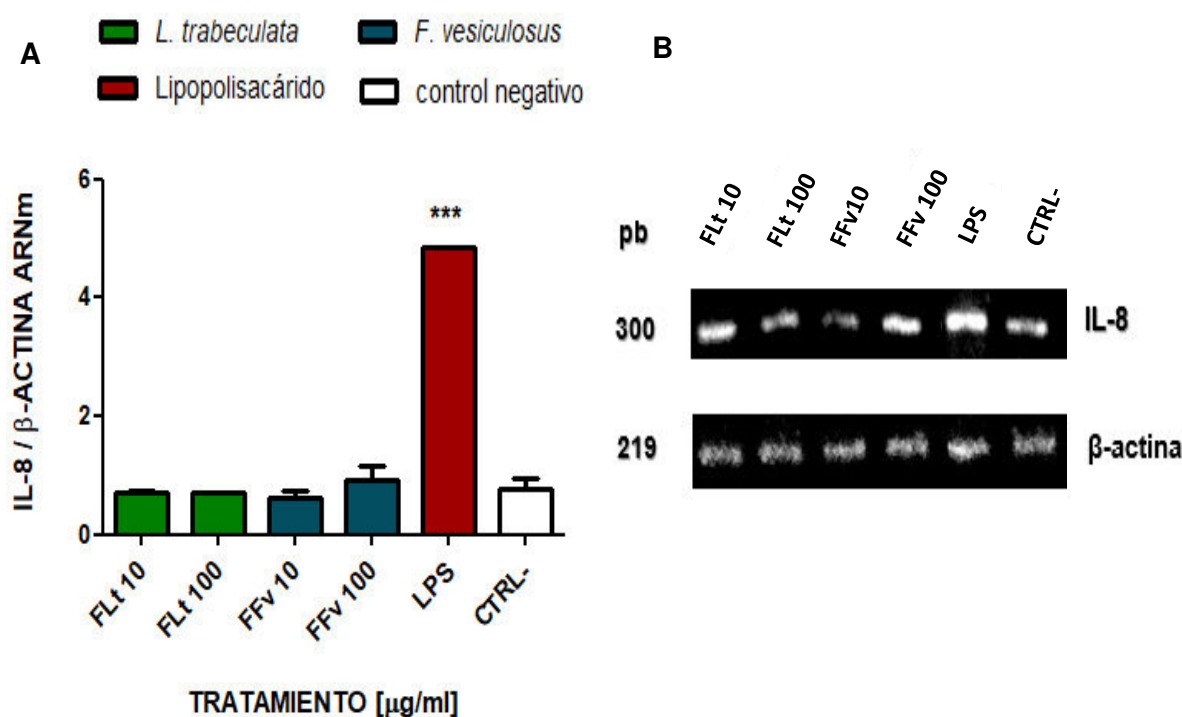


Figura 17. Efecto de FLt y FFv sobre la expresión transcripcional de la IL-8 durante 48 horas. La expresión del ARNm IL-8 se determinó mediante la PCR convencional en PBMC estimuladas con los fucoïdanos FLt, FFv y LPS y en el control negativo durante 48 h. **A.** Expresión del ARNm IL-8 normalizados con los niveles de expresión del ARNm de la β -actina. **B.** Productos de la PCR analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.7 %. Cada banda se cuantificó por densitometría empleando el programa *ImageJ* (NIH, USA). FLt: fucoïdan de *L. trabeculata*, FFv: fucoïdan de *F. vesiculosus*, LPS: Lipopolisacárido, CTRL-: control negativo o cultivo de PBMC sin tratamiento. Los resultados representan la media y desviación de los experimentos por triplicado. *** $p < 0.0001$.

En relación a la expresión transcripcional del ARNm de las proteínas que componen el heterodímero de la IL-12, no se produjo la expresión del ARNm IL-12p35 en los tratamientos evaluados. Respecto a los resultados obtenidos de la expresión transcripcional del ARNm IL-12p40 que conforma el heterodímero, no se observó ningún nivel de expresión con el tratamiento FLt 10 $\mu\text{g/ml}$; mientras que los tratamientos con FLt 100, FFv 10 y FFv 100 $\mu\text{g/ml}$ incrementaron significativamente en relación al control negativo ($p < 0.05$). Así mismo, el tratamiento con FLt 100 $\mu\text{g/ml}$ produjo un aumento significativo respecto al LPS ($p < 0.05$). Por otro lado, el tratamiento con FFv 10 $\mu\text{g/ml}$ presentó la mayor expresión en relación a los tratamientos evaluados ($p < 0.001$) (Figura 18).

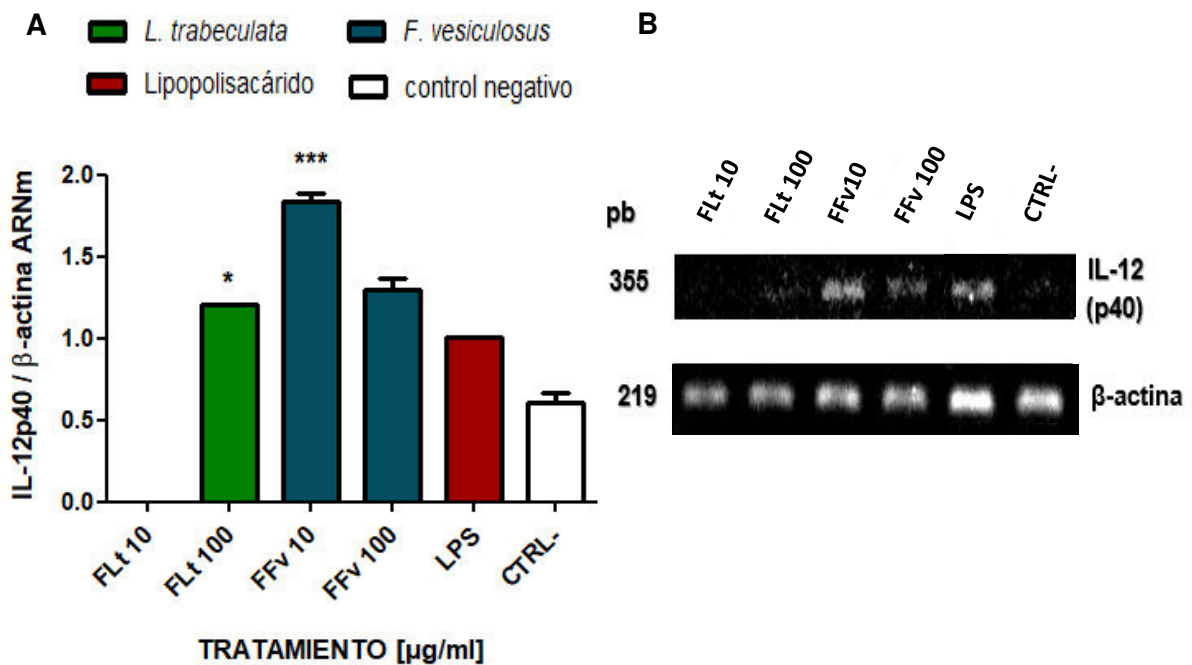


Figura 18. Análisis de la expresión transcripcional del ARNm IL-12p40 en cultivo de PBMC estimuladas con FLt, FFv y LPS durante 48 h. **A.** Expresión transcripcional del ARNm IL-12p40 normalizada con la expresión del ARNm β -actina. El tratamiento con FLt 100 $\mu\text{g/ml}$ incrementó la expresión transcripcional en relación al LPS y el control negativo ($p < 0.05$). Así mismo, FFv 10 $\mu\text{g/ml}$ aumentó notoriamente el nivel de expresión con respecto a los tratamientos y el control negativo ($p < 0.0001$). **B.** Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.7 %. Cada banda se cuantificó por densitometría empleando el programa *ImageJ* (NIH, USA) FLt: fucoidan de *L. trabeculata*, FFv: fucoidan de *F. vesiculosus*, CTRL-: control negativo o cultivo de PBMC sin tratamiento. Los resultados representan la media y desviación de los experimentos por triplicado. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

Respecto a la expresión transcripcional del ARNm TGF- β , en la Figura 19 se observó, mediante el análisis estadístico, que no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos con FLt, FFv con relación al control negativo ($p > 0.05$).

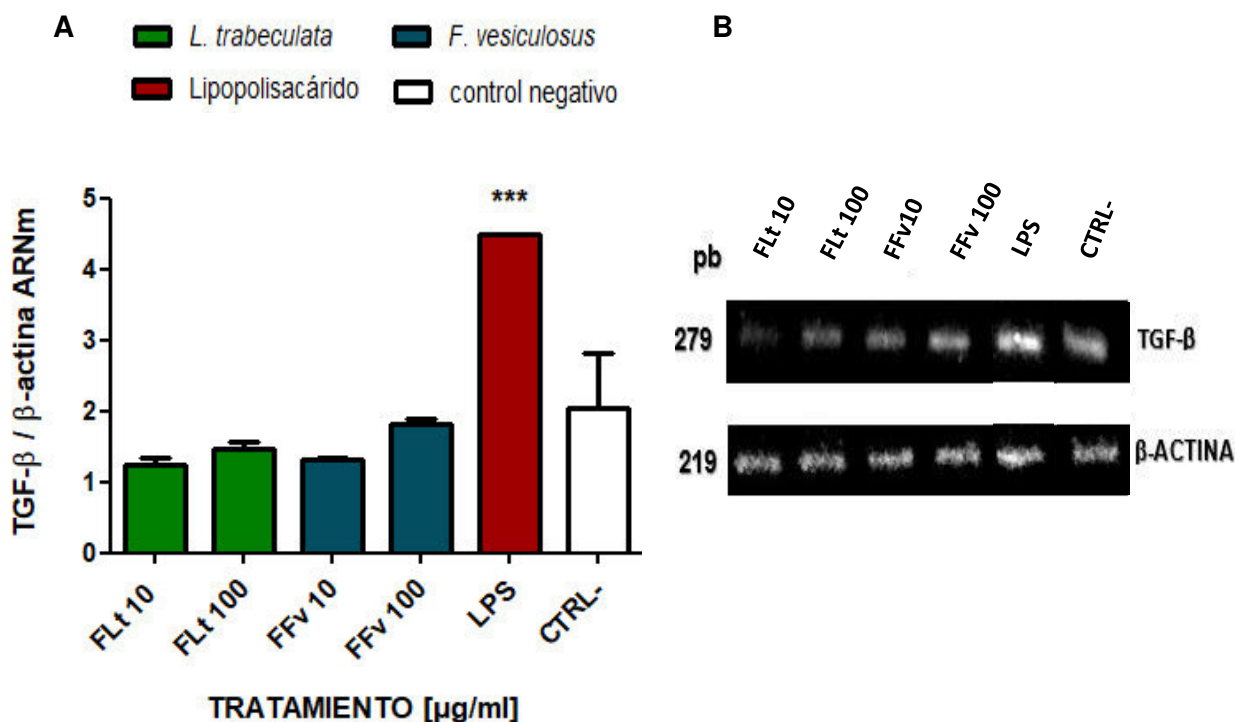


Figura 19. Evaluación de la expresión transcripcional de la citoquina TGF- β en cultivo de PBMC estimuladas con FLt, FFv y LPS durante 48 h. **A.** Expresión transcripcional del ARNm de la citoquina normalizada con la expresión del ARNm β -actina. No existen diferencias significativas entre los tratamientos con FLt, FFv respecto al control negativo ($p > 0.05$), excepto con el tratamiento con LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ que incrementó notoriamente el nivel de expresión ($p < 0.0001$). **B.** Determinación de la expresión del ARNm mediante la PCR convencional. Los amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.7 %. Cada banda se cuantificó por densitometría empleando el programa *ImageJ* (NIH, USA). FLt: fucoidan de *L. trabeculata*, FFv: fucoidan de *F. vesiculosus*, CTRL-: control negativo o cultivo de PBMC sin tratamiento. TGF: Factor de crecimiento tumoral. Los resultados representan la media y desviación de los experimentos por triplicado. *** $p < 0.0001$.

5.2.2. Citoquinas de respuesta inmune adaptativa

Posterior a las 48h de tratamiento de las PBMC con FLt y FFv (10 µg/ml y 100 µg/ml), no se detectó la expresión del ARNm IL-2. Así mismo, no se observó la expresión en los cultivos de PBMC expuestos al LPS 10 µg/ml.

En relación a la IL-10, el análisis estadístico mostró que existe un incremento significativo en la expresión transcripcional del ARNm en el tratamiento con FLt 10 µg/ml respecto a los tratamientos con FLt 100, FFv (10 y 100 µg/ml) y el control negativo ($p < 0.0001$). Además, se observó que el tratamiento con FLt 100 µg/ml incrementó significativamente la expresión al compararlo con el FFv 10 µg/ml ($p < 0.05$), sin embargo, no presentó diferencias significativas respecto al control negativo ($p > 0.05$) (Figura 20).

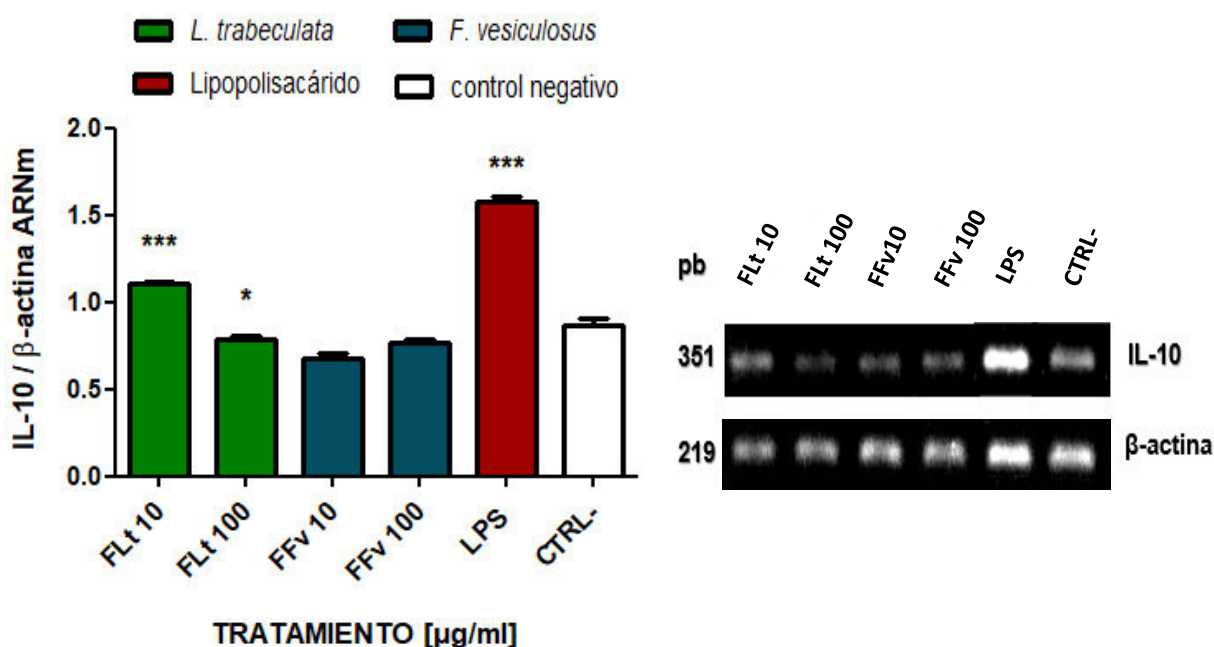


Figura 20. Análisis de la expresión transcripcional del ARNm IL-10 en PBMC estimuladas con FLt, FFv y LPS. **A.** Normalización de la expresión transcripcional del ARNm IL-10 respecto a la expresión del ARNm β-actina. Los tratamientos con FLt 10 µg/ml y LPS incrementaron considerablemente la expresión en relación a los demás tratamientos y al control negativo ($p < 0.0001$). **B.** Determinación de la expresión del ARNm mediante la PCR convencional. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.7 %. FLt: fucoidan de *L. trabeculata*, FFv: fucoidan de *F. vesiculosus*, CTRL-: control negativo o cultivo de PBMC sin tratamiento. Los resultados representan la media y desviación de los experimentos por triplicado. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$

El ARNm del gen “housekeeping” o de expresión constitutiva β-actina en cultivos de PBMC tratadas y no tratadas mostró un nivel de expresión constante durante 48 h.

VI. DISCUSIÓN

Algunos factores del ambiente en el que viven las algas del género *Lessonia* tales como la radiación solar y la temperatura del mar, afectan la presencia de metabolitos en estas algas (Hernández et al., 2012). Así mismo, Kotch et al. (2015), reportaron que la corriente de Humboldt en las costas del Pacífico y la gradiente latitudinal, influyen en la presencia y pureza de los metabolitos secundarios de estas algas.

En la actualidad, la información sobre la composición química de los metabolitos secundarios de *L. trabeculata* es escasa. El estudio realizado por Qu et al. (2014), determinó la composición química del fucoidan con un peso molecular de 105 KDa en comparación con otras especies de algas pardas. Adicionalmente, Chávez et al. (2017), reportaron en un extracto rico en fucoidan de *L. trabeculata* la presencia de algunos metabolitos como polifenoles, florotaninos, cardenólidos y terpenos. Es probable que la presencia de estos metabolitos, en el extracto de fucoidan provisto para este trabajo de investigación, influya sobre la expresión transcripcional de las citoquinas analizadas.

Los florotaninos han sido reportados en algunos estudios por presentar actividad antioxidante, antidiabética, antialérgica, antihipertensiva, antiinflamatoria, entre otras (Florez, 2018).

Otro compuesto biológicamente activo en las algas pardas es la fucoxantina. Algunos estudios sobre este pigmento han demostrado resultados significativos como buenos agentes citotóxicos (Pádua et al., 2015; Peng et al., 2011). Sin embargo, no se ha reportado su efecto sobre cultivos de PBMC.

El cultivo de PBMC tratadas con FLt durante 48 h no presentó efecto citotóxico y, además, se observó que los tratamientos con FLt 100 µg/ml, y FFv (10 y 100 µg/ml) incrementaron el porcentaje de viabilidad celular respecto al control negativo ($p < 0.05$). Estos resultados obtenidos son similares a los reportados por Vásquez et al. (2014), quienes observaron que el fucoidan de *Sargassum siliquosum* J. G. no produjo un efecto citotóxico sobre PBMC humanas. Por otro lado, reportaron que el tratamiento con 175 µg/ml de fucoidan incrementó significativamente el porcentaje de viabilidad celular con relación al

control, observándose un efecto mitogénico. Recientemente, Kim et al. (2018) demostraron que el tratamiento de PBMC porcinas con el fucoidan purificado de *F. vesiculosus* (100 y 200 µg/ml) no afectó la viabilidad celular. La ausencia de citotoxicidad estaría relacionada con las concentraciones pequeñas, el bajo peso molecular y la alternancia en el patrón de sulfatación del fucoidan de algunas especies de algas pardas como *L. trabeculata* (Thin et al., 2013; Qu et al., 2014).

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se consideran frecuentemente el estándar para investigar muchos aspectos de la respuesta inmunológica en un sistema de cultivo celular, incluyendo análisis a nivel genómico (Bolen et al., 2011). Como una población mixta de linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos y células dendríticas, las PBMC están implicadas en la expresión génica de citoquinas que conducen a respuestas inmunes innatas, adaptativas e inflamatorias (Denzler et al. 2010). Muchos estudios con diferentes fucoidanos de distintas especies de algas pardas, han comprobado la actividad inmunomoduladora específicamente sobre la expresión transcripcional de citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa (Lee et al. 2008). Respecto a las citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata:

La citoquina IL-8, también conocida como CXCL8, es una quimiocina proinflamatoria que se descubrió por su papel en la promoción de la quimiotaxis y la desgranulación de los neutrófilos (Baggiolini et al., 1989). En la fisiología normal o persona inmunocompetente, los macrófagos, las células endoteliales y las células epiteliales producen IL-8 en respuesta a una infección o lesión tisular, induciendo la quimiotaxis de granulocitos, principalmente neutrófilos, al sitio afectado (David et al., 2016). Una vez localizado en el sitio de la agresión, esta citoquina puede promover la resolución de la infección mediante la fagocitosis (Brinkmann et al., 2004). La segunda función de la IL-8 es activar la respuesta angiogénica. De esta manera, la IL-8 sirve tanto para resolver el estímulo inflamatorio como para promover la curación (David et al., 2016).

En relación a la expresión transcripcional de la quimiocina CXCL8, el análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con FLt y FFv respecto al control negativo ($p > 0.05$), mientras que el tratamiento con LPS 10 µg/ml incrementó considerablemente su expresión

transcripcional ($p < 0.0001$) (Figura 18). Harada et al. (1994), determinaron que la inyección intravenosa de LPS induce un aumento significativo de la IL-8 en el plasma, alcanzando niveles máximos a las 2 h. Así mismo, Mizuno et al. (2009), observaron que la adición de 500 $\mu\text{g/ml}$ del fucoidan de *L. japonica* a un co-cultivo de células Caco-2 y macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS, produjo un efecto supresor sobre la expresión del ARNm de la IL-8 en Caco-2.

Los resultados en el presente estudio demostraron que no existe supresión ni incremento del ARNm IL-8 en los tratamientos con el fucoidan empleado de las 2 especies de algas pardas a 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Al parecer, el fucoidan por sí solo no induce la expresión transcripcional de esta citoquina en cultivos de PBMC; por lo que haría falta un estímulo propicio (LPS, bacterias, entre otras) para evaluar su capacidad de modular los niveles de expresión transcripcional de la quimiocina analizada en cultivos de PBMC. Por otro lado, Zhang et al. (2015), han reportado que la estimulación de neutrófilos humanos con fucoidanos de *Macrocystis pyrifera*, *Unndaria pinnatifida*, *A. nodosum* y *F. vesiculosus* durante 24 h, produjeron IL-6, IL-8 y TNF- α . Por lo que sería necesario evaluar la estimulación y el tiempo de incubación en la expresión de la IL-8 en cultivos de PBMC tratadas con FLt.

La familia de citoquinas IL-12, constituida por la IL-12 (IL-12p35 / IL-12p40), IL-23 (IL-23p19 / IL-12p40), IL27 (IL-27p28 / Ebi3) e IL-35 (IL -12p35 / Ebi3), presentan importantes funciones reguladoras de la respuesta inmunológica. La IL-12 (IL-12p35 / IL-12p40) requiere la co-expresión de ambas subunidades en la misma célula para secretar la citoquina bioactiva IL12p70 unida a través de puentes disulfuro (Jalah, 2013). Aunque es secretada por una variedad de células hematopoyéticas, los mayores productores de esta citoquina son los macrófagos y las células dendríticas (células presentadores de antígenos). Esta citoquina induce a las células T CD4 + vírgenes a diferenciarse en células Th1, un subconjunto T-helper que está implicado en la etiología de varias enfermedades autoinmunes humanas (Sun et al., 2015).

Respecto a la expresión transcripcional de IL-12p35 que conforma la citoquina bioactiva IL-12, no se detectó ARNm en los tratamientos con FLt, FFv, LPS y sin fucoidan (control negativo). Sin embargo, el ARNm IL-12p40 mostró

niveles de expresión transcripcional significativos en los tratamientos con FLt 100, FFv 10 y FFv 100 µg/ml en relación al control negativo ($p < 0.05$).

Ale et al. (2011) propusieron que la interacción macrófago-fucoidan a través de receptores de membrana como receptor tipo Toll-4 (TLR-4), marcador de diferenciación CD14, el receptor de complemento 3 (CR-3) y receptores “scavenger” (SR) (Takahashi, 1983), producen la activación de los macrófagos y la secreción de IL-12. Así mismo, Zhang et al. (2015) determinaron que los fucoidanos de *M. pyrifera*, *A. nodosum* y *F. vesiculosus* inoculados en ratones C57BL/6 produjeron un aumento notable en la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-12p40 y TNF- α) en esplenocitos después de 2 h del tratamiento al compararlos con el grupo control. Además, observaron que los niveles séricos de las citoquinas IL-6, IL-12 y TNF- α aumentaron considerablemente.

La considerable expresión transcripcional del ARNm IL-12p40, en relación al cultivo control, haría pensar que se está expresando esta proteína para conformar la citoquina activa IL-23. Si bien no se conocen reportes sobre la actividad inmunomoduladora del fucoidan de *L. trabeculata* sobre la IL-23, sería necesario corroborar la expresión y producción de IL-23p19 para confirmar la presencia de la proteína activa.

Al analizar estos resultados se debe tener en cuenta que la proteína IL-12p40 de la IL-12 es compartida con la IL-23, por lo tanto, la no detección de la proteína IL-12p35 podría deberse a 2 aspectos:

1. El fucoidan de *L. trabeculata* y *F. vesiculosus* no es capaz de estimular a las PBMC para expresar y secretar la IL-12p35 y formar la proteína activa (IL-12p70).
2. El ARNm IL-12p35 pudo haberse traducido para conformar la proteína activa dentro de las 48 h. Por lo que sería necesario evaluar la producción de la IL-12p70 en los cultivos expuestos al FLt y FFv dentro de las 24 h.

El TGF- β es una citoquina inmunorreguladora producida por un amplio rango de células que incluyen macrófagos, células NK, células T y células B. Esta citoquina es un importante regulador de la inflamación ya que posee

propiedades proinflamatorias y anti-inflamatorias dependiendo de su concentración; a bajas concentraciones tiene propiedades proinflamatorias y recluta neutrófilos, monocitos y células T al lugar de inflamación durante una infección, mientras que a altas concentraciones presenta actividad antiinflamatoria, suprimiendo el TNF- α y el óxido nítrico en macrófagos, inhibe la producción del IFN- γ y el TNF- α en células NK e indirectamente disminuye la expresión MHC clase II (López & Ramos 2008).

Con respecto al ARNm TGF- β , el análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas en la expresión transcripcional en cultivos de PBMC tratados con FLt y FFv a 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ en relación control negativo ($p>0.05$). Sin embargo, el tratamiento con LPS a 10 $\mu\text{g/ml}$ incrementó significativamente la expresión transcripcional de esta citoquina ($p<0.0001$). No se conocen estudios sobre la actividad moduladora del fucoidan de *L. trabeculata* y *F. vesiculosus* sobre la expresión de TGF- β en PBMC humanas.

Kelly et al. (2017) demostraron que los monocitos pueden producir pequeños niveles de expresión de TGF- β continuamente; mientras que su estimulación con LPS incrementa significativamente la expresión y secreción de esta citoquina moduladora de la respuesta inmune innata y adaptativa, resultados que concuerdan con los obtenidos en este estudio al observar pequeños niveles de expresión en los cultivos tratados y no tratados con fucoidanos comparados con el LPS (Figura 20).

Respecto a las citoquinas involucradas en la respuesta inmune adaptativa:

La IL-2 es una citoquina involucrada ampliamente en la respuesta inmune adaptativa, siendo secretada por células T activadas por antígeno. Originalmente se identificó como un factor de crecimiento de células T, ahora se sabe que la IL-2 tiene una amplia gama de acciones, incluida la capacidad de aumentar la actividad citolítica de las células *Natural Killer* (NK) activadas por linfocinas u otras células NK, aumentar la actividad citolítica de los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), incrementar la producción de inmunoglobulina por las células B activadas, mantener la proliferación homeostática de las células T reguladoras (células Treg), modular la diferenciación de las células T efectoras, actuar sobre las células linfoides innatas, células T de memoria y monocitos. Además, la IL-2 en conjunto

con las citoquinas polarizantes Th pueden promover a las células Th vírgenes para la diferenciación en Th1, Th2, Th9 y células T reguladoras inducibles, mientras que inhibe la diferenciación Th17 y Th folicular (Tfh) (Mitra y Leonard, 2018).

Con relación a la citoquina IL-2, no se detectaron niveles de expresión transcripcional en los tratamientos con el fucoïdan de *L. trabeculata*, *F. vesiculosus*, el LPS y en el control negativo. En contraposición a este resultado, algunos estudios han reportado un incremento considerable en la producción de la IL-2 en células esplenocíticas aisladas de ratones tratados con 5 mg/kg del fucoïdan de *Laminaria hyperborea*. (Lebedynskaya et al., 2015; Halling et al., 2015). Si bien en el presente estudio se trabajó con PBMC *in vitro*, los resultados *in vivo*, sugieren que una mayor concentración de fucoïdan sería un punto importante a considerar para lograr la expresión y producción de esta citoquina. Así mismo, no se ha reportado el efecto del fucoïdan sobre los mecanismos de señalización implicados para la expresión de esta citoquina.

La función principal de la IL-10 es servir como una citoquina antiinflamatoria e inmunosupresora formada por células Th1 y Th2, aunque un subconjunto de células T, denominado Treg, producen preferentemente IL-10 y TGF- β ; además, puede ser producida por células B, macrófagos, células dendríticas activadas, queratinocitos y células epiteliales bronquiales. Así mismo, puede inhibir fuertemente la producción de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ; inhibir la presentación de antígenos por macrófagos y disminuir la expresión de MHC de clase II, las moléculas de adhesión y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Por otro lado, el LPS y el TNF son inductores de esta citoquina. El receptor IL-10R se expresa en macrófagos, mastocitos y en la mayoría de las células hematopoyéticas. Por esta razón la IL-10 se enfatiza como el inhibidor endógeno de la inmunidad mediada por células (O'Shea et. al, 2018).

Respecto a la expresión transcripcional de la citoquina IL-10, se observó que el tratamiento con FLt a 10 $\mu\text{g/ml}$ incrementó significativamente la expresión del ARNm IL-10 al compararlos con FLt 100 $\mu\text{g/ml}$, FFv (10 y 100 $\mu\text{g/ml}$) y el control negativo ($p < 0.0001$) (Figura 21). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Fang et al. (2015), quienes observaron que macrófagos RAW264.7 tratados con 200 $\mu\text{g/ml}$ de un polisacárido extraído de *L. japonica*

estimularon los niveles de expresión de citoquinas IL-6, IL-1 β , IL-10 y TNF- α de manera dosis dependiente. Así mismo, otros estudios demostraron que el tratamiento con un extracto enzimático de *E. cava* y un polisacárido soluble de *Sargassum angustifolium* incrementaron los niveles de expresión de la IL-10 en esplenocitos murinos (Ahn et al. 2007; Borazjani et al., 2017).

En su conjunto, se puede inferir que la expresión del ARNm IL-10 inhibe significativamente la expresión del ARNm IL-12p40 en cultivos tratados con FLt 10 μ g/ml; resultados que concuerdan con la funcionalidad de la IL-10 (O'Shea et al, 2018). A pesar de la pureza del FLt (80.84%), es probable que la presencia de otros metabolitos como polifenoles, florotaninos, cardenólidos y terpenos, influyan en los resultados obtenidos. Se ha demostrado que los polifenoles y florotaninos presentan actividad antiinflamatoria (Florez, 2018). Al parecer, estos compuestos estarían potenciando el efecto de FLt 10 μ g/ml sobre la expresión del ARNm de la IL-10. Sin embargo, el tratamiento con FLt 100 μ g/ml, incrementó considerablemente la expresión transcripcional de IL-12p40 con relación al ARNm IL-10, por lo que una mayor concentración de FLt estaría estimulando a los monocitos y células dendríticas a expresar ARNm IL-12p40 para conformar la IL-12p70 y disminuir la expresión ARNm IL-10; efecto que favorecería la polarización de células T CD4+ vírgenes a diferenciarse en células Th1 (Sun et al., 2015).

Por otro lado, el carácter pleiotrópico (múltiples efectos de una misma citoquina según el tejido involucrado) de estas proteínas puede dificultar la identificación de la función específica de una citoquina (MacPherson & Austyn, 2013), por lo que es necesario evaluarlas no solo por separado, sino también en un microambiente simulando un proceso inflamatorio o infeccioso.

VII. CONCLUSIONES

1. El fucoidan de *L. trabeculata* no presenta efecto citotóxico sobre las células mononucleares de sangre periférica humana.
2. En cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana, el fucoidan de *L. trabeculata* a 10 µg/ml estimula la expresión transcripcional de IL-10, mientras que no induce la expresión del ARNm de IL-12p40. Así mismo, el tratamiento con fucoidan de *L. trabeculata* a 100 µg/ml induce la transcripción de IL-12p40 en mayor proporción que la IL-10, mostrando un perfil dosis dependiente para IL-12p40 y no dependiente para IL-10.
3. El fucoidan de *L. trabeculata* a 10 y 100 µg/ml induce la expresión transcripcional de IL-12p40 e IL-10 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana como indicador de su capacidad estimulante sobre la inmunidad innata y humoral adaptativa respectivamente.
4. El fucoidan de *L. trabeculata* a 10 y 100 µg/ml no estimula la expresión del ARNm de IL-8, IL-12p35, IL-2 y TGF-β en cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la expresión transcripcional de las citoquinas a mayor concentración e intervalos de tiempo.
2. Determinar la producción de citoquinas de respuesta inmune innata y adaptativa mediante ensayos de ELISA con la finalidad de compararlos con la expresión génica.
3. Evaluar la expresión génica en PBMC estimuladas con lipopolisacáridos, proteínas, moléculas bacterianas, entre otras.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2015). Propiedades y generalidades de las respuestas inmunitarias. En: *Inmunología celular y molecular (2-12)*. España: Sanunders-Elsevier.
- Ahn, G., Hwang, I., Park, E., Kim, J., Jeon, YJ., Lee, J., Park, JW. & Jee Y. (2007). Immunomodulatory effects of an enzymatic extract from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. *Marine Biotechnology*, 10, 278-289.
- Aisa, Y.; Miyakawa, Y.; Nakazato, T.; Shibata, H.; Saito, K.; Ikeda, Y. & Kizaki, M. (2005). Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am. J. Hematol.*, 78, 7–14.
- Ale, M. T., Mikkelsen, M. J. & Meyer, A. S. (2011). Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar Drugs*, 9(10), 2106–2130.
- Ale, M. T. & Meyer, A. S. (2013). Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Adv.*, 3, 8131-8141.
- Alekseyenko, T. V., Zhanayeva, S. Y., Venediktova, A. A., Zvyagintseva, T. N., Kuznetsova, T. A., Besednova, N. N., et al. (2007). Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 143, 730–732.
- Andersen, T., Strand, B. L., Formo, K.; Alsberg, E., Christensen, B. E. (2012). Alginates as Biomaterials in Tissue Engineering. *Carbohydr. Chem.*, 37, 227–258.
- Arivulselvan N., Radhiga M. & Anantharaman P. (2011). *In vitro* antioxidant and anticoagulant activities of sulfated polysaccharides from brown seaweed (*Turbinaria ornata*) Turner J. Agardh. *Asian J Pharmaceutic. Biol Res*, 232-239.
- Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H. & Williams, K. C. (2010). Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A.*, 77(5), 410-9.

- Baggiolini, M., Walz, A. & Kunkel, S. L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.*, 84(4), 1045-9.
- Berteau, O., & Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 13(6), 29R-40R.
- Bolen, C. R., Uduman, M., & Kleinstein, S. H. (2011). Cell subset prediction for blood genomic studies. *BMC bioinformatics*, 12, 258.
- Borazjani, N. J., Tabarsa M. Y., SangGuan Y. & Masoud R. (2017). Purification, molecular properties, structural characterization, and immunomodulatory activities of water soluble polysaccharides from *Sargassum angustifolium*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 793-802.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosman, Ch., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535.
- Brownlee, I. A., Seal, C. J., Wilcox, M., Dettmar, P. W. & Pearson, J. P. (2009). Applications of Alginates in Food. En B. H. A. Rehm (Ed.), *Alginates: Biology and Applications* (Vol. 13, pp. 211–228); Berlín: Alemania: Springer.
- Carbajal, P. (2008). *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices. Recuperada de <http://www.imarpe.pe/imarpe/macroalgas.php>
- Chávez, J, Apumayta, E, Loayza, L, Casimiro, S, & Rabanal, M. (2017). Screening fitoquímico y contenido de elementos traza del alga parda *Lessonia trabeculata* procedente de la bahía de San Nicolás de Marcona, Ica - Perú. Presented at the VI Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal – Lima, Perú 201, Lima, Perú.
- Choi, E. M., Kim, A. J., Kim, Y. O., & Hwang, J. K. (2005). Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro*. *Journal of medicinal food*, 8(4), 446-453.

- Choi, J. I., Raghavendran, H. R., Sung, N. Y., Kim, J. H., Chun, B. S., Ahn, D. H., et al. (2010). Effect of fucoidan on aspirin-induced stomach ulceration in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 183, 249–254.
- Cotsapas, C. & Hafler, D. A. (2013). Immune-mediated disease genetics: the shared basis of pathogenesis. *Trends Immunol.*, 34(1), 22-6.
- Cumashi, A. Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D' Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L. & Nifantiev, N. E. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17, 541-552.
- David, J., Dominguez, C., Hamilton, D., & Palena, C. (2016). The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines*, 4(3), 22.
- Delagrèverie, H. M., Delaugerre, C., Lewin, S. R., Deeks, S. G., & Li, J. Z. (2016). Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. *Open Forum Infectious Diseases*, 3(4).
- Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B., & Hervé, C. (2017). A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydrate Polymers*.
- Denzler, K. L., Waters, R., Jacobs, B. L., Rochon, Y., Langland, J. O. (2010). Regulation of Inflammatory Gene Expression in PBMCs by Immunostimulatory Botanicals. *PLoS ONE*, 5(9), e12561.
- Dhama, K., M. Saminathan, S.S. Jacob, M. Singh & K. Karthik et al. (2015). Effect of immunomodulation and immunomodulatory agents on health with some bioactive principles, Modes of action and potent biomedical applications. *Int. J. Pharmacol.*, 11, 253-290.
- Dias, P. F., Siqueira, J. M., Vendruscolo, L. F., Neiva, T. D., Gagliardi, A. R., Maraschin, M. & Ribeiro-do-Valle, R. M. (2008). A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. *Microvasc. Res.*, 75, 34-44.

- Fang, Q., Wang, JF., Zha, XQ., Cui, SH., Cao, L. & Luo, JP. (2015). Immunomodulatory activity on macrophage of a purified polysaccharide extracted from *Laminaria japonica*. *Carbohydr Polym*, 134, 66-73.
- Florez, N. (2018). Extraction and purification of bioactive compounds from "*Sargassum muticum*". (Tesis doctoral). Universidad de Vigo. España.
- Fukuda, S., Saito, H., Nakaji, S., Yamada, M., Ebine, N., Tsushima, E., Oka, E., Kumeta, K., Tsukamoto, T. & Tokunaga, S. (2007). Pattern of dietary fiber intake among the Japanese general population. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 61(1), 99-103.
- García-Hernández, M., Guerrero-Ramírez, G., Castro-Corona. M. A. & Medina-de-la-Garza, C. (2009). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Medicina Universitaria*, 11(45), 247-259.
- Grievink, H. W., Cornelis, T. L., Moerland, K. M. & Malone, K. E. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, 14 (5).
- Grütz, G. (2004). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(1), 3–15.
- Hahn, T., Lang S., Ulber R., & Muffler K. (2012). Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry*, 47(12), 1691-1698.
- Halling, B. P., Vetvicka, V. & Blakemore, W. R. (2015). Evaluation of the immunomodulatory *in vivo* activity of *Laminaria hyperborea* fucoidan relative to commercial (1,3/1,6)-b-d-glucans from yeast and mushrooms. *J Nutr Health Sci*, 2(2), 205.
- Harada, A., Nobuaki, S., Akahoshi, T., Wada, T. & Mukaida, N. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 56.
- Hemmingson, J. A., Falshaw, R., Furneaux, R. H. & Thompson, K. (2006). Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from

- Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology*, 18, 185–193.
- Hernández, K., Yannicelli, B., Montecinos, A., Ramos, M., González, H. E. & Daneri, G. (2012). Temporal variability of incidental solar radiation and modulating factors in a coastal upwelling area (36°S). *Progress in Oceanography*, 92–95(Supplement C), 18–32.
 - Horna, M. (2018). Citotoxicidad de un extracto con fucoidanos obtenidos de algas pardas sobre la línea celular hep-2 (Human Epidermoid Carcinoma strain 2). (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
 - Hwang, PA., Wu, CH., Gau, SH., Chien, SY. & Hwang, DF. (2010). Anti-oxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. *J Mar Sci Tech*, 18(1), 41-46.
 - Informe Técnico (R. PESQ.) No. 135/2010. Suspensión transitoria de la inscripción en el Registro Pesquero Artesanal de los recursos huiro, huiro negro y huiro palo en las regiones de Valparaíso, O'higgins, Maule, Bío-Bío, Araucanía y Magallanes. Subsecretaria de Pesca del Gobierno de Chile.
 - Instituto del Mar del Perú. (2008). Informe de las actividades desarrolladas durante el año 2007. Laboratorio costero de Pisco.
 - Instituto del Mar del Perú. (2012). Estudios sobre macroalgas pardas en el sur del Perú. 2011-2015. ISSN 0378 – 7702.
 - Instituto del Mar del Perú. (2015). Evaluación poblacional de *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices, 1986 en San Juan de Marcona. Informe IMARPE, 42(4), 510- 515.
 - Ip, W., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S., & Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6337), 513–519.
 - Iso, H. & Kubota, Y. (2007). Nutrition and Disease in the Japan Colaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer (JACC). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 8, 35-80.

- Janeway, C. A. Jr, Travers, P., Walport, M., et al. (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. [Figura]. Recuperada de: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27092/figure/A47/?report=objectonly
- Jones, C. G., Lawton, J. H. & Shachak, M. (1997). Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology*, 78(7), 1946-1957.
- Josephine, A., Nithya, K., Amudha, G., Veena, C. K., Preetha, S. P. & Varalakshmi, P. (2008). Role of sulphated polysaccharides from *Sargassum wrightii* in Cyclosporine A-induced oxidative liver injury in rats. *BMC Pharmacol.*, 8(4), 64-68.
- Karmakar, P., Ghosh, T., Sinha, H., Saha, S., Mandal, P., Gosal, P. K. & Ray, B. (2009). Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastomatica*: characterization of sulfated fucans. *CarbohydrPolym*, 78, 416-421.
- Kelly, A., Houston, S. A., Sherwood, E., Casulli, J. & Travis, M. A. (2017). Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGF β . *Advances in Immunology*, 137–233.
- Khanavi, M., Nabavi, M., Sadati, N., Ardekani, M. S., Sohrabipour, J., Nabavi, B. M., Ghaeli, P. & Ostad, N. S. (2010). Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. *Biology Research*, 43, 31-37.
- Kim, H-M., Ahn, Ch., Kang, B-T., Kang, J-H. & Jeung E-B. (2018). Fucoidan suppresses excessive phagocytic capacity of porcine peripheral blood polymorphonuclear cells by modulating production of tumor necrosis factor-alpha by lipopolysaccharide-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Research in Veterinary Science*, 118, 413–418.
- Koch, K., Thiel, M., Tellier, F., Hagen, W., Graeve, M., Tala, F. & Bischof, K. (2015). Species separation within the *Lessonia nigrescens* complex (Phaeophyceae, Laminariales) is mirrored by ecophysiological traits. *Botánica Marina*, 58(2), 81–92.
- Krummen, M., Balkow, S., Shen, L., Heinz, S., Loquai, C., Probst, H. C., et al. (2010). Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation

is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy. *J Leukoc Biol*, 88, 189–99.

- Lebedynskaya, E. A., Makarenkova, I. D., Lebedynskaya, O. V., Akhmatova, N. K. & Zvyagintseva, T. N. (2015). The Effect of Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweed *Laminaria japonica* on the Morphology of Lymphoid Organs and Functional Characteristics of Immunocompetent Cells. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 9(1), 86–94.
- Lee, J. B., Koizume, S., Hayashi, K. & Hayashi, T. (2010). Structure of rhamnan sulfate from the green alga *Monostroma nitidum* and its anti-herpetic effect. *Carbohydr. Polym.*, 87, 572-577.
- Lee, SH., Ko, Cl., Ahn, G., You, S., Kim, JS., Heu, MS., Kim, J., Jee, Y. & Jeon, YJ. (2012). Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydr Polym*, 89(2), 599-606.
- Li, B., Lu, F., Wei, X. & Zhao, R. (2008). Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules: a Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 13, 1671–1695.
- Li, P., Wang, H., Shao, Q., Kong, B. & Qu, X. (2017). Fucoidan modulates cytokine production and migration of THP-1-derived macrophages via colony-stimulating factor-1. *Mol Med Rep*, 15(4), 2325-2332.
- López, A. & Ramos, A. (2008). El papel inmunorregulador del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) en las infecciones parasitarias. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 8(1), 38-44.
- MacPherson, G. & Austyn, J. (2013). *Inmunología. Conceptos y Evidencias*. España: Mc Graw Hill.
- McDonald, D. R. & Levy, O. (2018). Innate Immunity. En R. R. Rich (Ed.), *Clinical Immunology* (pp. 127-155). England, London: Elsevier.
- McHugh, D. J. (1987). Production, Properties and Uses of Alginates. En D. J. McHugh. (Ed.), *Production and utilization of products from commercial seaweeds*; Roma, Italia. Fisheries and Aquaculture Department of the United Nations.

- Mitra, S. & Leonard, W. J. (2018). Biology of IL-2 and its therapeutic modulation: Mechanisms and strategies. *Journal of Leukocyte Biology*.
- Mizuno, M., Nishitani, Y., Hashimoto, T. & Kanazawa, K. (2009). Different suppressive effects of fucoidan and lentinan on IL-8 mRNA expression in in vitro gut inflammation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(10), 2324-5.
- Mogollón, E. (2016). Evaluación del potencial químico de las algas pardas como fuente de ácido algínico. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Ingeniería. Perú.
- Morel J. (2014). Inmunopatología de la artritis reumatoide. *EMC – Aparato locomotor*, 47(4), 1-10 [Artículo E – 14-249].
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Moo-Puc, R., Robledo, D. & Freile-Felegrin, Y. (2009). *In vitro* cytotoxic and proliferative activities of marine algae from Yucatan, Mexico. *Cienc Mar*, 35, 345-358.
- O'Shea, J. J., Gadina, M. & Siegel, R. M. (2018). Cytokines and Cytokine Receptors. En R. R. Rich (Ed.), *Clinical Immunology* (pp. 127-155). England, London: Elsevier.
- Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D. & Ramos, A. A. (2015). Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters*, 14, 91–98.
- Park, B. Y., Kwon, S. C., Park, G. B. & Ham, J. (2008). Vasodilation effect of farnesylacetones, active constituents of *Sargassum siliquastrum* on the basilar and carotid arteries of rabbits. *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.*; 18, 6324-6326.
- Payyavula, R.S., Navarre, D.A., Kuhl, J.C., Pantoja, A. & Pillai, S.S. (2012). Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression. *BMC Plant Biology*, 12(1), 39-56.
- Peng, J., Yuan, J.-P., Wu, C.-F. & Wang, J.-H. (2011). Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism

- and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs*, 9(10), 1806–1828.
- Perez, E. A. (2009). Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 114(2), 195-201.
 - Prieto-González, S., Garrido-Garrido, G., González-Lavaut, J. A. & Molina-Torres, J. (2004). Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35(1), 19-36.
 - Qu, G., Liu, X., Wang, D., Yuan Y. & Huan L. (2014). Isolation and characterization of fucoidans from five brown algae and evaluation of their antioxidant activity. *J. Ocean Univ. China*, 13(5), 851-856.
 - Quitral R., V., & Morales G., C., & Sepúlveda L., M., & Schwartz M., M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista Chilena de Nutrición*, 39 (4), 196-202.
 - Rioux, L., Turgeon, S. L. & Beaulieu, M. (2007). Rheological characterisation of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *J. Sci. Food Agric.*, 87, 1630-1638.
 - Ruan, Wenjing & Lai, Maode. (2007). Actin, a reliable marker of internal control?. *Clinica Chimica Acta*, 385(1), p. 1-5.
 - Russo, R. C., Garcia, C. C. & Teixeira, M. M. (2010). Anti-inflammatory drug development: broad or specific chemokine receptor antagonists. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 13(4), 414-27.
 - Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M., & Amaral, F. A. (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(5), 593–619.
 - Santelices, B. (1989). *Algas marinas de Chile*. Universidad Católica de Chile. 399 pp.
 - Sinha, S., Astani, A., Ghosh, T., Schnitzler, P. & Ray, B. (2010). Polysaccharides from *Sargassum tenerimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. *Phytochem.*, 7, 235-242.
 - Sithranga, B. N. & Kathiresan, K. (2010). Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. *J. Oncology*, 21, 41-86.

- Shouval, D. S., Biswas, A., Goettel, J. A., McCann, K., Conaway, E., Redhu, N. S., Mascanfroni, I. D., Al Adham, Z., Lavoie, S., Ibourk, M., Nguyen, D. D., Samsom, J. N., Escher, J. C., Somech, R, Weiss, B., Beier, R., Conklin, L.S., Ebens, C. L., Santos, F. G., Ferreira, A. R., Sherlock, M., Bhan, A. K., Müller, W., Mora, J. R., Quintana, F. J., Klein, C., Muise, A. M., Horwitz, B. H. & Snapper, S. B. (2014). Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity*, 40(5), 706-19.
- Skriptsova, A. V. (2015). Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russian Journal of Marine Biology*, 41(3), 145–156.
- Smit, A. J. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, 16, 245–262.
- Sun, L., He, C., Nair, L., Yeung, J. & Egwuagu, C. E. (2015). Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*, 75(2),
- Takahashi, M. (1983). Studies on the mechanism of host mediated antitumor action of fucoidan from a brown alga *Eisenia bicyclis*. *J. Jpn. Soc. Reticuloendothel. Syst.*, 22, 269–283.
- Tanaka, K., Ito, M., Kodama, M., Tomita, M., Kimura, S., Hoyano, M., Mitsuma, W., Hirono, S., Hanawa, H. & Aizawa, Y., (2011). Sulfated polysaccharide fucoidan ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology & Therapeutics* 16, 79.
- Teruya, T., Tatemoto, H., Konishi, T. & Tako, M. (2009). Structural characteristics and in vitro macrophage activation of acetyl fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. *Glycoconj. J.* 26, 1019–1028.
- Thinh, P. D., Menshova, R. V., Ermakova, S. P., Anastyyuk, S. D., Ly, B. M., & Zvyagintseva, T. N. (2013). Structural Characteristics and Anticancer Activity of Fucoidan from the Brown Alga *Sargassum mcclurei*. *Marine Drugs*, 11(5), 1456–1476.

- Vandesompele, Jo, et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), p. research0034. 1.
- Vásquez, J. A. (2009). Informe Final del Estudio de Investigación de Poblaciones y de las condiciones de viabilidad ecológica de las actividades extractivas de algas pardas e invertebrados en la zona costera sur, en apoyo a la investigación y desarrollo del IMARPE. Proyecto UE-Perú/PENX. Lima, Perú. 90 p.
- Vasquez, Ross. (2014). Polysaccharide extracts from *Sargassum siliquosum* J.G. Agardh modulates production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced PBMC and delays coagulation time *in vitro*. *Journal of Harmonized Research in Pharmacy*, 3, 101-112.
- Vera, D. F. (2014). Efecto de la extracción del alga *Lessonia trabeculata*, Villouta & Santelices, sobre el macrobentos en Marcona, Perú. Tesis para optar al título de Magister. Universidad Nacional Agraria La Molina. [Figura]. Recuperada de repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2390
- Villouta, E. & Santelices, B. (1986). *Lessonia trabeculata* sp. nov. (Laminariales, Phaeophyta), a new kelp from Chile. *Phycologia*, 25(1), 81–86.
- Vischuk, S. O, Ermakova, P. S & Zvyagintseva, T. N. (2011). Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: Isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydr. Res.*, 346, 2769-2776.
- Wang, W.T., Zhou, J.H., Xing, S.T. & Guan, H.S. (1994). Immunomodulating action of marine algae sulfated polysaccharides on normal and immunosuppressed mice. *Chin. J. Pharm Toxicol*, 8, 199-202.
- Westermeier, R. (1981). The marine seaweed of Chile's Tenth Region (Valdivia, Osorno, Llanquihue and Chiloe). *Proceedings International Seaweed Symposium*. 10, 215-220.
- Westermeier, R., Gomez I. & Rivera, P. (1993). Suspended farming of *Gracilaria chilensis* (Rodophyta, Gigartinales) at Cariquilda River, Maullin, Chile. *Aquaculture*. 113, 215-229.

- Williams, M. A., Tyznik, A. J. & Bevan, M. J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature*, 441, 890–3.
- Yang, X.L., Sun, J.Y. & Xu, H.N. (1995). An experimental study on immunoregulatory effect of fucoidan. *Chin. J. Marine Drugs*, 9-13.
- Yoon, W. J., Ham, Y. M., Kim, S. S., Yoo, B. S., Moon, J. Y., Baik, J. S., Lee, N. H. & Hyun, C. G. (2009). Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages, *Eur Asia J. Bio sci*, 3, 130-134.
- Zhang, W., Oda, T., Yu, Q. & Jin, J. O. (2015). Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans, *Marine drugs*, 13(3).
- Zigmond, E., Bernshtein, B., Friedlander, G., Walker, C. R., Yona, S., Kim, K. W., Brenner, O., Krauthgamer, R., Varol, C., Müller, W. & Jung, S. (2014). Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity*, 40(5), 720-33.
- Zurita, S. (2013). Procedimientos de laboratorio: manual: laboratorios locales I: laboratorios locales II. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Recuperado de: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/2660.pdf>

X. ANEXOS

Anexo 1. RPMI 1640 SUPLEMENTADO

RPMI-1640 (10x)	10 ml
Agua tridestilada	90 ml
Bicarbonato de Sodio	2.6 ml
HEPES 1M.....	1ml
Antibióticos Penicilina-streptomina.....	1 ml
Aminoácidos no esenciales.....	1 ml
Suero bovino fetal de complementado	10ml

Diluir el medio RPMI hasta la concentración de 1X. Mezclar los componentes. Titular con NaOH 1M hasta conseguir el color rojo grosella. Filtrar con membrana de PVDF de 0.22 µm y guardar a 4°C.

Anexo 2. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

MTT	50 mg
Medio de cultivo RPMI base sin antibióticos	10 ml

Mezclar los componentes y filtrar con una membrana de PVDF de 0.22 µm. Almacenar en frasco oscuro a -20°C.

Anexo 3. BUFFER TRIS BASE-ÁCIDO BÓRICO-EDTA 1X (1X-TBE)

Para preparar 1 litro de 10 × TBE disuelva los siguientes componentes en 600 ml de agua desionizada:

Tris Base (FW = 121).....	108g
Ácido bórico (FW = 61.8).....	55 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0).....	40 ml

Ajustar el volumen final a 1 litro con agua desionizada.

Para preparar una solución de trabajo 1X a partir de 10X stock buffer, mezclar el tampón 10X de reserva con agua desionizada o tridestilada sin ADNasa en una proporción de 1: 9

Anexo 4. Secuencia de primers de las citoquinas empleados en la amplificación por PCR convencional.

CITOQUINA		OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMAÑO (pb)	Nº DE ACCESO
IL-2		F: 5'GTCACAAACAGTGACCTAC 3' R: 5'CCCTGGGTCTTAAGTGAAAG 3'	262	NM_000586.3
IL-8		F: 5' AAGAGAGCTCTGTCTGGACC 3' R: 5' GATATTCTCTTGGCCCTTGG 3'	408	NM_000584.3
IL-10		F: 5' AATAAGGTTTCTCAAGGGGCT 3' R: 5' AGAACCAAGACCCAGACATCAA 3'	351	NM_000572.2
IL-12	P35	F: 5' AGCCTCCTCCTTGTGGCTA 3' R: 5' TGTGCTGGTTTTATCTTTTGTG 3'	228	NM_001354582.1
	P40	F: 5' CCAAGAACTTGCAGCTGAAG 3' R: 5' TGGGTCTATTCCGTTGTGT 3'	355	NM_002187.2
TGF- β		F: 5'GCGTGCTAATGGTGGAAC 3' R: 5'CGGTGACATCAAAAGATAACCAC 3'	279	NM_000660
β –actina*		F: AAAGACCTGTACGCCAACAC R:GTCATACTCCTGCTTGCTGAT	219	NM_001101.4

(*) Gen “housekeeping”, gen endógeno o gen de expresión constitutiva.

Anexo 5. Constancia de Identificación botánica de la especie *L. trabeculata*



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento Académico de Biología

La Molina, 02 de marzo de 2017.

CONSTANCIA

03-2017-HM-UNALM

Mediante la presente se informa que la muestra de alga proveniente de la Bahía de San Nicolás, distrito de Marcona, provincia de Nazca, departamento de Ica, recolectada por Eder Valdir Apumayta Suárez, correspondiente al proyecto "Desarrollo e implementación de procesos tecnológicos de validación analítica y bioactiva para fucoidano de algas pardas como suplemento nutricional para humanos"; convenio 143-PNICP-PIAP-2015, ha sido estudiada en el Herbario "A. Weberbauer" del Dpto. de Biología (MOL) de la Universidad Nacional Agraria La Molina para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en dicho espécimen permiten concluir que el mismo corresponde a la siguiente especie:

Especie

Lessonia trabeculata Villouta & Santelices

Familia

Lessoniaceae

Atentamente,

Mercedes Flores Pimentel
Jefe

Herbario "A. Weberbauer" (MOL)
Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Agraria La Molina

