

**EVALUACIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DEL EFECTO DEL EXTRACTO TOTAL  
ETÉREO DE LOS CALICES DE *Physalis peruviana* L, EN UN MODELO DE  
COLITIS EN RATA**

**JENNY PAOLA CASTRO GUERRERO**

**Investigador**



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**GRUPO DE EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS PROMISORIAS**

**COL 0075883**

**CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.**

**2013**

**EVALUACIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DEL EFECTO DEL EXTRACTO TOTAL  
ETÉREO DE LOS CALICES DE *Physalis peruviana* L, EN UN MODELO DE  
COLITIS EN RATA**

**Proyecto de grado presentado como requisito para optar el título de  
MAGISTER EN FARMACOLOGÍA**

**Luis Alberto Franco Ospina Q.F. PhD**

**Director del Proyecto**



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**GRUPO DE EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS PROMISORIAS**

**COL 0075883**

**CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.**

**2013**

**Nota de aprobación del Jurado**

---

---

---

---

**Presidente del Jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

La Universidad de Cartagena ni el jurado examinador, se hacen responsables de los conceptos emitidos en el presente trabajo

**CARTAGENA DE INDIAS D.T.Y C., 2013**

## Agradecimientos

A Jesucristo, que conociendo mi debilidad me sostuvo con su fuerza, amor y fidelidad a lo largo de este proceso.

A toda mi familia por el apoyo brindado, en especial a mi abuela Ena, mi tía Xiomara, mi tía Glevis, mi tía Mirna, mi tío Gabriel, y a mis padres Rocío Guerrero y Edgar Castro y a mis hermanas Olga y Diana.

Al cuerpo docente de la Maestría por los conocimientos impartidos.

A mis compañeras de la maestría Alejandra Herrera y Daneiva Caro quienes me permitieron compartir todo lo difícil y agradable de esta experiencia.

A los evaluadores por tomarse el tiempo para revisar mi proyecto y por sus valiosos aportes, que sin duda contribuyeron al desarrollo y éxito de este proyecto.

A mi tutor Luis Alberto Franco que más que un docente se ha convertido en un maestro para mí. Sus enseñanzas no solo me han dado la oportunidad de formarme académicamente si no de crecer como persona.

A todos los miembros del Grupo de Evaluación Biológica de Sustancias Promisorias en especial a Yanet Ocampo, David Rivera y Daneiva Caro, por la ayuda, el tiempo, la solidaridad y compañía que me brindaron, en todo este proceso.

A Rocío Lacera por sus consejos, paciencia, hospitalidad y por todas las horas de sueño que perdió mientras me daba apoyo moral y revisaba el proyecto.

Que Dios los bendiga a todos.

<b>1.</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.</b>	<b>ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII) .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Definición.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.2.1.</b>	<b>Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal en Colombia .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>Clasificación .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3.1.</b>	<b>Enfermedad de Crohn .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3.2.</b>	<b>Colitis Ulcerosa.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.4.</b>	<b>Manifestaciones clínicas.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.4.1.</b>	<b>Digestivas .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.4.2.</b>	<b>Manifestaciones extraintestinales.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5.</b>	<b>Patogenia .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5.1.</b>	<b>Enfermedad de Crohn .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5.2.</b>	<b>Colitis ulcerosa .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.6.</b>	<b>Diagnóstico .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.7.</b>	<b>Etiología de la EII.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.7.1.</b>	<b>Consideraciones genéticas.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.7.2.</b>	<b>Consideraciones ambientales .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.7.3.</b>	<b>Consideraciones de la respuesta inmune .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.7.3.1.</b>	<b>Sistema inmunológico intestinal .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.7.3.2.</b>	<b>Defectos de la regulación inmunitaria en la enfermedad inflamatoria intestinal. 31</b>	
<b>3.2.</b>	<b>MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA EII .....</b>	<b>34</b>

3.2.1.	Mieloperoxidasa (MPO).....	34
3.2.2.	Citocinas.....	36
3.2.2.1.	Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ):.....	37
3.2.2.2.	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	37
3.2.2.3.	Interleuquina 1 $\beta$ : (IL-1beta).....	38
3.2.2.4.	Interleuquina 4 (IL-4) .....	39
3.2.2.5.	Interleuquina 6 (IL-6): .....	39
3.2.2.6.	Interleuquina 10 (IL-10): .....	40
3.3.	PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE FÁRMACOS.....	41
3.3.1.	Productos naturales como fuente de fármacos para el tratamiento de la EII .....	42
3.3.2.	<i>Physalis peruviana</i> .....	43
3.3.2.1.	Función y constituyentes de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> .....	43
3.3.2.2.	Actividad antiinflamatoria de <i>Physalis peruviana</i> .....	44
3.4.	MODELOS ANIMALES PARA EVALUAR EII .....	46
3.4.1.	Modelos químicos para evaluar EII .....	47
3.4.1.1.	Modelo inducido por DSS .....	47
3.4.1.2.	Modelo inducido por Oxazolona .....	48
3.4.1.3.	Modelo inducido por iodacetamida .....	48
3.4.1.4.	Modelo inducido por indometacina .....	48
3.4.1.5.	Modelo inducido por polisacárido-péptidoglicano .....	49
3.4.1.6.	Modelo inducido por ácido acético .....	49
3.4.2.	Modelo de TNBS .....	49
4.	METODOLOGÍA .....	52
4.1.	Obtención del extracto total etéreo de los cálices de <i>Physalis peruviana L.</i> .....	52
4.2.	Preparación del extracto para su administración por vía intraperitoneal (IP):.....	52
4.3.	Material biológico .....	53

4.4.	Determinación de la Dosis Letal 50 (DL <sub>50</sub> ) del extracto total etéreo de los cálices <i>Physalis peruviana</i> .....	53
4.5.	Análisis histológico.....	54
4.6.	Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto total etéreo de <i>Physalis peruviana</i> , en un modelo subagudo (quince días) de colitis inducida por TNBS. ....	54
4.7.	Evaluación macroscópica del tejido colónico .....	55
4.8.	Medida de la actividad de la enzima Mieloperoxidasa (MPO).....	55
4.9.	Evaluación de los niveles de citocinas, en el tejido colónico.....	56
4.10.	Análisis estadístico.....	56
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
5.1.	Material vegetal .....	57
5.2.	Determinación de la dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> ) del extracto de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	57
5.3.	Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto total etéreo de <i>Physalis peruviana</i> , en un modelo subagudo (quince días) de colitis inducida por TNBS en ratas. ....	61
5.4.	Evaluación macroscópica del tejido colónico .....	62
5.5.	Análisis microscópico del ensayo de colitis .....	65
5.6.	Medida de la actividad de la enzima Mieloperoxidasa (MPO).....	68
5.7.	Medida de los niveles de citocinas. ....	69
6.	CONCLUSIÓN.....	72
7.	RECOMENDACIONES.....	72
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	74
9.	ANEXOS.....	81
9.1.	Anexo N°1. Identificación taxonómica de <i>Physalis peruviana</i> .....	81
9.2.	Anexo N°2. Equipos, reactivos y preparación de reactivos .....	82
9.3.	Anexo N°3. Cuidado de animales.....	85
9.4.	Anexo N°4. Test de toxicidad empleado para la evaluación de la toxicidad del extracto etéreo de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> L.....	87



9.5.	Anexo N°5. Registros de análisis histológicos.....	88
9.6.	Anexo N°6. Registro de peso e ingestión de alimento de animales en el ensayo de colitis inducida por TNBS. ....	90
9.7.	Anexo N°7. Registro de daño macroscópico de colon en el ensayo de colitis inducida por TNBS.....	91

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Mapa global de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

**Figura 2:** Biomarcadores inflamatorios de la mucosa en la EII

**Figura 3:** Lugar de recolección de los cálices de *Physalis peruviana*.

**Figura 4:** Dosis letal 50 del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*.

**Figura 5:** Análisis histológico de tejido hepático de ratones tratados con extracto total de los cálices de *Physalis peruviana* (P.p), calificado por un patólogo.

**Figura 6:** Análisis histológico de tejido renal de ratones tratados con extracto total de los cálices de *Physalis peruviana* (P.p), calificado por un patólogo.

**Figura 7:** Medida del consumo de alimento y la variación de peso durante la administración subaguda (quince días) de P.p. (extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*) en ratas con colitis inducida por instilación intrarectal de TNBS (40mg/mL):

**Figura 8:** Segmentos colónicos de los grupos incluidos en el estudio de colitis inducida por TNBS.

**Figura 9:** Análisis macroscópicos de los segmentos colónicos obtenidos de ratas con colitis inducida con TNBS (40mg/mL vía IP) y tratadas con 62.5 mg/kg de P.p (Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*).

**Figura 10:** Análisis histológico de los segmentos colónicos obtenidos de ratas con colitis inducida con TNBS (40mg/mL vía IP) y tratadas con 62.5 mg/kg de P.p (Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*), calificado por un patólogo.

**Figura 11:** Análisis histológico de tejido hepático obtenidos de ratas con colitis inducida con TNBS (40mg/mL vía IP) y tratadas con 62.5 mg/kg de P.p

(Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*), calificado por un patólogo.

**Figura 12:** Análisis histológico de tejido renal obtenidos de ratas con colitis inducida con TNBS (40mg/mL vía IP) y tratadas con 62.5 mg/kg de P.p (Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*), calificado por un patólogo

**Figura 13:** Efecto del extracto de *P. peruviana*, sobre la actividad de la MPO.

**Figura 14:** Efecto del extracto de *P. peruviana*, sobre la actividad de la TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, e IL-10.

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1:** Clasificación de la enfermedad de Crohn

**Tabla 2:** Clasificación de la colitis ulcerosa

**Tabla 3:** Metabolitos secundarios presentes en los cálices de *Physalis peruviana*

**Tabla 4:** Distribución de los grupos de estudio en el ensayo de colitis subaguda

**Tabla 5:** Toxicidad aguda en ratones veinticuatro horas después de la administración del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*.

**Tabla 6:** Actividad de la enzima MPO observada en los segmentos colónicos obtenidos de los grupos incluidos en el estudio de colitis inducida por TNBS.

## **LISTA DE ANEXOS**

**Anexo N°1.** Identificación taxonómica de *Physalis peruviana*

**Anexo N°2.** Equipos, reactivos y preparación de reactivos

**Anexo N°3.** Cuidado de animales

**Anexo N°4.** Test de toxicidad empleado para la evaluación de la toxicidad del extracto etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* l.

**Anexo N°5.** Registros de análisis histológico

**Anexo N°6.** Registro de peso e ingestión de alimento de animales en el ensayo de colitis inducida por TNBS.

**Anexo N°7.** Registro de daño macroscópico de colon en el ensayo de colitis inducida por TNBS.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

- CI: Colitis Indeterminada
- CU: Colitis ulcerosa
- COX-1: Ciclooxygenasa 1
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- DL<sub>50</sub>: Dosis letal 50
- DO: Densidad óptica
- DSS: Dodecil sulfato de sodio
- EC: Enfermedad de Crohn
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- EII: Enfermedad inflamatoria intestinal
- ERN: Especies reactivas de nitrógeno
- ERO: Especies reactivas de oxígeno
- HTAB: Hexadeciltrimetilamonio
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogeno
- IFN- $\gamma$ : Interferón gamma
- IL-1beta: Interleuquina 1 $\beta$
- IL-4: Interleuquina 4
- IL-6: Interleuquina 6
- IL-10: Interleuquina 10
- IP: Intraperitoneal
- INS: Instituto Nacional de Salud
- MPO: Mieloperoxidasa
- PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>
- P.p.: *Physalis peruviana*
- PVP: Polivinilpirrolidona
- Rpm: Revoluciones por minuto
- ERO: Especies reactivas de oxígeno
- TNBS: Ácido trinitrobencenosulfónico
- TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

## 1. RESUMEN

Bajo la denominación de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se engloban un conjunto de alteraciones inflamatorias del intestino, unas de causa conocida (infecciosa, autoinmune, física y química) y otras en las que no se conoce el agente causal, que son fundamentalmente la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Las terapias utilizadas actualmente para su tratamiento presentan importantes efectos adversos y tolerancia por parte de algunos pacientes.

La especie *Physalis peruviana* L. (P.p.), conocida comúnmente como uchuva, es originaria de los Andes suramericanos y es una de las especies más conocidas de este género. Es extensamente utilizada en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, perfilándose como una promisoriosa fuente de moléculas activas. Además reportes de varios estudios científicos realizados demuestran esta actividad en extractos y fracciones de algunas especies de este género.

En este proyecto se evaluó el efecto antiinflamatorio del extracto total etéreo de cálices de *Physalis peruviana* L, en un modelo subagudo de colitis en ratas y su efecto sobre algunos marcadores inflamatorios.

El extracto total de los cálices de *Physalis peruviana* se obtuvo por percolación con éter de petróleo y posteriormente se determinó su dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>). El efecto antiinflamatorio se evaluó en ratas a las cuales se les indujo EII empleando ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS). El tejido colónico extraído de los animales, fue evaluado a nivel macroscópico y microscópico. Adicionalmente en el tejido colónico se determinó la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), así como los niveles de TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral alfa), INF- $\gamma$  (interferón gamma), IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, e IL-10.

Los resultados obtenidos demuestran la actividad antiinflamatoria del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*, puesto que logró reducir

significativamente las puntuaciones de inflamación macroscópica, extensión y gravedad del daño en el tejido y la relación de peso/longitud del colon en comparación con el grupo control tratado con TNBS, sin ejercer toxicidad renal o hepática. A nivel histológico el extracto indujo una notable restauración de la citoarquitectura intestinal normal a través de la disminución del edema, necrosis transmural y la infiltración de células inflamatorias. Estos resultados fueron confirmados bioquímicamente a través de la disminución de la actividad de la enzima MPO colónica, y la reducción de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mientras que el IFN- $\gamma$ , la IL-4, IL-6 e IL-10 no se modificaron.

Los cálices de *Physalis peruviana* constituyen una fuente prometedora de metabolitos que podrían ser utilizados para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Corroborando el uso de esta especie como antiinflamatoria en la medicina popular.



## 2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad intestinal inflamatoria (EII), es un desorden inflamatorio crónico del tracto gastrointestinal que incluye la enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) y colitis indeterminada (CI); las cuales tienen como común denominador la inflamación crónica y recurrente del tracto gastrointestinal, producto de alteraciones en la activación del sistema inmune de la mucosa intestinal. Su tasa de incidencia ha sufrido un notable incremento, convirtiéndose en una patología que representa una importante causa de morbilidad a nivel mundial (1-3).

La EII se caracteriza por la presencia de edema, incremento de la permeabilidad epitelial y una excesiva infiltración de células inmunes activadas, representadas principalmente por neutrófilos, macrófagos y células T citotóxicas. Estas células contribuyen significativamente a la necrosis del tejido y disfuncionalidad de la mucosa, lo cual puede ocurrir directamente mediante contacto físico o indirectamente a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), proteínas citotóxicas, enzimas o citocinas como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina IL-1 $\beta$  que tienen un importante papel en el desarrollo de esta patología. Aparentemente la IL-1 $\beta$  es el principal causante de la diarrea, que es a su vez el principal síntoma de la inflamación intestinal, aunque se piensa que IL-2, IL-6, IL-8 y la IL-4 también puedan estar implicadas (4, 5).

Debido a que no se cuenta con terapias curativas para la colitis ulcerosa, el alivio de los síntomas y el mantenimiento de la calidad de vida se han convertido en el objetivo del tratamiento. Las terapias utilizadas actualmente para tratar la EII incluyen: glucocorticosteroides, 5-aminosalicilatos, sulfasalazina, inmunosupresores y anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha$ , los cuales presentan importantes efectos secundarios para el paciente, y en ocasiones pueden incrementar el costo de la terapia debido a la necesidad de

un tratamiento adicional, además algunos pacientes presentan resistencia, incluso a la utilización combinada de estos agentes. Estas razones convierten en prioridad la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas más seguras y eficaces para el tratamiento de esta patología (6, 7). En este sentido la especie *Physalis peruviana* (uchuva), se perfila como una promisoriosa fuente de moléculas activas, por su extenso uso en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y cáncer. Lo cual ha dado lugar al desarrollo de diversos estudios realizados en esta planta alrededor de estas actividades biológicas, que ratifican su potencial antiinflamatorio.

Los productos naturales han servido de fuente de inspiración para una gran fracción del arsenal terapéutico con que se cuenta en la actualidad. A pesar de las diferentes estimaciones en la definición de lo que es considerado un fármaco derivado de un producto natural, se estima que entre el 25 – 50% de los productos farmacéuticos usados actualmente se derivan de productos naturales (8, 9). La búsqueda de moléculas bioactivas mantiene su vigencia, por lo que hoy en día las investigaciones encaminadas al desarrollo de nuevos y potentes agentes terapéuticos se centran en el estudio de las plantas utilizadas en la medicina tradicional. Sin embargo en el tema específico de la EII, se han realizado muy pocas investigaciones encaminadas a aprovechar las propiedades terapéuticas de las plantas como una fuente potencial de nuevos agentes terapéuticos. Por tanto, este proyecto de investigación contribuye a explorar el potencial farmacológico de las plantas medicinales, a través del estudio de la actividad antiinflamatoria de *Physalis peruviana* como una herramienta que contribuirá al desarrollo de nuevas terapias para tratar la EII.

*Physalis peruviana*, debido a su alto valor nutricional por su contenido de vitaminas (A, C, K y del complejo B), minerales (calcio y fosforo), antioxidantes y a las diversas propiedades medicinales que se le atribuyen, se ha convertido en una especie de gran importancia comercial en muchos países del mundo, incluyendo Colombia, donde su producción presenta una

alta demanda de los mercados europeos (97%), seguidos de Asia y Estados Unidos (3%). Esta planta es ampliamente utilizada en la medicina popular como diurética, antiséptica, antifúngica, antibacteriana, anticancerígeno, antimalárico y antiinflamatorio (10-13)

Actualmente existen varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, que corroboran la actividad antiinflamatoria de *Physalis peruviana*, sin embargo hasta la fecha no se cuenta con ningún reporte, donde se evalúe el efecto del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* en un modelo animal de EII (14-17).

En este proyecto se evaluó el efecto antiinflamatorio del extracto total etéreo de cálices de *Physalis peruviana* L., en un modelo animal de EII, llevado a cabo durante quince días. En el transcurso del ensayo se evaluó la variación de peso y consumo de alimento por parte de los animales. En el último día del ensayo los animales fueron sacrificados y se extrajo el intestino grueso, al cual se le determinó la severidad del daño colónico, la extensión de las áreas lesionadas y la relación de peso / longitud del colon. Además se le realizó un análisis histológico. En sobrenadantes de tejido colónico, se determinó la actividad de la enzima MPO y el efecto sobre los mediadores inflamatorios: TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-4 e IL-10.

Los resultados obtenidos en este proyecto mostraron la actividad antiinflamatoria del extracto total de los cálices de *Physalis peruviana* en un modelo de colitis inducida por TNBS y su efecto sobre algunos marcadores inflamatorios relacionados con la EII.

### **3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

#### **3.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)**

##### **3.1.1. Definición**

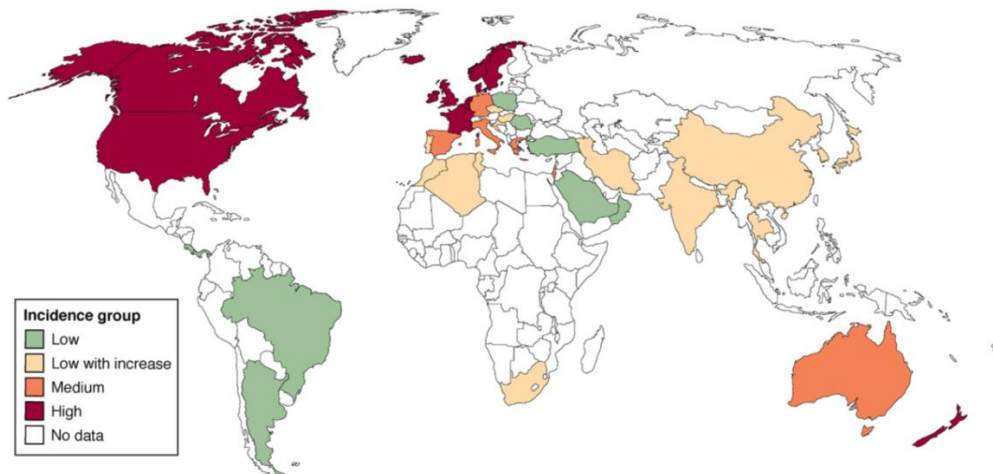
El término enfermedad inflamatoria intestinal (EII) hace referencia a aquellos procesos inflamatorios crónicos e idiopáticos que afectan el tracto gastrointestinal, cuyas dos formas principales son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Cuando a partir del diagnóstico no es posible distinguir entre CU y EC, se aplica el término de colitis indeterminada (CI). La enfermedad de Crohn puede afectar cualquier parte del tracto digestivo, desde los labios hasta el margen anal, aunque con más frecuencia se localiza en el íleon distal y en el colon; además la inflamación se extiende a toda la pared intestinal, desde la mucosa hasta la serosa. En contraste, la colitis ulcerosa afecta solamente el intestino grueso. Ambas enfermedades están asociadas a manifestaciones extraintestinales que pueden afectar la piel, los ojos, el esqueleto, el hígado, el páncreas y raramente otros órganos como pulmones y corazón (1, 18, 19).

##### **3.1.2. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal**

La incidencia de la enfermedad inflamatoria intestinal varía entre las diferentes zonas geográficas. Tradicionalmente, se ha considerado a la EII como una patología frecuente en países industrializados y las incidencias más altas se encuentran en Europa y Norteamérica, lo que señala la importancia de factores ambientales, dietéticos y genéticos en la patogénesis de la enfermedad. Los países de Europa Oriental, África, Suramérica y Asia; tienen incidencia más baja, por lo que a estas regiones del mundo se les denomina tradicionalmente zonas de bajo riesgo. Sin embargo, revisiones realizadas por Pineda *et al.* 2010 y Cosnes, *et al.* 2011, muestran un cambio en la tendencia de estos patrones tradicionales de incidencia, puesto que regiones que habitualmente se consideraban de bajo riesgo presentan un incremento

progresivo alcanzando en algunas áreas niveles comparables a los de los países desarrollados (20, 21). Estos datos indican que la brecha epidemiológica convencional norte-sur cada día se está cerrando más y que los paradigmas epidemiológicos previos deben ser reevaluados. Además este cambio rápido de incidencia sugiere que factores como estilo de vida, dieta, urbanización y otros cambios ambientales tienen un papel etiológico importante en la EII (Figura 1) (1, 19, 22, 23).

En general los datos de países en desarrollo son escasos y carecen de calidad metodológica, pero la mayoría sugieren bajas tasas de incidencia. Tal es el caso de Colombia, donde no se disponen de datos concluyentes acerca de la incidencia de EII; sin embargo, algunos estudios sugieren una tendencia similar a la mundial registrando un significativo incremento del número de pacientes que padecen esta enfermedad en los últimos años (20, 24).



**Figura 1:** Mapa global de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Los colores indican la clasificación por incidencia anual. Rojo (10/105), naranja (5-10/105), verde (>4/105). El color amarillo representa países con baja incidencia que crece continuamente. La ausencia de color indica la ausencia de datos. Cosnes, *et al.* 2011, (21).

La edad más frecuente para el comienzo de la enfermedad está situada entre los quince y treinta años. Se produce un segundo pico entre los

sesenta y ochenta años. La proporción entre varones y mujeres es de 1:1 para la CU y de 1:2 para la EC. Los estudios epidemiológicos de susceptibilidad a EII, indican una relación entre factores genéticos y ambientales. En Estados Unidos, Europa y Sudáfrica se ha descrito una incidencia dos a cuatro veces mayor de ambas enfermedades en la población judía. Además, la enfermedad difiere entre las diferentes poblaciones judías. La prevalencia de EII entre los judíos asquenazí es alrededor del doble que entre los nacidos en Israel, los sefardíes y los judíos orientales. La prevalencia disminuye progresivamente en caucásicos no judíos, afroestadounidenses, hispanos y asiáticos. Las zonas urbanas tienen prevalencia más alta de EII que las rurales, al igual que las clases socioeconómicas más altas en comparación con las más bajas (19).

Se sabe, que inmigrantes de países en vías de desarrollo tienen un riesgo más alto de EII en su país desarrollado adoptivo, comparado al que tendrían si se hubieran quedado en su lugar de origen, lo que sugiere que existe un factor ambiental precipitante muy importante en los países desarrollados. Se ha postulado que estos factores ambientales están relacionados con cambios en la ecología microbiana del tracto digestivo inducidos por cambios en la dieta y otros hábitos adquiridos en el país de destino, pero esta hipótesis aún no se ha probado. Adicionalmente, se especula que exposición a infecciones entéricas con bacterias, parásitos o virus a una edad temprana podría inducir tolerancia inmunológica y disminuir el riesgo futuro de EII (1).

Otro aspecto asociado con la aparición de EII es la apendicectomía, siendo un factor que disminuye el riesgo de padecer colitis ulcerosa, pero no de enfermedad de Crohn. Los mecanismos que podrían explicar esta observación epidemiológica aún no se conocen (25, 26).

El consumo de tabaco es un factor de riesgo para la enfermedad de Crohn. Fumadores tienen un curso clínico peor que no fumadores. Sin

embargo, dejar de fumar es un factor de riesgo para colitis ulcerosa. Esta observación dio lugar a que se trataran pacientes con colitis ulcerosa con nicotina transdérmica (27, 28).

Existe un gradiente norte-sur en la incidencia de la EII. Regiones geográficas de latitudes altas en Norteamérica tienen mayor prevalencia e incidencia de EII y el mismo patrón existe en Europa. Una posible razón para explicar este patrón de incidencia podría ser la diferencia de exposición ambiental al sol y la diferencia que ello genera en la suficiencia de síntesis cutánea de vitamina D. La deficiencia de vitamina D es común en latitudes nórdicas debido a que la radiación solar ultravioleta B (UVB) tiene suficiente energía solamente seis meses al año para generar síntesis cutánea de vitamina D debido a factores climáticos. Adicionalmente, el uso de lociones con bloqueador solar no deja que pasen los rayos UVB, incluso en el verano. En modelos experimentales de colitis crónica se ha demostrado que la deficiencia de vitamina D agrava la inflamación, mientras que la suplementación de vitamina D alivia la inflamación intestinal en este modelo (29).

#### **3.1.2.1. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal en Colombia**

En Colombia no se disponen de datos concluyentes sobre la incidencia y prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal; actualmente solo se cuenta con dos estudios, uno realizado en el Hospital Pablo Tobón Uribe, entre agosto de 2001 y julio de 2009 y otro realizado en la ciudad de Cartagena en el 2010. En el estudio realizado en la ciudad de Cartagena, Yepes *et al.* 2010, estudiaron 26 pacientes con EII para calcular su prevalencia en esta ciudad. Seis individuos tenían EC y 20 CU. La prevalencia general estimada para la EII fue de  $29 \times 10^5$  (22). Otro estudio de tipo observacional descriptivo realizado por Juliao *et al.* 2010, en el Hospital Pablo

Tobón Uribe, de la ciudad de Medellín, entre agosto de 2001 y julio de 2009, mostró el comportamiento clínico de 202 pacientes que presentaban diagnóstico de EII, con una relación de CU y EC de 5:1 y una distribución similar por géneros (30).

### 3.1.3. Clasificación

#### 3.1.3.1. Enfermedad de Crohn

Se puede definir como un proceso inflamatorio crónico que puede afectar a cualquier región del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano. La lesión inflamatoria es transmural, asimétrica y discontinua. La enfermedad se caracteriza por un curso clínico prolongado y variable, por la diversidad de las manifestaciones clínicas, por las complicaciones perianales y sistémicas. Esta enfermedad se puede clasificar según la edad de diagnóstico, la localización y el comportamiento de la enfermedad (Tabla 1) (31).

**Tabla 1:** Clasificación de la enfermedad de Crohn

<b>Clasificación según la edad de diagnóstico (A)</b>	
A1	16 años o menos
A2	17- 40 años
A3	> 40años
<b>Localización (L)</b>	
L1	Ileon terminal
L2	Colon
L3	Ileocolónica
L4	Tracto digestivo alto
<b>Patrón clínico (B)</b>	
B1	No-estenosante, no fistulizante, inflamatorio
B2	Estenosante
B3	Fistulizante



### 3.1.3.2. Colitis Ulcerosa

La colitis ulcerosa se puede definir como un proceso inflamatorio ulcerativo agudo, subagudo o crónico de la mucosa recto-colónica que se extiende de manera proximal y continua desde el recto hasta ciego, en diferente grado. Esta enfermedad ha sido clasificada según su extensión y severidad (Tabla 2) (31).

**Tabla 2:** Clasificación de la colitis ulcerosa

<b>Extensión (E)</b>
Proctitis ulcerosa (E1): afección limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea)
Colitis izquierda o colitis distal (E2): afección limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico)
Colitis extensa o pancolitis (E3): afección que se extiende más allá del ángulo esplénico.
<b>Gravedad (S)</b>
Colitis en remisión o colitis saliente (S0): no hay síntomas de la enfermedad.
Colitis leve (S1): cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia y anemia.
Colitis moderada (S2): criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leve.
Colitis grave (S3): seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis y taquicardia

### 3.1.4. Manifestaciones clínicas

#### 3.1.4.1. Digestivas

Los principales síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal son diarrea, rectorragia, tenesmo, secreción de moco y dolor abdominal de tipo cólico o "retortijón", fiebre, taquicardia y pérdida de peso. La intensidad de los síntomas depende de la extensión de la enfermedad. Aunque en general suele tener una presentación aguda, los síntomas por lo común ya han estado presentes durante semanas o meses. En ocasiones, la diarrea y la hemorragia son tan

intermitentes y leves que el paciente no solicita atención médica (19, 31).

#### **3.1.4.2. Manifestaciones extraintestinales**

La EII se asocia a diversas manifestaciones extraintestinales; hasta un tercio de los pacientes presentan al menos una. Los pacientes con EC perianal son los que corren mayor riesgo de presentar estas manifestaciones con respecto a los demás pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. En algunos casos, manifestaciones extraintestinales pueden ser la carta de presentación de la EII. Casi todos los sistemas del organismo pueden ser afectados por manifestaciones extraintestinales en la EII, encontrándose afecciones de tipo dermatológico, reumatológicas, oculares, urológicas, entre otras (1, 19).

#### **3.1.5. Patogenia**

##### **3.1.5.1. Enfermedad de Crohn**

Por ser una enfermedad de inflamación transmural, la pared intestinal aumenta de grosor involucrando las capas submucosa, muscular, serosa y la grasa mesentérica, provocando adherencia excesiva a los órganos cercanos. Las lesiones macroscópicas son aparentes en la capa mucosa y serosa de la pared intestinal. La apariencia de la mucosa es heterogénea, presentando ulceraciones de diferente tamaño que pueden alcanzar la capa muscular para dar lugar a abscesos o fístulas con órganos o pliegues intestinales adyacentes. En el caso de ulceraciones severas, se presenta una pérdida total de la integridad de la mucosa, con la consecuente formación de estenosis. De manera histológica, la EC se caracteriza por la agregación de macrófagos y formación de granulomas no caseificantes, presencia de agregados linfoides transmurales, hiperplasia de la fibra nerviosa, obliteración fibromuscular,

desorganización discontinua de la arquitectura de las criptas y la presencia de fisuras (32, 33).

La enfermedad de Crohn se caracteriza por una respuesta Th1 y Th17. El fenotipo Th1 en la enfermedad de Crohn esta mediado por la IL-12, el factor de crecimiento TGF- $\beta$  y los factores de transcripción STAT-4, STAT-1 y T-bet, lo que desemboca en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, e IL-18 que estimula a los macrófagos a la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Por su parte la IL-6, IL-23, TGF- $\beta$  y ROR $\gamma$ t, median la diferenciación de linfocitos Th17. (18, 32, 33).

### **3.1.5.2. Colitis ulcerosa**

El aspecto macroscópico varía con la severidad de la enfermedad y se caracteriza por la presencia de lesiones que usualmente se limitan a la mucosa. En la forma aguda, la superficie de la mucosa se observa húmeda y brillante por la abundancia de sangre, moco y hemorragias petequiales. Las úlceras en general son superficiales con bordes irregulares y socavados. El proceso continuo de daño y regeneración que se presenta en las zonas inflamadas, provoca el crecimiento de pseudopolipos, característicos de las formas más severas de CU. Al presentarse pancolitis, las haustras desaparecen, generando acortamiento generalizado del colon. En general, las úlceras profundas fisurantes no son observadas, a excepción de los casos donde se presenta megacolon tóxico (34, 35).

Histológicamente, la CU se caracteriza por la presencia de un proceso inflamatorio agudo asociado con la destrucción de las células de la mucosa, en particular células epiteliales, e infiltración de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas (plasmocitosis basal). Es también usual la depleción de células mucosas y metaplasia de células de Paneth. La pérdida y destrucción de la arquitectura de las criptas, así como la formación

de abscesos crípticos, se presentan en todos los estados de la enfermedad. La inflamación de las criptas (criptiditis) es también característico de la EC, sin embargo se considera un criterio de diagnóstico pues se presenta con mayor frecuencia en CU (41%) que en EC (19%).(34, 35).

La colitis ulcerosa se caracteriza por una respuesta Th2. El fenotipo Th2 en la colitis ulcerosa esta mediado por la IL-4 y los factores de transcripción STAT6 y GATA3; trayendo como consecuencia la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-5, IL-9 e IL-13 (18, 32, 33).

### **3.1.6. Diagnóstico**

No existe una prueba diagnóstica única para determinar que un paciente tiene enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. El diagnóstico se hace basado en la historia clínica, examen físico, exámenes de laboratorio, imágenes, colonoscopia y estudio patológico de biopsias o especímenes de resección (1, 19).

### **3.1.7. Etiología de la EII**

La etiología de la EII es desconocida. No obstante, el progreso alcanzado en el estudio de la EII en los últimos años, ha permitido identificar el papel importante que juega la interacción de factores genéticos, ambientales y alteraciones en la respuesta inmune del hospedador. En consenso general, se acepta que estos factores no son independientes, sino que se fusionan en vías funcionales compartidas que son necesarias para que la EII sea clínicamente aparente (19, 36-38).

#### **3.1.7.1. Consideraciones genéticas**

La sospecha de un componente genético que contribuye a la susceptibilidad a EII, inició con la observación de la historia familiar como el principal factor de riesgo para su desarrollo.(39) La EII se

distribuye por familias. Si un paciente la padece, el riesgo a lo largo de la vida que tienen los familiares de primer grado de verse afectados por la enfermedad es de casi 10%. Si los padres tienen una enfermedad inflamatoria intestinal, cada hijo tiene 36% de probabilidades de sufrirla también. En los estudios con gemelos, 67% de los monocigotos eran concordantes para la EC y 20% para la CU, mientras que 8% de los dicigotos lo eran para la EC y ninguno era concordante para la CU. También existen concordancias en cuanto a las localizaciones anatómicas y los tipos clínicos de EC entre las familias (19, 40, 41).

Búsquedas en el genoma han señalado varios loci de susceptibilidad para la EII, a través de *Genome wide association studies* (GWAS) o Estudio de asociaciones genéticas en el genoma completo. GWAS consiste en examinar el ADN de diferentes individuos de una especie para investigar cuánta variación existe entre los genes de diferentes sujetos. Muchos investigadores están dedicados a examinar el significado de los marcadores genéticos identificados a través de GWAS, para relacionarlos con EII, identificado más de 30 loci de susceptibilidad para esta patología, lo que ha permitido expandir el repertorio de vías patogénicas previamente insospechadas. (1, 19).

### **3.1.7.2. Consideraciones ambientales**

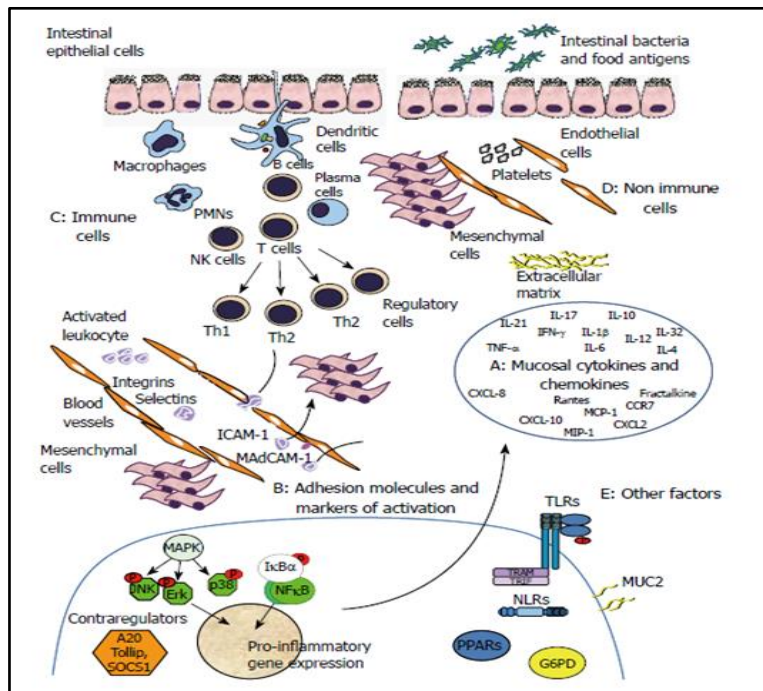
Los factores ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. Dentro de estos factores se encuentran el uso de antibióticos, anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), dieta, infecciones sistémicas, estrés y tabaquismo (42). Desafortunadamente, el mecanismo por el cual estos factores inician o reactivan la EII no es conocido. Desde una perspectiva amplia, podría afirmarse que estos factores alteran la integridad de la barrera mucosa, de la respuesta inmune y del

microambiente luminal, incrementando la susceptibilidad de la inflamación. (43).

### 3.1.7.3. Consideraciones de la respuesta inmune

#### 3.1.7.3.1. Sistema inmunológico intestinal

El estado normal del sistema inmunitario intestinal es el de respuestas inmunitarias inhibidas frente a los contenidos luminales, a causa de la tolerancia oral que se produce en los individuos normales. En el proceso de tolerancia están implicados múltiples mecanismos del epitelio intestinal, sistema innato y adaptativo. En la EII se altera este estado de supresión de la inflamación intestinal regulado, lo que provoca inflamación incontrolada. Los mecanismos que mantiene la regulación de este estado de supresión inmunitaria todavía no se conocen a fondo (19).



**Figura 2:** Biomarcadores de la mucosa en EII. A: Citocinas y quemoquinas; B: moléculas de adhesión (MadCAM, ICAM-1, etc) y activación de marcadores intracelulares (MAPK y NK- $\kappa$ ); C: células inmunes (monocitos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos, NK, etc); D: células no inmunes (células endoteliales, plaquetas, etc); E: otros factores (toll-like receptor (TLR), NLRs, mucina(MUC), etc). Scalfaferrri, *et al.* 2010, (34)

### **3.1.7.3.2. Defectos de la regulación inmunitaria en la enfermedad inflamatoria intestinal.**

En lo que se refiere a la EII, se puede hablar de cinco marcadores inflamatorios de la mucosa, que juegan un rol fundamental en el desequilibrio de la respuesta inmune, que se presenta en esta enfermedad: Citocinas, células inmunes, células no inmunes, moléculas de adhesión y otros componentes de la mucosa ( Figura 2) (34).

El desequilibrio de estos marcadores en la EII, se debe básicamente a alteraciones en función de las células epiteliales, defectos en la respuesta inmune innata y defectos en la respuesta inmune adaptativa.

- **Células epiteliales y respuesta inmune innata:** El sistema innato es la primera línea de defensa contra agresores como bacterias, virus, parásitos, toxinas y xenobióticos. El sistema innato está formado por barreras mecánicas y funcionales que impiden la invasión de gérmenes. En el intestino, el moco que recubre su superficie, las células epiteliales, sustancias antimicrobianas secretadas por las células de Paneth (defensinas y catelecidina), células dendríticas, macrófagos y las células NK “natural killer” (“asesinas naturales”), forman parte de este sistema (1).

La barrera epitelial de los pacientes con EII tiene menor resistencia, lo que incrementa la permeabilidad. Por el momento se han propuesto diferentes hipótesis para explicar este fenómeno como la reducción de la secreción de mucina en pacientes con EII, quienes frecuentemente poseen compromiso en el grosor y actividad de la capa mucosa (34).

La expresión de TLR, en especial TLR4, se incrementa significativamente en células epiteliales intestinales y en células dendríticas, durante la EII, en comparación con individuos normales. La activación de TLR4 aumenta la secreción de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6, lo que resulta en la activación de NK- $\kappa$  $\beta$ , STAT-1, MAPKs y PPAR; produciendo efectos pro y antiinflamatorios. La sobreexpresión o inhibición de este receptor afecta la función de la barrera epitelial (35).

Mutaciones en el receptor NOD2 se han asociado con la EC y no en CU, y está presente en aproximadamente el 40% de los pacientes. Esta mutación impiden la habilidad del NOD2 para reconocer su ligando MDP (muramildipeptido) (35, 44).

La expresión aberrante de Linfopietina estromal tímica (TSLP), que es constitutivamente expresado por las células epiteliales intestinales, en particular en el colon, se relaciona directamente con ambas formas de EII. Alteraciones por aumento o defecto de TSLP, inducen respuesta adaptativas exageradas y conducirá al desarrollo de EC y CU (43, 45).

Alteraciones en la expresión del HLA (antígenos leucocitarios humanos), en la N-cadherina, en el gen de multirresistencia a fármacos y la interacción entre integrinas ( $\alpha$ 4 $\beta$ 7) y sus ligandos (MadCAM-1), se asocian con EII (19, 34).

**Respuesta inmune adaptativa:** Los linfocitos B y T constituyen el sistema inmunológico adaptativo, el cual permite a un individuo desarrollar una respuesta



específica a un antígeno y retener memoria de esa exposición. La memoria inmunológica permite una reacción rápida y vigorosa a la reexposición de antígeno, lo cual es la base de la vacunación. Las células B producen anticuerpos contra el antígeno (inmunidad humoral) mientras que las células T tienen mecanismos que atacan al antígeno directamente o a través de la activación de otras células (inmunidad celular). Células dendríticas, macrófagos y posiblemente otras células como basófilos son capaces de presentar antígenos a células T y determinar su diferenciación. Según el microambiente conformado por citoquinas específicas, la presentación de antígeno a células T vírgenes (“naive” en inglés) puede dar lugar a células T efectoras o a células T reguladoras. Las células T efectoras pueden ser Th1, Th2 o Th17 y se diferencian por las citoquinas que producen. Por ejemplo, Th1 produce una gran cantidad de interferón- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , Th2 interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13, mientras que Th17 produce IL-17 (1, 19, 33, 46).

En la enfermedad de Crohn se encuentra una predominancia de células efectoras Th1 y Th17, mientras que la colitis ulcerosa se caracteriza por una respuesta Th2 modificada, con un papel importante de células NK. (1, 19, 46). En la EII los Treg, que son los linfocitos encargados de mantener homeostasis de la respuesta adaptativa mediada por células, disminuyen su población circulante y aumentan en la lámina propia, en periodos activos de la enfermedad. El predominio de linfocitos Th1 y Th2, sobre la población Treg, causa la acumulación de mediadores inflamatorios como óxido nítrico, radicales

libres, prostaglandinas, leucotrienos, histamina y proteasas, los cuales son directamente responsables de la destrucción del tejido colónico que se produce durante la inflamación (18, 34). Una vez que se inicia en la EII la respuesta inflamatoria inmunitaria se perpetúa como consecuencia de la activación de las células T. y una cascada secuencial de mediadores inflamatorios actúa para amplificar la respuesta; cada paso es un objetivo potencial del tratamiento. (19)

### **3.2. MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA EII**

#### **3.2.1. Mieloperoxidasa (MPO)**

La mieloperoxidasa es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, encontrándose en diferentes fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial y semen, entre otros) y tejidos (corazón, riñón, piel, hígado y placenta). Sin embargo su fuente fundamental son los neutrófilos, donde se encuentra localizada a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos y constituye del 2-5 % de las proteínas. La MPO contribuye a la primera línea de defensa del organismo, al liberarse en vacuolas fagocíticas durante la activación neutrófilos y catalizar la conversión del peróxido de hidrógeno y del cloruro a ácido hipocloroso, un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos. Sin embargo, en procesos de inflamación crónica e incontrolable, presente en algunos procesos patológicos, puede ser capaz de actuar sobre las células del hospedero y debido a su amplio espectro de reactividad generar especies reactivas de oxígeno, asociadas con un aumento del riesgo al estrés oxidativo. En estos casos se reporta un aumento significativo de la actividad de MPO, relacionado con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado; por lo que la medición de esta actividad enzimática ha sido considerada un sensible marcador cuantitativo de la quimiotaxis y

de la infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio y un indicativo de estrés oxidativo (36-40).

El sistema MPO-peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) – haluro, inicia con la reacción de la enzima MPO con el  $H_2O_2$  proveniente de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa. Este complejo se combina con el haluro, generalmente cloruro, que se oxida para formar el ácido hipocloroso. El ácido hipocloroso es un potente agente oxidante que si bien contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos, puede actuar sobre las células del hospedero lo que provocaría inactivación provocando daño a nivel de proteínas y ácidos grasos de la membrana. De aquí que el ácido hipocloroso es un candidato a causar mucho del daño mediado por neutrófilos en enfermedades inflamatorias (37, 40).

La inflamación crónica del intestino grueso inducida por TNBS, produce la infiltración de leucocitos, principalmente de neutrófilos y por consiguiente un aumento en la actividad de la enzima MPO, la cual se encuentra predominantemente en los gránulos primarios de los neutrófilos y cataliza la formación de potentes oxidantes citotóxicos (ERO y ERN), que causan estrés oxidativo en la mucosa intestinal, dañando las células epiteliales y deteriorando la integridad de la barrera de la mucosa intestinal (31, 47-49).

La medición de la actividad de la MPO se puede realizar mediante inmunoensayos enzimáticos (ELISA), los cuales son altamente selectivos y sensitivos, además permiten medir la actividad MPO en una gran variedad de lisados celulares y fluidos, siendo de fácil realización pero algo costosos. También existen métodos colorimétricos que a pesar de no ser tan sensibles son confiables, de fácil ejecución y mucho más económicos, uno de los compuestos más empleados para este tipo de ensayo es la O-dianisidina. Este ensayo

se fundamenta en la capacidad que tiene la mieloperoxidasa de oxidar a la O-dianisidina, al emplearla como un sustrato donador de electrones. La O-dianisidina al ser oxidada se convierte en un compuesto cromógeno amarillo anaranjado cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente a 460nm (41)

### **3.2.2. Citocinas**

Las citocinas son un grupo de moléculas mensajeras que transportan información de una célula a otra, son una familia de proteínas pleiotrópicas (que afecta la actividad de múltiples células) de relativamente bajo peso molecular, producidas por la mayor parte de las células del organismo, aunque los linfocitos T y los macrófagos son las principales fuentes. Son farmacológicamente activas mostrando efectos tanto benéficos como patológicos sobre las células diana. Se han identificado más de 200 citocinas las cuales se encuentran catalogadas dentro de alguno de los siguientes subgrupos: interleucinas, factores de crecimiento, quimiocinas, interferones y factores estimulantes de colonias. Tradicionalmente las citocinas se han dividido en función de su actividad sobre el proceso inflamatorio en antiinflamatorias y pro-inflamatorias. Las citocinas que median funciones proinflamatorias pueden ser inhibidas por citocinas antiinflamatorias o por antagonismo del receptor específico de esa citocina. Este balance entre factores inductores e inhibitorios es fundamental para el normal funcionamiento celular, de tal forma que la desbalanceada expresión de citocinas está implicada en la progresión de muchas enfermedades. Frecuentemente las manifestaciones predominantes de la enfermedad (fiebre, shock y pérdida de peso) no son directamente atribuibles al patógeno invasor o a la célula neoplásica, sino a algún complejo, redundante, interactivo y ocasionalmente derivado de la cascada de los efectos de las citocinas (45, 50).

En la enfermedad inflamatoria intestinal (tanto en la CU como en la EC), células T CD4+ activadas presentes en la lámina propia y en la sangre periférica secretan citocinas inflamatorias. Las citocinas que se sintetizan van a depender de si los linfocitos T CD4+ activados son de tipo Th1 (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) o Th2 (IL-4, IL-6, IL-10). Las citocinas juegan un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal, debido a que contribuyen a la respuesta inflamatoria sostenida al activar otras células inflamatorias (macrófagos y linfocitos), promover la fibrogénesis, activar metaloproteinasas y la producción de otros mediadores inflamatorios, por tanto la regulación de las citocinas son un objetivo potencial en la búsqueda de agentes terapéuticos para la EII (19, 47, 49, 51).

#### **3.2.2.1. Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ):**

El IFN- $\gamma$  posee cierta actividad antiviral. Es secretado por casi todas las células T CD8 y por algunas T CD4 particularmente las del subgrupo Th1. Es el activador de macrófagos más potente que se conoce. La exposición a IFN- $\gamma$  aumenta considerablemente la actividad antimicrobiana de los macrófagos y los induce a secretar citocinas como IL-1, 6, 8 y IFN- $\gamma$ , además, aumenta la actividad de las Th1. El IFN- $\gamma$  es una de las citocinas que se elevan en todos los modelos animales genéticos de EII y es crucial en el desarrollo de la respuesta Th1. Clínicamente su expresión en la mucosa es elevada en la EC, pero no en la CU.(33, 48).

#### **3.2.2.2. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

Factor de necrosis tumoral alfa es un polipéptido con una amplia gama de actividades biológicas, que tiene propiedades citocida o citostático para algunas células tumorales en cultivo de tejidos. Además, estudios recientes indican que el TNF- $\alpha$  puede actuar ya sea como un mediador en los procesos beneficiosos de defensa del huésped, la inmunidad y la homeostasis de los tejidos o en la

patogénesis de infecciones, lesión de los tejidos y la inflamación (52).

TNF- $\alpha$  es responsable de una variedad de estímulos pro-inflamatoria, que son cruciales para la amplificación de la inflamación de la mucosa en la EII. Esta citoquina es principalmente secretada por monocitos y macrófagos, activa macrófagos intestinal, neutrófilos, fibroblastos y células de músculo liso, induciéndolos a secretar prostaglandinas, proteasas, y otros mediadores solubles de la inflamación, así como otras citoquinas quimiotácticas. TNF- $\alpha$  se incrementa en la mucosa intestinal tanto en la EC como en la CU, y se correlaciona con una mayor puntuación de inflamación endoscópica (48). Por otro lado se sabe que el TNF- $\alpha$  que se libera de los macrófagos durante la respuesta inflamatoria temprana desempeña un papel importante en la colitis inducida por ácido 2,4,6 trinitrobencenosulfónico TNBS- y es probable que sea un regulador clave de la cascada inflamatoria en este modelo de EII.(49)

### **3.2.2.3. Interleuquina 1 $\beta$ : (IL-1beta)**

La IL-1 $\beta$  es primariamente producida por macrófagos y monocitos, como también por células no inmunológicas, tales como fibroblastos y células endoteliales activadas durante la lesión celular, la infección, la invasión y la inflamación. La IL-1 $\beta$  produce una inflamación sistémica por medio de la activación de la ciclooxigenasa-2, con la formación de PGE2 en el hipotálamo anterior causando fiebre. También produce la sustancia-P, óxido nítrico (activando la enzima óxido nítrico sintetasa) y moléculas de adherencia endotelial. Posee una importante función en el desarrollo y en el mantenimiento del dolor postoperatorio (50).

IL-1 posee propiedades pro-inflamatoria y es crucial para la amplificación de la respuesta inmune en la EII. Esta citoquina, es

principalmente secretada por monocitos, macrófagos intestinales activados, neutrófilos, fibroblastos y células de músculo liso, induciéndolos a secretar prostaglandinas, proteasas, y otros mediadores solubles de la inflamación y lesiones, así como otras citoquinas quimiotácticas (48). Antagonistas del receptor de IL-1 suprimen la infiltración de células inflamatorias en el intestino grueso, la actividad de MPO, disminuye el edema y la necrosis de la mucosa en animales con colitis aguda (49).

#### **3.2.2.4. Interleuquina 4 (IL-4)**

Esta citocina es una glucoproteína, con propiedades antiinflamatorias y que es producida por linfocitos -T-CD4, mastocitos, eosinófilos y basófilos. La IL-4 promueve el desarrollo de células Th2 en la defensa del hospedador siendo la responsable de la inducción y expansión de esta subpoblación. Esta citocina antagoniza los efectos de activación de macrófagos del IFN- $\gamma$ , de esta manera inhibe la respuesta inmunitaria mediada por células, actuando sobre los macrófagos activados reduciendo los efectos de las citocinas IL-1, FNT $\alpha$ , IL-6 e IL-8, e inhibiendo la producción de radicales libres de oxígeno (33, 50).

La IL-4 es una molécula estimuladora para las células T y B, y tiene efectos inmunosupresores conocidos en el intestino. Estudios realizados en ratones sugieren que la IL-4 juega un papel importante en la inducción de CD4 + de tipo Th2 (47). Un estudio ha encontrado que la IL-4 se expresa en la mayoría de las biopsias de los pacientes con CU, pero no en EC, mientras que otros no han encontrado ninguna asociación entre los niveles de IL-4 y cualquier forma de EII, probablemente debido a cuestiones técnicas (48).

#### **3.2.2.5. Interleuquina 6 (IL-6):**

Segregada por muchos tipos de células, como los macrófagos, monocitos, eosinófilos, hepatocitos y células de la glia, siendo FNT-

$\alpha$  e IL-1 potentes inductores. La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que genera la madurez y la activación de los neutrófilos, macrófagos y la diferenciación/mantenimiento de los linfocitos T citotóxicos y de las células asesinas naturales NK (50). La interleucina-6 estimula la quimiotaxis de neutrófilos y se asocia con necrosis en el colon, lo que, a su vez, conduce a la destrucción del tejido (49).

#### **3.2.2.6. Interleuquina 10 (IL-10):**

La IL-10 es un polipéptido sintetizado por diversas células. La producción de IL-10 se perjudica por muchas citocinas, como IL-4, IL-13 y el IFN- $\gamma$  y también por su propia autorregulación. Inhibe las citocinas proinflamatorias, principalmente FNT- $\alpha$ , IL-1 y la IL-6, producidas por macrófagos y monocitos activados, estimulando la producción endógena de citocinas antiinflamatorias. Además, aumenta la proliferación de mastocitos e impide la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK (50).

El papel fundamental desempeñado por la IL-10 dentro del sistema inmune de la mucosa ha sido ampliamente estudiado en ratones knockout y su eficacia terapéutica en varios modelos animales de colitis. Una inactivación de IL-10 en ratones resulta en un aumento de la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$ . La IL-10 disminuye la inflamación del intestino y la formación de granulomas en la EC, por tanto, recientemente la producción de IL-10 por las células T reguladoras se ha implicado como tema importante en la EII (47).

Se ha demostrado que en los seres humanos, una inyección intravenosa de IL-10 en voluntarios sanos era bien tolerada y tenía efectos inhibidores sobre las células T y la inhibición de la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  (49)



### **3.3. PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE FÁRMACOS**

Las plantas se han utilizado en los sistemas tradicionales de salud desde tiempos prehistóricos y siguen siendo las alternativas terapéuticas más importantes para la mayoría de la población en todo el mundo. Aunque las estimaciones varían en función de la definición de lo que se considera una droga o sustancia de origen natural, es seguro decir que entre el 25 y el 50% de los medicamentos que se comercializan actualmente deben sus orígenes a los productos naturales. Esto se puede presentar por la gran diversidad bioquímica de las plantas, la cual es evidente si se tiene en cuenta que por lo menos cuatro quintos de los metabolitos secundarios conocidos hoy en día son de origen vegetal. La explicación de este fenómeno se encuentra probablemente en el hecho de que las plantas son organismos inmóviles y han desarrollado múltiples mecanismos de adaptación. La diversidad química que caracteriza a las plantas hace la exploración de sus características biológicas no sólo una importante fuente de nuevos compuestos que potencialmente pueden ser utilizados para la realización de nuevas drogas, sino también una herramienta útil para el descubrimiento de nuevos mecanismos de acción (8, 9, 53).

Investigaciones recientes revelan que entre un 70-80% de las personas en todo el mundo confían en la medicina tradicional a base de plantas para satisfacer las necesidades primarias de salud. A nivel mundial, millones de personas dependen de las plantas medicinales no sólo para la atención primaria de la salud, sino también para la generación de ingresos. Las ventas anuales de medicamentos a base de plantas se encuentran entre 7,5 y 108 billones de dólares en todo el mundo. Por lo que la medicina herbaria es ahora la práctica médica más popular entre todas las terapias complementarias y en muchos países se ha producido un aumento constante de la misma. Algunas preparaciones a base de hierbas se registran de conformidad con las regulaciones de la industria farmacéutica. En la mayoría de los casos, sin embargo, en ausencia de ensayos clínicos, la experiencia empírica acumulada en el largo plazo puede ser

considerada como evidencia aceptable de su utilidad en la medicina (8, 53).

### **3.3.1. Productos naturales como fuente de fármacos para el tratamiento de la EII**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) involucra un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por inflamación crónica y recurrente del tracto gastrointestinal, producto de la activación aberrante del sistema inmune de la mucosa intestinal (54, 55). Debido a que no se cuenta con terapias curativas para esta patología, el alivio de los síntomas y el mantenimiento de la calidad de vida se han convertido en el objetivo del tratamiento. Dentro de los medicamentos clínicamente importantes para tratar esta enfermedad se encuentran los aminosalicilatos, antiinflamatorios no esteroideos, glucocorticoides e inmunosupresores; los cuales presentan limitaciones por sus importantes efectos secundarios para el paciente y el incremento asociado al costo de la terapia debido a la necesidad de un tratamiento adicional (7). Aproximadamente el 40% de los pacientes presentan resistencia a la terapia farmacológica, incluso a la utilización combinada de estos agentes, y en muchos casos este fracaso conduce a la necesidad de realizar resecciones quirúrgicas del colon e ileostomías (6). En este sentido las plantas han mostrado ser una fuente promisoría en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para tratar la EII, ya que diversos estudios han reportado que extractos derivados de plantas presentan actividad antiinflamatoria mediante el control de los niveles de diversas citoquinas inflamatorias o mediadores inflamatorios incluyendo IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , NF-kB, NO, la iNOS y COX-2. Algunos de estos extractos se emplean empíricamente a nivel clínico por sus efectos benéficos (56).

### **3.3.2. *Physalis peruviana***

*Physalis peruviana* L. es originaria de los Andes Suramericanos, y es de las especies más conocidas de este género. Esta planta crece de forma silvestre y semisilvestre en zonas altas entre los 1500 y 3000 m.s.n.m. y actualmente se encuentra en casi todos los altiplanos de los trópicos y en varias partes de los subtrópicos, incluyendo Malasia, China y el Caribe, entre otros (57-59).

Desde la década de los noventa el cultivo del fruto de *Physalis peruviana* (comúnmente llamado uchuva) ha crecido de forma acelerada, recaudando solo en el 2007 treinta y cuatro millones de dólares por su exportación (10-12). Sin embargo, a pesar de la importancia económica que tiene este fruto, no es la única parte de esta planta que es apetecida por la comunidad, puesto que sus hojas, flores, tallos y cálices tienen un amplio uso en la medicina popular por su efecto diurético, antiséptico, antifúngico, antibacteriano, anticancerígeno, animalario y antiinflamatorio (10, 13, 60).

#### **3.3.2.1. Función y constituyentes de los cálices de *Physalis peruviana***

El cáliz que recubre el fruto de *Physalis peruviana* es una hoja modificada de mucha importancia puesto que cumple una función fisiológica muy importante para el fruto a lo largo de su desarrollo y maduración, al tiempo que lo protege contra insectos, pájaros, enfermedades y situaciones climáticas adversas, prolongando su vida, la cual es solo de cuatro a cinco días en ausencia del cáliz, mientras que con este es de más o menos un mes. Por otra parte, esta estructura representa una fuente esencial de hidratos de carbono durante los primeros veinte días de crecimiento y desarrollo (Tabla 3) (61, 62).

### **3.3.2.2. Actividad antiinflamatoria de *Physalis peruviana***

La actividad antiinflamatoria de *Physalis peruviana* ha sido corroborada por varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. En el estudio realizado por Wu, *et al.*, en el 2006, el extracto de *Physalis peruviana* obtenido por extracción de fluido supercrítico fue capaz de prevenir la generación de óxido nítrico (NO) y la liberación de PGE2, así como la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2) en células Raw 264.7, estimuladas con lipopolisacárido (LPS) (14).

En el 2008, Pardo *et al.*, demostraron *in vivo* la actividad antiinflamatoria del zumo del fruto de *Physalis peruviana* en conejos afectados con pterigión. Los resultados obtenidos por este estudio asocian la actividad antiinflamatoria del zumo de uchuva, con su capacidad para inhibir el crecimiento de fibroblastos (15).

Actualmente existen solo dos reportes del efecto antiinflamatorio del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*. Un estudio realizado por Martínez *et al.*, en un modelo de fagocitosis *in vitro*, empleando macrófagos infectados por *Leishmania panamensis* y otro llevado a cabo por Franco *et al.*, en un modelo murino de edema auricular inducido por 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) (16, 17).

**Tabla 3:** Metabolitos secundarios presentes en los cálices de *Physalis peruviana*

Metabolito	Prueba	Resultado
Alcaloides	Dragendorff	Negativo
	Valser	Negativo
	Bertrand	Negativo
	Mayer	Negativo
	Dragendorff CCD	Positivo
Flavonoides	Cianidina	Positivo
	HCl 10% + Calentamiento	Positivo
Nafto y/o Antraquinonas	Börtrager – Krauss	Negativo
Taninos	Gelatina – Sal	Negativo
	Cloruro férrico	Negativo
Saponinas	Hemólisis	Negativo
	Espuma	Negativo
Esteroides y/o Triterpenoides	CCD: Lieberman–Buchard Vainillina ácido-O-fosfórico	Positivo: presencia de manchas de color café, violeta, verde y naranja.
Cumarinas	CCD: KOH 5%/EtOH+UV 336 nm	Negativo
Lactonas Terpénicas	CCD: Vainillina–ácido ortofosfórico, Hidroxamato férrico y reactivo de Raymond	Positivo: presencia de manchas de color café y violeta. No revelan con el reactivo de Raymond.
Cardiotónicos	CCD: Reactivo de Raymond	Negativo

Es importante resaltar que a pesar de que existen estudios donde ha sido corroborada la actividad antiinflamatoria de los cálices de *Physalis peruviana*, hasta la fecha no se cuenta con ningún reporte, donde se haya evaluado el efecto del extracto etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* en colitis ulcerosa empleando un modelo animal.

### **3.4. MODELOS ANIMALES PARA EVALUAR EII**

La enfermedad inflamatoria intestinal representa una de las principales causas de morbilidad, causando deterioro en la salud y calidad de vida de aquellos que la padecen. Por otro lado los costos de esta patología en cuanto a tratamiento, hospitalización y pérdida de productividad son sumamente elevados. A pesar de que se desconoce la etiología de esta enfermedad, la implementación de diversos modelos animales de EII, han permitido avances significativos en la comprensión de la patogénesis y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, para esta enfermedad durante las últimas décadas (63).

Los modelos de enfermedad inflamatoria intestinal se clasifican principalmente en modelos inducidos químicamente, por transferencia de células, mutación congénita, modelos de ingeniería genética y espontáneos. Estos modelos se fundamentan básicamente en tres principios: desestabilizar la integridad y permeabilidad del epitelio intestinal, inducir defectos en la respuesta inmune innata e inducir defectos en la respuesta inmune adaptativa. Para conseguir alguno de los objetivos anteriormente mencionados la mayoría de estos modelos se basan ya sea en la administración de agentes químicos que dañan directamente el epitelio intestinal, en la transferencia de células inmunes o en la manipulación de los genes que regulan la función del epitelio intestinal (63, 64).

Los científicos involucrados en el estudio de la EII han debatido durante mucho tiempo acerca de cuál es el mejor modelo animal para el estudio de

la enfermedad inflamatoria en humanos, lo cual es un verdadero desafío teniendo en cuenta que hasta el momento se han descrito por lo menos sesenta y seis modelos, que involucran diversas especies animales, dentro de las que se encuentran monos, conejos, conejillos de india, rata, perros, ratones, gusanos, moscas y cerdos. Actualmente no existe ningún modelo animal que reproduzca con fidelidad la etiopatogenia de la EII, y no se puede afirmar que el modelo que mejor mimetice esta enfermedad es necesariamente el más adecuado, debido a que esta patología involucra factores genéticos, microbianos, ambientales e inmunológicos; lo recomendable es elegir el modelo que sea más apropiado para abordar los objetivos específicos de lo que se quiera investigar. En conclusión, es difícil concebir el desarrollo de un modelo único para hacer frente a las investigaciones relacionadas con EII, porque cada uno de estos proporciona una información valiosa a los investigadores para conocer la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal y así desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (63, 65-67).

#### **3.4.1. Modelos químicos para evaluar EII**

El fundamento de este método consiste en la aplicación de un enema vía rectal de compuestos que tienen la capacidad de producir inflamación al contacto con la mucosa intestinal. Dentro de ellos se destaca el ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS), sulfato de dextrano sódico (DSS), oxazolona, iodacetamida, indometacina, ácido acético y polisacárido-péptidoglicano (PS-PG) (68).

##### **3.4.1.1. Modelo inducido por DSS**

Este método consiste en la administración del polímero de DSS disuelto en agua. A diferencia del TNBS, el DSS se administra con una concentración de 1-5% a todos los animales de experimentación, sean estos ratones, ratas, cobayos, perros etc. (69). Este es un modelo simple de colitis, reproducible y que permite estudiar los mecanismos de reparación epitelial, pero carece de

algunas características clínicas importantes que se observan en la EII humana, como por la falta de inflamación transmural y la presencia de úlceras aisladas en el intestino (63).

#### **3.4.1.2. Modelo inducido por Oxazolona**

La inflamación producida por esta sustancia produce un daño intestinal que se localiza solo en la parte distal del colon, y afecta exclusivamente la capa mucosa, mostrando ulceraciones y disminución relevante de las células epiteliales. La Oxazolona actúa como un hapteno al igual que el TNBS, sin embargo a diferencia de este último, la respuesta inmunológica que induce es de tipo Th2, promoviendo la liberación de IL-4, IL-5 e IL-13 (64, 70).

#### **3.4.1.3. Modelo inducido por iodacetamida**

Este modelo se basa en el supuesto efecto protector ejercido por compuestos endógenos con grupos sulfhídricos (SH), como el antioxidante tripéptido glutatión (71). Con esto, la administración de iodacetamida podría disminuir los componentes implicados en el mecanismo de defensa antioxidante; y conduce a un estado colítico caracterizado por diarrea y pérdida de peso, asociado a dilatación colónica, adhesión y daño de la mucosa de diferente intensidad de la respuesta Th1 con un aumento liberación de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  e IL-6 y disminución de algunas citoquinas Th2 como IL-4 (72).

#### **3.4.1.4. Modelo inducido por indometacina**

A diferencia de los dos procedimientos anteriores, la indometacina es administrada vía peritoneal. Sin embargo, para producir una reproducibilidad adecuada es necesario conseguir una solubilidad completa de este compuesto. La indometacina provoca daño tisular debido a su efecto inhibitorio sobre la síntesis de prostaglandinas protectoras y prostaciclina. La ventaja de este modelo, es que las



lesiones que produce en ambos segmentos intestinales son similares a las producidas por la enfermedad de Crohn (73).

#### **3.4.1.5. Modelo inducido por polisacárido-péptidoglicano**

La administración del componente de la pared bacteriana en la parte distal del colon de las ratas induce enterocolitis, caracterizada por engrosamiento del colon, infiltración de las células inmunológicas y producción de citoquinas proinflamatorias como IL-8, IL-6 y TNF- $\alpha$  (74)

#### **3.4.1.6. Modelo inducido por ácido acético**

Este modelo se caracteriza por la administración de ácido acético diluido en roedores, induciéndose entonces necrosis e inflamación colónica. Esta colitis se caracteriza por un daño agudo, donde los neutrófilos no están implicados en la fase temprana. Este modelo no contempla la utilización de ácido acético concentrado ya que este producirá perforaciones del tejido (75).

### **3.4.2. Modelo de TNBS**

Es un modelo químico empleado para inducir inflamación crónica en el colon de manera dosis dependiente, a partir de la instilación rectal de 2,4,6-acidotrinobencenosulfónico y etanol (64, 67, 76). Actualmente no hay un protocolo único para la inducción de la colitis utilizando este modelo, puesto que existen diferencias en cuanto a las dosis de TNBS empleadas, el porcentaje de etanol y el tiempo de duración del ensayo. A pesar de que no se cuenta con un protocolo estándar es importante tener en cuenta que las dosis de TNBS debe generar una inflamación significativa y una baja tasa de mortalidad durante los primeros días del ensayo. En ratas las dosis recomendadas oscilan entre 5-40 mg (67, 77).

El mecanismo patogénico de este modelo se puede explicar por la capacidad del etanol de debilitar la barrera mucosa, lo que facilitaría el

contacto entre antígenos lumenales colónicos y la lámina propia, permitiendo la participación de macrófagos y neutrófilos activados por una gran variedad de estímulos que generan grandes cantidades de metabolitos altamente reactivos de oxígeno. Sin embargo el etanol por sí solo no es capaz de inducir la condición patológica, por lo que un tema de discusión es si la adición del etanol se debe considerar como un diluyente o vehículo en la preparación del TNBS, lo que da lugar a la pregunta de si el grupo control sano debe ser tratado con etanol o únicamente con solución salina. El porcentaje de etanol recomendado varía entre 35 y 50%. Siendo 40% el valor más usado, ya que se ha reportado que en porcentajes superiores a este las ratas se recuperan lentamente de la anestesia después de la administración intrarrectal de TNBS. Por otro lado el TNBS (hapteno) modifica la estructura de proteínas de la superficie de la célula por su capacidad de unirse covalentemente a residuos de lisina y tirosina. Esto provoca una inmunoreactivación por parte de macrófagos y linfocitos T semejante a una reacción de hipersensibilidad retardada por alérgeno (65, 67, 76).

El modelo de inducción de colitis a partir de la administración de TNBS guarda mucha relación con el cuadro clínico, las características morfológicas e histológicas de EII en seres humanos. Las características clínicas incluyen la falta de apetito y la pérdida de peso; mientras que a nivel morfológico se puede apreciar claramente inflamación de la mucosa y afección transmural, presencia de úlceras y engrosamiento del intestino. A nivel histológico se observa abundancia de moco, infiltración de leucocitos plimorfonucleares, macrófagos, linfocitos, mastocitos, fibroblastos y formación de granulomas. La respuesta inflamatoria que se presenta en este modelo es de tipo Th1, con excesiva producción de citoquinas proinflamatorias (IFN [interferón]- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral [TNF]- $\alpha$ , y la interleucina [IL] -12) (66, 67, 76).

A pesar de las diferencias etiopatológicas que puedan existir entre el proceso inflamatorio intestinal inducido por TNBS y la EII, este es el modelo animal más citado en el estudio de los procesos inflamatorios intestinales, ya que tiene como ventajas la duración de la inflamación por un tiempo significativo, reproducibilidad y economía; lo que permite una oportunidad para estudiar la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria del colon de una manera controlada específicamente, y así evaluar nuevos tratamientos potencialmente aplicables a la enfermedad inflamatoria intestinal en humanos (63, 65, 76).

La inducción de colitis por TNBS se puede llevar a cabo en ratas, ratones, conejos y cerdos. Sin embargo los roedores son los que se usan con mayor frecuencia, puesto que su epitelio intestinal presenta las mismas células que la de los seres humanos (enterocitos, paneth, enteroendocrinas y caliciformes). Por otro lado, entre los roedores se prefiere el uso de ratas, ya que un sólo enema de TNBS llega a provocar una colitis de hasta ocho semanas de duración en las líneas de ratas más susceptibles, mientras que los ratones se muestran más resistentes a la inducción de la lesión intestinal, la cual solo perdura entre dos y tres semanas (63-65, 67).

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Obtención del extracto total etéreo de los cálices de *physalis peruviana* L.

El extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* fue suministrado por el Grupo de Investigación de Principios Bioactivos de Plantas Medicinales de la Universidad Nacional de Colombia. El material vegetal fue recolectado en La Mesa, Cundinamarca (Figura 3). La planta fue enviada al Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia para su identificación (Anexo N° 1).



**Ubicación:** 4° 37' 49,22" N y 74° 27' 45,60" W

**Altitud:** 1198 m.s.n.m.

**Clima:** 20°C

**Figura 3:** Lugar de recolección de los cálices de *Physalis peruviana*

Los cálices de *Physalis peruviana* se secaron en horno con flujo de aire a temperatura constante de 40°C. Posteriormente este material seco, fue pulverizado y sometido a extracción por percolación con éter de petróleo hasta agotamiento y el extracto total obtenido fue concentrado en rotaevaporador a temperatura controlada (35-45°C) y presión reducida.

### 4.2. Preparación del extracto para su administración por vía intraperitoneal (IP):

Debido a la baja solubilidad del extracto de *Physalis peruviana* en agua, se realizó un coprecipitado del extracto en polivinilpirrolidona (PVP) en

proporción 1:4, para posteriormente solubilizar el extracto en tampón PBS (Anexo N° 2 ) y administrarlo por vía intraperitoneal (78).

### **4.3. Material biológico**

Se utilizaron ratas Wistar y ratones ICR provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS), de sexo femenino de siete semanas de edad, los cuales fueron sometidos a un proceso de adaptación de dos semanas, en las instalaciones del Bioterio del Área de la Salud de la Universidad de Cartagena y fueron manipuladas según lo estipulado en el capítulo IV de la Ley 84 de 1989. Se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y estrés, con temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa  $45\% \pm 5\%$ , bajo un ciclo de doce horas de luz y doce horas de oscuridad, y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* (Anexo N° 3).

### **4.4. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) del extracto total etéreo de los cálices *Physalis peruviana*.**

La  $DL_{50}$  del extracto de *Physalis peruviana*, se determinó haciendo uso de protocolos previamente descritos en la literatura internacional, con ligeras modificaciones (79-81). Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en siete grupos ( $n=6$ ). Diferentes dosis del extracto de *Physalis peruviana* fueron administradas por vía intraperitoneal. Los animales se observaron constantemente durante veinticuatro horas, registrando cualquier signo tóxico. Inmediatamente después de la muerte de los animales por toxicidad se tomaron muestras de hígado y riñón, que se conservaron en formalina tamponada para análisis histológico (Anexo N°4). Transcurridas las veinticuatro horas, los animales restantes fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron muestras de hígado y riñón, que se conservaron en formalina tamponada para análisis histológico. Con el número de muertes en cada grupo se calculó la  $DL_{50}$  empleando el método Probit.

#### 4.5. Análisis histológico

El análisis microscópico se llevó a cabo según protocolos estándar,(82). Muestras de tejido hepático, renal y colónico, fueron conservadas en formalina tamponada e incluidas en parafina. Se practicaron cortes histológicos los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y analizados por la doctora Lia Barrios, patóloga de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena, en un diseño blindado contra sesgos, utilizando microscopia óptica. Los análisis histológicos se llevaron a cabo empleando una escala de valoración correspondiente a cada tejido (Anexo N° 5).

#### 4.6. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto total etéreo de *Physalis peruviana*, en un modelo subagudo (quince días) de colitis inducida por TNBS.

La colitis se indujo empleando el método descrito por Morris, *et al* 1989, con algunas modificaciones (76). Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos (n=10):

**Tabla N° 4.** Distribución de los grupos de estudio en el ensayo de colitis subaguda

N° del grupo	Grupo en estudio	N° de animales
1	Control sano (SIn de PVP)	10
2	Control TNBS (SIn de PVP)	10
3	Extracto 62.5 mg/Kg vía IP + TNBS	10

Un control sano, un control tratado solo con TNBS y un grupo tratado con TNBS y con el extracto total de P.p. (62.5 mg/kg, IP), por dos semanas. La colitis fue inducida el primer día del ensayo, anestesiando ligeramente los animales por vía IP con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y diazepam (5 mg/kg). Posteriormente se administró por vía IP 0.25 mL de una solución de TNBS (40 mg/mL preparada en etanol al 50% v/v.), utilizando

una sonda, que se introdujo a una profundidad de 8 cm. Durante los siguientes catorce días se realizó un seguimiento de la variación de peso y consumo de alimento de los animales (Anexo N°6). El último día de tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajo un segmento del intestino grueso que va aproximadamente desde el ciego hasta lo más cercano posible al recto. Secciones de tejido colónico de aproximadamente de 1 cm<sup>2</sup>, hígado y riñones, fueron conservadas en formalina tamponada para análisis histológico.

#### **4.7. Evaluación macroscópica del tejido colónico**

Se determinó cualitativamente el daño macroscópico del tejido colónico, haciendo uso de la escala de Bobin-Dubigeon *et. al.*, 2001, la cual va 0-10, donde: 0 (sin daño), 1 (hiperemia focal), 2 (ulceración sin hiperemia o engrosamiento de la pared intestinal), 3 (ulceración con inflamación en un sitio), 4 (igual o mayor a dos sitios de ulceración e inflamación), 5 (muchos sitios de inflamación mayor de 1 cm a través del órgano), 6-10 (muchos sitios de inflamación mayor de 2 cm a través del órgano) (Anexo N° 7) (83). Además se cuantificó el daño a nivel macroscópico, midiendo el largo y el ancho de cada zona lesionada en el tejido y calculando el área dañada en mm<sup>2</sup> (la suma de todas las áreas corresponde al daño total). Además, se calculó la relación entre el peso del segmento colónico y su longitud, como una medida del edema intestinal. Durante todo el análisis macroscópico, el tejido colónico permaneció refrigerado y al finalizar el análisis fue almacenado a – 80°C, para su posterior utilización en la cuantificación de los mediadores inflamatorios.

#### **4.8. Medida de la actividad de la enzima Mieloperoxidasa (MPO)**

Homogenizados de tejido colónico se prepararon con tampón fosfato (pH: 7.4). Las muestras se centrifugaron durante sesenta minutos a 4000 rpm a 4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido fue resuspendido en una solución de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) 0.5% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.3% en tampón fosfato (pH:6) y

sometido inmediatamente a ciclos rápidos de congelamiento–descongelamiento, con nitrógeno líquido. Las muestras fueron sonicadas por 10 segundos y luego centrifugadas durante de 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. El sobrenadante recuperado se empleó para evaluar la actividad de la enzima MPO utilizando el protocolo descrito por Bradley, 1982, modificado para lectura en microplaca (84). 50 µL de los sobrenadantes fueron mezclados con 50 µL de *o*-dianisidina dihidroclorhidrato 0.067%, 50 µL de HTAB 0.5% y 50 µL de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.003%. La DO<sub>450</sub> fue determinada en lector de placas Multiscan EX Thermo. Los resultados se presentan como unidades de actividad de la enzima. Una unidad de actividad fue definida como aquella que degrada 1µmol de peróxido de hidrogeno por minuto a 25°C.

#### **4.9. Evaluación de los niveles de citocinas, en el tejido colónico.**

Se cuantificó la presencia de las citocinas TNF-α, INF-γ, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-4 e IL-10 en los sobrenadantes del homogenizado de tejido colónico, por el método descrito por Whittle, *et al.* 2008 (85). El tejido colónico se homogenizó en tampón Greenburger. El homogenizado obtenido se sonicó por diez segundos al 50% de amplitud y posteriormente se centrifugó durante veinte minutos a 10000 rpm a 4 °C. El sobrenadante recuperado se empleó para evaluar el nivel de las citocinas TNF-α, INF-γ, IL-1β, IL-4, IL-6, e IL-10 utilizando kit de ELISA de invitrogen. El kit fue desarrollado de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante.

#### **4.10. Análisis estadístico**

Los resultados correspondientes al ensayo fueron expresados como el promedio ± ESM y analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de Tukey post hoc para comparaciones múltiples. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados significativos.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Material vegetal

La identificación taxonómica realizada por el Herbario Nacional Colombiano, confirmó que la muestra enviada correspondía a la especie *Physalis peruviana* identificada previamente con el número de colección 512200 (Anexo No.1) que se resume a continuación.

Nombre: *Physalis peruviana*

Familia: Solanaceae

No. COL 512200

Determinó: C.I.Orozco



### 5.2. Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del extracto de *Physalis peruviana* L.

Debido a que en la literatura no se cuenta con ningún reporte sobre la toxicidad del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*, fue necesario calcular la DL<sub>50</sub> del mismo, para poder seleccionar una dosis que no provocara efectos tóxicos sobre los animales empleados en el ensayo de EII inducida por TNBS. Para determinar los Dosis Letal 50 del extracto de *Physalis peruviana*, este fue administrado en dosis entre 300-450 mg/kg (dosis seleccionadas a partir de ensayos preliminares) vía IP a ratones, los cuales, fueron observados por veinticuatro horas (Tabla 5).

**Tabla 5:** Toxicidad aguda en ratones veinticuatro horas después de la administración del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*.

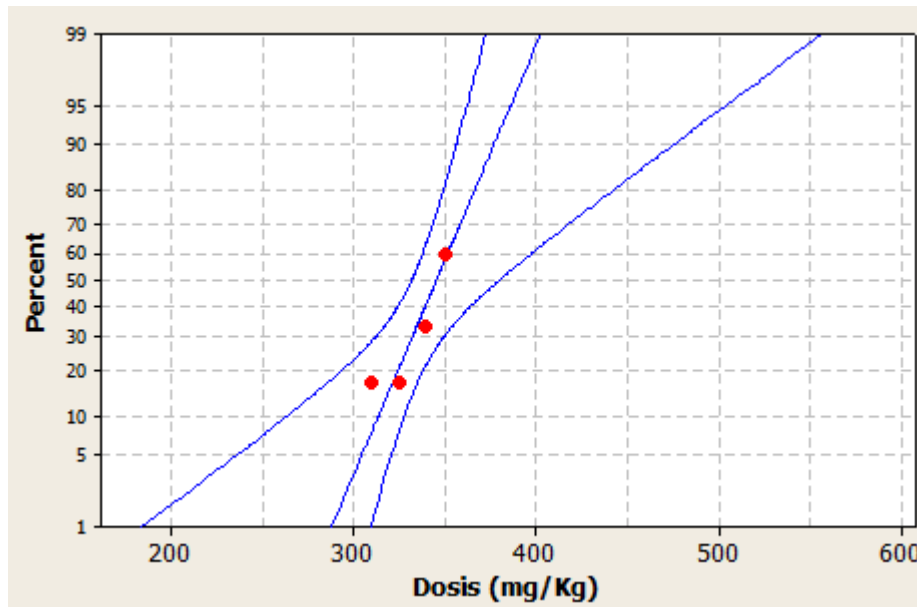
Dosis (mg/kg)	(M/T)*	Mortalidad (%)	Signos de toxicidad
300	0/6	0.0	No se observaron signos de toxicidad
310	1/6	16.6	Contracciones abdominales leves. Hipoactividad en las primeras dos horas
325	1/6	16.6	
340	2/6	33.3	
350	4/6	66.6	Contracciones abdominales. Hipoactividad prolongada, cianosis periférica y dificultad respiratoria antes de morir
400	6/6	100.0	
450	6/6	100.0	

\* M: número de ratones muertos, T: número total de ratones tratados en el grupo.

Los datos de mortalidad para cada dosis del extracto de *Physalis peruviana* se muestran en la Tabla 5, como se puede observar solo las dosis superiores a 350 mg/kg presentan porcentajes de mortalidad superiores al 50%, calculándose una  $DL_{50}$  de 345,49 mg/kg, límites de confianza entre 329,82 – 361,15 mg/kg, como se puede apreciar en la Figura 4. En función de estos resultados en el ensayo de colitis subaguda (quince días) se empleó una dosis de 62.5 mg/kg.

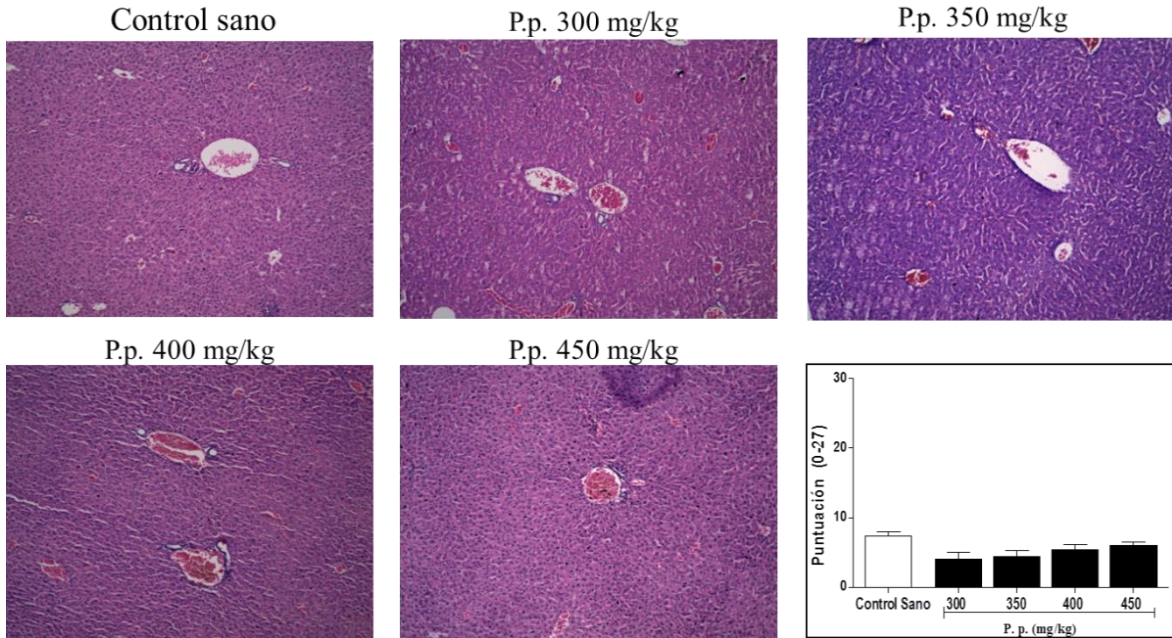
El estudio realizado por Arun *et al.* 2007, reporta que el extracto de acuoso de las hojas de *Physalis peruviana* tiene una  $DL_{50}$  superior a 1250 mg/kg P.O en ratas (86). Estos resultados son consistentes con la función protectora que tienen los cálices en la planta, por lo que es de esperarse la presencia de potentes metabolitos que permitan resguardar al fruto contra insectos, pájaros y plagas (61, 62). Hasta el momento en la literatura no se cuenta con ningún reporte de toxicidad de extractos realizados con los

cálices de *Physalis peruviana*, ni para ninguna otra especie de este género.

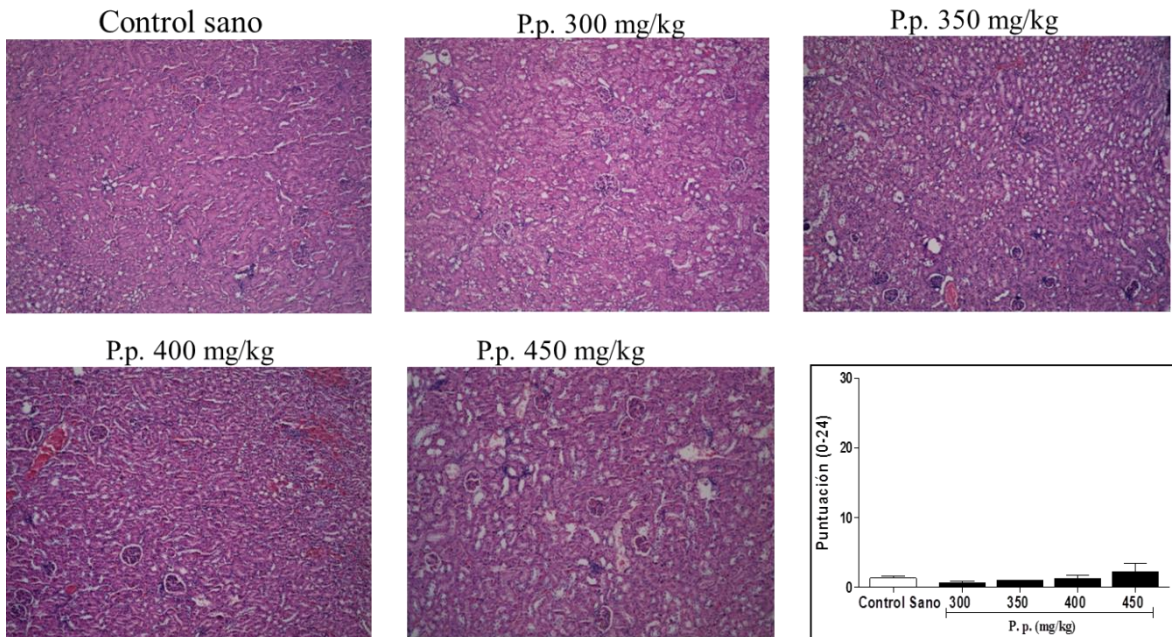


**Figura 4:** Dosis letal 50 del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*

Con el fin de seguir indagando acerca de la toxicidad del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*, se tomaron muestras de hígado y riñones de los ratones y enviadas para análisis histológico, el cual reveló, que en el tejido hepático ninguno de los grupos tratados con el extracto, presentó inflamación, lesiones celulares, cambios regenerativos, congestión vascular y neoplasia (Figura 5). Por otra parte, en el tejido renal no se observó edema, tubulitis, cambios regenerativos, necrosis, distalización ni fibrosis (Figura 6). Estos parámetros fueron medidos utilizando una escala de 1-3, que fue diseñada por el patólogo, donde: 0, ninguno; 1, leve; 2, moderado y 3, severo. Los hallazgos histopatológicos indican que el extracto de *Physalis peruviana* a dosis iguales e inferiores a 450 mg/kg no induce toxicidad hepática y renal, lo que es evidente al compararlo con el grupo control sano, con el cual no existe diferencia significativa.



**Figura 5:** Análisis histológico de tejido hepático de ratones tratados con extracto total de los cálices de *Physalis peruviana* (P.p) calificado por un patólogo. Ampliación original 10X. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S.M. (n = 6).



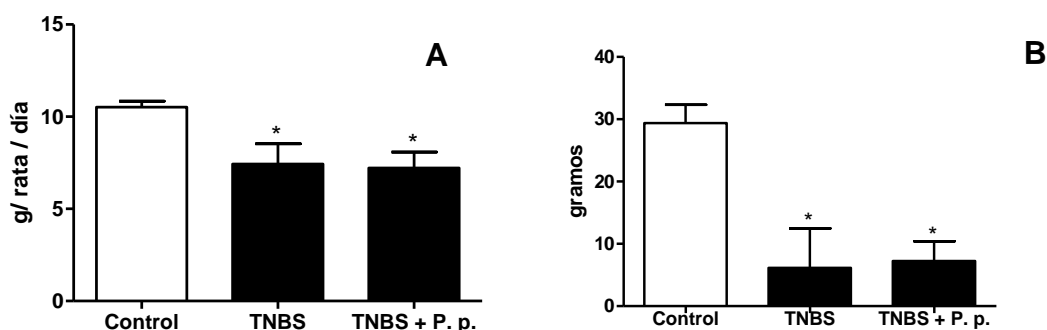
**Figura 6:** Análisis histológico de tejido renal de ratones tratados con extracto total de los cálices de *Physalis peruviana* (P.p), calificado por un patólogo. Ampliación original 10X. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S.M. (n = 6).

### 5.3. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto total etéreo de *Physalis peruviana*, en un modelo subagudo (quince días) de colitis inducida por TNBS en ratas.

Durante los quince días del ensayo se midió el consumo de alimento y la variación de peso de las ratas, ya que, es sabido que la EII inducida por TNBS, disminuye el apetito y consecuentemente induce pérdida de peso por parte de los animales, lo que guarda relación con las características clínicas de esta patología (66, 67, 76).

Los resultados del seguimiento a los animales durante los días del ensayo, en cuanto a variación de peso y consumo de alimento, se presentan en la Figura 7. El consumo de alimento para cada grupo se presenta como los gramos de alimento consumido por cada animal por día de tratamiento (g/rata/día). La variación de peso se determinó comparando el peso del animal el día final del ensayo contra el peso que tenía al momento de iniciar el estudio.

Grupo	N°	Consumo alimento (g/rata/día)	Variación de peso en (g)
Control Sano	10	10,5 ± 0,3	29,4 ± 2,9
Control TNBS	10	7,4 ± 1,1*	6,1 ± 10,4 *
TNBS + <i>P. p.</i>	10	7,2 ± 0,8*	7,2 ± 3,2 *



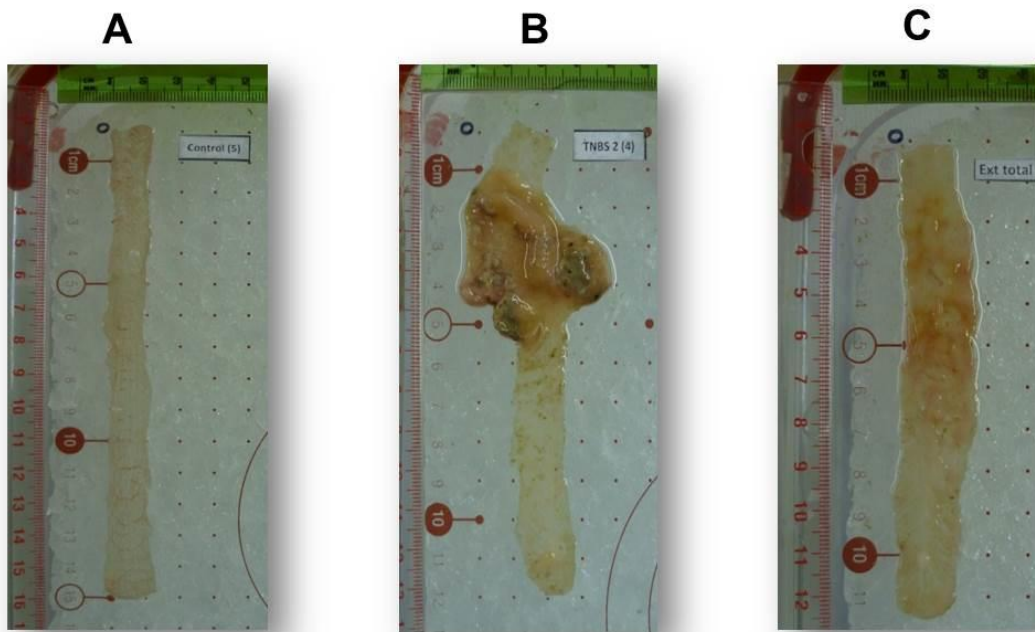
**Figura 7:** Medida del consumo de alimento y la variación de peso durante la administración subaguda (quince días) de P.p. (extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*) en ratas con colitis inducida por instilación intrarectal de TNBS (40mg/mL): (A) Consumo de alimentos y (B) Variación de peso. Los resultados representan la media ± E.S.M. (n=10). (\*P<0.05; ANOVA, estadísticamente significativo frente al control).

El estado de inflamación, producto del daño intestinal ocasionado por el TNBS, se asocia con pérdida de apetito, notable en la reducción significativa de consumo de alimento por parte del grupo control TNBS en comparación con el grupo control sano. Por otro lado, entre el grupo tratado con el extracto de *Physalis peruviana* y el control TNBS, no existen diferencias importantes, es decir que el tratamiento con el extracto de *Physalis peruviana*, no mejora la pérdida de apetito, durante el transcurso del ensayo. Consecuentemente y como se esperaba el grupo control TNBS y el tratado con el extracto de *Physalis peruviana*, no presentaron un aumento de peso similar al mostrado por el grupo control sano (Figura 7).

#### **5.4. Evaluación macroscópica del tejido colónico**

La Figura 8 muestra segmentos colónicos representativos de los grupos incluidos en el estudio de colitis inducida por TNBS. En el control sano no se presentan lesiones como era de esperar, ya que se trata de un grupo no tratado, mientras que en el control TNBS se observa un importante daño de la mucosa intestinal y afección transmural, presencia de úlceras, acompañado de engrosamiento del tejido; hallazgos morfológicos que están acorde a lo referenciado en la literatura para este modelo (76). Por otro lado, en el grupo tratado con *Physalis peruviana*, se nota una importante mejora del daño colónico, con menos tejido lesionado en comparación con el control TNBS.





**Figura 8:** Segmentos colónicos de los grupos incluidos en el estudio de colitis inducida por TNBS: (A) Control sano, (B) Control TNBS y (C) Control TNBS + Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* (62.5 mg/kg IP) durante quince días.

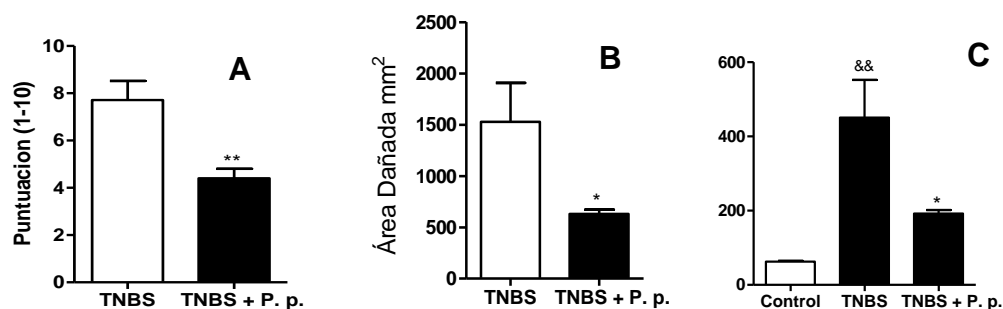
Los resultados de la evaluación macroscópica del daño intestinal de los segmentos colónicos extraídos de los grupos incluidos en el estudio de colitis inducida por TNBS, se presentan en la Figura 9.

A pesar de que el extracto de *Physalis peruviana* no mejoró el apetito ni el peso de los animales a lo largo del ensayo, el análisis macroscópico del colon reveló un evidente efecto antiinflamatorio, causando una reducción significativa de las lesiones presentes en el tejido colónico, lo cual se vio reflejado en una puntuación inferior en comparación con el grupo control TNBS (Figura 9: A)

La administración del TNBS (40 mg/mL) produce una fuerte respuesta inflamatoria de la mucosa intestinal, con formación de edema y ulceración, produciendo en algunos sectores necrosis del tejido. El extracto de *Physalis peruviana* reduce significativamente la extensión y severidad del área lesionada, mejorando el daño causado por la instilación rectal del TNBS (Figura 9: B).

Una de las características macroscópicas de la enfermedad inflamatoria intestinal es el engrosamiento del colon, producto de la fibrosis que se presenta como consecuencia del constante proceso de cicatrización que se da en la mucosa intestinal, lo cual es mediado por citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y el TNF (19). El engrosamiento del tejido colónico se ve reflejado en un aumento de peso del mismo. Otra característica macroscópica de la EII detectable en los estudios radiográficos, es el acortamiento del colon con pérdida de los haustrors normales. El acortamiento del colon puede ser extremo en algunos casos y se debe a la presencia de edema y al engrosamiento y la contractura de la capa muscular de la pared intestinal. Por tanto, la relación peso/longitud del colon, se considera un índice fiable de daño tisular (50, 51). El extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* redujo significativamente la relación peso/longitud, indicando una mejora del edema asociado al proceso inflamatorio inducido por TNBS después de la instilación rectal (Figura 9: C).

Grupo	Puntuación del daño (0-10)	Área Dañada (mm <sup>2</sup> )	Peso/Longitud (mg/cm)
Control	0.0	0.0	62.62 ± 2.1
TNBS	7.7 ± 0.8 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	1527.2 ± 380.3 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	450.6 ± 101.87 <sup>&amp;&amp;</sup>
TNBS + <i>P. p.</i>	4.4 ± 0.4 <sup>**&amp;&amp;</sup>	630.02 ± 41.35 <sup>*</sup>	192.0 ± 9.6 <sup>*</sup>

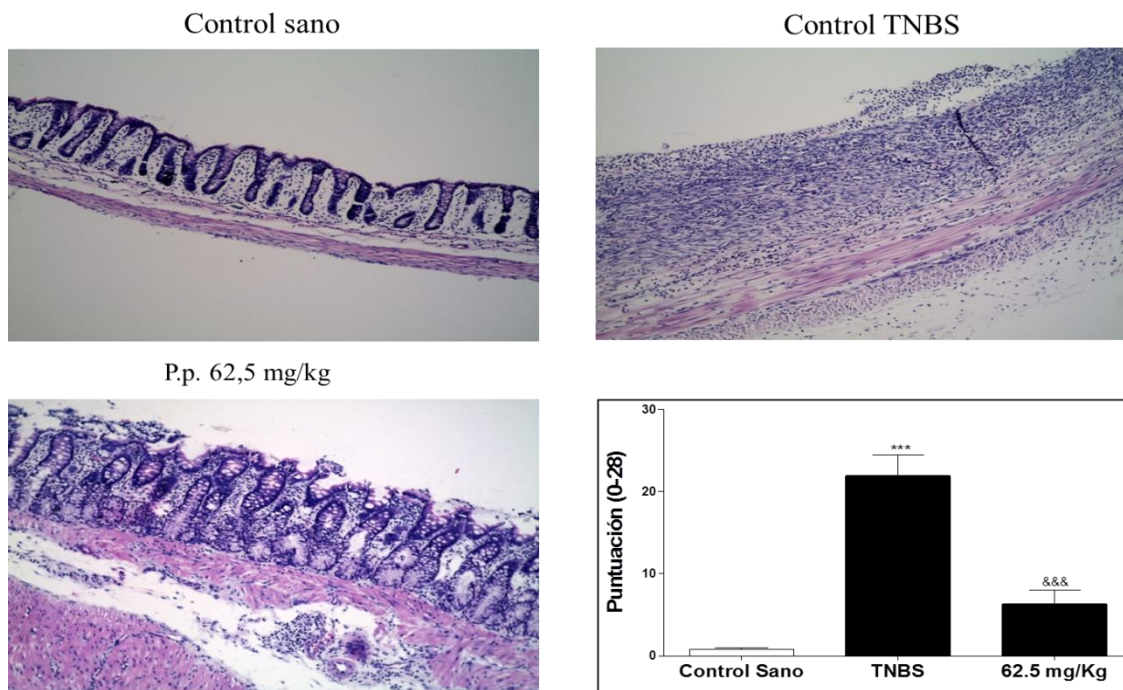


**Figura 9:** Análisis macroscópicos de los segmentos colónicos obtenidos de ratas con colitis inducida con TNBS (40mg/mL vía IP) y tratadas con 62.5 mg/kg de P.p (Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*). (A) Apreciación de daño en el tejido colónico, empleando una escala de 1-10, (B) medida del área dañada y (C) Relación peso-longitud (mg/cm). Los resultados representan la media ± E.S.M. (n=10). (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  ANOVA, estadísticamente significativo frente al control TNBS). (<sup>&&</sup> $P < 0.01$ ; <sup>&&&</sup> $P < 0.001$  ANOVA, estadísticamente significativo frente al control Sano).



### 5.5. Análisis microscópico del ensayo de colitis

La evaluación microscópica de las muestras de tejido colónico corrobora el efecto antiinflamatorio del extracto de *Physalis peruviana*. Las características histológicas del colon de ratas del grupo control sano eran típicas de una estructura normal. Sin embargo, las muestras de colon del grupo control TNBS mostraron intensa interrupción transmural, con una extensa ulceración, inflamación y edema intestinal, como consecuencia de una infiltración masiva de neutrófilos principalmente en la capa de la mucosa, distorsión de las criptas y depleción de células caliciformes. Por el contrario, la evaluación histológica del colon de las ratas tratadas con el extracto de *Physalis peruviana* mostró una significativa recuperación del tejido, acompañada de una restauración del epitelio y una reducción de la infiltración de neutrófilos (Figura 10). (87).

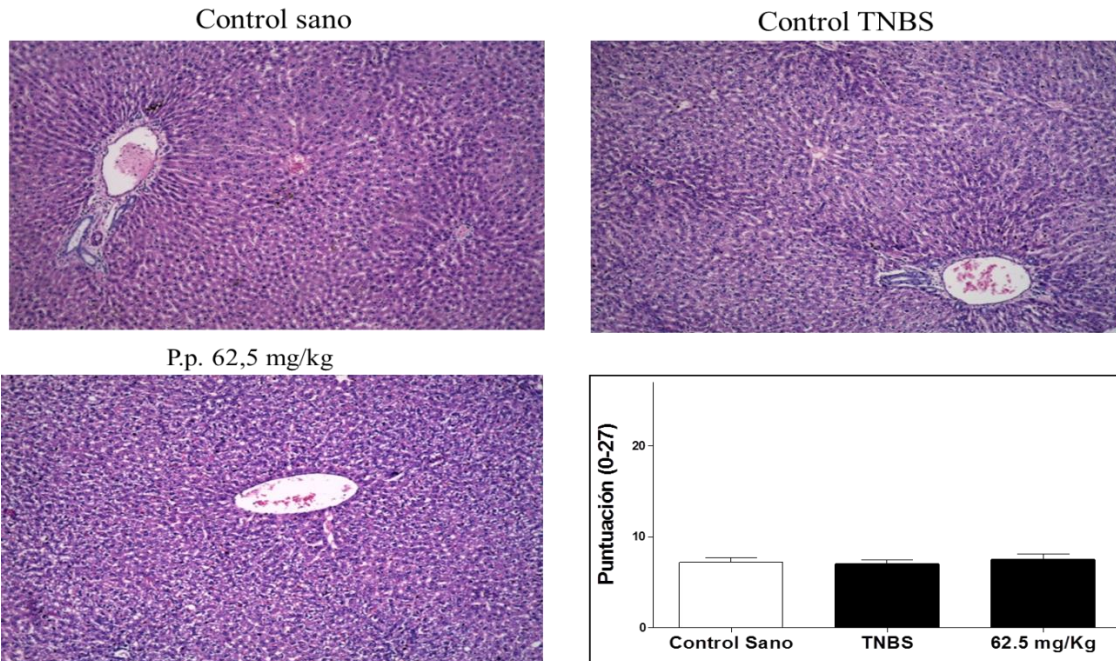


**Figura 10:** Análisis histológico de los segmentos colónicos obtenidos de ratas con colitis inducida con TNBS (40mg/mL vía IP) y tratadas con 62.5 mg/kg de P.p (Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*), calificado por un patólogo. Ampliación original 10X. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S.M. (n = 6).

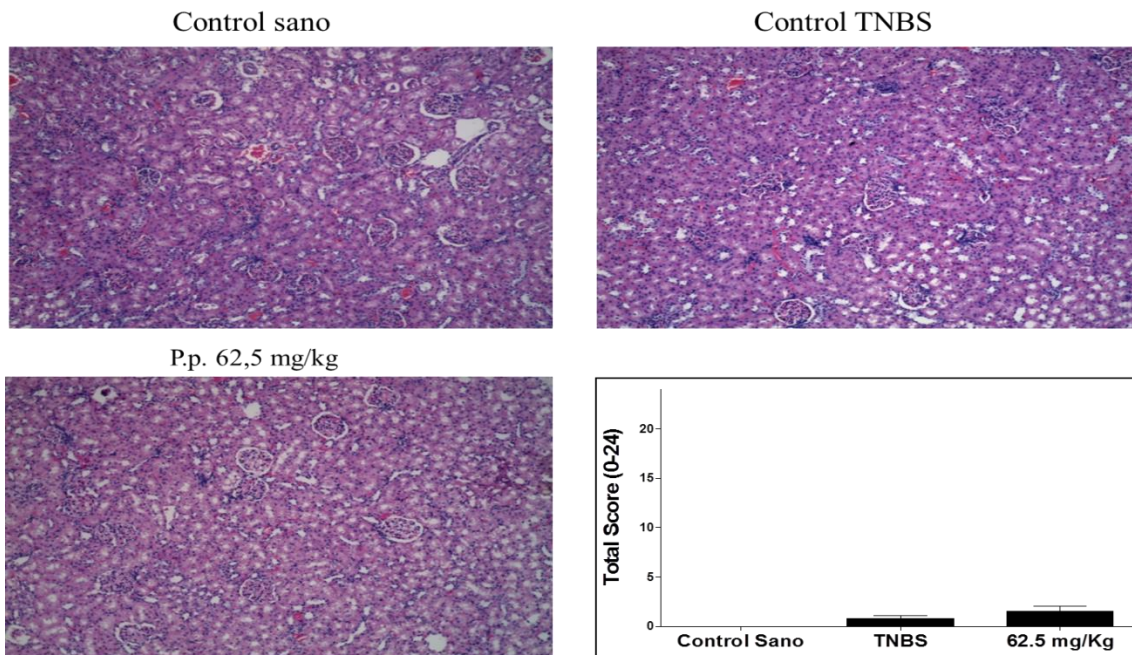
Los parámetros para el análisis histológico del colon fueron medidos según la escala de valoración de daño histológico descrita por Stucchi *et al.* 2000 con algunas modificaciones. La escala presenta una puntuación de 1-4 (0, ninguno; 1, ligero; 2, leve; 3, moderado; 4, severo)

Un el estudio realizado por Pinto *et al.* 2010, revelo que el compuesto Physalin E, aislado de la especie *Physalis angulata* mejoro las características histológicas de forma similar a *Physalis peruviana* en el colon, en orejas inflamadas con 12-O-tetradecanoil-forbol-13 acetato (35).

Con el objetivo de indagar sobre los posibles efectos tóxicos que pudiera tener la administración del extracto de *Physalis peruviana* sobre las ratas, durante los quince días del ensayo de la colitis, inducida por TNBS (40mg/mL, IP.), en el último del ensayo se tomaron muestras de hígado y riñones para análisis histológico, el cual reveló, que a nivel hepático ninguno de los grupos en estudio presentó inflamación, lesiones celulares, cambios regenerativos, congestión vascular y neoplasia (Figura 11). En cuanto al tejido renal no se observó edema, tubulitis, cambios regenerativos, necrosis, distalización ni fibrosis (Figura 12). Estos parámetros fueron medidos utilizando una escala de 1-3, que fue diseñada por el patólogo, donde: 0, ninguno; 1, leve; 2, moderado y 3, severo. Los hallazgos histopatológicos muestran que el extracto de *Physalis peruviana* no induce toxicidad hepática y renal, a una dosis de 62.5 mg/kg vía IP., cuando se administró de manera continua durante quince días.



**Figura 11:** Análisis histológico de tejido hepático obtenidos de ratas con colitis inducida con TNBS (40mg/mL vía IP) y tratadas con 62.5 mg/kg de P.p (Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*), calificado por un patólogo. Ampliación original 10X. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S.M. (n = 10).



**Figura 12:** Análisis histológico de tejido renal obtenidos de ratas con colitis inducida con TNBS (40mg/mL vía IP) y tratadas con 62.5 mg/kg de P.p (Extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*), calificado por un patólogo. Ampliación original 10X. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S.M. (n = 10).

## 5.6. Medida de la actividad de la enzima Mieloperoxidasa (MPO)

El efecto anti-inflamatorio del extracto de *Physalis peruviana*, fue confirmado bioquímicamente midiendo la actividad de la enzima MPO, encontrándose que este extracto presentó un significativo porcentaje de inhibición de esta enzima, como se puede ver en la Tabla 6.

**Tabla 6:** Actividad de la enzima MPO observada en los segmentos colónicos obtenidos de los grupos incluidos en el estudio de colitis inducida por TNBS.

Grupo	MPO (U/mg de tejido)	% de Inhibición
Control sano	0.09±0.029	----
Control TNBS	6.059±0.43***	----
TNBS + <i>P. peruviana</i>	2.448±0.75*&&	59.590

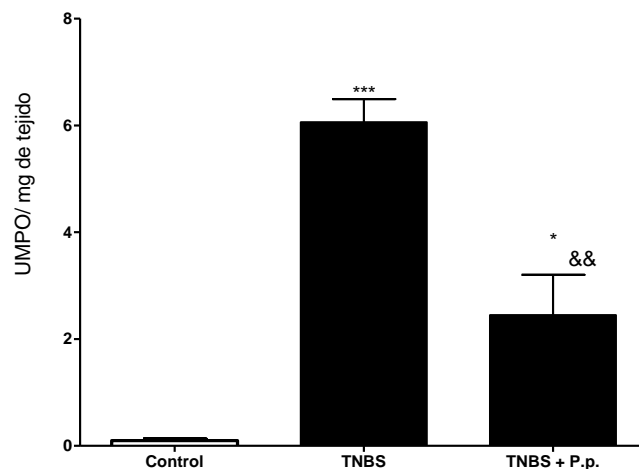
Los resultados representan la media ± E.S.M. (n=10).

(\*P<0.05; \*\*\*P<0.001 ANOVA, estadísticamente significativo frente al control sano). (&&P<0.01 ANOVA, estadísticamente significativo frente al control TNBS).

La mieloperoxidasa es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, sin embargo su fuente principal son los neutrófilos, donde se encuentra localizada a nivel lisosomal, en los gránulos azurófilos. Por consiguiente, la actividad de esta enzima se emplea como una medida indirecta de la infiltración de neutrófilos en el sitio de la inflamación. La MPO cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y del cloruro a ácido hipocloroso, un potente agente oxidante que en procesos de inflamación crónica e incontrolable, actúa sobre las células del hospedero causando daño a nivel de proteínas y ácidos grasos de la membrana y debido a su amplio espectro de reactividad genera ERO y ERN, asociadas con un aumento del riesgo al estrés oxidativo. Siendo considerada la actividad de esta enzima como un índice para medir la gravedad de la inflamación (88, 89).

La EII se caracteriza por una elevada actividad de la enzima MPO, como consecuencia del reclutamiento de neutrófilos en la mucosa intestinal por quimiocinas como la CXCL5, desempeñando un importante papel en la patogénesis de esta enfermedad (34).

Como se puede observar en la Figura 13 el extracto de *Physalis peruviana* disminuyó significativamente la actividad de la enzima MPO, indicando una disminución de la infiltración de neutrófilos en la mucosa intestinal, resultados que son consistentes con los hallazgos histológicos. Compuestos aislados de la especie *Physalis angulata*, también han mostrado tener un efecto inhibitorio sobre esta enzima (35).

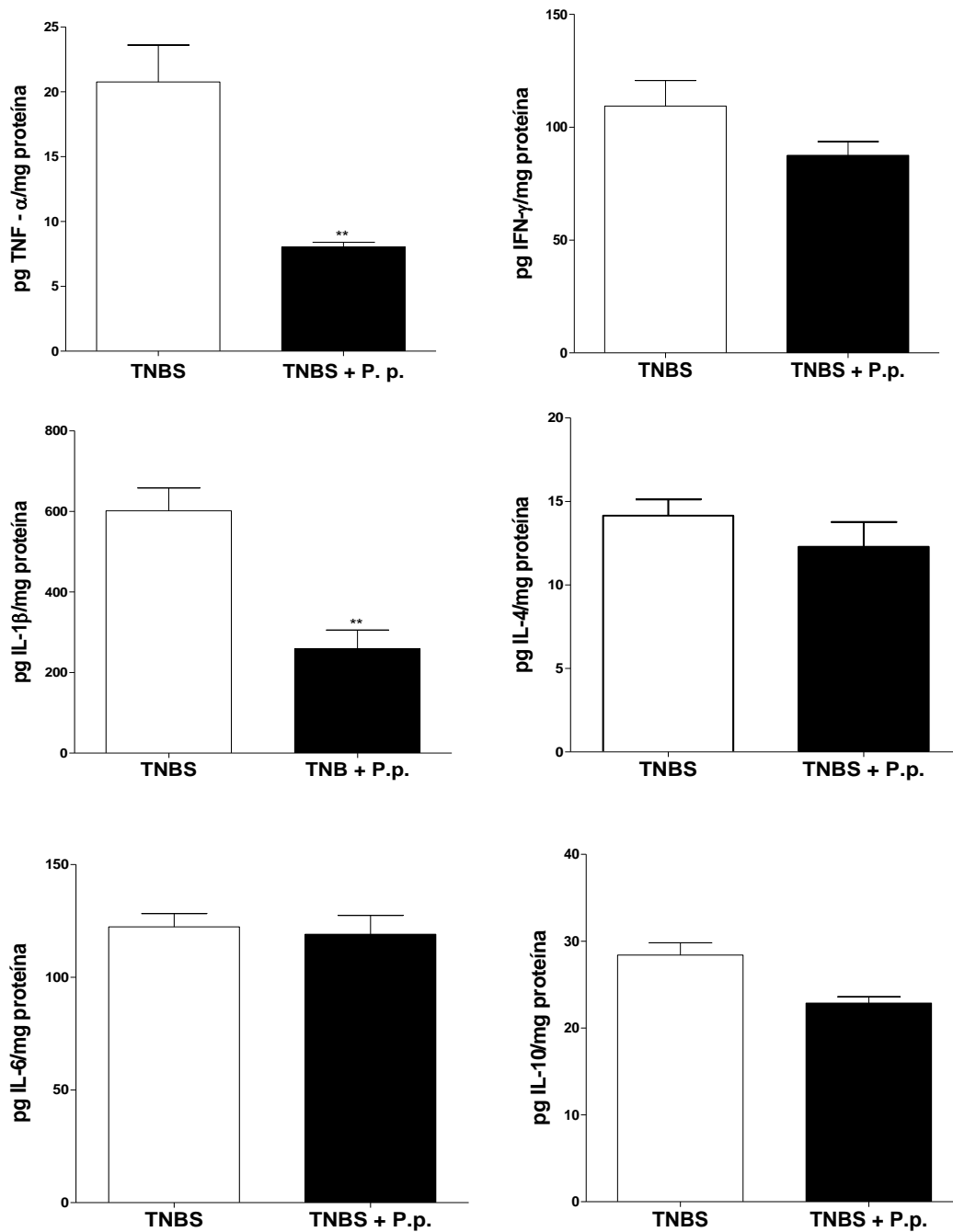


**Figura 13:** Efecto del extracto de *P. peruviana*, sobre la actividad de la MPO. Los resultados representan la media  $\pm$  E.S.M. ( $n = 10$ ). (\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$  ANOVA, estadísticamente significativo frente al control sano). (&& $P < 0.005$  ANOVA, estadísticamente significativo frente al control TNBS)

### 5.7. Medida de los niveles de citocinas.

En la enfermedad inflamatoria intestinal (tanto en la CU como en la EC), las células T CD4+ activadas presentes en la lámina propia y en la sangre periférica secretan citocinas inflamatorias, por lo que estas juegan un papel fundamental en el desarrollo de esta patología, debido a que contribuyen a la respuesta inflamatoria sostenida al activar otras células inflamatorias (macrófagos y linfocitos), promueven la fibrogénesis, activan metaloproteinasas y aumentan la producción de otros mediadores inflamatorios (4, 49, 51).

Los resultados de la Figura 14 muestran que el extracto de *Physalis peruviana* reduce de manera significativa en la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mientras que las IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  no se modificaron (Figura 14).



**Figura 14:** Efecto del extracto de *P. peruviana*, sobre la actividad de la TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, e IL-10.

Los resultados representan la media  $\pm$  E.S.M. (n = 10).

(\*P<0.05; \*\*P<0.005 ANOVA, estadísticamente significativo frente al control TNBS).

Es sabido que el TNF- $\alpha$  es responsable de una variedad de estímulos pro-inflamatoria, que son cruciales para la amplificación de la inflamación de la mucosa en la EII. Este se incrementa en la mucosa intestinal tanto en la EC como en la CU, y se correlaciona con una mayor puntuación de inflamación endoscópica (48). El TNF- $\alpha$  que se libera de los macrófagos durante la respuesta inflamatoria temprana desempeña un papel importante en la colitis inducida por ácido 2,4,6 trinitrobencenosulfónico TNBS- y es probable que sea un regulador clave de la cascada inflamatoria en este modelo de EII.(49).

Por su parte la IL-1, al igual que el TNF- $\alpha$ , promueve la respuesta inmune sobre la mucosa intestinal (48). Estudios han demostrado que antagonistas del receptor de IL-1 suprimen la infiltración de células inflamatorias en el intestino grueso, así como la actividad de MPO, contribuyendo a la disminución del edema y la necrosis de la mucosa en animales con colitis aguda (49). Por lo tanto la inhibición del TNF- $\alpha$  y de la IL-1 por parte del extracto total de *Physalis peruviana* se considera un resultado promisorio teniendo en cuenta que estas dos citocinas comparten una multitud de propiedades pro-inflamatorias, y son cruciales para la amplificación de la inflamación de la mucosa en la EII, por tanto su regulación son un objetivo potencial en la búsqueda de agentes terapéuticos para esta patología (4, 90).

En este sentido, la inhibición del TNF- $\alpha$  y de la IL-1 por parte del extracto total de *Physalis peruviana* se considera un resultado promisorio teniendo en cuenta que el desarrollo de sustancias que regulen la producción de estas citocinas se considera una alternativa para prevenir o tratar complicaciones de la EII. Otros estudios realizados por Soares *et al.* 2003 y Vieira *et al.* 2005; en *Physalis angulata*, demostraron que compuesto aislados de esta especie también disminuye los niveles de TNF- $\alpha$  (43, 44).



## 6. CONCLUSIÓN

- El extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* presentó una dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de 345,49 mg/kg.
- El extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* no presentó toxicidad hepática ni renal cuando fue administrado durante quince días a dosis de 62,5 mg/kg via IP, a ratas con colitis inducida por TNBS.
- El extracto total etéreo de *Physalis peruviana* L. disminuyó el daño de la mucosa y la relación peso/longitud del tejido colónico de ratas con colitis inducida por TNBS, indicando un efecto antiinflamatorio, el cual fue confirmado a partir de un análisis histológico.
- El extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* presentó disminución de la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y de la actividad de la enzima MPO. Lo cual podría contribuir significativamente al efecto antiinflamatorio observado en esta especie.
- El extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* no presentó ningún efecto sobre los niveles de INF- $\gamma$ , IL-4, IL-6, e IL-10



## 7. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos que permitan profundizar en los conocimientos toxicológicos que se tienen acerca del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*, con el fin de conocer los riesgos o peligros a los que pueda estar expuesta la salud humana al exponerse de manera crónica a este extracto.
- Realizar un ensayo de colitis por un periodo de tiempo mínimo de dos meses, empleando diferentes dosis del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*. Debido a que la EII es una patología de tipo crónico.
- Realizar ensayos que permitan conocer el comportamiento farmacocinético del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana*.
- Realizar estudios de proteómica y genómica que permitan elucidar los mecanismo(s), por los cuales el extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* ejerce su efecto antiinflamatorio.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Garibay EMV. Nutrición y enfermedades del aparato digestivo en niños. *Nutrición y enfermedades del aparato digestivo en niños*. 2011:317.
2. Louis E, Van Kemseke C, Reenaers C. Necessity of phenotypic classification of inflammatory bowel disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011;25:S2-S7.
3. Murdoch TB, Bernstein CN, El-Gabalawy H, Stempak JM, Sargent M, Elias B, et al. Prevalence of genetic variants associated with inflammatory bowel disease in a healthy First Nations cohort. *Canadian Medical Association Journal*. 2012;184(8):E435-E41.
4. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2008;14(27):4280.
5. Siegmund B, Zeitz M. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2011;17(27):3178.
6. Flood L, Innala E, Löfberg R, Wikström A-C. Patients with ulcerative colitis responding to steroid treatment up-regulate glucocorticoid receptor levels in colorectal mucosa. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2008;2(2):123-30.
7. Paiva L, Gurgel L, Silva R, Tomé A, Gramosa N, Silveira E, et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascular pharmacology*. 2002;39(6):303-7.
8. Uprety Y, Asselin H, Dhakal A, Julien N. Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*. 2012;8(7).
9. Kingston DG. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of natural products*. 2010;74(3):496-511.
10. Simbaqueba J, Sanchez P, Sanchez E, Zarrantes VMN, Chacon MI, Barrero LS, et al. Development and characterization of microsatellite markers for the cape gooseberry *Physalis peruviana*. *PloS one*. 2011;6(10):e26719.
11. Urrea R, Cabezas L, Sierra R, Cardenas M, Restrepo S, Jimenez P. Selection of antagonistic bacteria isolated from the *Physalis peruviana* rhizosphere against *Fusarium oxysporum*. *J Appl Microbiol*. 2011;111(3):707-16. Epub 2011/07/01.
12. Garzón-Martínez GA, Zhu ZI, Landsman D, Barrero LS, Mariño-Ramírez L. The *Physalis peruviana* leaf transcriptome: assembly, annotation and gene model prediction. *BMC genomics*. 2012;13(1):151.
13. Wei J, Hu X, Yang J, Yang W. Identification of Single-Copy Orthologous Genes between *Physalis* and *Solanum lycopersicum* and Analysis of Genetic Diversity in *Physalis* Using Molecular Markers. *PloS one*. 2012;7(11):e50164.

14. Wu S, Tsai J, Chang S, Lin D, Wang S, Huang S, et al. Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;108(3):407-13.
15. Pardo JM, Fontanilla MR, Ospina LF, Espinosa L. Determining the pharmacological activity of *Physalis peruviana* fruit juice on rabbit eyes and fibroblast primary cultures. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(7):3074-9.
16. Martínez W, Ospina LF, Granados D, Delgado G. In vitro studies on the relationship between the anti-inflammatory activity of *Physalis peruviana* extracts and the phagocytic process. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010;32(1):63-73. Epub 2009/08/15.
17. Franco LA, Matiz GE, Calle J, Pinzón R, Ospina LF. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomédica*. 2007;27(1):110-5.
18. IBAÑEZ DJM, CIENTIFICO I. Nuevos marcadores genéticos de predisposición a la enfermedad inflamatoria intestinal. 2008.
19. Anthony S. Fauci EB, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, and Joseph Loscalzo, Eds. *Harrison Principios de Medicina Interna*.
20. Pineda Ovalle LF. Enfermedad inflamatoria intestinal en Colombia: ¿Está cambiando nuestro perfil epidemiológico? *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2010;25:235-8.
21. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-94. Epub 2011/05/03.
22. Yepes I, Carmona R, Díaz F, Marín-Jiménez I. Prevalencia y características demográficas de la enfermedad inflamatoria intestinal en una población asegurada en Cartagena de Indias, Colombia. *Rev Col Gastroenterol*. 2010;25(2).
23. Baños FJ, Vélez MHR, Arango JFF, Gómez JHD, Zuluaga JIM, Arango CM, et al. Fenotipo e historia natural de la enfermedad inflamatoria intestinal en un centro de referencia en Medellín-Colombia. 2010.
24. Juliao Baños F, Ruiz Vélez MH, Flórez Arango JF, Donado Gómez JH, Marín Zuluaga JI, Monsalve Arango C, et al. Fenotipo e historia natural de la enfermedad inflamatoria intestinal en un centro de referencia en Medellín-Colombia. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2010;25:240-51.
25. Beaugerie L, Sokol H. Appendicitis, not appendectomy, is protective against ulcerative colitis, both in the general population and first-degree relatives of patients with IBD. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(2):356-7.
26. Frisch M, Pedersen BV, Andersson RE. Appendicitis, mesenteric lymphadenitis, and subsequent risk of ulcerative colitis: cohort studies in Sweden and Denmark. *BMJ: British Medical Journal*. 2009;338.

27. Boyko EJ, Koepsell TD, Perera DR, Inui TS. Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers. *New England Journal of Medicine*. 1987;316(12):707-10.
28. McGrath J, McDonald J, Macdonald J. Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;4.
29. Cantorna MT. Session 2: Micronutrients and the immune system Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2010;69(3):286-9.
30. Juliao F, Ruiz M, Florez J, Donado J, Marín J, Monsalve C, et al. Fenotipo e historia natural de la enfermedad inflamatoria intestinal en un centro de referencia en Medellín-Colombia. *Rev Col Gastroenterol*. 2010;25(3):240-51.
31. Dutra RC, Claudino RF, Bento AF, Marcon R, Schmidt EC, Bouzon ZL, et al. Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice. *PloS one*. 2011;6(11):e27122.
32. Nakayama T, Yamashita M. The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation. *Seminars in immunology*. 2010;22(5):303-9. Epub 2010/05/22.
33. Muzes G, Molnar B, Tulassay Z, Sipos F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(41):5848-61. Epub 2012/11/10.
34. Scaldaferrri F, Correale C, Gasbarrini A, Danese S. Mucosal biomarkers in inflammatory bowel disease: key pathogenic players or disease predictors? *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010;16(21):2616-25. Epub 2010/06/03.
35. Pinto NB, Morais TC, Carvalho KM, Silva CR, Andrade GM, Brito GA, et al. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine*. 2010;17(10):740-3. Epub 2010/02/13.
36. Nakamura K, Honda K, Mizutani T, Akiho H, Harada N. Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(29):4628.
37. Li M-C, He S-H. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2004;10(5):620-5.
38. Rahimi R, Shams-Ardekani MR, Abdollahi M. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010;16(36):4504.
39. Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(3):831-48. Epub 2011/02/15.

40. Thompson AlaL, C.W. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.*. 2011: p. 831-48.
41. Cho J. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.*. 2008:458-66.
42. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine.* 2012;160(1):29-44. Epub 2012/06/13.
43. Vieira AT, Pinho V, Lepsch LB, Scavone C, Ribeiro IM, Tomassini T, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* 2005;146(2):244-51. Epub 2005/07/19.
44. Soares MB, Bellintani MC, Ribeiro IM, Tomassini TC, Ribeiro dos Santos R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European journal of pharmacology.* 2003;459(1):107-12. Epub 2002/12/31.
45. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature immunology.* 2005;6(5):507-14.
46. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2008;14(27):4280-8. Epub 2008/07/31.
47. Masoodi I, Tijjani BM, Wani H, Hassan NS, Khan AB, Hussain S. Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review. *GMS German Medical Science.* 2011;9.
48. Lima de Albuquerque C, Comalada M, Camuesco D, Rodríguez-Cabezas ME, Luiz-Ferreira A, Nieto A, et al. Effect of kale and papaya supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism.* 2010;5(3):e111-e6.
49. de Faria FM, Luiz-Ferreira A, Socca EAR, de Almeida ACA, Dunder RJ, Manzo LP, et al. Effects of *Rhizophora mangle* on Experimental Colitis Induced by TNBS in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2012;2012.
50. Kelley WN. *Medicina Interna* 1992.
51. Algieri F, Zorrilla P, Rodriguez-Nogales A, Garrido-Mesa N, Banuelos O, Gonzalez-Tejero MR, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Phlomis purpurea* L. and *Phlomis lychnitis* L. in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Journal of ethnopharmacology.* 2013;146(3):750-9. Epub 2013/02/12.
52. Dost T, Ozkayran H, Gokalp F, Yenisey C, Birincioglu M. The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. *Digestive diseases and sciences.* 2009;54(6):1214-21.

53. Giachetti D, Monti L, Biagi M. Piante medicinali in fitoterapia. ANNALI-ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA. 2005;41(1):17.
54. Louis E, Van Kemseke C, Reenaers C. Necessity of phenotypic classification of inflammatory bowel disease. Best practice & research Clinical gastroenterology. 2011;25 Suppl 1:S2-7. Epub 2011/06/10.
55. Murdoch TB, Bernstein CN, El-Gabalawy H, Stempak JM, Sargent M, Elias B, et al. Prevalence of genetic variants associated with inflammatory bowel disease in a healthy First Nations cohort. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne. 2012;184(8):E435-41. Epub 2012/04/13.
56. Debnath T, Kim DH, Lim BO. Natural Products as a Source of Anti-Inflammatory Agents Associated with Inflammatory Bowel Disease. Molecules. 2013;18(6):7253-70.
57. Morton JF. Fruits of warm climates: JF Morton; 1987.
58. Mayorga H, Knapp H, Winterhalter P, Duque C. Glycosidically bound flavor compounds of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). J Agric Food Chem. 2001;49(4):1904-8. Epub 2001/04/20.
59. McCain R. Goldenberry, passionfruit and white sapote: potential fruits for cool subtropical areas. New Crops. 1993:479-86.
60. Wu S-J, Ng L-T, Huang Y-M, Lin D-L, Wang S-S, Huang S-N, et al. Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2005;28(6):963-6.
61. MAZORRA MF, QUINTANA ÁP, Miranda D, Fischer G, DE VALENCIA MC. ASPECTOS ANATÓMICOS DE LA FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DEL FRUTO DE UCHUVA *Physalis peruviana* (Solanaceae) Anatomic Aspects of Formation and Growth of the Cape Gooseberry Fruit *Physalis peruviana* (Solanaceae). Acta Biológica Colombiana. 2006;11(1):69-81.
62. Puente LA, Pinto-Muñoz CA, Castro ES, Cortés M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Research International. 2011;44(7):1733-40.
63. Lin J, Hackam DJ. Worms, flies and four-legged friends: the applicability of biological models to the understanding of intestinal inflammatory diseases. Disease models & mechanisms. 2011;4(4):447-56.
64. Mizoguchi A. Animal Models of Inflammatory Bowel Disease.
65. Mañé Almero J. Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal: Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. Nutrición Hospitalaria. 2007;22(2):178-89.
66. Brenna Ø, Furnes MW, Drozdov I, van Beelen Granlund A, Flatberg A, Sandvik AK, et al. Relevance of TNBS-Colitis in Rats: A Methodological Study with Endoscopic, Historical and Transcriptomic Characterization and Correlation to IBD. PloS one. 2013;8(1):e54543.

67. te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(10):995-9.
68. Fuss IJ, Boirivant M, Lacy B, Strober W. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. *J Immunol*. 2002;168(2):900-8. Epub 2002/01/05.
69. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98(3):694-702. Epub 1990/03/01.
70. Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(10):1929-39.
71. Barada KA, Mourad FH, Sawah SI, Khoury C, Safieh-Garabedian B, Nassar CF, et al. Localized colonic inflammation increases cytokine levels in distant small intestinal segments in the rat. *Life sciences*. 2006;79(21):2032-42.
72. Pérez-Navarro R, Ballester I, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F. Disturbances in epithelial ionic secretion in different experimental models of colitis. *Life sciences*. 2005;76(13):1489-501.
73. GRISHAM MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*. 1992;102:1524-34.
74. Sartor RB, Bond TM, Schwab J. Systemic uptake and intestinal inflammatory effects of luminal bacterial cell wall polymers in rats with acute colonic injury. *Infection and immunity*. 1988;56(8):2101-8.
75. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;109(4):1344-67.
76. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989;96(3):795-803.
77. Motavallian-Naeini A, Andalib S, Rabbani M, Mahzouni P, Afsharipour M, Minaiyan M. Validation and optimization of experimental colitis induction in rats using 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid. *Research in pharmaceutical sciences*. 2012;7(3):159.
78. Ratnasooriya W, Premakumara G, Tillekeratne L. Post-coital contraceptive activity of crude extracts of Sri Lankan marine red algae. *Contraception*. 1994;50(3):291-9.
79. Bass R, P. Günzel, et al. LD 50 versus acute toxicity. *Archives of Toxicology*. 1982;51(3):183-6.
80. Hayes AW. *Principles and methods of toxicology*. Informa Healthcare. 2007.
81. Repetto MaGRK. *Toxicología fundamental* 1997.

82. Langer Lilleholt L, Johansen C, Arthur JSC, Funding A, Bibby BM, Kragballe K, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in murine skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Acta dermato-venereologica*. 2011;91(3):271-8.
83. Bobin-Dubigeon C, Collin X, Grimaud N, Robert JM, Le Baut G, Petit JY. Effects of tumour necrosis factor-alpha synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *European journal of pharmacology*. 2001;431(1):103-10. Epub 2001/11/22.
84. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*. 1982;78(3):206-9.
85. Whittle B, Varga C, Berko A, Horvath K, Posa A, Riley J, et al. Attenuation of inflammation and cytokine production in rat colitis by a novel selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase. *British journal of pharmacology*. 2008;153(5):983-91.
86. Arun M, Asha VV. Preliminary studies on antihepatotoxic effect of *Physalis peruviana* Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;111(1):110-4. Epub 2006/12/13.
87. Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000;279(6):G1298-G306.
88. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;111(1):16-26.
89. Garrido G, González D, Lemus Y, Delporte C, Delgado R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L.(VIMANG<sup>®</sup>) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. *Phytomedicine*. 2006;13(6):412-8.
90. Andoh A, Yagi Y, Shioya M, Nishida A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2008;14(33):5154.



## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo N°1. Identificación taxonómica de *Physalis peruviana*.

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ

INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES  
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

Bogotá, D.C., 29 de marzo de 2006  
COL-110

Señor  
LUIS FRANCO OSPINA  
Bogotá

Asunto: Identificación Taxonómica.

Cordial Saludo:

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

Nombre:	<i>Physalis peruviana</i> L.
Familia:	Solanaceae
No. COL:	512200
No. Colección:	Luis Ospina s.n.
Determinó:	C. I. Orozco

El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,



JULIO BETANCUR  
Curador General  
Herbario Nacional Colombiano (COL)  
E-mail Herbario: herbario\_colbog@unal.edu.co

Copia: Archivo COL  
Eliana R.

Ciudad Universitaria, Edificio 425, Entrada Calle 53  
Tels. (57-1) 3165305 - 3165006 Ext. 11538 - Apartado 7495  
Fax (57-1) 3165365  
E-mail: herbario\_colbog@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia

## 9.2. Anexo N°2. Equipos, reactivos y preparación de reactivos

### EQUIPOS

- Horno de secado
- Rotaevaporador Buchi
- Termohigrometro
- Autoclave
- Agitador Vortex (Velp Scientifica)
- Microscopio
- Balanza gramera
- Balanza analítica (Ohaus)
- Revco
- Sonicador
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5702 RM o Kubota 2100)
- Lector de placas (Multiscan ex Thermo)

### REACTIVOS

- Éter de petróleo
- Polivinilpirrolidona (PVP)
- Tampón PBS
- Formalina tamponada
- Hematoxilina
- Eosina
- Ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS)
- Etanol grado reactivo
- Ketamina
- Diazepam
- Tampón fosfato (pH: 7.4).

- Hexadeciltrimetilamonio (HTAB)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Nitrógeno líquido
- Tampón fosfato (pH:6)
- Tampón Greenburger

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **PBS**

Solución Salina Tamponada con Fosfatos (PBS) estéril  
(Sin calcio y sin magnesio) pH 7.4

Reactivo	Cantidad	Concentración
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.16 g/L	8.09 mM
NaCl	8.00 g/L	137 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g/L	2.94 mM
KCl	0.20 g/L	2.68 mM

Agitar para homogeneizar y almacenar en frasco tapa rosca a 4 °C.

- **Tampón fosfato (pH: 7.4).**

### Tampón fosfato (pH: 7.4).

Reactivo	Cantidad	Concentración
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Solución A)</b>	13.6 g/L	0.1 M
<b>NaOH (Solución B)</b>	4 g/L	0.1 M

Preparar 500 mL de solución A + 390 mL de solución B. Medir el pH y ajustar con solución B hasta pH = 7.4. Completar con agua desionizada a 0.5 L.

- **Tampón fosfato (pH:6)**

<b>Tampón fosfato (pH: 6.0).</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Solución A)</b>	13.6 g/L	0.1 M
<b>NaOH (Solución B)</b>	4 g/L	0.1 M

Mezcla 500 mL de solución A + 50 mL de solución B. Medir el pH y ajustar con solución B hasta pH = 6.0. Completar con agua desionizada a 0.5 L.

- **Tampón Greenburger**

<b>Tampón Greenburger</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
<b>Cloruro de Sodio (NaCl).</b>	17.5 g/L	300 mM
<b>Tris</b>	0.9 g/L	15 mM
<b>Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>).</b>	0.4 g/L	2 mM
<b>Tritón X-100®</b>	1.23 mL/L	2 mM
<b>cOmplete Mini, Inhibidor de proteasas.</b>	100 MI (Sln 7X). 10 Tabletas	1X

Agitar para homogeneizar y almacenar en frasco tapa rosca a 4 °C.

### 9.3. Anexo N°3. Cuidado de animales

Registro de control de humedad y temperatura de animales de experimentación.

	UNIVERSIDAD DE CARTAGENA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS GRUPO EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS PROMISORIAS	
Versión: 01	Registró de control de humedad y temperatura de animales de experimentación.	Página 1 de 1
Fecha: 2011/08/22		

Fecha	Hora	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	observaciones

Elaborado por: Jenny Castro Guerrero	Revisado por: <u>Yanet Ocampo Buendia</u>	Aprobado por: Luis A Franco O
---	--	----------------------------------

- **Comité de ética**



**Universidad de Cartagena**

Vice-Rectoría de Investigaciones

**EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA  
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**

**CERTIFICA QUE:**

El proyecto titulado "IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS MOLECULARES IMPLICADAS EN EL EFECTO ANTI-INFLAMATORIO E INMUNOMODULADOR PRODUCIDO POR COMPUESTOS AISLADOS DE *PHYSALIS PERUVIANA* L., EN UN MODELO DE COLITIS ULCEROSA", presentado por **LUIS ALBERTO FRANCO OSPINA**, docente investigador de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, de la Universidad de Cartagena, no presenta impedimentos éticos, de acuerdo a lo contemplado en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y en el Reglamento de Ética de la Universidad de Cartagena, tal como consta en el Acta N° 23 del Comité de Ética en Investigaciones del 14 de octubre de 2010.

Para constancia se firma en la Ciudad de Cartagena, a los catorce (14) días del mes de octubre del año dos mil diez (2010).

  
**ALVARO OLIVERÁ DÍAZ, MD**  
Presidente

*Wayne Mackay*



*Siempre a la altura de los tiempos!*

Sede: Claustro de la Merced, Centro, Plaza de la Merced, Cra. 4ª N° 38-61, Segundo Piso. Teléfono: 6642663

E-mail: vicerectoria@investigaciones@unicartagena.edu.co - investigaciones@unicartagena.edu.co

Cartagena de Indias, D. T. N. y C.

**9.4. Anexo N°4. Test de toxicidad empleado para la evaluación de la toxicidad del extracto etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* L.**

	UNIVERSIDAD DE CARTAGENA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS GRUPO EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS PROMISORIAS	
Versión: 01	Test de Toxicidad.	Página 1 de 1
Fecha: 2011/08/22		



  

Muestra:									
Dosis, Vía de administración y Vehículo:									
Hora de administración:									
Fecha:									
Responsable:									
Parámetros:	Tiempo de respuesta								
<b>SNC</b>									
Actividad motora									
Reacción de alarma									
Temblores									
<b>OREJAS</b>									
Palidez									
Hiperemia									
Cianosis									
<b>EFFECTOS GENERALES</b>									
Salivación									
Pilo erección									
Micción									
Diarrea									
<b>EFFECTOS SUBJETIVOS</b>									
Agresivo									
Pasivo									
Temeroso									
<b>OBSERVACIONES</b>									


Elaborado por: Jenny Castro Guerrero	Revisado por: Yanet Ocampo Buendia	Aprobado por: Luis A Franco O
---	---------------------------------------	----------------------------------

## 9.5. Anexo N°5. Registros de análisis histológicos

	UNIVERSIDAD DE CARTAGENA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS GRUPO EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS PROMISORIAS	
	<b>EB-RE-21: Análisis Histopatológico Hígado</b>	
Versión: 01 Fecha: 2012/09/03		Página 1 de 1

**FECHA** (Día /Mes/ Año): \_\_\_\_\_  
**MUESTRA:** \_\_\_\_\_  
**ANALIZADO POR:** \_\_\_\_\_

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE MUESTRA HEPÁTICA					
Hallazgos Histopatológicos	Criterios de Evaluación				Observaciones
	0 (Ninguno)	1 (Leve)	2 (Moderado)	3 (Severo)	
<b>Inflamación y Necrosis/Apoptosis</b>					
1 Espacio Porta					
2 Zona de Interfase					
3 Lobulillar					
<b>Lesiones Hepatocelular</b>					
1 Degeneracion Balonizante					
2 Vacuolización					
3 Colestasis					
<b>Cambios Regenerativos</b>					
<b>Congestión Vascular</b>					
<b>Neoplasias</b>					

	UNIVERSIDAD DE CARTAGENA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS GRUPO EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS PROMISORIAS	
	<b>EB-RE-21: Análisis Histopatológico Riñón</b>	
Versión: 01 Fecha: 2012/09/03		Página 1 de 1

**FECHA** (Día /Mes/ Año): \_\_\_\_\_  
**MUESTRA:** \_\_\_\_\_  
**ANALIZADO POR:** \_\_\_\_\_

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE MUESTRAS RENAL					
Hallazgos Histopatológicos	Criterios de Evaluación				Observaciones
	0 (Ninguno)	1 (Leve)	2 (Moderado)	3 (Severo)	
Edema					
Tubulitis					
Cambios Regenerativos					
Necrosis Tubular Aguda					
Distalización					
Fibrosis					





Versión: 01  
 Fecha: 2012/09/03

EB-RE-19: Análisis Histopatológico Tejido Colónico

Página 1 de 2

FECHA (Día /Mes/ Año): \_\_\_\_\_



MUESTRA: \_\_\_\_\_

ANALIZADO POR: \_\_\_\_\_

**ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE MUESTRA DE COLON**

Capa	Criterio de análisis	0 (Ninguno)	1 (Ligero)	2 (Leve)	3 (Moderado)	4 (Severo)
<b>MUCOSA</b>	Ulceración					
	Infiltración polimorfonucleares					
	Infiltración mononucleares					
	Fibrosis					
	Edema					
	Actividad mitótica					
	Dilatación					
	Depleción de células caliciformes					
<b>SUBMUCOSA</b>	Infiltración de polimorfonucleares					
	Infiltración de mononucleares					
	Edema					
<b>CAPA MUSCULAR</b>	Infiltración de polimorfonucleares					
	Infiltración de mononucleares					
<b>SEROSA</b>	Infiltración de polimorfonucleares y mononucleares					

## 9.6. Anexo N°6. Registro de peso e ingestión de alimento de animales en el ensayo de colitis inducida por TNBS.



	UNIVERSIDAD DE CARTAGENA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS GRUPO EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS PROMISORIAS	
Versión: 01 Fecha: 2011/06/18	<b>EB-RE-07: Registro de peso e ingestión de alimento de animales en el ensayo de colitis inducida por TNBS.</b>	Página 1 de 1

Tratamiento	Animal	Fecha:		Fecha:		Fecha:		Fecha:		Fecha:		Fecha:	
		C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P
Control Sano (PVP)	1												
	2												
	3												
TNBS (40 mg/kg)	1												
	2												
	3												
Physalis peruviana (62.5 mg/kg)	1												
	2												
	3												

**NOTA:** El registro del peso de los animales (P) y de la comida (C) debe realizarse en gramos.

## 9.7. Anexo N°7. Registro de daño macroscópico de colon en el ensayo de colitis inducida por TNBS.

	UNIVERSIDAD DE CARTAGENA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS GRUPO EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS PROMISORIAS	
Versión: 01 Fecha: 2011/06/18	EB-RE-07: Registro daño macroscópico ensayo de colitis inducida por TNBS.	Página 1 de 1

Tratamiento	Animal	Colon		Daño total (cm)		Daño real (cm <sup>2</sup> )	Adherencia	Ulceracion
		Largo (cm)	Peso (mg)	Largo	Ancho			
Control Sano (PVP)	1							
	2							
	3							
TNBS (40 mg/kg)	1							
	2							
	3							
Physalis peruviana (62.5 mg/kg)	1							
	2							
	3							

**Nota:** se sigue el criterio establecido por robin-dubegion et al, 2001. La adherencia es relativa a la cantidad de tejido que se acumula alrededor del colon (0: no adhesión; 1 adherencia menor; 2 adherencia mayor) ulceracion (0 sin daño; 1 hiperemia focal; 2 ulceracion sin hiperemio o engrosamiento de la pared intestinal; 3 ulceracion con inflamacion en un sitio; 4= o > a 2 sitios de ulceracion e inflamacion; 5 muchos sitios de inflamacion > 1 cm a traves de l organo ; 6-10: muchos sitios de inflamacion > 2cm a traves del organo).