



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación preclínica de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en modelo murino de artritis reumatoide

Stefany Rocío Umaña Bautista

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2023

Evaluación preclínica de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en modelo murino de artritis reumatoide

Stefany Rocío Umaña Bautista

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias-Farmacología

Director (a):

Ph.D. Luis Fernando Ospina Giraldo

Línea de Investigación:

Plantas con actividad antiinflamatoria

Grupo de Investigación:

Principios Bioactivos en Plantas Medicinales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2023

"Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Ahora es el momento de comprender más para temer menos".

Marie Curie

Declaración de obra original

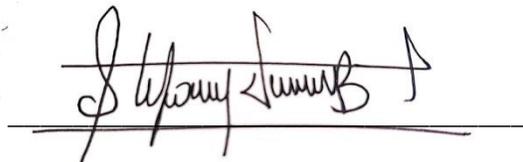
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is cursive and appears to read 'Stefany Rocío Umaña Bautista'.

Stefany Rocío Umaña Bautista

Fecha 01/02/2023

Agradecimientos

En primer lugar, quiero darle gracias a Dios por permitirme llegar tan lejos, etapas que de pequeña solo alcanzaba en mis sueños, y hoy, gracias a él, puedo decir que los alcance mis sueños y mucho más.

A mis padres quienes me brindaron una ayuda incondicional en el desarrollo de las etapas de mi vida hasta llegar a este punto, quienes me apoyaron y sirvieron de inspiración para nunca desistir ante las adversidades que se presentaron en este camino.

A mi hermana quien es mi confidente y a la vez mi ejemplo a seguir, quien me aconseja, quien me llena de sabiduría y me enseña a tener fe, aunque la situación sea compleja.

A mi sobrina hermosa, quien me alentó días y noches con su sonrisa y con sus palabras, aunque inocentes, me servían para entender desde otra lógica cosas que son más complejas en la realidad.

A mi hermano quien me apoyó constante y firmemente en los momentos difíciles de este trasegar, quien con su disciplina y temperamento me enseñó a hacerle frente a las situaciones que, aunque sean fuertes, siempre enfrentarlas con la cabeza en alto.

A mis docentes, quienes, con sus enseñanzas y pasión por la academia, sembraron en mí ese amor por la investigación, por estudiar, por esforzarme cada día más, a todos los que algún día estuvieron frente a mí en aula de clases, y supieron guiarme hacia esta etapa de mi vida.

A mis amigos, quienes con sus risas y con su apoyo incondicional no me dejaron rendirme y en medio de charlas y comentarios sarcásticos me hicieron comprender que la perseverancia rinde frutos.

A Ramón Fernando Quintero por siempre confiar en mí y siempre estar a mi lado para sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba.

Gracias a todos por acompañarme en este proceso de crecimiento profesional, intelectual, personal y emocional.

Resumen

Evaluación preclínica de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en modelo murino de artritis reumatoide

La medicina tradicional se ha enfocado en estudiar los beneficios terapéuticos de plantas de la familia solanácea. En el caso de la planta *Physalis peruviana* L. se han descrito sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e inmunomoduladoras. Sin embargo, en la actualidad no se ha reportado su uso en modelos murinos de inflamación crónica en artritis.

Objetivo: Evaluar el posible efecto antiartrítico de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en ratas Wistar hembras con artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) y colágeno.

Método: La fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. se obtuvo a partir de la percolación con etanol de material seco, al cual se le hizo fraccionamiento con diferentes solventes hasta obtener la fracción butanólica.

Se utilizó un modelo de inducción de artritis por adyuvante de Freund (ACF) y colágeno en ratas Wistar, evidenciando un pico de máxima inflamación el día 21. Los individuos fueron tratados desde el día 21 hasta el día 36 con dexametasona como medicamento patrón (1 mg/Kg/día) y la fracción butanólica (100, 50, 25 mg/Kg). La artritis fue evaluada a través de medición volumétrica de miembros posteriores (articulación del maléolo, zona plantar e interfalángica), evaluación radiográfica y análisis histopatológico. El efecto de la fracción butanólica sobre la inflamación se evaluó midiendo los niveles de interleucina 1 beta (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α); mientras que TBARs, la capacidad antioxidante (FRAP) y superóxido dismutasa (SOD) fueron medidos para evaluar el efecto de la fracción butanólica sobre el estrés oxidativo.

Resultados: La fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. no presentó diferencias significativas en la disminución de inflamación en comparación con el grupo patrón. Ninguno de los parámetros bioquímicos presentó diferencias significativas entre los

grupos de investigación. La artritis inducida por ACF y colágeno no presentó involución de acuerdo con el análisis histopatológico y radiográfico.

Conclusión: La fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100, 50, 25 mg/Kg/día/VO) no presentó actividad inmunomoduladora ni antioxidante.

Palabras clave: *Physalis peruviana* L., artritis, antioxidante, inmunomodulador, antiartrítico, erosión ósea y pannus.

Abstract

Preclinical evaluation of the butanolic fraction of calyces of *Physalis peruviana* L. in a murine model of rheumatoid arthritis

Traditional medicine has focused on studying the therapeutic benefits of plants from the *Solanaceae* family. In the case of the *Physalis peruviana* L plant, its anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulation properties have been described. However, its use in models of chronic inflammation in induced arthritis in murine models has not been reported to date.

Objective: To evaluate the possible antiarthritic effect of the butanolic fraction of the calyces of *Physalis peruviana* L. in female Wistar rats with arthritis induced by complete Freund's adjuvant (CFA) and collagen.

Method: The butanolic fraction of the calyces of *Physalis peruviana* L. was obtained from the percolation with ethanol of dry material, which was fractionated with different solvents until obtaining the butanolic fraction.

A Freund's adjuvant (FCA) and collagen induction model of arthritis was used in Wistar rats, evidencing a peak of maximum inflammation on day 21. Individuals were treated with dexamethasone as standard drug (1 mg/Kg/day) and the butanolic fraction. (100, 50, 25 mg/Kg) from day 21 to day 36. Arthritis was evaluated through volumetric measurement of hind limbs (malleolar joint, plantar and interphalangeal area), radiographic evaluation, and histopathological analysis. The effect of the butanolic fraction on inflammation was evaluated by measuring the levels of interleukin (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF α) while TBARs, antioxidant capacity (FRAP) and superoxide dismutase (SOD) were measured to assess the effect of the butanolic fraction on oxidative stress.

Results: The butanolic fraction of calyces of *Physalis peruviana* L. does not present significant differences in the reduction of inflammation compared to the standard group.

None of the biochemical parameters presented significant differences between the research groups. The arthritis induced by CFA and collagen does not present involution according to the histopathological and radiographic analysis.

Conclusion: The butanolic fraction of calyces of *Physalis peruviana* L. (100, 50, 25 mg/Kg/day/VO) did not present immunomodulatory and antioxidant activity.

Keywords: *Physalis peruviana* L., arthritis, antioxidant, immunomodulator, antiarthritic, bone erosion, pannus.

Contenido

	Pág.
Resumen	9
Abstract	11
Lista de Símbolos y abreviaturas	19
Introducción	21
1. Marco teórico	23
1.1 Artritis reumatoide (AR).....	23
1.1.1 Desarrollo de la AR	23
1.1.2 Curso de la enfermedad.....	26
1.1.3 Fisiopatología de la AR	27
1.2 Modelo murino de artritis.....	36
1.2.1 Artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) y colágeno.....	38
1.3 Tratamiento farmacológico de la AR	38
1.3.1 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en AR	38
1.3.2 Fármacos glucocorticoides en AR	39
1.3.3 Fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) - convencionales.....	39
1.3.4 Fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) - biológicos.....	40
1.4 Fitofarmacología de <i>Physalis peruviana</i> L.....	42
1.4.1 Actividad antiinflamatoria de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> L.	42
2. Objetivos	45
2.1 Objetivo general	45
2.2 Objetivos específicos	45
3. Metodología	47
3.1 Materiales y reactivos	47
3.1.1 Instrumentos.....	47
3.1.2 Reactivos.....	47
3.2 Equipos.....	48
3.3 Material vegetal.....	49
3.3.1 Obtención y selección de material vegetal	49
3.3.2 Proceso de extracción y fraccionamiento de la fracción butanólica de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> L.	50
3.4 Animales de experimentación.....	51
3.5 Ensayos preliminares.....	52
3.6 Diseño experimental	52
3.6.1 Medidas de control experimental	52

3.6.2	Modelo murino de inducción de artritis por adyuvante de Freund y colágeno en ratas Wistar	53
3.7	Evaluación de la inflamación	57
3.7.1	Evolución del peso	57
3.7.2	Medidas anatómicas.....	58
3.7.3	Estudio radiográfico.....	59
3.7.4	Evaluación histopatológica.....	60
3.8	Evaluación de parámetros bioquímicos – Muestras biológicas	61
3.8.1	Obtención de muestras	61
3.8.2	Cuantificación de proteína: Método Ácido biconcínico	62
3.8.3	Determinación de interleucinas.....	64
3.8.4	Índice de peroxidación lipídica (TBARs).....	65
3.8.5	Determinación del parámetro FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	66
3.8.6	Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	67
4.	Resultados y Discusión.....	69
4.1	Medidas anatómicas	69
4.1.1	Evolución del peso	69
4.1.2	Caracterización de animales normales.....	70
4.1.1	Efecto terapéutico de la fracción butanólica de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> L.	74
4.2	Estudio radiográfico	79
4.1	Evaluación histopatológica	86
4.2	Parámetros inmunomoduladores.....	88
4.2.1	Cuantificación de interleucinas	88
4.3	Parámetros bioquímicos	92
4.3.1	Índice de peroxidación lipídica TBARs	93
4.3.2	Determinación del parámetro FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).	95
4.3.3	Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	97
4.3.4	Resultados globales	99
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	103
5.1	Conclusiones.....	103
5.2	Recomendaciones	103
A.	Anexo: Aval ético para el proyecto de tesis	112
B.	Anexo: Estudios radiográficos	115
C.	Anexo: Cuantificación de interleucinas.....	120
D.	Anexo: Curvas de calibración – interpolación de datos ensayos bioquímico	122
E.	Anexo: Datos en prueba de ácido biconcínico para determinación de proteína en plasma y homogenado.....	123
F.	Anexo: Datos prueba TBARs	125
G.	Anexo: Datos método FRAP – Capacidad antioxidante	127
H.	Anexo: Datos prueba de superóxido dismutasa (SOD).....	129

Lista de figuras

	Pág.
Diagrama 1-1: Factores involucrados en el desarrollo de artritis reumatoide.....	27
Diagrama 1-2: Isoformas de peptidil arginina deiminasa (PAD).....	29
Imagen 3-1: Selección y secado de cálices de <i>Physalis peruviana</i> L.	49
Imagen 3-2: Preparación de sustancia artritogénica.....	54
Imagen 3-3: Administración de solución artritogénica por vía intradérmica.	55
Gráfica 3-1: Distribución de grupos de tratamiento por caja.	56
Gráfica 3-2: Línea de tiempo del ensayo preclínico de la fracción butanólica de <i>Physalis peruviana</i> L. en ratas Wistar hembras artríticas.	58
Imagen 3-4: Evaluación del grosor de miembros posteriores en ratas Wistar artríticas...59	59
Imagen 3-5: Fundamento: Método de Ácido bicinconínico.....	63
Imagen 3-6: Fundamento: Método de Índice de peroxidación lipídica.....	65
Gráfica 4-1: Efecto de la fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i> L. en el peso de ratas artríticas.	69
Gráfica 4-2: Evolución del grosor de la zona interfalángica, zona plantar y articulación del maléolo en miembros posteriores de ratas Wistar - Grupo satélite.....	74
Gráfica 4-3: Evolución del grosor de la zona interfalángica, zona plantar y articulación del maléolo en miembros posteriores de ratas Wistar artríticas - Grupo control.	75
Gráfica 4-4: Evolución del grosor de zona plantar en miembros posteriores de ratas Wistar artríticas tratadas con la fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i> L – Actividad antiinflamatoria.....	78
Gráfica 4-5: Efecto antiartrítico de la fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i> L. en ratas Wistar.....	79
Imagen 4-1: Placas radiográficas ratas Wistar hembras sanas – Grupo satélite.....	83
Imagen 4-2: Placas radiográficas ratas Wistar hembras artríticas – Grupo control.	84
Imagen 4-3: Placas radiográficas ratas Wistar hembras artríticas – Grupo patrón.	85
Gráfica 4-6: Cuantificación de interleucinas en plasma de ratas Wistar hembras artríticas.	92
Gráfica 4-7: Nivel de peroxidación lipídica en ratas Wistar artríticas tratadas con la fracción butanólica de <i>Physalis peruviana</i> L.....	95
Gráfica 4-8: Capacidad FRAP en ratas Wistar artríticas tratadas con la fracción butanólica de <i>Physalis peruviana</i> L.....	97
Gráfica 4-9: Actividad de la enzima superóxido dismutasa en ratas Wistar artríticas tratadas con la fracción butanólica de <i>Physalis peruviana</i> L.....	99

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Principales modelos murinos de inducción de artritis en ratas.....	37
Tabla 3-1: Obtención de la fracción butanólica de cálices <i>Physalis peruviana</i> L.	51
Tabla 3-2: Caracterización de los grupos experimentales	56
Tabla 3-3: Escala de clasificación de lesiones histopatológicas.....	61
Tabla 3-4: Preparación de curva de calibración para cuantificación de proteína. (técnica del ácido bicinconínico).	64
Tabla 4-1: Caracterización de medidas anatómicas en miembros posteriores de ratas Wistar hembra sanas - Grupo satélite.....	71
Tabla 4-2: Evaluación radiográfica de miembros posteriores de ratas Wistar hembras artríticas tratadas con la fracción butanólica de <i>Physalis peruviana</i> L.....	80
Tabla 4-3: Análisis histopatológico de miembros posteriores de ratas artríticas tratadas con la fracción butanólica de los cálices de <i>Physalis peruviana</i> L.....	88

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ACF	Adyuvante completo de Freund
ACPA	Anticuerpos antipeptidos citrulinados
ADAM-T4	Agrecanasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Artritis inducida por antígeno
AIC	Artritis inducida por colágeno
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
APC	Células presentadoras de antígeno
AR	Artritis reumatoide
BCA	Ácido bicinconánico
cDC	Células dendríticas convencionales
COX	Enzima ciclooxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación estándar
FARME	Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FLS	Sinoviocitos similares a fibroblastos
FR	Factor reumatoide
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GLC	Glucocorticoides
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GWAS	Genome-wide association studies
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HE	Hematoxilina-eosina
HLA	Human leukocyte antigen
IFN	Interferón
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2

Abreviaturas

Abreviatura Término

<i>i</i> NOS	Óxido nítrico sintasa inducible
<i>LEF</i>	Leflunomida
<i>LOX</i>	Lipoxigenasa
<i>MAPK</i>	Mitogen-activated protein kinases
<i>M-CSF</i>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<i>MEC</i>	Matriz extracelular
<i>MHC</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<i>MMP</i>	Metaloproteinasas
<i>MMP13</i>	Colagenasa
<i>MMP3</i>	Estromelisina
<i>MTX</i>	Metotrexato
<i>NK</i>	Natural killer cells
<i>NO</i>	Óxido nítrico
<i>O₂•</i>	Anión superóxido
<i>•OH</i>	Radical hidroxilo
<i>ONOO-</i>	Anión peroxinitrito
<i>PAD</i>	Deiminasa peptidilarginina
<i>PBS</i>	Solución salina tamponada con fosfatos
<i>pDC</i>	Células dendríticas plasmocitoides
<i>PG</i>	Prostaglandinas
<i>PGIA</i>	Artritis inducida por proteoglicanos
<i>PIA</i>	Artritis inducida por pristane
<i>EOR</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>SNP</i>	Polimorfismos de un solo nucleótido
<i>SOD</i>	Superóxido dismutasa
<i>SSF</i>	Solución salina fisiológica
<i>SSZ</i>	Sulfasalazina
<i>TBARs</i>	Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
<i>TGF-β</i>	Factor de crecimiento transformante
<i>TLR</i>	Receptores tipo Toll
<i>TNFα</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>TPTZ</i>	2,4,6-tripiridil-s-triazina

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la inflamación de múltiples articulaciones, en donde el individuo según la progresión de la enfermedad puede presentar deterioro del cartílago, erosión ósea y disminución del espacio interarticular; presentando en estadios avanzados anquilosamiento de las articulaciones. En la actualidad la artritis reumatoide es una de las principales enfermedades reumáticas con mayor incidencia de ingreso y permanencia en el área de hospitalización, así como de incapacidad laboral (Durán et al., 2002; Cho et al., 2007).

A nivel mundial, la incidencia anual de AR es aproximadamente de 3 casos por 10.000 habitantes, siendo su prevalencia del 1 % que asciende con la edad. Afecta a la población en general, no obstante, tiene una mayor presencia entre nativos americanos (5 – 6 %) y cuenta con una prevalencia menor en personas afrodescendientes de la región Caribe (Hazes et al., 2011). En Colombia, la prevalencia de AR es de 2 casos por cada 1000 habitantes, siendo mayor en Bogotá y los departamentos del Eje Cafetero (Antioquia, Quindío, Caldas y Risaralda) (Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, 2016).

El tratamiento de la AR tiene dos principales objetivos: primero, disminución de los síntomas (inflamación y dolor) utilizando fármacos como los analgésicos, AINEs, y glucocorticoides. Segundo, la modificación de la enfermedad empleando fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) de tipo sintético y biológico, los cuales permiten controlar la progresión de la AR. Se han reportado para estos fármacos algunos eventos adversos que incluyen la neumonitis intersticial aguda, fibrosis pulmonar (Grant, 1997), toxicidad mucocutánea (Klinkhoff & Teufel, 1995), diarrea, náuseas, dolor abdominal, infecciones respiratorias altas, hepatotoxicidad (van Riel et al., 2004), cefalea, vértigo, riesgo de tumores y el desarrollo de autoinmunidad (Alañón et al., 2018).

En la actualidad entre 30 y 60 millones de personas en todo el mundo padecen de AR, por lo que su tratamiento supone un importante coste económico y social; siendo el mayor costo directo en su atención el de los medicamentos (World Health Organization, 2004; Kumar et al., 2018). En muchas ocasiones los pacientes crean resistencia frente a la primera opción de tratamiento (Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad FARME - sintéticos), por este motivo se debe continuar la medicación con FARME- biológicos, los cuales tienen un mayor precio; situación por la cual se buscan alternativas dentro de la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades, partiendo de la actividad biológica atribuible a los metabolitos secundarios presentes en diferentes órganos de las plantas; con el fin de generar alternativas para el apoyo de tratamientos terapéuticos y realizar aportes a la industria farmacéutica para la elaboración de nuevos productos.

En los últimos años se han evidenciado resultados relevantes de investigaciones con respecto a la actividad biológica antiinflamatoria, inmunomoduladora y antioxidante de hojas, tallos y cálices de *Physalis peruviana* L. atribuidos a la presencia de flavonoides y otros compuestos con propiedades antioxidantes (Toro et al., 2014). Estudios han reportado resultados positivos al emplear el extracto etanólico y fracciones de los cálices de *Physalis peruviana* L. en modelos de inflamación aguda, corroborando la actividad antiinflamatoria y antioxidante (Franco et al., 2007). Del mismo modo, se ha reportado la disminución de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α), asociadas a su actividad antiinflamatoria en un modelo murino de colitis al utilizar el extracto total etéreo de los cálices (Castro, 2013). Posiblemente, las actividades farmacológicas reportadas se encuentran asociadas a la presencia de metabolitos secundarios como la rutina, quercetina y nicotoflorin en la fracción butanólica de cálices de uchuva (Toro et al., 2014).

La información presentada a continuación busca brindar soporte a futuras investigaciones en la implementación de modelos de inflamación crónica y de la caracterización del perfil terapéutico de la planta *Physalis peruviana* L., con el ánimo de identificar principios bioactivos que contribuyan al tratamiento de enfermedades reumáticas a nivel inmunológico y de estrés oxidativo.

1. Marco teórico

1.1 Artritis reumatoide (AR)

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune que se presenta en múltiples articulaciones bilateralmente. Se caracteriza por una inflamación progresiva del tejido sinovial de las articulaciones, del cartílago y del hueso; ocasionando la destrucción del cartílago y la erosión ósea (Lin et al., 2020). En la fase temprana de la enfermedad se ven afectadas algunas articulaciones, pero a medida que progresa puede extenderse en gran medida. Las articulaciones más afectadas son las metacarpofalángicas, interfalángicas proximales, metatarsfalángicas, muñecas y las rodillas (Grassi et al., 1998).

El sinovio normalmente es una estructura delgada similar al espacio articular. El sinovio reumatoide, en cambio, está infiltrado por células como los macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y linfocitos T, que se organizan en agregados linfoides. Así mismo se puede evidenciar infiltración de sinoviocitos y proliferación neovascular acentuada (Morel, 2014).

Los principales síntomas de AR en su fase temprana son: fatiga, sensación de gripe, articulaciones inflamadas, sensibles, y rigidez matutina, mientras que en estadios avanzados puede presentar pérdida de la amplitud de movimiento, erosión ósea, destrucción del cartílago y nódulos reumáticos (Lin et al., 2020). También pueden verse afectados otros órganos, como vasos sanguíneos, riñones, corazón, pulmones e hígado (van Delft & Huizinga, 2020).

1.1.1 Desarrollo de la AR

La etiología de la AR es aún desconocida, en los últimos años se ha evidenciado que existen factores genéticos, ambientales y epigenéticos que pueden estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad. Por ende, es posible que su establecimiento requiera de dos condiciones: (1) Predisposición genética del paciente que da como resultado la generación

de linfocitos T y B autorreactivos y (2) un evento desencadenante, como infecciones virales y bacterianas o lesiones tisulares que pueden estimular los linfocitos autorreactivos. A continuación, se describen los principales factores asociados a la enfermedad:

▪ **Predisposición genética**

Estudios realizados por la genome-wide association studies (GWAS), han identificado aproximadamente 100 alelos que pueden estar asociados con la AR, entre ellos está la variante genética del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Se ha sugerido que los alelos del HLA (Human Leukocyte Antigen) pueden definir diferentes fenotipos de la enfermedad, al igual que variantes genéticas en loci no HLA, como es el caso de varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que pueden llegar a modular la liberación de varias citocinas involucradas en el desarrollo de la AR. Con relación a lo anterior se ha evidenciado que el genotipo de la TNF α -308A está asociada a la susceptibilidad y a la gravedad de la enfermedad. Aunque se cree que las diferentes variantes genéticas en los loci HLA y no HLA son cruciales en la patogenia de la AR, no pueden explicar por sí solas la susceptibilidad a la enfermedad, pero pueden ser objetivos para agentes terapéuticos.

La asociación de diferentes componentes que participan en el desarrollo de la AR permite comprender su patogenia, por ejemplo, a nivel del sistema inmune innato y adaptativo se encuentran componentes que ejercen efectos directos o indirectos sobre la inflamación y remodelación de tejidos tanto a nivel sistémico como local; que contribuyen a la liberación de citocinas (Giannini et al., 2020).

Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han centrado en comprender la susceptibilidad a la AR, siendo igual de importante realizar investigación enfocada en la identificación de biomarcadores asociados a la gravedad de la enfermedad. De igual manera, sería valioso establecer biomarcadores genéticos para predecir el éxito de un tratamiento, pero debido a tamaños pequeños de muestra y estudios limitados no se han definido (Smolen et al., 2018).

▪ **Epigenética**

La epigenética, junto con la metilación del ADN y la acetilación de histonas, podría influir en el desarrollo de AR. En estudios de metilación del ADN en personas no emparentadas se identificaron nueve grupos con un patrón de metilación diferencial en la región del HLA con respecto a controles sanos, indicando que factores ambientales pueden inducir cambios en la actividad celular a través de un mecanismo generado por la metilación del ADN. Por ejemplo, en fumadores los niveles de metilación fueron más altos en individuos con AR que portaban el alelo de riesgo HLA DRB1, que en aquellos que no portaban el alelo de riesgo; esta diferencia en la metilación no se observó en los no fumadores (Smolen et al., 2018).

▪ **Sexo y hormonas sexuales**

El tipo de sexo ha sido considerado como un factor determinante en el desarrollo de la AR se ha reportado mayor incidencia en mujeres que en hombres en proporciones de 3:1. Su tendencia se asocia a los efectos estimulantes generados por estrógenos sobre el sistema inmunitario, así como desbalances hormonales presentados en procesos de menopausia, postparto y mujeres nulíparas (Smolen et al., 2018).

▪ **Microbiota**

La enfermedad periodontal y la AR son enfermedades que comparten mecanismos patogénicos, factores ambientales de riesgo y se asocian en estudios epidemiológicos. El desarrollo de su patogenia puede estar asociada al agente causal *Porphyromonas gingivalis*, considerado como nexo epidemiológico entre la AR y la periodontitis. Es el único organismo procariota que expresa la enzima deiminasa peptidilarginina (PAD), la cual convierte la arginina a citrulina en tejidos normales, es decir, promueve la formación de proteínas citrulinadas que actúan como precursores de inflamación crónica, con destrucción de cartílago y erosión ósea en articulaciones al igual que en la AR (Espinoza & García, 2013).

▪ **Otros factores**

Investigaciones sobre hábitos de vida modificables se han asociado a la presentación de AR, encontrando que personas con un índice de masa corporal superior a 30 con respecto a individuos de índice de masa corporal de 20 presentan mayor riesgo de AR, al igual que mujeres con síntomas de trastorno de estrés postraumático (Lee et al., 2016). Inclusive se ha evidenciado que el tabaquismo, exposiciones a sílice y enfermedades infecciosas como el parvovirus B19; pueden ocasionar niveles elevados de citocinas responsables de la prolongación de la inflamación, lo que conduce a la modificación de autoantígenos (principalmente por citrulinación) que genera neoepítomos por una pérdida de carga superficial y una mayor susceptibilidad a la degradación proteolítica presente en la AR (Lin et al., 2020; Olivares et al., 2011).

1.1.2 Curso de la enfermedad

La fase preclínica de la AR inicia en una etapa de alto riesgo y susceptibilidad de individuos con factores genéticos que debido a un estímulo por parte de factores ambientales o epigenéticos pueden desarrollar la enfermedad. Es posible que durante esta fase con una intervención farmacológica específica se anule o prevenga la enfermedad. En la actualidad no se encuentra dilucidado el mecanismo que utilizan los factores ambientales en el desarrollo de la AR. Sin embargo, se considera que los factores ambientales como el cigarrillo; pueden actuar sobre las células de la mucosa e inducir el proceso de citrulinación o deiminación que consiste en la conversión postraduccional del aminoácido arginina a citrulina, en una variedad de proteínas intracelulares (como las histonas) y proteínas de la matriz (por ejemplo, fibronectina, colágeno, fibrinógeno, enolasa y vimentina) (Smolen et al., 2018).

Una vez ocurre el proceso de citrulinación, los péptidos se unen al complejo mayor de histocompatibilidad y son presentados a los linfocitos T, que a su vez estimulan a los linfocitos B para sintetizar anticuerpos que son capaces de reconocer a proteínas propias como el factor reumatoide FR (dirigidas a IgG) y anticuerpos contra péptidos citrulinados ACPA (dirigida a proteínas citrulinadas) promoviendo la formación de autoanticuerpos (Smolen et al., 2018).

Las células del estroma (como los sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS)), las células presentadoras de antígeno (APC) y los macrófagos pueden activarse localmente y producir una serie de factores inflamatorios. La respuesta autoinmune provocada por el sistema inmunitario desencadena la inflamación sinovial. Sin embargo, para ocasionar sinovitis se requerirá un detonante como la formación de complejos inmunitarios, activación del complemento o lesión microvascular que promuevan la producción de citocinas que perpetúan la enfermedad hasta inducir lesión del cartílago y erosión ósea (Smolen et al., 2018).

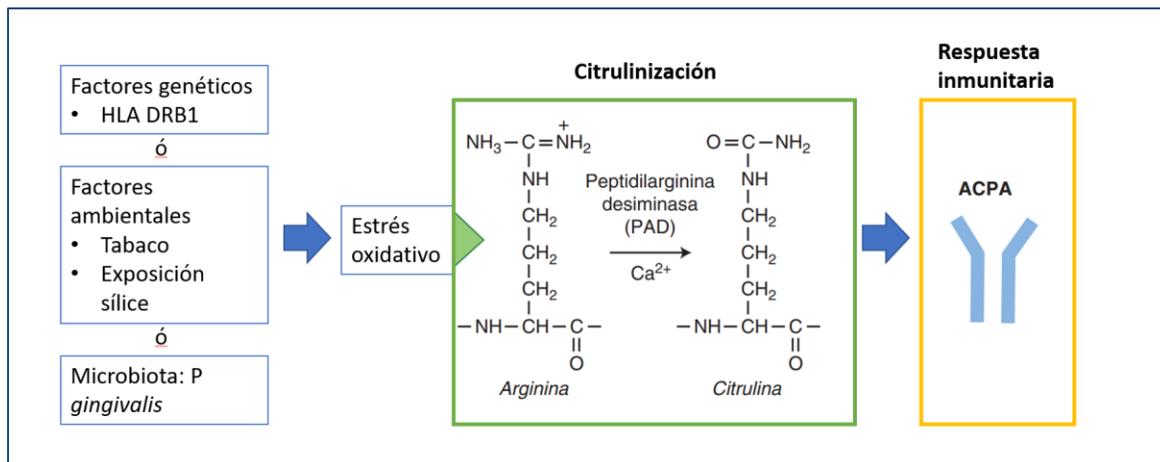
En cuanto a la fase temprana de la AR, se caracteriza por la inflamación de la cápsula sinovial debido a la infiltración en mayor medida de linfocitos TCD4, macrófagos y células del estroma. Durante la primera semana después de la aparición de los síntomas iniciales se ha descrito presencia de enzimas metaloproteinasas capaces de destruir la matriz en el revestimiento de la íntima sinovial y establecimiento de vías patogénicas en la membrana sinovial, mientras que en la fase establecida de la enfermedad se ve el trabajo más exhaustivo de los macrófagos y fibroblastos en la perpetuación de la sinovitis (Smolen et al., 2018).

1.1.3 Fisiopatología de la AR

La AR es una enfermedad autoinmune cuya patogenia es en gran parte desconocida. Sin embargo, se ha asociado su desarrollo a factores de riesgo genéticos, epigenéticos y ambientales, que pueden dar lugar al desarrollo de anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (ACPA); por la activación de la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD), que cataliza residuos de citrulina a arginina a partir de péptidos presentes en las matrices celulares como el fibrinógeno, la fibronectina, la filagrina, el colágeno, la enolasa, la queratina e incluso la vimentina; dando lugar a péptidos citrulinados presentes en mayor medida en la etapa inicial de la enfermedad (ver diagrama **1-1**) (Morel, 2014; Olivares et al., 2011).

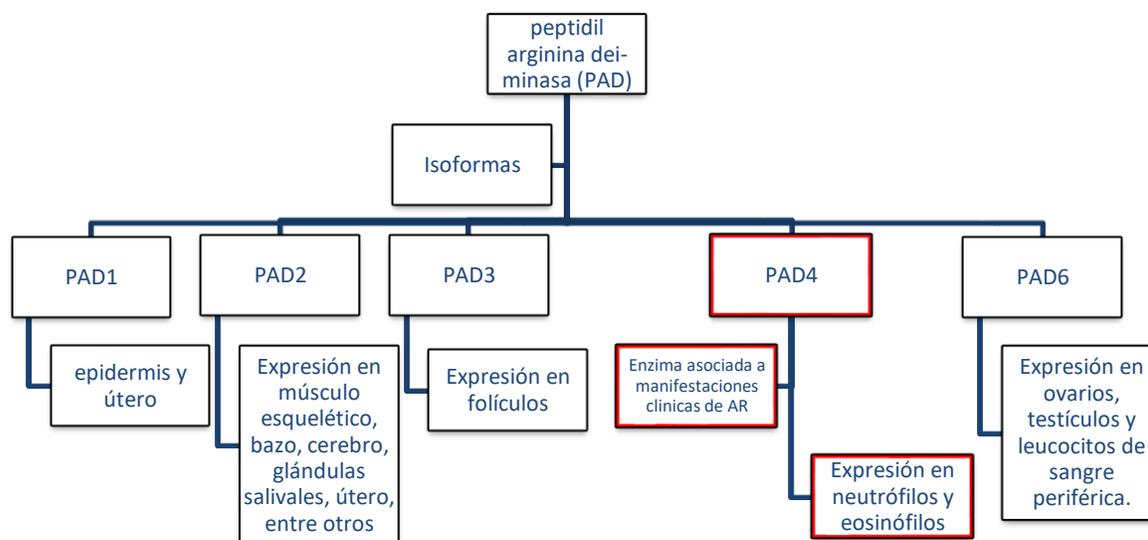
La citrulinización de proteínas es un proceso normal fisiológico desconocido en gran parte que se presenta en mayor medida en procesos patológicos mediados por la PAD, de la cual se conocen 5 isoformas (ver diagrama **1-2**).

Diagrama 1-1: Factores involucrados en el desarrollo de artritis reumatoide. El desarrollo de la AR se encuentra relacionado a factores genéticos, factores ambientales o presencia de bacterias bucales como *P. gingivalis* que promueven modificaciones postraduccionales a partir de péptidos con residuos de arginina a citrulina, por la catálisis de la enzima PAD que promueve una respuesta inmunitaria a través del desarrollo de anticuerpos específicos de proteínas citrulinadas (ACPA). En el caso puntual de la *P. gingivalis* presenta una enzima denominada enolasa capaz de ser detectada por los anticuerpos humanos específicos de enolasa humana citrulinada, que pueden causar la reacción inflamatoria observada en la AR.



La presencia de proteínas citrulinadas y expresión de la enzima PAD en sus isoformas PAD4 se ha asociado a manifestaciones clínicas de AR, mientras que la isoforma PAD2 ha sido encontrada en el líquido sinovial. Por lo anterior se concluye que la AR está asociada a la generación de anticuerpos patogénicos que reconocen proteínas citrulinadas en procesos de inflamación. En la AR inducida por colágeno en ratas se observó la relación del proceso de citrulinación del colágeno en la auto reactividad del sistema inmunitario (Olivares et al., 2011).

Diagrama 1-2: Isoformas de peptidil arginina deiminasa (PAD). Se han identificado 5 isoformas de la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD) distribuidas en los tejidos como PAD1 se expresa predominantemente en la epidermis y útero; PAD2 se expresa en músculo esquelético, bazo, cerebro, glándulas salivales, útero, entre otros; PAD3 se expresa en folículos; PAD4 enzima asociada a la presentación de cuadro clínico en AR, se expresa en neutrófilos y eosinófilos; PAD6 ha sido detectada en ovarios, testículos y leucocitos de sangre periférica. En procesos patológicos, las proteínas citrulinadas se han asociado a la enfermedad AR.



Las proteínas citrulinadas son reconocidas por las células presentadoras de antígeno, que a través del complejo de histocompatibilidad tipo II promueven la liberación de linfocitos T autorreactivos que se diferencian en linfocitos T productores de citocinas como el interferón γ (INF- γ) y la interleucina 2 (IL-2), con una respuesta denominada de tipo TH1 y una respuesta denominada TH17 implicada en la formación de linfocitos T liberadores de citocina IL-17 (Olivares et al., 2011).

La interacción de linfocitos T con los linfocitos B promueven el desarrollo de ACPA. Los linfocitos B a pesar de ser considerados como células accesorias, se ha dilucidado que pueden actuar como células presentadoras de antígeno CPA, ya que pueden presentar antígenos a los linfocitos TCD4 debido a los factores reumatoideos de la membrana que permiten captar con mucha eficacia los complejos inmunitarios. A continuación, se detalla cada uno de los actores que intervienen en la fisiopatología de la AR (Olivares et al., 2011).

▪ Inmunidad innata

La activación de la inmunidad innata se da por los receptores tipo Toll (TLR) denominados de reconocimiento de patrones, es decir, capaces de identificar moléculas expresadas por los microorganismos infecciosos. Los TLR hacen parte de la familia de los receptores de la IL-1 y son los sensores de primera línea de las señales de peligro que se liberan después de una lesión o infección. La activación de los TLR estimula las células dendríticas, los sinoviocitos y los macrófagos que intervienen en el inicio y mantenimiento de la AR a través de su función como fagocitos, células presentadoras de antígenos y productoras de citocinas (Edilova et al., 2021).

Células dendríticas en la AR

Una vez activadas las células dendríticas sinoviales por los TLR, estas pueden migrar a los ganglios linfáticos donde los linfocitos T pueden estar sesgados para el fenotipo TH1; vía que activa las células que residen en la articulación promoviendo la liberación de citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión favoreciendo el reclutamiento de células inflamatorias en la articulación. La mayoría de las células dendríticas son células presentadoras de antígeno que expresan altos niveles de HLA tipo I y II y moléculas coestimuladoras de linfocitos T (Edilova et al., 2021).

Existen dos tipos de células dendríticas involucradas en la AR: DC convencionales (cDC) y DC plasmocitoides (pDC) que contribuyen a la progresión de la enfermedad al secretar una gran cantidad de citocinas, incluidos TNF, IL-1, IL-12, IL-6, interferones (IFN), así como factores de diferenciación, incluido el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Edilova et al., 2021; Morel, 2014).

Macrófagos en la AR

Los macrófagos se encuentran presentes desde el inicio y establecimiento de la AR, considerados fuentes importantes de citocinas y enzimas degradantes que inducen inflamación en las articulaciones hasta ocasionar la destrucción del cartílago, erosión ósea y angiogénesis sinovial. Actúan como APC estimulando la respuesta en células T. Su activación está dada por los TLR, linfocitos T, complejos inmunitarios y partículas lipoproteicas (Morel, 2014).

Los macrófagos inician como monocitos circulantes que se infiltran en el sinovio donde se diferencian en macrófagos, pueden polarizarse y convertirse en macrófagos similares a M1 (macrófagos 1) activados clásicamente (considerados como proinflamatorios) y macrófagos similares a M2 (macrófagos 2) activados alternativamente con propiedades antiinflamatorias y de reparación de tejidos (Siouti & Andreakos, 2019).

Los macrófagos M1 secretan una variedad de citocinas proinflamatorias en las articulaciones, como TNF, IL-1 β , IL-8, IL-15, IL-18 y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). Adicionalmente, ocasionan la destrucción del cartílago debido a la liberación de metaloproteinasas en la matriz. En el caso de los macrófagos M2 producen IL-10 junto con arginasa-1, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de crecimiento transformante (TGF- β) (Morel, 2014).

Finalmente, los monocitos y macrófagos son considerados como los centinelas del sistema inmunitario, son capaces de detectar agresiones que afectan la homeostasis como los microbios, ligandos TLR, células necróticas, complejos inmunitarios, fragmentos de matriz extracelular, lípidos oxidados y hormonas y tratan de controlarlos o eliminarlos. Sin embargo, no es suficiente dado que en la AR los macrófagos permanecen activos por periodos prolongados, en donde promueven principalmente la liberación de TNF α , IL-1 β e IL-6 citocinas proinflamatorias, quimiocinas y MMP, y causan la infiltración y estimulación de células leucocitarias en la AR. Además, los macrófagos M1 pueden estimular células vecinas como fibroblastos, que produzcan enzimas proinflamatorias y degradantes de la matriz y contribuyan a circuitos de retroalimentación adicionales (Siouti & Andreakos, 2019).

En particular, los macrófagos activados, junto con los fibroblastos y la acumulación de linfocitos T y B, aumentan la generación de osteoclastos promoviendo el daño del cartílago y la pérdida ósea.

▪ Citocinas en la AR

Las citocinas son mensajeros celulares que transmiten señales a otras células y existen 4 familias de citocinas que incluyen: interleucinas, interferones, factores de crecimiento y quimiocinas. En la AR existe un desequilibrio de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Dentro de las citocinas proinflamatorias más importantes en la enfermedad y consideradas como dianas farmacológicas se encuentran la TNF α , IL-1 β e IL-6 (Morel, 2014).

La forma en que las citocinas se comunican con células ocurre de manera directa o por activación de vías intracelulares que transmiten una señal. Cuando una citocina entra en contacto con un receptor, induce la fosforilación del receptor o de una enzima asociada a él, promoviendo la activación en cascada de enzimas denominadas proteincinasas que a su vez activan factores de transcripción. Las principales vías de señalización implicadas en la inflamación son: TRAF/I κ BK/NF κ B, la vía de las proteincinasas activadas por mitógeno (mitogen-activated protein kinases, MAPK) /AP-1, la vía de la fosfoinosítido PI-3 cinasa y la vía JAK/STAT. En el caso de la AR, las MAPK induce la síntesis de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1, la IL-6 y la IL8 y de otras moléculas que participan en la inflamación como: las quimiocinas, las moléculas de adhesión y metaloproteinasas (MMP) responsables de la destrucción cartilaginosa o de la síntesis de las prostaglandinas (Morel, 2014).

Citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α en AR

La artritis reumatoide se caracteriza por la liberación de citocinas proinflamatorias derivadas de macrófagos activos dentro de las que se incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleucina 1 beta (IL-1 β). Estas citocinas son consideradas como precursores de un tipo de cascada proinflamatoria que conlleva a la liberación de otro tipo de mediadores inflamatorios relacionados con la hiperplasia sinovial, deterioro del cartílago y destrucción

ósea. Se ha reconocido que al bloquear TNF- α e IL-1 β por separado se regulan los niveles de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-6 e IL-8 (Feldmann et al., 2001).

Por su parte, el TNF- α es conocido como una citocina pleiotrópica que se expresa fuertemente en la membrana sinovial y líquido articular, asociándose a la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, inducción de citocinas proinflamatorias entre ellas la IL-1 β y aumento de la producción de metaloproteinasas como la estromelina. Su inhibición se asocia con la disminución de la inflamación de las articulaciones, alivio del dolor y destrucción ósea (Cantagrel et al., 2017; van den Berg et al., 1999).

La IL-1 es una citocina que presenta dos isoformas: IL-1 α asociada a procesos inflamatorios iniciales e IL-1 β citocina dominante en inflamación crónica. La IL-1 α es reducida por células asesinas naturales (NK), las células T, las células B, las células endoteliales, las células sinoviales, los neutrófilos, los macrófagos y monocitos, siendo estos dos últimos los principales productores de este tipo de citocina en procesos artríticos. A su vez, la IL-1 β activa monocitos y macrófagos aumentando la inflamación (Siouti & Andreakos, 2019). En procesos avanzados de artritis reumatoide se evidencia erosión exclusiva del cartílago debido a la activación de los condrocitos por la IL-1 β , los cuales producen la inhibición de la síntesis de la matriz extracelular (MEC) y su degradación generada por la acción principal de las metaloproteinasas (MMP) como la colagenasa (MMP13), estromelina (MMP3) y la agrecanasa (ADAM-T4); las cuales degradan el colágeno de la matriz extracelular y estimulan complejos inmunes que producen erosión tisular (Burrage et al., 2006). La IL-1 β se caracteriza por su desempeño en la infiltración de células y erosión del cartílago sostenida (van den Berg et al., 1999).

En ensayos in vitro se ha encontrado que tanto la IL-1 β como el TNF- α causan lesiones en cartílago, sin embargo, en modelos in vivo la IL-1 β es mucho más efectiva (van de Loo & van den Berg, 1990). Así mismo, se ha observado que la IL-1 β en concentraciones bajas inhibe la síntesis de colágeno y proteoglicanos de condrocitos, mientras que en niveles más elevados existe liberación de proteasas (van den Berg & Bresnihan, 1999). En conclusión, a pesar de que el TNF- α es considerado como el precursor de la IL-1 β , se han encontrado en modelos murinos que la producción de IL-1 β es independiente al TNF- α probando que los dos son objetivos apropiados para el tratamiento, lo que sugiere posibles desacoplamientos

de la inflamación articular y de los cambios óseos. Por tal motivo, se recomienda la inhibición conjunta del TNF- α con la IL-1 β debido a que una omisión en el bloqueo de este último marcador podría tener consecuencias perjudiciales en la articulación (van den Berg et al., 1999).

▪ **Especies reactivas de oxígeno (EOR)**

El estrés oxidativo es un proceso en el cual la producción de radicales libres excede la capacidad del organismo para neutralizarlos. Son conocidos como radicales libres los átomos que contienen un electrón desapareado en su orbital externo, siendo capaces de inducir daño en otras moléculas, convirtiéndolas en radicales libres al captar un electrón. Esta situación se presenta en procesos inflamatorios causando daño en proteínas por la actividad de productos de especies reactivas de oxígeno (EOR) que en inglés equivale a ROS e incluyen: el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Afonso et al., 2007; Phull et al., 2018).

Las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) al activarse presentan un estallido oxidativo mediado por el sistema NADPH oxidasa que demanda un gasto importante de oxígeno y la producción de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para eliminar patógenos. Posteriormente, el superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno cuando es catalizada por la enzima superóxido dismutasa inducida por citocinas inflamatorias como el TNF- α . En presencia de iones ferrosos (Fe^{2+}) y otros metales de transición, el peróxido de hidrógeno y el superóxido se convierten, a través de la reacción de Fenton, en radicales hidroxilo ($OH \cdot$) altamente reactivos y solubles en agua; que probablemente son responsables de gran parte de la toxicidad celular asociada con EOR (Hitchon & El-Gabalawy, 2004).

Las EOR se encuentran normalmente en el organismo como resultado del metabolismo celular aeróbico normal, y desempeñan un papel importante en el mantenimiento del estado *redox* de la célula; así como en el metabolismo celular, vías de señalización intracelular y la actividad de factores de transcripción como NF- κB (Hitchon & El-Gabalawy, 2004).

Varios mecanismos de defensa antioxidante se presentan en el organismo, actuando como primera línea de protección, se incluyen los antioxidantes intracelulares comprendidos por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, catalasa, entre otras (Hitchon & El-Gabalawy, 2004); seguidos de scavengers pequeños y antioxidantes exógenos provenientes de la dieta dentro de los que se incluyen: la vitamina A, vitamina C, carotenoides y vitamina E. Los antioxidantes intracelulares se caracterizan por mediar reacciones para convertir EOR en moléculas menos reactivas y de fácil eliminación; mientras que los antioxidantes endógenos actúan como donadores de electrones para estabilizar las moléculas y mitigar su acción lesiva. La SOD se caracteriza por presentar tres isoformas ubicadas en diferentes compartimentos corporales de la siguiente forma: SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD3 es extracelular (tanto SOD1 como SOD3 emplean cobre y zinc como cofactores) y SOD2 está presente en las mitocondrias (Afonso et al., 2007).

La catalasa degrada el peróxido de hidrógeno y probablemente tiene una función en la protección citosólica o extracelular de los oxidantes, porque está ausente en las mitocondrias de la mayoría de las células (Hitchon & El-Gabalawy, 2004).

Cuando los mecanismos de defensa antioxidante del organismo no son suficientes para contrarrestar el aumento de EOR, se presenta una respuesta del organismo denominada estrés oxidativo; caracterizada por inducir lesiones en la membrana celular por un proceso de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (peroxidación lipídica), considerados como el principal componente de los fosfolípidos presentes en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular (Phull et al., 2018).

Dentro de las EOR más importantes se encuentra el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que se produce por la adición de un electrón al oxígeno molecular producto de su reducción proveniente del transporte de electrones en la mitocondria, retículo endoplásmico, o de la acción de enzimas como xantina oxidasa o NADPH oxidasa (Chirino et al., 2006). Cuando los niveles de anión superóxido se elevan, las células activan su mecanismo de defensa endógeno, provocando la dismutación por la enzima superóxido dismutasa (SOD) del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) especie considerada menos reactiva. A su vez, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es reducido por la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa a una molécula de agua y oxígeno, evitando alteraciones en el organismo (Kunsch et al., 2005).

Estrés oxidativo en AR

Investigaciones han presentado la importancia del estrés oxidativo al encontrarse relación con la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, en donde se han detectado en articulaciones inflamadas cantidades importantes de EOR dentro de los que se incluyen: anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Sánchez et al., 2005). Adicionalmente, se ha establecido que células inflamatorias como neutrófilos activados, sinoviocitos y monocitos producen mayores cantidades del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a nivel del líquido sinovial; por una mayor activación de la NADPH oxidasa asociada a niveles elevados de IL- 1β y TNF α (Kunsch et al., 2005); pero también se ha vinculado a la sobreproducción de TNF α a una disminución de la actividad de SOD (Afonso et al., 2007).

Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno podrían activar enzimas que degradan la matriz extracelular indirectamente a través de la activación de metaloproteinasas (Phull et al., 2018).

1.2 Modelo murino de artritis

En la actualidad se han establecido varios modelos animales para la investigación de la patogenia de la artritis reumatoide y sus tratamientos. Dentro de los modelos establecidos en roedores se incluye principalmente la artritis inducida por colágeno (AIC), artritis inducida por adyuvante (ACF), artritis inducida por pristane (AIP), artritis inducida por antígeno (AIA), artritis inducida por proteoglicanos (AIPG); entre otros (Zhao et al., 2022).

Existen varios enfoques para establecer modelos animales para artritis, pero cada modelo debe ser valorado de acuerdo con su validez aparente, constructiva y predictiva. En el caso de los modelos murinos de artritis, se busca que el modelo tenga una validez aparente de tal manera que presente dolor, inflamación, destrucción articular y activación de anticuerpos de manera similar a la AR humana. De igual manera, debe tener validez constructiva que correlaciona el método de modelado con la etiología de la enfermedad y por último tener una validez predictiva que permita comprender la patología y el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, teniendo en cuenta dianas específicas como citocinas. A continuación, se

describen los principales modelos murinos de artritis en rata (ver tabla 1-1) (Zhao et al., 2022).

Tabla 1-1: Principales modelos murinos de inducción de artritis en ratas.

Modelo	Ciclo de la enfermedad	Aplicaciones	Limitantes	Validez	Referencia
Artritis inducida por colágeno (AIC) Inyección intradérmica en la base de la cola de emulsión de Colágeno bovino tipo II y adyuvante completo de Freund (ACF).	14 – 60 días	Permite retar y desarrollar tratamientos de base biológica.	Este modelo no permite observar fluctuaciones y recurrencias de AR, síntomas de vasculitis, nódulos subcutáneos o serositis.	Validez de constructo, predictiva y aparente.	(Choudhary et al., 2018; T. Zhao et al., 2022)
Artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) Inyecciones subcutáneas unilaterales de 0,1 ml de ACF en el retropié o la raíz de la cola.	14 – 45 días	Permite el estudio de la patogenia y la evaluación de fármacos contra la artritis reumatoide. Es ideal para estudiar mecanismos moleculares entre células T y subpoblaciones.	Este modelo carece de la naturaleza progresiva crónica de la AR y los cambios patológicos son autolimitantes.	Validez aparente y de constructo.	
Artritis inducida por pristane (AIP) Inyección intradérmica única dosis de pristane en ratas.	14 – 180 días	Verificar eficacia de nuevos medicamentos antiartríticos.	No existe evidencia de respuesta autoinmune.	Validez de constructo, predictiva y aparente.	
Artritis inducida por antígeno (AIA) Inmunización con antígenos	1 – 3 días	Estudio de respuesta inmune, humoral y celular.	Sin información	Validez aparente y de constructo.	(T. Zhao et al., 2022)
Artritis inducida por proteoglicanos (AIPG) Inmunización con proteoglicanos	21 – 28 días	Estudio de nuevos medicamentos para artritis.	Sin información	Validez de constructo, predictiva.	

Adaptado de Choudhary et al., (2018) y Zhao et al., (2022)

1.2.1 Artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) y colágeno

Modelo considerado como “*gold standard*” para la investigación de la patogenia y evaluación de la eficacia de nuevos tratamientos para la AR, ya que destruye la tolerancia al colágeno propio y la producción de autoanticuerpos, permitiendo recrear la AR con validez aparente, predictiva y de constructo. Después de 2 semanas de la inmunización con colágeno tipo II y el adyuvante de Freund se observan individuos con artritis crónica en donde se aprecia poliartritis en extremidades delanteras y traseras, acompañado con malformación de los huesos. Las citocinas TNF α e IL1 β son marcadores de inflamación importantes en este modelo (Choudhary et al., 2018; Zhao et al., 2022).

1.3 Tratamiento farmacológico de la AR

La artritis reumatoide es una enfermedad que requiere tratamiento oportuno en su fase temprana con el fin de inducir a la remisión clínica o generar un estado leve de actividad inflamatoria. De acuerdo con la fisiopatología de la enfermedad, existe una ventana de oportunidad terapéutica entendida como el periodo inicial de la enfermedad, que al iniciar una adecuada intervención puede evitar el daño articular y las complicaciones asociadas (Narváez, 2016).

En la actualidad existen 4 grupos de fármacos: Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), glucocorticoides (GLC), FARME (Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad) de origen sintético (FARME convencionales, como metotrexato o FARME, como los inhibidores de la janus quinasa [JAK]) y FARME de origen biológico (FARME biológicos, como los inhibidores del factor de necrosis tumoral [TNF], inhibidores de la interleucina-6 y fármacos que agotan las células B) (Narváez, 2016).

1.3.1 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en AR

Los AINEs se encuentran indicados en la AR para las fases iniciales de la enfermedad para el control del dolor e inflamación, generan un alivio inmediato de los síntomas, pero no modifican el curso de la enfermedad. Se requiere evaluar el estado hepático y renal

del paciente antes de su administración (Hernández & Martínez, 2009). Actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), la cual es responsable de la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas (PGs) y tromboxano-A2 (Carreño, 2015).

1.3.2 Fármacos glucocorticoides en AR

Los glucocorticoides son considerados como una de las sustancias antiinflamatorias e inmunosupresoras más efectivas. Su mecanismo de acción se basa en efectos no genómicos y genómicos, siendo este último de gran importancia para el tratamiento de AR, ya que estimula la transcripción de genes (transactivación) o la suprime (transrepresión) afectando la sensibilidad y disponibilidad de estos factores de transcripción necesarios para la expresión de genes proinflamatorios inducidos por citocinas. Adicionalmente, reduce la activación, proliferación, diferenciación de macrófagos, monocitos y linfocitos T; inhibe la adhesión de neutrófilos a células endoteliales; inhibe la producción de prostaglandinas y leucotrienos, reduce la expresión de moléculas de adhesión e inhibición de enzimas quimiotácticas, alterando la migración de leucocitos al sitio de inflamación (Carreño, 2015; Cutolo et al., 2021).

En conclusión, los glucocorticoides durante el curso de la AR son capaces de inhibir la respuesta de las principales células proinflamatorias e inclusive puede llegar a polarizar los macrófagos proinflamatorios activos (M1) hacia un fenotipo activado alternativamente (M2), con efectos antiinflamatorios obteniendo como resultado la regulación efectiva y duradera de los procesos fisiopatológicos en la AR (Carreño, 2015; Cutolo et al., 2021).

1.3.3 Fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) - convencionales

Son los principales agentes terapéuticos que conforman el tratamiento inicial de la fase temprana y establecida de la AR. Hacen parte de este grupo: el metotrexato (MTX), la leflunomida (LEF) y la sulfasalazina (SSZ); siendo el fármaco de primera elección el metotrexato, caracterizado por alterar la síntesis de ADN y aumentar la liberación de adenosina a través de los efectos sobre diferentes enzimas, lo que da como resultado

una disminución de las respuestas inflamatorias y la proliferación de linfocitos. En aquellos casos en que el metotrexato no es tolerado o es ineficaz, se cambiará el medicamento por uno del mismo grupo o se realizará una asociación de fármacos. El tratamiento terapéutico será definido de acuerdo con el factor de riesgo, el número de articulaciones dolorosas y tumefactas, el dolor evaluado por el paciente, la evaluación global de la actividad de la enfermedad por el médico y el paciente, la capacidad funcional, la existencia de daño estructural, o el impacto de la enfermedad sobre la calidad de vida (Hernández & Martínez, 2009). En caso de que no se evidencie una evolución favorable con los medicamentos FARME, se incorpora un fármaco modificador de la enfermedad biológico. A continuación (ver tabla 1-2) se describe el mecanismo de acción y efectos adversos de los fármacos FARME convencionales y biológicos (Kour et al., 2021).

1.3.4 Fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) - biológicos

Están indicados para pacientes que no responden satisfactoriamente al tratamiento con FARME convencionales o son intolerantes al tratamiento. Estos fármacos se han caracterizado por activar o bloquear dianas específicas involucradas en la progresión de la enfermedad como moléculas y receptores. Por ejemplo, la inhibición del TNF α , que permite reducir la inflamación del sinovio, destrucción del cartílago y erosión ósea. Sin embargo, su uso ha suscitado preocupaciones sobre la toxicidad y ha aumentado notablemente el riesgo de infecciones graves asociadas con ellos. En terapias con inhibidores de TNF α se ha evidenciado un aumento en el riesgo de presentación de infecciones como la *Listeria*, *Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis*, histoplasmosis, coccidioidomicosis y neumonía por *Pneumocystis* (Kour et al., 2021).

Tabla 1-2: Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME). Adaptado de Hernández & Martínez (2009) y Kour et al., (2021).

Tipo de fármacos	Medicamentos	Mecanismo de acción	Efectos adversos
Convencionales (fármacos inmunomoduladores inespecíficos)	Hidroxicloroquina	Inmunomodulador, inhibe la presentación de antígenos de las células, regula a la baja la respuesta inmunitaria contra los péptidos autoantigénicos.	Anemia hemolítica, retinopatía
	Sulfasalazina	Antiinflamatorio, inmunomodulador.	Anemia hemolítica, cefalea, diarrea, mareo, náuseas, vómito.
	Metotrexato	Análogo estructural del ácido fólico que altera la síntesis de ADN y aumenta la liberación de adenosina, lo que ocasiona una disminución de las respuestas inflamatorias y la proliferación de linfocitos.	Alopecia, cirrosis, diarrea, estomatitis, hepatotoxicidad, náuseas, neumonitis o fibrosis pulmonar, teratogenia, toxicidad gastrointestinal.
	Leflunomida	Inhibe la dihidroorotato deshidrogenasa, una enzima importante para la síntesis de ADN y la proliferación de linfocitos.	Alopecia, cefalea, hepatotoxicidad, hipertensión, intolerancia gastrointestinal, pérdida de peso, úlceras orales, teratogenia.
Agentes biológicos (Fármacos específicos que se dirigen a citocinas, marcadores de la superficie celular y las vías intracelulares)	Inhibidores de TNF: Etanercept, adalimumab, infliximab, certolizumab, golimumab.	Actúan bloqueando la interacción del TNF-alfa con sus receptores.	Enfermedad desmielinizante, enfermedad linfoproliferativa, infección de herpes, infección del tracto respiratorio, reacciones locales en el lugar de la inyección, reactivación de la tuberculosis y riesgo de infección.
	Tocilizumab	Bloquea citocinas proinflamatorias como la IL-6.	Enzimas hepáticas anormales, hipertensión, infección y perforación gastrointestinal.
	Rituximab	Bloquea las células B.	Infección, reacciones transfusionales y reactivación de hepatitis B
	Abatacept	Inhibe las células T.	Cefalea, hipertensión, mareos, infecciones oportunistas y reacciones en el lugar de la inyección.
	Tofacitinib	Inhibe la señalización de JAK-STAT intracelular.	Intolerancia gastrointestinal, nefrotoxicidad y reactivación de la tuberculosis.

1.4 Fitofarmacología de *Physalis peruviana* L.

La *Physalis peruviana* L. es una planta andina perteneciente a la familia *Solanaceae* conocida comúnmente en Colombia como uchuva. Esta planta crece de manera silvestre y semisilvestre a una altura de 1500 a 3000 m.s.n.m. En el año 2021 la uchuva logró la mayor cifra de exportaciones, alcanzando un recaudo de \$37.820.445 dólares. Esta cifra posiciona a Colombia como el mayor exportador de uchuva a nivel mundial. El fruto es apetecible debido a su actividad antioxidante, pero no es la única parte de la planta que cuenta con beneficios terapéuticos, se han realizado en los últimos años investigaciones concernientes a su actividad terapéutica en enfermedades inflamatorias encontrando efectos farmacológicos de tipo antiinflamatorio, antioxidante, inmunomodulador y para el tratamiento de enfermedades asociadas con estrés oxidativo como la artritis reumatoide. Las anteriores propiedades han sido relacionadas con metabolitos secundarios presentes en los diferentes órganos de la planta (raíces, tallos, fruto y cálices de uchuva)(Carreño, 2015).

1.4.1 Actividad antiinflamatoria de los cálices de *Physalis peruviana* L.

En diferentes estudios fitoquímicos se ha tratado de elucidar los componentes presentes en la planta. En extractos obtenidos a partir de cálices de uchuva se ha evidenciado la presencia de compuestos fenólicos de tipo flavonoide, terpenoides, glucósidos y esteroides naturales como withanólidos (28-hydroxywithanolide E) y fisalinas; por lo que este órgano puede ser una fuente importante de compuestos terapéuticos (Medina et al., 2018).

La variedad de metabolitos secundarios identificados en los extractos y fracciones de los cálices de uchuva se caracterizan por su actividad biológica como antiinflamatorios e inmunomoduladores, permitiendo establecer posibles modos de acción que incluyen: actividades antioxidantes y captadoras de radicales, modulación de las actividades de enzimas proinflamatorias (ciclooxigenasa (COX), lipoxigenasa (LOX), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)), inhibición de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), modulación de mediadores inflamatorios y modulación de la vía de señalización proinflamatoria (NF-kB). Como podemos ver, la mayoría de los marcadores biológicos anteriormente mencionados están asociados a

la inflamación crónica reportada en la fisiopatología de algunas enfermedades (Kour et al., 2021).

Adicionalmente, se ha evaluado la actividad antiartrítica del flavonoide rutina como regulador de los marcadores de estrés oxidativo y mediadores inflamatorios (iNOS y NF-κB) en modelos de artritis inducida por colágeno (Gul et al., 2018). En otras investigaciones se ha establecido que el extracto de *Physalis peruviana* L. obtenido por extracción con fluido supercrítico fue capaz de prevenir la generación del óxido nítrico (NO) y la liberación de prostaglandina E2 (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) (Carreño, 2015).

Los grupos de investigación de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales y SILICOMOBA, en los últimos años ha realizado investigaciones obteniendo avances en la características fitoquímicas y actividad farmacológica de extractos y fracciones obtenidas de los cálices de uchuva. Inicialmente el grupo se enfocó en la estandarización del método de extracción etanólica de los cálices de uchuva y determinó las condiciones de almacenamiento, así como su relación en la actividad antioxidante, contenido de rutina y fenoles totales (Cardona, 2014). Durante el mismo año, se caracterizó la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en donde se identificó la presencia de flavonoides (rutina y nicotiflorina) y se evaluó su capacidad antioxidante (Toro et al., 2014). Adicionalmente, en el año 2021 se realizó análisis fitoquímico del extracto hidroetanólico de cálices de uchuva, y se evidencia presencia mayoritaria del flavonoide rutina, comprobando su actividad hipoglucemiante por vía oral en roedores (Domínguez et al., 2021).

De igual forma, se evaluó el posible efecto terapéutico de la fracción butanólica de los cálices, en modelos de inflamación aguda; como el modelo de edema auricular inducido por TPA, en donde se evidenció actividad antiinflamatoria y antioxidante por parte de la fracción (Toro et al., 2014). Asimismo, se investigó su posible efecto en modelos agudos de úlcera gástrica en donde se observó su efecto antiulceroso y citoprotector en roedores (Martínez, 2020).

Debido a la actividad favorable de la fracción butanólica en modelos agudos de inflamación, desde el grupo de investigación se desean iniciar investigaciones enfocadas en la evaluación de su actividad en procesos de inflamación crónica; por lo que se proponen investigaciones

asociadas a la estandarización de un protocolo de inducción de artritis reumatoide en ratas Wistar con adyuvante completo de Freund y colágeno tipo II como modelo de inflamación crónica (Rojas, 2019) y modelos murinos para la evaluación de la actividad antidiabética de la fracción butanólica de los cálices.

De acuerdo con lo anterior, surge una oportunidad para identificar nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades reumáticas utilizando como alternativa terapéutica los cálices de *Physalis peruviana* L., por lo que se plantea la evaluación preclínica de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en un modelo murino de artritis inducida por colágeno y adyuvante completo de Freund como tema de nuestra investigación.

A continuación se presenta el propósito, metodología y resultados evidenciados durante nuestra investigación.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el potencial efecto antiartrítico de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en modelo murino de artritis reumatoide.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antiartrítica de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en el modelo animal de artritis.
- Explorar un posible modo de acción antioxidante en animales artríticos tratados con la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L.

3. Metodología

3.1 Materiales y reactivos

3.1.1. Instrumentos

Balón aforado, capilares, cápsulas de porcelana, embudos, erlenmeyer PYREX® de 2000 mL, percolador Siliser® de 5 L, aguja hipodérmica calibre 23 G, calibrador digital – Caliper digital Kanon EMS6 (0.01 – 25 mm), guantes de carnaza, hoja de bisturí número 22, jeringas de 1 – 20 mL, sondas de nutrición enteral, microplaca fondo plano de 96 pocillos TPP®, micropipeta multicanal, pipetas monocanal Select BioProducts – capacidad de 5 - 50, 20 - 200 y 200 - 1000 µL, pipeta repetidora, tubos de ensayo, tubos eppendorf.

3.1.2. Reactivos

- **Extracción material vegetal:**

Acetato de Etilo Merck J.T.Baker®, alcohol etílico desnaturalizado 40B J.T. Baker®, diclorometano J.T.Baker®, hexano J.T.Baker®, n-butanol Merck®.

- **Modelo de artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) y colágeno:**

Adyuvante completo de Freund (1 mg/mL) Sigma F-5881, alcohol antiséptico MK®, clorhexidina Baxidin®, colágeno tipo II (5 mg/mL) en ácido acético 0.05 M obtenido a partir de los anillos de tráquea de bovinos (elaborado por el Grupo de Trabajo de Ingeniería de Tejidos (COL0011106) de la Universidad Nacional de Colombia), dexametasona fosfato (4 mg/ml), ketamina Ketafine® (5 g/100 mL), suero fisiológico Baxter®, Xilacina Virbac® (20 mg/mL).

- **Pruebas bioquímicas:** kit ELISA interleucina 1 Beta - ratas Sigma®, kit ELISA factor de necrosis tumoral alfa - ratas Sigma®, complejo férrico-2,4,6- tripiridil-s-triazina Sigma®, buffer de acetato, cloruro férrico Merck®, ácido clorhídrico Merck®, sulfato ferroso, heparina Inhepar® 5000 UI/mL, ácido bicinconínico BCA Sigma® B9643, albúmina sérica bovina (BSA) proteína estándar micro líquido 1 mg/mL Sigma®, sulfato de cobre en solución 4 % p/v Sigma®, buffer fosfato (con Sodio dihidrógeno fosfato monohidratado Merck®), hipoxantina Sigma®, hidróxido de potasio Merck®, citocromo C de corazón de caballo Sigma®, superóxido dismutasa Sigma®, xantina oxidasa de leche bovina Sigma®.

3.2 Equipos

- Agitador vortex Labscient® V8
- Balanza electrónica analítica QUIMIS® Q500L210C
- Balanza Ohaus® con canastilla y tapa (para pesar animales)
- Centrífuga Hettich® MIKRO 220R
- Espectrofotómetro BIORAD (xMark microplate manager® 6 software)
- Estufa industrial de bandejas Stokes®
- Generador de rayos X Polymat 30/50 Siemens
- Horno de aire circulante
- Refrigerador-congelador -20 °C
- Rotavapor BuchiB-100 X750mbar 50 °C
- Triturador industrial-licuadora Vitamix®
- Triturador Oster modelo 3320-013 70 Grz 120 V

3.3 Material vegetal

3.3.1 Obtención y selección de material vegetal:

Los cálices de uchuva fueron obtenidos de cosechas orgánicas provenientes de la compañía **Andes Fruits**, empresa exportadora de frutas exóticas principalmente uchuva. Esta empresa cuenta con certificación GLOBAL G.A.P. (garantiza buenas prácticas agrícolas en campo) y certificación CERES CERTIFIED (certificación alemana para agricultura orgánica). Las fincas asociadas a la compañía se encuentran ubicadas en la región Boyacense a una altura promedio de 2427 m.s.n.m. y cuentan con asistencia técnica permanente con el fin de garantizar productos orgánicos. Se recolectaron 6 bultos de uchuva, los cuales pasaron por un proceso de selección, conservando los cálices de color verde y desechando el material con cambios de color, presencia de hongos, necrosis del tejido, humedad o descomposición. Finalizado el proceso de selección se extendió el material vegetal sobre papel periódico durante 24 horas (ver imagen **3-1**). Enseguida se almacenó en bandejas de acero y se introdujeron en el horno de aire circulante a una temperatura de 38 – 40 °C durante 72 horas, para retirar totalmente la humedad del material vegetal. El material obtenido del horno de aire circulante fue fragmentado empleando el triturador industrial-licuadora Vitamix® y el triturador Oster modelo 3320-013 120V, recuperando un total de 2400 g de polvo de cálices de *Physalis peruviana* L.

Imagen 3-1: Selección y secado de cálices de *Physalis peruviana* L.



3.3.2 Proceso de extracción y fraccionamiento de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L.

▪ Extracción inicial

Se utilizaron 2 percoladores de 5 litros acondicionados con dos capas de filtración conformadas por papel filtro y una capa delgada de algodón, ubicadas en el fondo del percolador para recuperar el etanol libre de particulado. Posteriormente, se llenó el recipiente con 1200 gramos del material vegetal triturado de los cálices de *Physalis peruviana* L. en cada recipiente y se incorporó cuidadosamente 9.4 Litros de etanol por percolador, hasta cubrir el material vegetal dejando en promedio 2 cm adicionales de etanol desde la superficie del triturado. El solvente permaneció en contacto durante 8 horas con el material vegetal y se recuperó por goteo lento en recipientes de vidrio; el proceso se realizó por triplicado. El volumen total recuperado (18 litros) fue concentrado empleando el equipo Rotavapor BuchiB-100 X 750 mbar 50 °C, generando un vacío de 175 mbar. El extracto concentrado fue recuperado del balón y se colocó en cápsulas de porcelana para terminar de concentrar a baño maría durante 24 horas, obteniendo finalmente 118 g de extracto etanólico.

▪ Fraccionamiento

Con el fin de obtener la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. se hicieron 3 fraccionamientos con el fin de retener metabolitos secundarios u otras sustancias afines a cada uno de los solventes empleados, que no eran consideradas de interés para el desarrollo de la investigación. Para cada fraccionamiento se incorporó en las cápsulas un solvente en un volumen suficiente para cubrir el concentrado y de manera simultánea se ejecutaron movimientos circulares con el mango de un mortero, generando impactos con moderada presión para favorecer la extracción sólido - líquido. Finalmente, la fracción butanólica fue concentrada utilizando el equipo Rotavapor BuchiB-100 X 750 mbar 50 °C y el baño maría. A continuación, en la tabla **3-1** se describen en orden los solventes usados, tiempo de contacto, volumen y fracción obtenida.

Tabla 3-1: Obtención de la fracción butanólica de cálices *Physalis peruviana* L. **El fraccionamiento etanólico se realizó a partir de 2400 g de material vegetal // Fracción de hexano: se hicieron 3 lavados con el solvente hexano // Fracción diclorometano: se realizaron 3 lavados con el solvente diclorometano // Fracción acetato de etilo: se efectuaron 2 lavados con acetato de etilo // Fracción butanólica: Se efectuaron 6 lavados con el solvente butanol.**

Fracción obtenida	Tipo de Solvente	Volumen total (mL)	Tiempo contacto	Número lavados
1. Fracción de hexano: Total 95.04 g 	Hexano	915 mL	2 horas	3
2. Fracción diclorometano: Total 8.81 g 	Diclorometano	670 mL	1 hora	3
3. Fracción de acetato de etilo: 6.61 g 	Acetato de etilo	670 mL	1 hora	2
4. Fracción butanólica: Total 1.77 g	Butanol	670 mL	1 hora	6

3.4 Animales de experimentación

El Bioterio de Experimentación del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia entregó para el desarrollo de la investigación ratas Wistar de ambos sexos, entre 7 y 17 semanas de edad y peso de 187 a 289 gramos. Los animales estuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), humedad ($60\% \pm 10\%$),

fotoperíodo (12 horas luz / 12 horas oscuridad), con agua y alimento *ad libitum* (concentrado LabDiet®). Se organizaron grupos conformados por 5 individuos con edades y pesos similares del mismo sexo por cada caja. Se realizó cambio y lavado de jaulas 2 veces por semana. Fue establecido como punto final humanitario de los individuos la presentación de vocalización espontánea, patrón de marcha anormal, pérdida del 20 % de su peso corporal y ulceración presente por más de 7 días (Hawkins et al., 2015); razón por la cual los individuos fueron observados a diario. La metodología empleada en la investigación contó con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (ver anexo A).

3.5 Ensayos preliminares

Se efectuó una fase inicial de capacitación y familiarización con la manipulación de individuos de experimentación, vías de administración de soluciones y manejo de equipos; con el fin de disminuir la variabilidad introducida por el investigador. Los ensayos preliminares consistieron en la inducción de artritis por colágeno en ratas Wistar (hembras y machos) aplicando el protocolo estandarizado previamente por el grupo de investigación. Dado que se identificó que las hembras tenían una mayor susceptibilidad en el desarrollo de la enfermedad con respecto a los machos, al presentar artritis bilateral y poliartritis caracterizada por la inflamación en las zonas interfalángicas, plantares y articulación del maléolo; se determinó usar para la investigación final ratas Wistar hembras entre 7 a 17 semanas de edad.

3.6 Diseño experimental

3.6.1 Medidas de control experimental

El diseño experimental se enfocó en la reducción de aspectos como artefactos experimentales, sesgos y error de muestreo descritos a continuación:

- **Artefactos experimentales:** Se hizo entrenamiento del personal, verificación de reproducibilidad del protocolo y determinación de condiciones experimentales.

- **Sesgos:** Se estableció un grupo satélite (individuos sanos), un grupo control (individuos artríticos), un grupo patrón (individuos con tratamiento patrón). Diseño ciego (un investigador administró tratamientos y otro analizó los resultados).
- **Error de muestreo:** Bloques (por sexo y peso, controlando la variabilidad de las unidades experimentales y reduciendo el error experimental) y factor de tratamiento (controles, patrón y extracto).

3.6.2 Modelo murino de inducción de artritis por adyuvante de Freund y colágeno en ratas Wistar

Se aplicó el protocolo estandarizado de inducción de artritis por colágeno determinado por el grupo de investigación, para lo cual se seleccionaron los individuos y se preparó la emulsión artritogénica junto con el protocolo anestésico.

- **Unidad de experimentación:** Se seleccionaron 44 ratas Wistar hembras entre 7 y 17 semanas de edad, con un peso corporal entre 170 a 287 g.
- **Sustancia artritogénica:** Se preparó una emulsión conformada por Adyuvante completo de Freund (1 mg/mL Sigma F5881) y colágeno bovino tipo II (5 mg/mL en ácido acético 0.05 M) en una proporción 1:1 buscando un volumen final de 15 mL para la sensibilización de los 44 animales seleccionados. Se obtuvo una emulsión de color blanco bastante densa por lo cual para su aplicación se utilizó una aguja calibre 23 G (ver imagen 3-2).
- **Anestesia:** Se realizó anestesia intraperitoneal con una mezcla de Xilacina (10 mg/Kg), Ketamina (40 mg/Kg) diluida en suero fisiológico (1 mL/100 g de peso corporal).

Imagen 3-2: Preparación de sustancia artritogénica. Preparación de 15 mL de sustancia artritogénica conformada por 7 mL de adyuvante completo de Freund y 7 mL de colágeno bovino tipo II (Proporción 1:1). Mezclar los dos productos hasta obtener una emulsión homogénea de color blanco.



A. Protocolo de inducción de artritis por Colágeno y Adyuvante de Freund en ratas Wistar.

- Los 44 individuos fueron anestesiados por vía intraperitoneal con el protocolo anestésico Xilacina (concentración del producto 20 mg/mL), Ketamina (concentración del producto 5 g/ 100 mL) y suero fisiológico con el fin de reducir el dolor y asegurar el punto de aplicación por vía intradérmica de la sustancia artritogénica. La mezcla (Xilacina, Ketamina y suero fisiológico) fue administrada en una dosis de 1 mL/100 g de peso corporal por vía intraperitoneal.
- Cuando los individuos alcanzaron el plano anestésico III, se tomaron medidas externas de miembros posteriores en tres puntos que incluyen: articulación del maléolo, zona plantar y zona interfalángica con un instrumento de medición (calibrador digital) – Caliper digital Kanon EMS6 (0.01 – 25 mm). Se realizó seguimiento de las medidas semanalmente (ver imagen 3-4).
- Cada individuo fue depilado en la base de la cola y se desinfectó con alcohol. Luego se administró la emulsión artritogénica en la base de la cola con una dosis total de 0.3 mL, distribuida en tres puntos diferentes (0.1 mL) por cada punto de aplicación, por vía intradérmica. Este procedimiento se repitió en el día 7 (ver imagen 3-3).

Imagen 3-3: Administración de solución artritogénica por vía intradérmica. Una vez los animales fueron depilados en la base de la cola, se efectuó limpieza con alcohol y se procedió a aplicar la solución artritogénica a una distancia de 2 cm de la base de la cola por vía intradérmica en tres puntos diferentes de aplicación.



B. Procedimiento. Ensayo preclínico de fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. (FB) en ratas Wistar artríticas

- Los animales con artritis unilateral o bilateral en miembros posteriores fueron seleccionados el día 14 para conformar la base del estudio preclínico. De los 44 animales inducidos inicialmente, 24 animales desarrollaron artritis. Los animales fueron clasificados de acuerdo con su peso y edad. Se establecieron los grupos de tratamiento de tal manera que se representara en cada caja; la totalidad del experimento (5 individuos) (ver gráfica 3-1).
- El día 21 desde la inducción de artritis con ACF y colágeno tipo II se inició el ensayo preclínico. Se administraron los tratamientos de acuerdo con el diseño experimental por vía oral durante 14 días consecutivos utilizando sondas orogástricas metálicas. Todos los tratamientos fueron administrados en soluciones en un volumen de 1 mL/100 g de peso corporal (ver tabla 3-2).

Gráfica 3-1: Distribución de grupos de tratamiento por caja. Cada caja incluyó 1 representante de cada grupo: control, patrón (dexametasona), fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en dosis de 100 mg/Kg (FB100), 50 mg/Kg (FB50) y 25 mg/Kg (FB25).

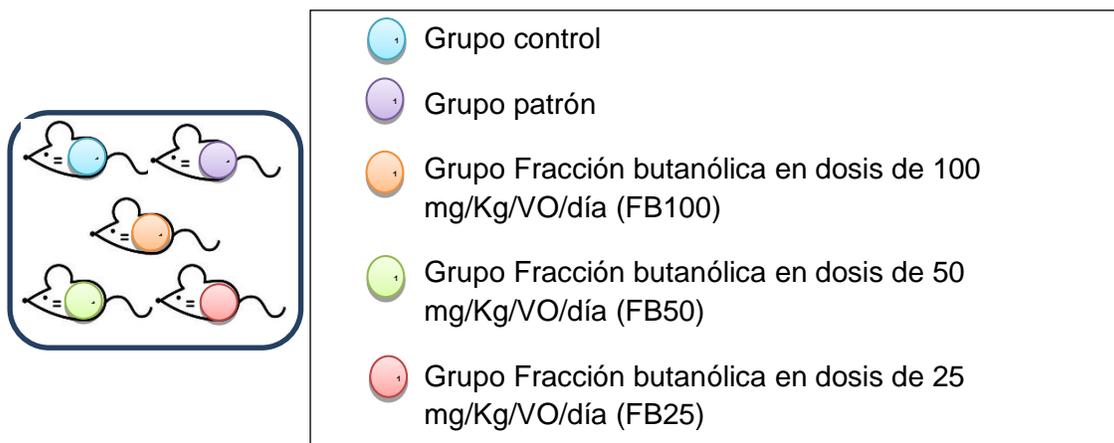


Tabla 3-2: Caracterización de los grupos experimentales

GRUPO	DESCRIPCIÓN
Grupo satélite	Individuos sanos. Sin intervención.
Grupo control	Individuos artríticos. Administración por vía oral de vehículo (agua destilada, glicerina y propilenglicol en proporción 8:1:1). Dosis total: 1 mL/100 g de peso corporal/día.
Grupo Patrón (dexametasona®)	Individuos artríticos. Administración por vía oral de dexametasona fosfato (1 mg/Kg de peso corporal/día) disuelta en agua destilada.
Grupo de Fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i> L. 100 mg/Kg (FB100)	Individuos artríticos. Administración por vía oral de Fracción butanólica (100 mg/Kg de peso corporal/día) disuelto en vehículo (agua destilada, glicerina y propilenglicol en proporción 8:1:1).
Grupo de Fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i> L. 50 mg/Kg (FB50)	Individuos artríticos. Administración por vía oral de Fracción butanólica (50 mg/Kg de peso corporal /día) disuelto en vehículo (agua destilada, glicerina y propilenglicol en proporción 8:1:1).
Grupo de Fracción butanólica de cálices de <i>Physalis peruviana</i> L, 25 mg/Kg (FB25)	Individuos artríticos. Administración por vía oral de Fracción butanólica (25 mg/Kg de peso corporal /día) disuelto en vehículo (agua destilada, glicerina y propilenglicol en proporción 8:1:1).

*El tratamiento se realizó por 14 días consecutivos una vez al día.

- Al finalizar el experimento se seleccionaron 2 ejemplares de cada grupo de tratamiento y se hizo un estudio radiográfico que incluye la vista dorso – plantar y latero - medial de miembros posteriores, centrándose en la articulación tibio-tarsiana. Los animales fueron anestesiados aplicando el protocolo anestésico descrito anteriormente con el fin de evitar la movilidad de los animales durante la toma de las placas (ver esquema **3-1**).
- El día 36 todos los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal (Ketamina 40 mg/Kg - Xilacina 10 mg/Kg) y se tomaron muestras de sangre por punción intracardiaca. Finalizada la actividad se efectuó eutanasia a los individuos por dislocación cervical aún bajo anestesia y se remitió un miembro posterior tomado desde la articulación del maléolo para análisis histopatológico de 2 representantes de cada grupo de tratamiento.

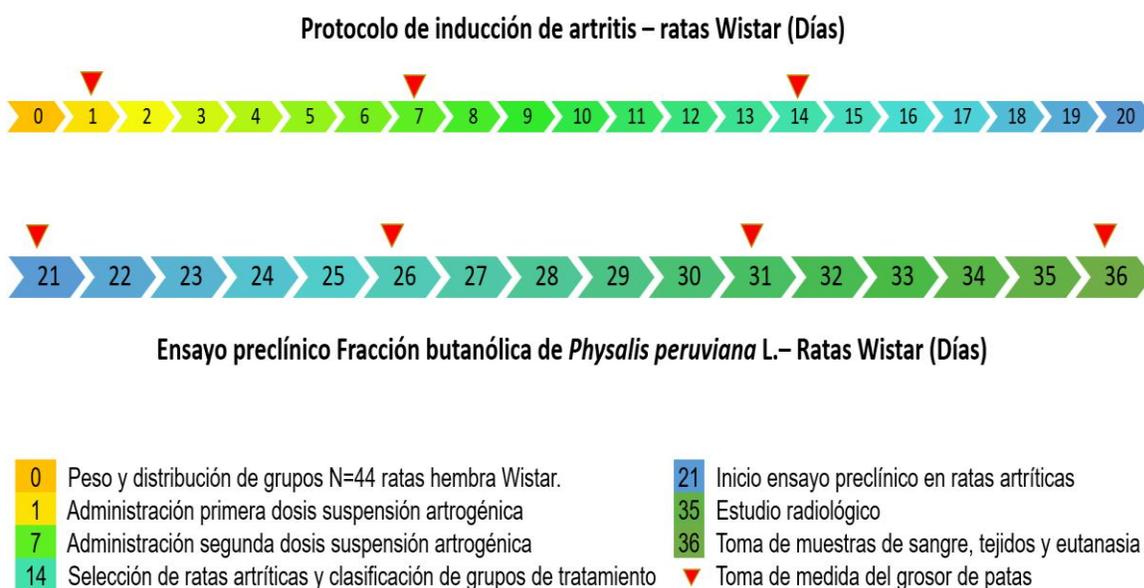
A continuación, se expone la línea de tiempo desde la inducción de artritis de la unidad experimental hasta la ejecución del ensayo de administración; finalizado en la toma de muestras de sangre e histopatología (ver gráfica **3-2**).

3.7 Evaluación de la inflamación

3.7.1 Evolución del peso

Se hizo seguimiento del peso una vez por semana de los individuos desde el inicio del protocolo de inducción de artritis por ACF y colágeno, hasta la finalización del experimento. Esto permitió comparar la evolución del peso entre los grupos de tratamiento y al mismo tiempo determinar la necesidad de aplicar el “punto final humanitario” en aquellos animales que presentaran pérdidas superiores al 20 % del peso corporal. Durante el desarrollo de la fase experimental no fue necesario aplicar este criterio.

Gráfica 3-2: Línea de tiempo del ensayo preclínico de la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. en ratas Wistar hembras artríticas. Durante los primeros 14 días se realizó la inducción de artritis en ratas Wistar (N=44) con ACF y colágeno tipo II en el siguiente orden cronológico: El día 0, peso y distribución de grupos; día 1 administración de la primera dosis de suspensión artritogénica; día 7 administración de la segunda dosis de suspensión artritogénica; día 14, selección de ratas artríticas y clasificación de grupos de tratamiento. A partir del día 21 se dio inicio del ensayo preclínico con la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. culminando el día 34. La evaluación radiográfica se realizó el día 35 y el día 36 se tomaron las muestras de sangre y tejidos después de realizada la eutanasia. El seguimiento del grosor de los miembros posteriores en la zona interfalángica, plantar y en la articulación del maléolo con el calibrador digital se llevó a cabo los días: 1, 7, 14, 21, 26, 31 y 36.

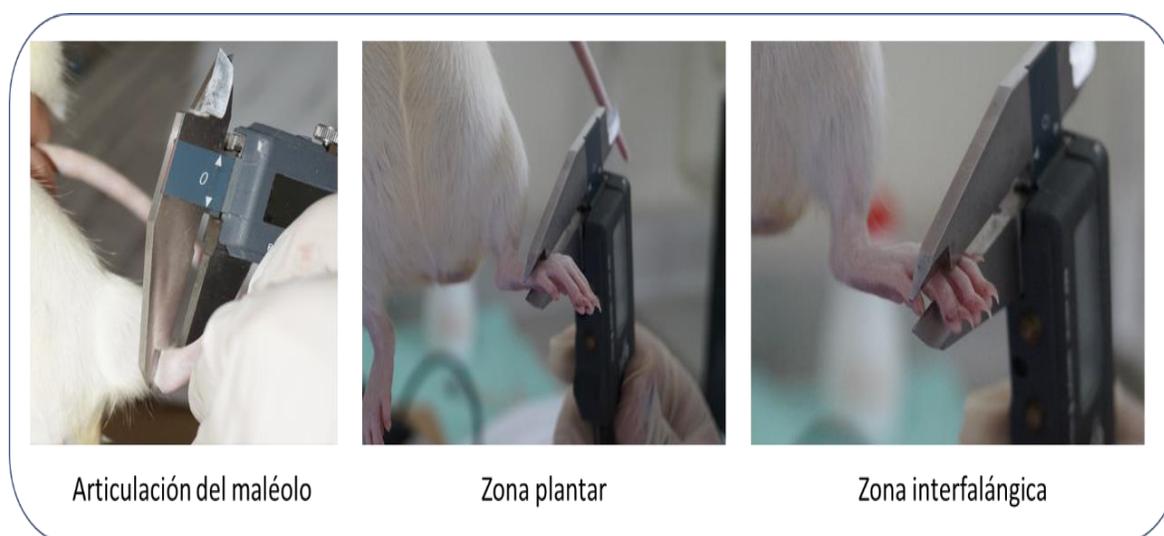


3.7.2 Medidas anatómicas

La inflamación de las articulaciones fue evaluada con un calibrador digital – Caliper digital Kanon EMS6 (0.01 – 25 mm) en 3 zonas sensibles de inflamación en miembros posteriores reportadas en el modelo murino de artritis inducida por adyuvante completo de Freund (ACF) y colágeno que incluyen: Articulación del maléolo, zona plantar y zona interfalángica (Rojas, 2019). La medida se tomó semanalmente y cada punto anatómico fue medido por duplicado y promediado el resultado, permitiendo así evaluar el comportamiento y sensibilidad de las

diferentes articulaciones en el modelo. A continuación, se ilustran los puntos anatómicos evaluados (ver imagen 3-4).

Imagen 3-4: Evaluación del grosor de miembros posteriores en ratas Wistar artríticas. Las medidas fueron tomadas con el calibrador digital Caliper digital Kanon EMS6 (0.01 – 25 mm) una vez por semana en la zona interfalángica (el calibrador se posicionó en el plano dorso – plantar, en la parte inferior de la falange medial, cerca de la articulación interfalángica); Zona plantar (el calibrador fue posicionado en la parte distal de los metatarsianos cerca a la articulación metatarsofalángica) y en la articulación del maléolo (el calibrador se colocó en el plano medio – lateral de la articulación del maléolo).



3.7.3 Estudio radiográfico

Fueron seleccionados al azar de cada grupo de tratamiento 2 individuos a excepción del grupo satélite en donde se seleccionó 1. El estudio radiológico se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales fueron sedados previamente con un protocolo de anestesia basado en Ketamina 40 mg/Kg y Xilacina 10 mg/Kg por vía intraperitoneal. Una vez los animales alcanzaron un plano III de anestesia, se tomaron las placas por vista dorso – plantar y medio lateral del miembro posterior, procurando enfocar: las articulaciones interfalángicas, metatarsofalángica y del maléolo con el fin de detectar posibles lesiones en procesos artríticos. A continuación, se describen los ítems a evaluar en cada imagen diagnóstica:

- **Márgenes y superficies articulares:** Deben estar totalmente lisas y sin presencia de corrosión e incluyen: La superficie del talo, la resbaladera de la tibia, la superficie intertarsiana proximal y distal (cercana a la zona de los metatarsianos y del tarso).
- **Existencia de quistes subcondrales:** Se encuentran en las superficies articulares y se observan como perforaciones radiolúcidas. Su presencia está asociada a la enfermedad articular degenerativa crónica.
- **Osteoesclerosis:** Engrosamiento del hueso con aumento de la densidad.
- **Tejidos blandos anexos a la articular:** Se evalúa la cápsula articular teniendo en cuenta el aumento en la radiopacidad, tamaño y presencia de líquido.
- **Osteofitos:** Neoformación de osteofitos periarticulares.

Adicionalmente, se aplicó una escala radiográfica la cual se centra en las principales lesiones de la articulación en procesos artríticos como la erosión de la superficie ósea, la disminución del espacio articular y la destrucción del espacio articular (Snehalatha et al., 2013).

3.7.4 Evaluación histopatológica

Una vez los animales fueron sacrificados se seleccionaron 3 individuos por cada grupo de tratamiento y se retiró un miembro posterior de cada animal, de tal manera que el corte permitiera preservar completa la articulación del maléolo. Las muestras fueron fijadas en formol y fueron descalcificadas por inmersión en ácido nítrico al 3 %, en donde permanecieron durante 7 días a temperatura ambiente. Finalizado este periodo las muestras fueron fijadas en formol al 10 % bufferado y se realizaron cortes transversales, luego se realizó coloración con hematoxilina-eosina (HE) y se evaluaron en el microscopio.

La evaluación histopatológica incluyó la evaluación de la estructura ósea, médula ósea, osteomielitis, infiltrado periarticular y cápsula sinovial. Pero para fines del estudio se centrará su análisis en la proliferación sinovial, infiltración celular, erosión del cartílago y formación del pannus. A continuación, en la (tabla **3-3**) se describe la escala utilizada para la calificación de los parámetros ya mencionados:

Tabla 3-3: Escala de clasificación de lesiones histopatológicas. Permite clasificar el grado de gravedad de la lesión en miembros posteriores en una escala de 0 a 3. Los parámetros evaluados son la proliferación sinovial, infiltración sinovial, erosión del cartílago y formación del pannus (Ali et al., 2015).

Parámetros	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Proliferación sinovial	No hay proliferación	Leve proliferación en 2 o 4 capas de sinoviocitos reactivos.	Moderada proliferación en las 4 capas de sinoviocitos reactivos, incremento de la actividad mitótica y leve o ausencia de invasión celular adyacente al hueso y tejido conectivo.	Severa proliferación caracterizada por invasión del sinovio hiperplásico y desaparición del espacio articular, cartílago adyacente, hueso y tejido conectivo.
Infiltración celular	Sin cambios	Reducida infiltración celular focal.	Extensa infiltración celular focal.	Extensa infiltración celular que invade la cápsula articular con formación de agregados.
Erosión del cartílago	No hay cambios visibles	Degradación localizada del cartílago en más de una región.	Degradación profunda y localizada del cartílago.	Cartílago con degradación extensa, profunda y en varias zonas.
Formación del pannus	No hay cambios	Formación de pannus hasta en dos sitios.	Formación de pannus hasta en cuatro sitios, con infiltración o sobrecrecimiento en la superficie articular.	Formación de pannus en más de cuatro sitios o formación extensa de pannus hasta en dos sitios.

Recuperado de Ali et al., 2015

3.8 Evaluación de parámetros bioquímicos – Muestras biológicas

3.8.1 Obtención de muestras

▪ Plasma sanguíneo

Se realizó eutanasia por dislocación cervical, pero previamente los animales fueron anestesiados (protocolo Ketamina 40 mg/Kg; Xilacina 10 mg/Kg en solución de suero fisiológico por vía intraperitoneal), enseguida se tomó la muestra de sangre por vía intracardiaca mediante punción intercostal lateral con aguja calibre 21 y jeringa de 3 mL. Previamente, se alistaron tubos eppendorf de 1.5 mL con una solución de 15 µL de heparina diluida, preparada a partir de 500 µL de heparina comercial (1.000 UI) más 2 mL de agua destilada. La sangre se incorporó en el tubo eppendorf y con movimientos lentos se mezcló la sangre con la heparina. Las muestras se refrigeraron a 4 °C.

Al día siguiente las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en nuevos viales. Las muestras se congelaron a -20 °C hasta su utilización en pruebas bioquímicas.

▪ Homogenado de patas

Una vez finalizada la toma de muestras de sangre, se extrajeron los miembros posteriores realizando un corte en la articulación tibio – metatarsal de todos los individuos. En total se obtuvieron 35 muestras de patas, de las cuales 18 se remitieron para análisis histopatológico y 17 fueron empleadas para hacer homogenados de patas, para el análisis de parámetros bioquímicos. Cada muestra fue rotulada de acuerdo con el individuo y tipo de tratamiento recibido.

Para la obtención del homogenado, cada pata fue pesada y seccionada en pequeños fragmentos. El tejido se colocó en un frasco de vidrio de 7 mL junto con solución salina fisiológica (SSF) en una proporción de 4 mL por cada gramo de tejido (1:4). Con la ayuda del POLYTRON PT2100 se homogeneizaron los tejidos (3 ciclos de 10 segundos cada uno) y se colocaron en nuevos recipientes.

Por último, se centrifugaron las muestras a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante colocándolo en viales tipo eppendorf. Las muestras se congelaron a una temperatura de -20 °C hasta su utilización.

3.8.2 Cuantificación de proteína: Método Ácido bicinonínico

Es un método colorimétrico para estimar la concentración de proteínas. Se basa en la reducción de un ion cúprico Cu^{2+} a un ion cuproso Cu^{1+} mediante 4 enlaces peptídicos en condiciones alcalinas. El ion cuproso Cu^{1+} es posteriormente quelado por 2 moléculas de Ácido bicinonínico (BCA) (Reactivo cromogénico), dando lugar a un complejo de color púrpura con un máximo de absorción a una longitud de onda de 562 nm (ver imagen 3-6). Los resultados obtenidos de absorbancia se correlacionan con la concentración de proteína de la muestra que pueden cuantificarse mediante una curva de calibración. Como solución estándar de proteína se utiliza Albúmina Sérica bovina (Yalamati et al., 2015; Nilles et al., 2022).

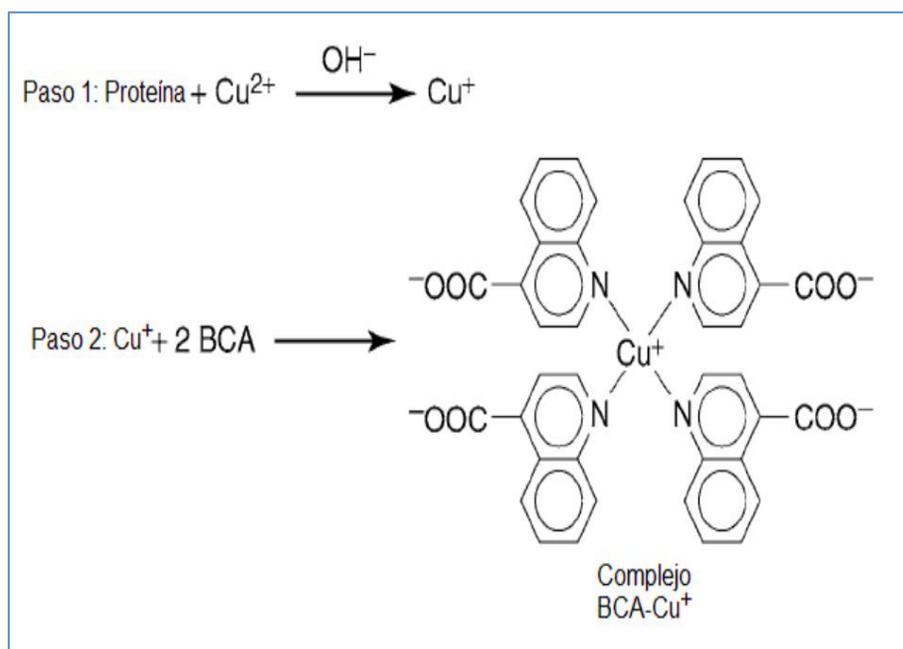
Imagen 3-5: Fundamento: Método de Ácido bicinconínico

Imagen adaptada de: Curado & Ballester, 2016

- **Muestras homogenado de patas:** Las muestras de homogenado de patas se descongelaron 2 horas antes de iniciar la prueba. En seguida se realizó una dilución de las muestras consistente en 1 parte de la muestra de homogenado de patas y 4 partes de solución PBS de pH de 7.4 (guardando una proporción 1:4). La solución se dispensó en nuevos tubos eppendorf de 1.5 mL y se sometió a agitación constante en un vórtex.
- **Muestras de suero:** Las muestras de suero pasaron por una dilución conformada por 1 parte de la muestra de suero hasta 50 partes de solución PBS de pH 7.4 (guardando una proporción 1 en 50). La solución se dispensó en nuevos tubos eppendorf de 1.5 mL y se sometió a agitación constante en un vórtex.
- **Mezcla reactiva (reactivo A+B):** El reactivo se preparó a partir de una solución de trabajo A (ácido bicinconínico BCA) y la solución de trabajo B (sulfato de cobre al 4 % p/v) en una proporción de 50:1 correspondientemente. La solución final fue incorporada en un volumen de 200 μL por cada punto (ver tabla 3-4).

- **Curva de calibración:** La curva de calibración se realizó a partir de una solución estándar de albúmina sérica bovina (1 mg/mL), de tal manera que la curva de calibración presentara 6 puntos con las siguientes concentraciones (1000, 800, 600, 400, 200 y 0 µg/mL) (ver tabla 3-4).
- **Ensayo:** Se instaló la curva de calibración y las muestras por triplicado en la microplaca de 96 pocillos. Para el caso de las muestras se incorporó en cada pozo: 25 µL de la muestra (homogenado o suero) y 200 µL del reactivo A+B mientras que para la curva de calibración se adicionó en cada pozo las soluciones descritas en la (tabla 3-4). Finalmente, la placa se incubó a una temperatura de 37 °C por 30 min. Inmediatamente, se hizo lectura de la placa con una longitud de onda de 562 nm. Los resultados fueron expresados como miligramo de proteína por mililitro de plasma (mg/mL plasma), o como miligramo de proteína por gramo de tejido (mg/g de tejido).

Tabla 3-4: Preparación de curva de calibración para cuantificación de proteína. (técnica del ácido bicinconínico).

Concentración de proteína	1000 µg/mL	800 µg/mL	600 µg/mL	400 µg/mL	200 µg/mL	0 µg/mL
BSA estándar (1 mg/mL)	25 µl	20 µl	15 µl	10 µl	5 µl	0 µl
PBS	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
Reactivo A+B	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

3.8.3 Determinación de interleucinas

Las citocinas evaluadas fueron la IL-1 β y TNF α mediante el método de ELISA (Ensayo de adsorción inmune ligado a enzimas) (SIGMA Aldrich, Alemania). Para ello se seleccionaron las muestras de suero y de homogenado (muestra de 1 pata por cada individuo) de 3 representantes de cada grupo de tratamiento.

Se analizaron las citocinas siguiendo las instrucciones del fabricante y se expresaron los resultados en pg/mL.

3.8.4 Índice de peroxidación lipídica (TBARs)

El índice de peroxidación lipídica es un método espectrofotométrico utilizado para la cuantificación de malonilaldehído. Durante el estrés oxidativo se desencadena la peroxidación lipídica que produce daño tisular y se forma un dialdehído de tres carbonos altamente reactivo denominado malonilaldehído. Cuando 1 mol de malonilaldehído reacciona sobre el grupo metilo activo de 2 moles de TBARs en medio ácido y a alta temperatura, se genera un aducto MDA-TBA cromógeno rosado-rojizo detectable a una longitud de onda de 532 nm. De acuerdo con lo anterior se establece que la absorbancia es un valor proporcional a la concentración de MDA en las muestras biológicas (ver imagen 3-7).

Imagen 3-6: Fundamento: Método de Índice de peroxidación lipídica

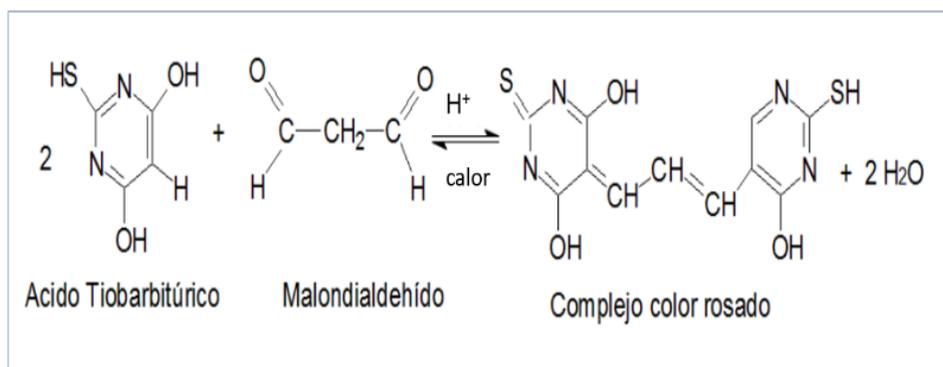


Imagen adaptada de: Inzunza, F., Araya, I. & Letelier, M., 2016

- **Muestras de plasma y homogenado de patas:** Las muestras de homogenado de patas se descongelaron 2 horas antes de iniciar la prueba.
- **Compuesto reactivo:** Ácido tiobarbitúrico 0,67 % p/v, que se obtuvo diluyendo 6,7 mg de ácido tiobarbitúrico por cada mL de buffer fosfato.
- **Porcentaje de formación de TBARs:** Inicialmente, se calculó el promedio de absorbancias del grupo satélite y se consideró como el 100 % de formación de TBARs. A partir de los anteriores datos se calculó el porcentaje de formación de

TBARs de manera individual para cada muestra de los grupos de tratamiento con los valores de absorbancia.

- **Ensayo:** Primero se tomaron 125 μL de las muestras de plasma y homogenado y se mezclaron con 400 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % con el fin de precipitar proteínas. Segundo, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Tercero, se toman 250 μL del sobrenadante de la muestra y se mezcla con 250 μL de TBA al 0.67 %, luego se coloca en baño de agua a 90 °C durante 30 minutos y se enfría en hielo. Cuarto, en una placa multipozos se coloca 150 μL de la muestra y se lee a una longitud de onda de 532 nm.

3.8.5 Determinación del parámetro FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

El principio se basa en la capacidad de los antioxidantes de reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en el reactivo FRAP a la forma ferrosa (Fe^{+2}). Cuando se genera un complejo ferroso con 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) se genera una coloración azul que puede medirse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 593 nm y está directamente relacionada con la capacidad reductora de los antioxidantes por transferencia de electrones (Gan et al., 2017).

- **Muestras de suero y homogenado de patas:** Las muestras se descongelaron 2 horas antes de iniciar la prueba, de cada muestra se utilizaron 25 μL .
- **Preparación de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ):** Se preparó una solución de TPTZ 8.33 mM usando una solución de ácido clorhídrico 40 mM.
- **Preparación del reactivo FRAP:** El reactivo fue preparado empleando solución buffer de acetato (pH 3,6), solución 16.67 mM de cloruro férrico (FeCl_3), solución 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ); finalmente todo se mezcló en una proporción 8:1:1 correspondientemente.

- **Preparación de reactivo FRAP SIN:** Reactivo utilizado en la curva de calibración, se prepara de la misma manera que el reactivo FRAP, con la diferencia de que se debe cambiar la solución 16.67 mM de cloruro férrico (FeCl_3) por agua desionizada, ya que la forma ferrosa ya está presente en la curva de calibración y solo reaccionará con el TPTZ mientras que en las muestras biológicas se genera la forma ferrosa a partir del cloruro férrico.
- **Curva de calibración:** La curva de calibración estuvo conformada por 8 concentraciones diferentes que incluyen: 187, 375, 750, 1500, 3000 y 6000 μM y dos puntos de solución FRAP y FRAP SIN. Cada concentración se obtuvo por la ejecución de diluciones a partir de una solución madre de sulfato ferroso 30.000 μM . Las concentraciones se colocaron en una microplaca de 96 pozos por triplicado (ver anexo **D-E**).
- **Ensayo:** En los primeros pozos se ubicó la curva de calibración seguida de las muestras de suero y homogenado; en cada pozo se colocó en un volumen de 50 μL de la muestra y 450 μL del reactivo FRAP. Después de 15 minutos se hizo lectura de la placa a una longitud de onda de 593 nm. Los datos fueron interpolados en la curva de calibración y se expresaron como concentración de Fe^{2+} (mM).

3.8.6 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

El ensayo se basa en la reducción del citocromo C a ferrocitocromo C por el radical superóxido, el cual es producido por el sistema Xantina / Xantina Oxidasa. Cuando existe presencia de la enzima superóxido dismutasa esta destruye el radical superóxido catalíticamente (Campos et al., 2020). La absorbancia se interpreta como inversamente proporcional a la actividad SOD. Los resultados fueron expresados como delta de las absorbancias.

- **Muestras de suero y homogenado de patas:** Las muestras se descongelaron 2 horas antes de iniciar la prueba, de cada muestra se utilizaron 40 μL .

- **Premezcla:** Para la elaboración de la premezcla se prepararon de forma individual las siguientes soluciones: *100 mL de Buffer sodio fosfato KH_2PO_4 (PBS) 50 mM (pH 7,4) con 38 mg de EDTA-2NA disódico dihidrato 1 mM (0,38 mg/mL); * 7 mg de Hipoxantina 100 μM en 5 mL de KOH (dilución de 1,36 mg/mL en KOH 1 N) y *13 mg de Citocromo C 13 μM (0,16 mg/mL). En total se preparó 80 mL de premezcla conformados por 79.2 mL de Buffer sodio fosfato KH_2PO_4 (PBS), 0.8 mL de hipoxantina y 13 mg de Citocromo C para un total de 87 muestras.
- **Curva de calibración:** La curva de referencia se realizó a partir de 3,5 μL de suspensión de SOD de 15000 U/mL + 497 μL de PBS completando un volumen final de 500 μL en un vial eppendorf. A partir de esta solución se hizo diluciones seriadas tomando 250 μL de la mezcla anterior y 250 μL de PBS. Los puntos de la curva correspondieron a las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12,5; 6,3 y 3,15 U/mL.
- **Inductor de la reacción:** A partir de una suspensión de Xantina Oxidasa de 10,5 U/mL se tomaron 5 μL por cada mL de PBS (3 mL total) para una concentración de 0,048 U/mL.
- **Ensayo:** Primero se dispuso 40 μL de cada muestra (plasma, homogenado y puntos de la curva) en tubos eppendorf junto con 720 μL de premezcla. Segundo, en una placa multipozos se vertieron 190 μL de la solución anteriormente preparada por triplicado. Tercero, el espectrofotómetro fue programado de tal manera que realizara una lectura seriada cada 30 segundos durante 5 minutos en tres columnas de pozos, cuarto se incorporó xantina oxidasa (XO) como inductor de la reacción en un volumen de 10 μL en cada pozo de 3 columnas y se realizó la lectura inmediata a una longitud de onda de 550 nm. Este procedimiento se repitió hasta procesar todas las muestras. La reducción del Citocromo C se evaluó por medio del aumento en la absorbancia; los resultados se presentaron como delta de absorbancia.

4. Resultados y Discusión

4.1 Medidas anatómicas

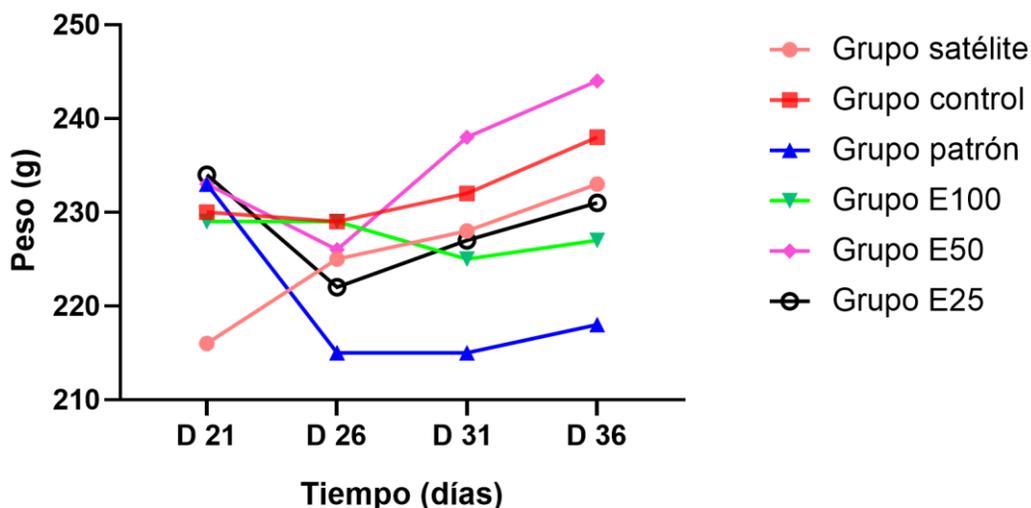
4.1.1 Evolución del peso

Los animales del grupo satélite presentaron un aumento en el peso durante los días evaluados, mientras que los animales artríticos inicialmente tuvieron una reducción del peso en el día 26, pero después se observó una ganancia de éste a partir del día 31 hasta la culminación de la investigación. En el caso del grupo tratado con la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en una dosis de 100 mg/Kg, se evidenció para el día 31 una disminución del peso en comparación con el día 26, mientras que el grupo patrón no presentó ganancia de peso para esos mismos días. Pero en los dos casos para el día 36 se observó ganancia de peso (ver gráfica 4-1).

La reducción del peso no representó un porcentaje mayor al 10 % en ninguno de los grupos, por ende, no fue necesario aplicar el punto final humanitario. La reducción de peso en animales artríticos ha sido reportada en otros estudios, e inclusive en animales artríticos tratados con dexametasona, en donde se ha relacionado a sus efectos secundarios (Hussain et al., 2021). Aunque otras investigaciones reportan restauración leve del peso por la administración de los extractos de plantas solanáceas, en esta investigación no se observó este efecto, dado que el grupo control presentó un comportamiento similar a los grupos de tratamiento (He et al., 2020; Hussain et al., 2021).

Gráfica 4-1: Efecto de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en el peso de ratas artríticas. n = 5 ratas hembra Wistar // Los animales estuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (21 °C +/- 2 °C), humedad (60 % +/- 10 %), fotoperíodo (12 horas luz / 12 horas oscuridad), con agua y alimento *ad libitum* (concentrado LabDiet®). // Los individuos fueron pesados cada 5 días

(D1, D21, D26, D31 y D36) // El grupo satélite presentó ganancia de peso durante la investigación. Los individuos artríticos presentaron pesos similares en el día 21 presentando un rango entre 215 y 244 g, en el día 26 se observó una disminución del peso, pero después presentaron una ganancia de peso para el día 31 y 36; excepto el grupo de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. 100 mg/kg y el grupo patrón que presentaron una ganancia de peso hasta el día 36.



4.1.2 Caracterización de animales normales

▪ Grosor de miembros posteriores

Los modelos murinos de artritis permiten establecer el comportamiento de la actividad antiinflamatoria de medicamentos o extractos a nivel macroscópico, a través de la medición de puntos sensibles de inflamación en la artritis reumatoide como son: la articulación del maléolo, zona plantar y zona interfalángica de miembros posteriores con instrumentos de medición como el calibrador digital.

En este caso, se realizó el seguimiento en el grupo satélite conformado por 5 ratas Wistar hembras sanas a partir de la semana 15 de edad o día 21 del ensayo preclínico de la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. en ratas artríticas. La medida de cada punto anatómico se hizo por duplicado y se promedió. Los resultados obtenidos permitieron establecer: Primero, caracterización de las medidas anatómicas de miembros posteriores de ratas Wistar hembras sanas teniendo en cuenta los parámetros de promedio, desviación estándar (DE),

coeficiente de variación (CV) y rango (valores máximo y mínimo). Segundo, comportamiento de las medidas anatómicas de miembros posteriores en la zona interfalángica, plantar y de la articulación del maléolo durante el transcurso del experimento; para lo cual se aplicó la prueba estadística ANOVA de una sola vía y Tukey para comparaciones múltiples. A continuación, inicialmente se presenta la caracterización de las medidas anatómicas de miembros posteriores de ratas Wistar hembras sanas en la (tabla 4-1).

Tabla 4-1: Caracterización de medidas anatómicas en miembros posteriores de ratas Wistar hembra sanas - Grupo satélite. n = 5 Ratitas hembra (a cada individuo se le midieron sus dos miembros posteriores) // D1, D21, D26, D31 y D36: Días en los cuales se hicieron las mediciones (valores expresados en mm) // DE. Desviación estándar // CV. Coeficiente de variación (valor expresado en porcentaje).

ÍTEMS		D21	D26	D31	D36
Zona interfalángica	Patas analizadas	10	10	10	10
	Rango máximo	2,48	2,20	2,70	2,10
	Rango mínimo	1,93	1,72	1,61	1,60
	Promedio	2,15	1,90	2,03	1,83
	DE	0,17	0,13	0,30	0,16
	CV (%)	8	7	15	9
Zona plantar	Patas analizadas	10	10	10	10
	Rango máximo	4,32	4,56	4,19	3,85
	Rango mínimo	3,91	3,61	3,72	3,14
	Promedio	4,12	4,03	3,95	3,57
	DE	0,17	0,35	0,17	0,24
	CV (%)	4	9	4	7
Articulación del maléolo	Patas analizadas	10	10	10	10
	Rango máximo	6,42	6,45	6,53	6,45
	Rango mínimo	5,69	5,46	5,74	5,71
	Promedio	5,94	5,96	6,13	6,09
	DE	0,26	0,40	0,25	0,26
	CV (%)	4	7	4	4

De acuerdo con los datos presentados en la tabla 4-1, se establece que el grosor de la zona interfalángica en ratas Wistar hembras sanas en el D21 presenta un rango constituido por un valor máximo de 8.48 mm y un valor mínimo de 1.93 mm, con un promedio de 2.48 mm, una desviación estándar (DE) de +/- 0.17 y un coeficiente de variación de 8 %. Sin embargo, para D36 se observa que el rango está entre 2.10 mm y de 1.60 mm con un promedio de 1.83 mm +/- DE 0.16 y CV 9 %.

En el caso de la zona plantar para el D21 presentó un rango está entre 4.32 mm y 3.91 mm con un promedio de 4.12 mm +/- DE 0.17 y CV 4 % mientras que el D36 el rango se encuentra entre 3.85 mm y 3.14 mm con un promedio de 3.57 mm +/- DE 0.24 y CV 7 %.

Por otra parte, la articulación del maléolo presentó un rango con un máximo de 6.42 mm y un mínimo de 5.69 mm con un promedio de 5.94 mm +/- una DE 0.26 y CV 4 %, mientras que para la semana 19 de edad el rango máximo corresponde a un máximo de 6.45 mm y un mínimo de 5.71 mm con un promedio de 6.09 mm +/- DE 0.26 y CV 4 %.

De acuerdo con lo anterior se establece que entre el D21 y D36 del ensayo, las ratas Wistar hembras sanas en sus miembros posteriores presentan un grosor en la zona interfalángica entre 1.60 mm y 2.70 mm, zona plantar entre 3.14 mm y 4.56 mm y en la articulación del maléolo entre 5.69 mm y 6.53 mm.

Se recomienda que en futuras investigaciones se realice un seguimiento durante un periodo mayor de 14 días con el fin de establecer una correlación de las medidas en los miembros posteriores en la zona interfalángica, zona plantar y articulación del maléolo con relación a las semanas de edad de las ratas Wistar hembras.

▪ **Puntos de medición de inflamación en modelo de artritis**

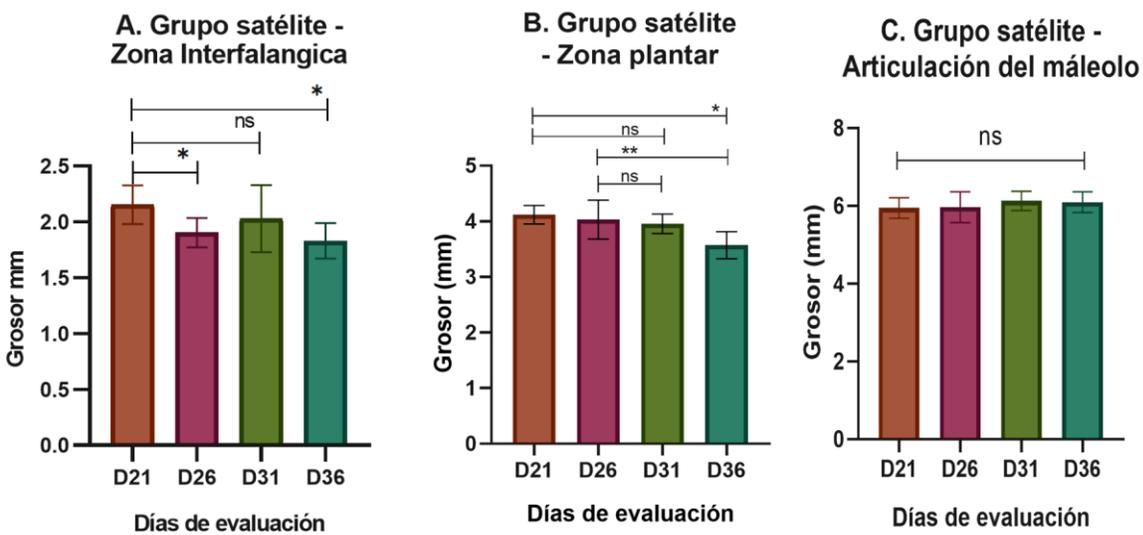
Se evaluó el comportamiento de las medidas anatómicas de miembros posteriores en la zona interfalángica, plantar y en la articulación del maléolo durante un periodo de 14 días, se evidenció que el grosor de la zona interfalángica presentó una disminución significativa en los días D26 (*p= 0,0409) y D36 (*p=0,0052) en comparación con el D21; a diferencia del

D31 en donde presentó un aumento no significativo en el grosor con respecto al D21 ($p=0,5237$) y demás días (ver gráfica **4-2A**). Con respecto a lo anterior se observó que los datos presentaron valores aleatorios y no aumentaron conforme a los días evaluados, teniendo un comportamiento impredecible que también puede estar asociado a características físicas propias de cada individuo. Pero, aun así, los valores del grosor se comportaron dentro del rango de medida de la zona (ver gráfica **4-2**).

Por otro lado, el grosor de la zona plantar presentó un comportamiento estable; no se evidenció diferencias significativas entre el D21 ($*p=0,8522$) con el D26 ($*p=0,4439$) y entre el D26 con el D31 ($*p=0,8951$). Sin embargo, el grosor presentó una disminución significativa en el D36 con respecto al D21 ($*p=0,0001$), D26 ($*p=0,0009$) y D31 ($*p=0,0065$). El comportamiento del grosor de la zona plantar fue estable y los resultados se encuentran dentro de los valores establecidos para la zona anatómica. Este punto presentó menos variabilidad que la zona interfalángica, lo cual puede deberse a su practicidad para la toma de las medidas y control en la manipulación del calibrador digital (ver gráfica **4-2B**).

Finalmente, la articulación del maléolo no presentó cambios significativos en el grosor de la articulación en los diferentes días de medición, presentando un comportamiento estable durante todo el ensayo (ver gráfica **4-2C**). Se concluye que la medida del grosor de la zona plantar y de la articulación del maléolo tomada con el calibrador digital presentó un comportamiento estable con respecto a la zona interfalángica. Lo que puede estar asociado a la dimensión y consistencia de las estructuras de la zona y fácil acceso durante la manipulación. Adicionalmente, el tiempo no es un factor condicionante en el grosor de la zona interfalángica, zona plantar y articulación del maléolo.

Gráfica 4-2: Evolución del grosor de la zona interfalángica, zona plantar y articulación del maléolo en miembros posteriores de ratas Wistar – Grupo satélite. // D1, D26, D31 y D36: días de evaluación // n=5 ratas Wistar hembra // ANOVA - Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05) // ns: Sin diferencia significativa //A. grupo satélite sanos – zona interfalángica. El grosor de la zona interfalángica presenta disminución significativa entre el D21 y los días D26 y D36, mientras que el D31 a pesar de presentar disminución en el grosor, este no es significativo con respecto al D21// B: Grupo satélite sano - zona plantar. En la zona plantar no se evidenció una disminución significativa en el grosor entre D21 y D26, al igual que en el D26 con el D31. Sin embargo, sí presentó una disminución significativa en el D21 con respecto al D36 // C. Grupo satélite sanos – articulación del maléolo. No se evidenció diferencias significativas en el grosor de la articulación del maléolo. Se concluye que el tiempo no es condicionante en el grosor de los puntos evaluados en un periodo de tiempo de 14 días.



4.1.1 Efecto terapéutico de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L.

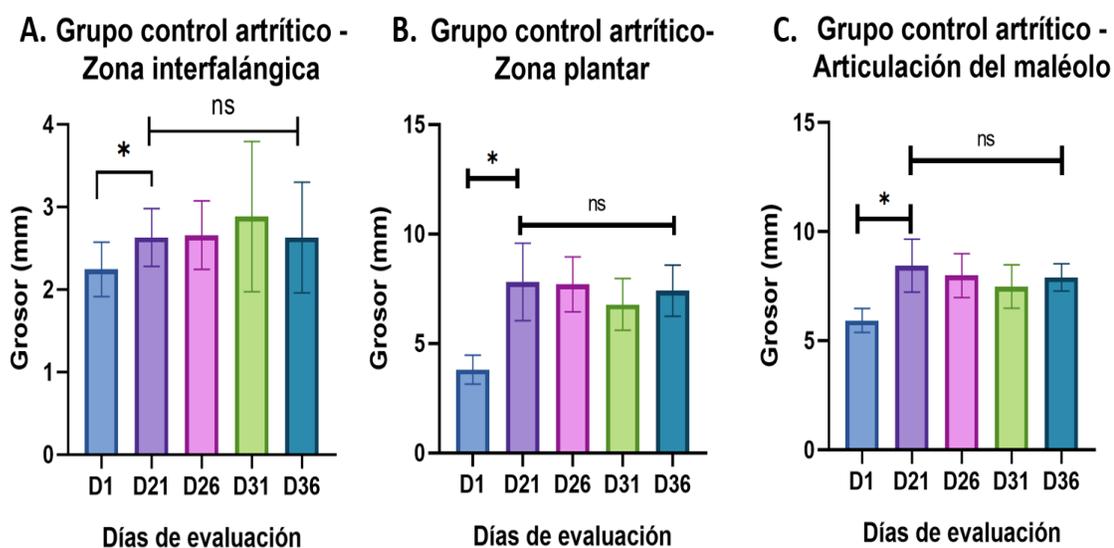
▪ Grupo control de máximo daño

Los individuos del grupo control presentaron en los miembros posteriores inflamación significativa entre el día 1 (inducción con ACF y colágeno) y el día 21 (inicio de tratamiento) a nivel de la zona interfalángica (*p= 0,0284), zona plantar (*p =0,0001) y articulación del maléolo (*p= 0,0003). A partir del D21 hasta el D36 la inflamación se estableció sin presentar variaciones significativas durante los 14 días siguientes (ver gráfica 4-3). Por lo anterior se

concluye que el protocolo de inducción de artritis con adyuvante de Freund y colágeno al D21 de recibir la primera dosis de inducción genera en ratas Wistar hembras inflamación establecida en la zona interfalángica, zona plantar y articulación del maléolo hasta el día 36 sin presentar involución del proceso inflamatorio en los diferentes puntos anatómicos evaluados. Del mismo modo, en otro estudio se observó que la inflamación de las patas de ratas macho artríticas inducidas por colágeno alcanzó su punto máximo el día 21 después de la inducción y no presentó involución (Yu et al., 2020).

Para esta investigación, el análisis estadístico de la evolución de la inflamación en el estudio preclínico de la *Physalis peruviana* L. en ratas artríticas se realizó con los datos de la zona plantar debido a que es uno de los puntos más sensibles de inflamación en procesos artríticos según los cambios físicos evidenciados en las unidades de experimentación y sus valores presentan menor variabilidad a diferencia de la zona interfalángica.

Gráfica 4-3: Evolución del grosor de la zona interfalángica, zona plantar y articulación del maléolo en miembros posteriores de ratas Wistar artríticas - Grupo control. // D1: Inducción de artritis // D21: Inicio de tratamiento // D26, D31 y D36: Días de evaluación // n=5 ratas Wistar hembra // ANOVA (*p < 0.05) // ns: Sin diferencia significativa // La zona interfalángica, zona plantar y articulación del maléolo del grupo control artrítico presentaron inflamación significativa entre el D1 y el D21 y a partir del D21 se estableció la inflamación hasta el D36 sin presentar cambios significativos en el día 14 de tratamiento.



▪ Grupos de tratamiento

En el presente estudio se evidenció que en todos los grupos de tratamiento los individuos presentaron inflamaciones significativas a partir del D21 (inicio de la intervención) con relación al D1 en la zona plantar de miembros posteriores (*p= <0,0001) (ver gráfica 4-4). El grupo control a partir del D21 hasta el día 36 (D36) no presentó diferencias significativas entre las medidas tomadas, pero se confirmó el mantenimiento de la inflamación sin presentar involución del proceso artrítico de la zona plantar de miembros posteriores en ratas Wistar (ver gráfica 4-3A).

En cuanto al grupo patrón, se observó que la inflamación disminuye significativamente en los D26, D31 y D36 (*p= <0,0001) con respecto a la medida tomada el D21 en la zona plantar de los miembros posteriores de ratas Wistar tratadas con dexametasona (1 mg/Kg). Sin embargo, la inflamación no disminuye significativamente entre el D26 (*p= 0,9370), D31 (*p= 0,7226) y D36 (*p= 0,2853) (ver gráfica 4-3B). De acuerdo con lo anterior, se puede concluir que la dexametasona en una dosis de 1 mg/ Kg durante 14 días en ratas Wistar artríticas presenta una actividad antiinflamatoria, pero no es suficiente para tratar totalmente la inflamación de la zona plantar. Lo anterior puede deberse a que la inflamación presentada en la artritis corresponde a un proceso de inflamación crónico y una vez establecido requiere tratamiento de sostén para controlar los síntomas de la enfermedad por los posibles daños ocasionados en la estructura ósea y tejidos blandos como la cápsula sinovial (**ver capítulo 1.3**). Por otro lado, en otro estudio se estableció que la dexametasona en una dosis menor administrada por vía oral (0.225 mg/Kg/Dosis única) presentó actividad antiinflamatoria en ratas Lewis con artritis inducida por colágeno (Yu et al., 2020). Por consiguiente, en futuros ensayos preclínicos se podrían realizar variaciones en la dosis e intervalos de administración de dexametasona en las unidades experimentales.

Por otra parte, los grupos tratados con la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en una dosis de 100 mg/Kg (E100) se evidenció actividad antiinflamatoria significativa a partir del D31 (*p=0,0012) y en D36 (p*= 0,0057), es decir que la actividad antiinflamatoria fue observada a partir del décimo día de tratamiento (ver gráfica 4-4C). A diferencia del grupo de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en una dosis de 50 mg/Kg (E50), en donde la actividad antiinflamatoria significativa se evidenció en

D26 (*p= 0,0231), D31 (*p= 0,0007) y D36 (*p= 0,0001) con respecto al día D21 (ver gráfica **4-4D**).

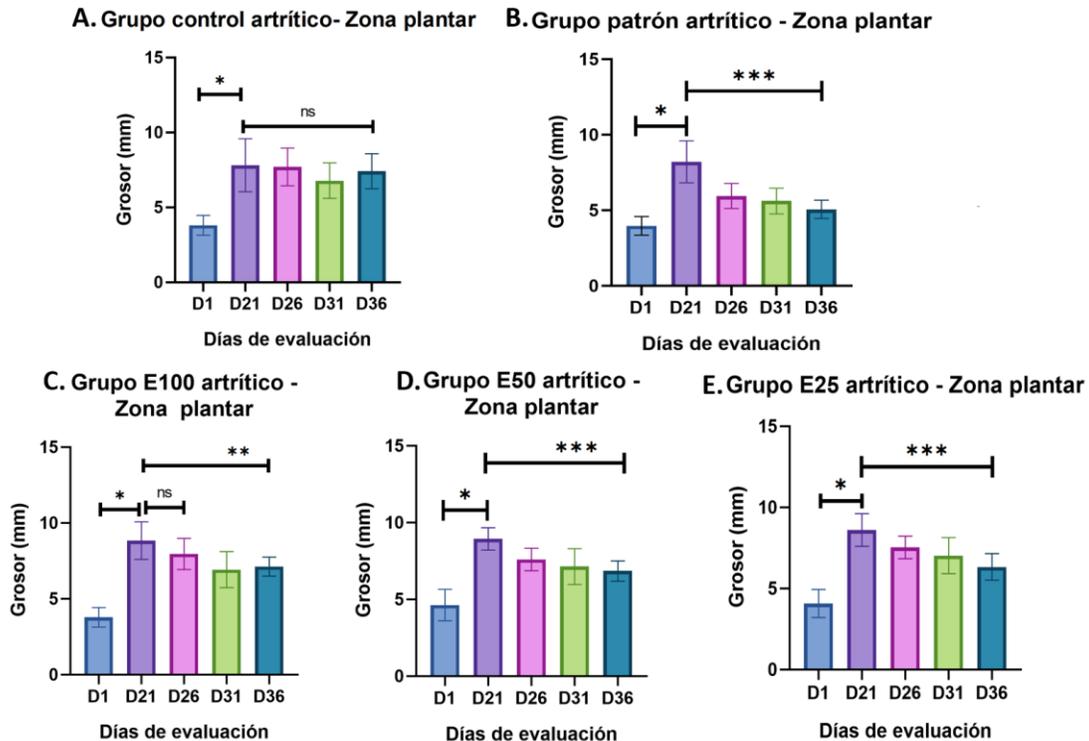
Por el contrario, el comportamiento del grupo que recibió la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en una dosis de 25 mg/Kg (E25) es similar al grupo que recibió la dosis de 100 mg/Kg, ya que presenta actividad antiinflamatoria significativa a partir del día D31 (*p= 0,0116) y en el D36 (*p= 0,0002) (ver gráfica **4-4E**).

Por consiguiente, se establece que la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en dosis de 100 y 25 mg/Kg presenta actividad antiinflamatoria significativa a partir del décimo día de tratamiento a diferencia de la administración por vía oral de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en dosis de 50 mg/Kg que presentó actividad antiinflamatoria significativa a partir del D26; presentando un comportamiento similar al grupo patrón, situación por la cual se puede presumir una posible actividad antiinflamatoria en el modelo de artritis inducida por ACF y colágeno en ratas Wistar por la administración repetida (14 días) de la fracción por vía oral.

En otros estudios se ha evaluado la actividad antiinflamatoria de plantas de la familia *Solanaceae* en modelos murinos de artritis, obteniendo resultados positivos, como es el caso del extracto metanólico y acuoso de hojas de la *Ardisia solanacea*, que administrado por vía oral en dosis de 250 y 500 mg/Kg se observó disminución del diámetro de la pata de las ratas (Silpavathi et al., 2021). Al igual que el tratamiento administrado por vía oral de raíces de *Withania somnifera* (en dosis de 600 mg Kg⁻¹ y dosis de 800 mg Kg⁻¹) que en ratas artríticas dieron como resultado una disminución significativa en el grosor de sus patas desde el día 30 (4,55 ± 0,41 mm) hasta el día 45 (4,2 ± 0,22 mm) (Gupta & Singh, 2014a).

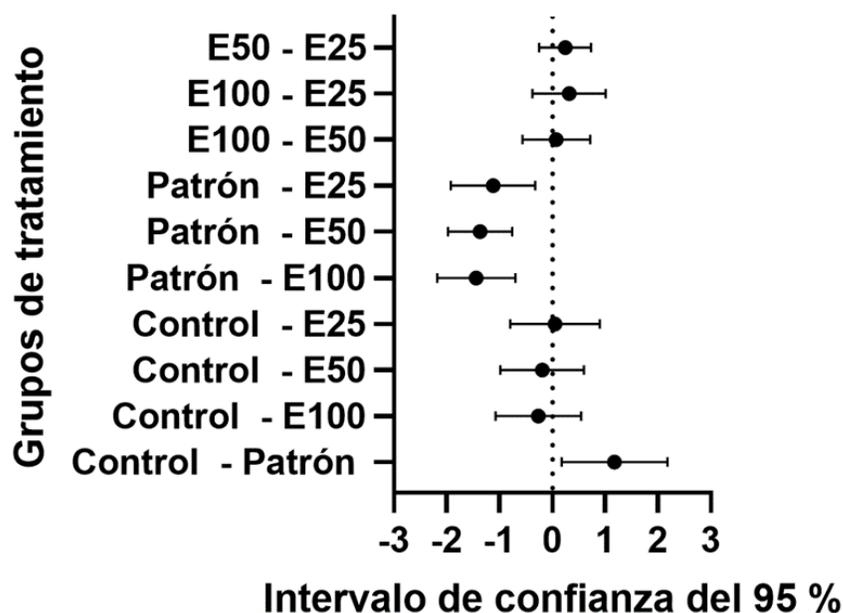
Por último, con el fin de identificar la diferencia entre los grupos de tratamiento se aplica la prueba estadística ANOVA y el método de comparación múltiple Tukey. De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que el grupo patrón presentó actividad antiinflamatoria frente a los grupos: control, E100, E50 y E25 a diferencia de la fracción butanólica que no presentó actividad antiinflamatoria significativa con relación al grupo control, ni entre las dosis de la fracción. Por consiguiente, no existen evidencias suficientes para determinar que la fracción butanólica presenta una actividad antiinflamatoria superior entre las dosis manejadas durante la investigación (ver gráfica **4-5**).

Gráfica 4-4: Evolución del grosor de zona plantar en miembros posteriores de ratas Wistar artríticas tratadas con la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L – Actividad antiinflamatoria. D1: Inducción de artritis // D21: Inicio de tratamiento // D26, D31 y D36: Días de evaluación // n=5 ratas Wistar hembra // ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05) // ns: Sin diferencia significativa.



En otro estudio se emplearon ratas Wistar artríticas inducidas con adyuvante de Freund y colágeno tipo II y se realizó tratamiento con *Withania somnifera* (familia *Solanaceae*) en una dosis de 800 y 600 mg/Kg/día/VO durante un periodo de 25 días; se observó enrojecimiento e inflamación en el grupo tratado con 800 mg/Kg/día a diferencia del grupo que recibió *Withania somnifera* en una dosis de 600 mg/Kg que no mostró signos de artritis y parecía esencialmente similar a las ratas normales (Gupta & Singh, 2014). De acuerdo con lo anterior, se recomienda en el desarrollo de otras investigaciones aumentar el tiempo de dosificación y estudiar dosis más altas de la fracción.

Gráfica 4-5: Efecto antiartrítico de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en ratas Wistar. Grupos de tratamiento: Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100 g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1 mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de uchuva (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de uchuva (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de uchuva (25 mg/Kg/día/VO) // n=5 ratas Wistar hembra // ANOVA y método de comparación múltiple Tukey (95 % Intervalo de confianza).



4.2 Estudio radiográfico

Para esta investigación se realizó un estudio radiográfico con el objetivo de identificar las lesiones osteoarticulares presentes en el modelo de artritis inducida por adyuvante de Freund y colágeno, en ratas Wistar hembras tratadas con diferentes dosis de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. y el patrón dexametasona. Lo anterior permite seguir contribuyendo a la caracterización del modelo y de la posible actividad antiartrítica de la planta. El estudio radiográfico se ejecutó en 2 vistas (medio – lateral y dorso – plantar) de miembros posteriores, enfocándose en las articulaciones interfalángicas, metatarsofalángica y del maléolo. La interpretación de las placas se basó en 4 ítems que incluyen: 1. Márgenes y superficies articulares, 2. Existencia de quistes subcondrales, 3. Osteoesclerosis, 4. Tejidos blandos anexos a la superficie articular. Los cuales fueron evaluados por un médico veterinario especialista en imagenología (ver tabla 4-2).

El estudio radiográfico de miembros posteriores del individuo sin artritis correspondiente al grupo satélite presentó: márgenes y superficies articulares bien definidas y lisas, sin presencia de quistes subcondrales. No se evidenció osteoesclerosis o distracción de las superficies óseas (aumento del espacio intraarticular), los tejidos blandos no presentaron alteraciones, no se observan neoformaciones osteofitarias (ver imagen **4-1**) a diferencia de los demás grupos de tratamiento que presentaron alteraciones en cada uno de los ítems evaluados.

En los grupos control y patrón se evidenció alteración moderada de las márgenes y superficies articulares en la tibia distal y el talo, osteoesclerosis moderada en las superficies articulares y presencia leve de osteofitos en el tarso a diferencia del grupo E100, E50 y E25 que presentaron alteración severa de las márgenes y superficies articulares en la articulación tibio-talar e intertarsiana, con pérdida de la continuidad y resorción ósea en algunas superficies acompañada de fusión crónica de la zona metatarsiana e intertarsiana; osteoesclerosis severa y neoformación osteofitaria severa. Así mismo, se evidenció presencia moderada de quistes subcondrales en el grupo control, E50 y E25, mientras que en el grupo patrón y E100 se evidenciaron levemente.

Finalmente, en los tejidos blandos anexos a la superficie articular los grupos: control, patrón, E50 y E25 presentaron respuesta inflamatoria moderada con aumento en el tamaño de la cápsula articular, a diferencia del Grupo E100 que presentó una respuesta inflamatoria crónica con aumento de tamaño de la cápsula articular y periarticular con acumulación de líquido sinovial.

Tabla 4-2: Evaluación radiográfica de miembros posteriores de ratas Wistar hembras artríticas tratadas con la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L.: Se seleccionaron 2 individuos al azar de cada grupo de tratamiento a excepción del grupo satélite en donde se seleccionó 1 individuo // Grupos de tratamiento: Grupo satélite, sin inducción de daño // Grupo control, máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100 g/día/VO) // Grupo patrón, dexametasona (1 mg/Kg/día/VO) // Grupo E100, fracción butanólica de cálices de uchuva (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50, fracción butanólica de cálices de uchuva (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25, fracción butanólica de cálices de uchuva (25 mg/Kg/día/VO) // n = 11.

Grupos	Márgenes y superficies articulares	Existencia de quistes subcondrales	Osteoesclerosis	Tejidos blandos anexos a la articular	Osteofitos
Grupo Satélite (Ver Imagen 4-1)	Definidas y lisas.	Ausencia.	Ausencia.	Sin alteraciones visibles.	Ausencia.
Grupo Control (Ver Imagen 4-2)	Alteración moderada a nivel de la tibia distal y el talo pero se denota una alteración en márgenes y superficies articulares severas del tarso, articulación intertarsiana y tarsometatarsiana.	Presentes: A nivel de la tibia distal y calcáneo.	Moderada en todas las superficies articulares.	* Respuesta inflamatoria moderada con aumento de tamaño de la capsula articular. * Cambios severos en la superficie de la capsula articular. *Posible acumulación de líquido sinovial.	Presentes: Osteofitos periarticulares leves en cara medial del tarso distal.
Grupo Patrón (Ver Imagen 4-3)	* Alteración moderada a severa a nivel de la tibia distal y el talo. * Perdida de continuidad y estructura a nivel del tarso, articulación intertarsiana y tarsometatarsiana. * Cambio morfológica de tibia - distal, con una respuesta perióstica distal marcada, periostitis y una respuesta posiblemente lamelar. * Cambio morfológico en tarso y tarso metatarso, en calcáneo también se evidencia la perdida estructural.	Presencia leve.	Moderada en la parte proximal, pero en la parte distal tarso - metatarsiana se ve osteoesclerosis severa.	Respuesta inflamatoria moderada a nivel de la articulación intertarsiana, tarso y metatarso.	Presentes: Osteofitos leves en el tarso hacia proximal.
E 100 (Ver Anexo B)	* Alteración severa. * Pérdida de la continuidad y resorción ósea de la superficie talar, tibial - distal. * Fusión de toda la zona metatarsiana e intertarsiana.	Presencia leve.	Severa.	* Respuesta inflamatoria crónica con aumento de tamaño de la cápsula articular y periarticular. * Acumulación de líquido sinovial. * Velocidad aumentada del proceso artrítico.	Presentes: Neoformación severa de un osteofito de gran tamaño.
E 50 (Ver anexo B)	* Alteración severa a nivel de la articulación tibio-talar e intertarsiana. * Perdida de la estructura anatómica del tarso y metatarso con distanciamiento entre el calcáneo y el tarso. * Resorción ósea de la superficie talar y tibio – distal. * Fusión crónica del proceso de todos los intertarsianos y zona metatarsiana.	Presencia moderada a severa de quistes subcondrales en toda la superficie articular.	Severa a nivel de la tibia distal.	Respuesta inflamatoria moderada con aumento de tamaño de la cápsula articular.	Presentes: Severa neoformación osteofitaria a nivel del tarso proximal - craneal y caudal.
E 25 (Ver anexo B)	* Alteración severa de la superficie de la tibia - distal, el talo, articulación intertarsiana y tarsometatarsiana * Perdida completa de la continuidad y resorción osea de la superficie articulara nivel de la tibia - distal, el talo, intertarsiana y tarso metatarsiano.	Presencia severa de quistes subcondrales a nivel de la tibia distal, del talo y sobre la superficie del calcáneo.	Severa en la superficie articular en todos los huesos	Respuesta inflamatoria moderada en la capsula articular.	Presentes: Neoformación severa osteofitaria en la superficie craneal de la articulación intertarsiana

Con el fin de identificar los efectos de la intervención en las articulaciones se tuvo en cuenta la siguiente escala (Snehalatha et al., 2013):

- Erosión de superficie ósea: Sin erosión (0), grado medio (1), grado moderado (2) y grado severo (3).
- Disminución del espacio articular: ninguno (0), mínimo (1), moderado (2) y severo (3).
- Destrucción del espacio articular: ninguno (0), mínimo (1), extensivo (2) y anquilosis (3).

Los resultados radiográficos obtenidos en el grupo control presentan erosión de la superficie ósea grado (2), disminución del espacio articular grado (1) y destrucción del espacio articular grado (2). En comparación con el grupo tratado con dexametasona, que presentó erosión de la superficie ósea grado (2), disminución del espacio articular grado (0) y destrucción del espacio articular grado (0), los grupos de tratamiento con fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. presentaron una calificación grado 3 en todos los ítems evaluados.

Normalmente, el modelo de artritis en ratas inducido por ACF y colágeno cursa con la disminución del espacio intraarticular y resorción ósea. En este caso, las ratas Wistar hembra artríticas presentaron lesiones a nivel óseo similares a las presentadas en los grupos de tratamiento de la fracción butanólica; evidenciándose una disminución exclusiva en el grupo patrón de tratamiento con dexametasona. Lo anterior sugiere que la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg administradas una vez al día por 14 días no reducen la pérdida de la erosión ósea en comparación con el medicamento dexametasona. Posiblemente, es necesario reducir el intervalo de dosificación y aumentar la dosis de tratamiento de la fracción butanólica, para lograr una supresión de la sinovitis y la protección ósea; obteniendo como resultado la protección de las articulaciones (He et al., 2020).

La actividad de la dexametasona en modelos artríticos es descrita de manera similar en otros estudios, como el ejecutado en ratas Sprague-Dawley machos artríticos inducidas con ACF, que al recibir tratamiento con dexametasona por un periodo de 6 días en una dosis de 0.4 mg/Kg/día; se evidenció hiperplasia sinovial leve, sin presencia significativa de exudado de células inflamatorias ni erosión ósea del cartílago (He et al., 2020). Así mismo, ratas Wistar

hembras artríticas inducidas por adyuvante de Freund y colágeno tratadas con dexametasona en una dosis de 1 mg/Kg/12 h durante 10 días, presentaron lesiones moderadas en la disminución del espacio articular y destrucción articular junto con erosión ósea grado medio (Rojas, 2019).

Imagen 4-1: Placas radiográficas ratas Wistar hembras sanas – Grupo satélite. Descripción radiográfica: Vista medio-lateral miembro posterior izquierdo: no se observan cambios en márgenes y superficies articulares, no se evidencian quistes subcondrales, sin presencia de osteoesclerosis, no se ve alteración en tejidos blandos ni neoformaciones osteofitarias. Vista medio-lateral miembro posterior derecho: márgenes y superficies articulares bien definidas, sin alteración morfológica, no hay evidencia de quistes subcondrales, no hay evidencia de osteoesclerosis, no hay alteración en tejidos blandos ni en la superficie anterior ni posterior, no hay neoformación osteofitaria periarticular. Vista dorso plantar: márgenes y superficies definidas, no hay alteración de la superficie, no presenta una distracción de las superficies óseas, sin osteoesclerosis, tejidos blandos intactos, no hay neoformación osteofitaria.

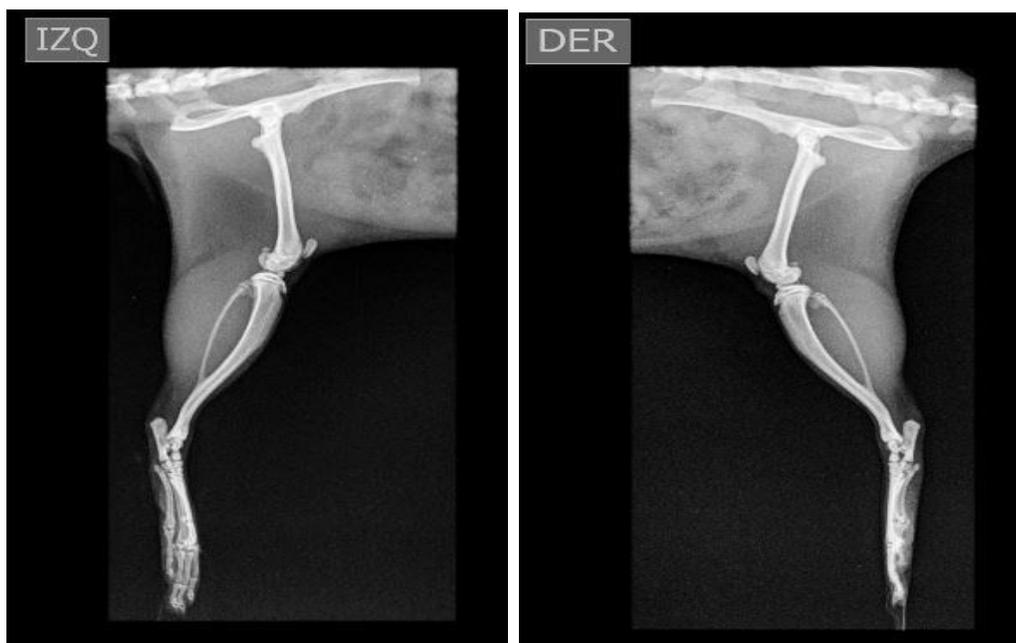
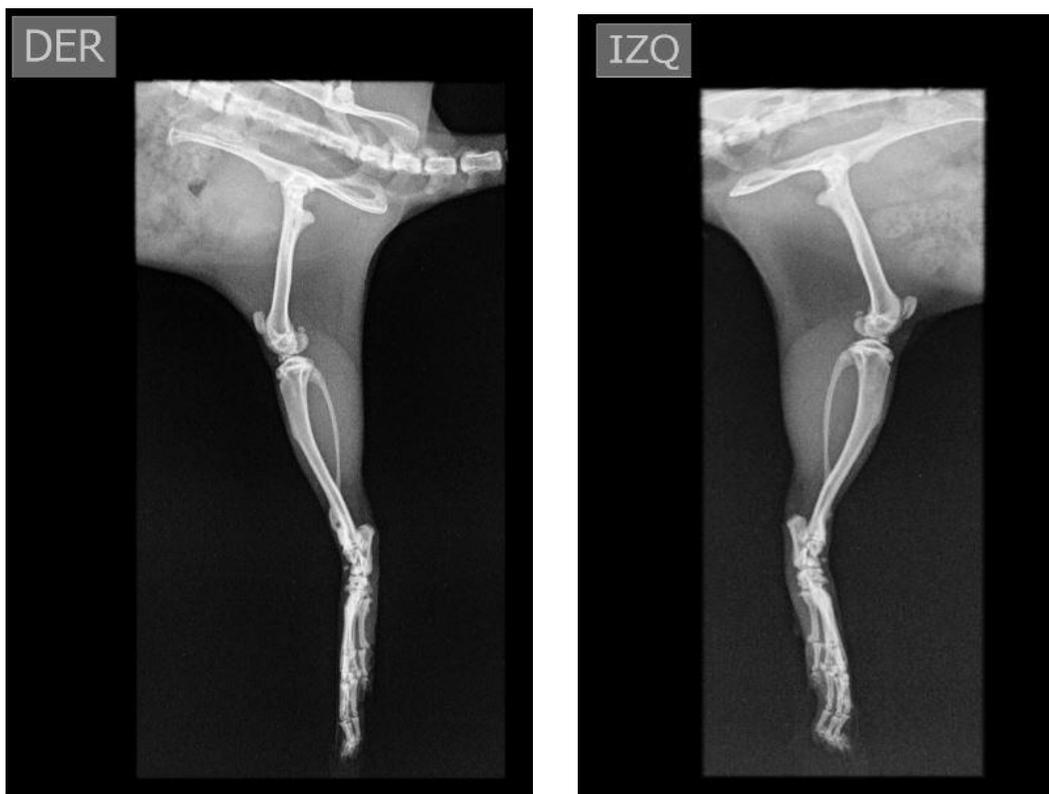


Imagen 4-2: Placas radiográficas ratas Wistar hembras artríticas – Grupo control. Descripción radiográfica: Vista medio-lateral miembro posterior izquierdo: alteración moderada de márgenes y superficies articulares de tibia distal y talo, con alteración severa a nivel del tarso, articulación intertarsiana y tarsometatarsiana, se evidencian algunos quistes subcondrales en tibia distal, algunos en calcáneo, presencia de osteoesclerosis moderada en todas las superficies articulares, con aumento moderado de tamaño en tejidos blandos y posible acumulación de líquido sinovial, no se evidencia neoformación de osteofitos. Vista medio-lateral miembro posterior derecho: se evidencia moderadas a leves alteraciones de márgenes y superficies articulares de la articulación tibiotalar, pero moderado a severos cambios en la articulación Intertarsiana y tarsometatarsiana con leves quistes subcondrales a lo largo de todas superficies articulares, osteoesclerosis moderada, severos cambios en tejidos blandos en toda la superficie articular, aumento de la radiopacidad y tamaño, con presencia de un pequeño osteofito neoformación proximal intertarsiana sin ninguna importancia. Vista dorso plantar: márgenes y superficies articulares en la articulación tibiotalar casi normales, movilización de las estructuras tarsianas bilateralmente, con una alteración marcada de la superficie de la articulación tarsometatarsiana, pérdida de la continuidad y de estructura, osteoesclerosis moderada en ambos miembros, alteración de tejidos blandos más marcada en el miembro derecho que el izquierdo. Sin embargo, ambos se ven con aumento de tamaño y pequeños inicios de osteofitos periarticulares en la cara medial del tarso distal.



Imagen 4-3: Placas radiográficas ratas Wistar hembras artríticas – Grupo patrón. Descripción radiográfica: Vista medio-lateral miembro posterior izquierdo: se evidencian márgenes y superficies articulares con moderada modificación estructural, pocos quistes subcondrales, el tejido blando no tiene una alteración marcada, hay evidente inflamación en las articulaciones intertarsianas, del tarso y metatarso, pero hacia proximal no hay cambios importantes hay una neoformación osteofitaria pequeña en tarso proximal. Vista medio-lateral miembro posterior derecho: se evidencia una alteración en márgenes y superficies articulares moderada a severa con cambio morfológica de tibia distal, con una respuesta perióstica distal marcada, periostitis y una respuesta posiblemente lamelar, cambio morfológico en tarso y articulación tarsometatarsiana, en calcáneo también se evidencia la pérdida estructural, hay focos de radiolúcidas, pérdida de calcio evidente. Vista dorso plantar: en el miembro posterior derecho se observa una alteración marcada de tibia distal con un sobre crecimiento de la superficie ósea de tibia distal con evidente cambio similar a un proceso tumoral, reacción perióstica marcada, pérdida de continuidad en la zona interna de tibia distal, avanzada pérdida ósea.



4.1 Evaluación histopatológica

Los efectos de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en la proliferación sinovial, infiltración celular, erosión del cartílago y formación del pannus en las articulaciones de miembros posteriores de ratas Wistar artríticas, se evaluaron mediante estudios histopatológicos llevados a cabo en el Laboratorio de Patología de la Universidad Nacional de Colombia en la Facultad de Medicina Veterinaria. Los resultados se presentan en la (tabla 4-3), no se observaron alteraciones histopatológicas en el grupo satélite (animales sanos). En el grupo control artrítico de máximo daño se evidenció proliferación sinovial, erosión del cartílago y formación del pannus grado 3 mientras que la infiltración celular (linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares) presentó un grado (2) de acuerdo con la escala descrita en la (tabla 3-3). Las imágenes histopatológicas en el grupo patrón (dexametasona 1 mg/Kg/día/VO) y el grupo E50 (fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. 50 mg/Kg/día/VO) presentaron un menor grado de calificación con respecto al grupo control, evidenciando menor proliferación sinovial y erosión del cartílago grado 2 e infiltración celular y formación del pannus grado 1. Por el contrario, el grupo E100 (fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. 100 mg/Kg/día/VO) y E25 (fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. 25 mg/Kg/día/VO) presentaron lesiones similares a las del grupo control de máximo daño.

La actividad de la dexametasona y del E50 puede estar relacionada a la inhibición de la inflamación en miembros posteriores, exudación de células inflamatorias y proliferación de células sinoviales. Al reducirse la proliferación o activación de células inflamatorias como macrófagos se puede disminuir las lesiones en el cartílago y tejido óseo y la respuesta inflamatoria en el pannus, ya que normalmente en la artritis los macrófagos activados presentes en el sinovio producen la secreción de varios mediadores de inflamación; entre ellos se incluyen las citocinas IL-1 β y el TNF α . La TNF α se encuentra involucrada en la degradación del cartílago articular mediante la promoción de la expresión de metaloproteinasas, proteoglicanos y colágeno tipo II mientras que la IL-1 β promueve la degradación de la matriz extracelular y la destrucción del cartílago articular (He et al., 2020). Por ende al reducir la presencia de células inflamatorias se reduce la expresión de citocinas que promueven la erosión ósea y del cartílago.

Sin embargo, a pesar de que se observa a nivel histopatológico efectos similares entre el grupo patrón y E50, en la evaluación radiográfica el grupo E50 los resultados obtenidos informan erosión de la superficie ósea, disminución del espacio articular y destrucción del espacio articular; lo cual puede estar relacionado con la muestra de individuos empleados en el estudio radiográfico. Probablemente, al tener una muestra más significativa del grupo se evidenciarán resultados con respuestas similares entre los grupos de tratamiento.

Estudios similares han reportado presencia de hiperplasia sinovial leve y ausencia de exudados de células inflamatorias y erosión ósea en ratas Sprague-Dawley artríticas inducidas con ACF, tratadas con dexametasona en una dosis de 0.4 mg/Kg; así como reducción significativa de la capa sinovial y las células inflamatorias, y la superficie lisa del cartílago en el caso de realizar tratamiento con extracto n-butanol de *Gastrodia elata* en dosis de 100 y 50 mg/Kg/día durante 15 días (He et al., 2020). Así mismo en ratas Sprague-Dawley artríticas de control negativo inducidas con ACF presentaron infiltración celular significativa, hiperplasia sinovial, disminución del espacio articular, formación de pannus, y daño del cartílago que indican la inducción exitosa de artritis (Ben et al., 2017).

Tabla 4-3: Análisis histopatológico de miembros posteriores de ratas artríticas tratadas con la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. Nivel de daño: Criterios (Ali et al., 2015) // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100 g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1 mg/Kg/día/VO)// Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de uchuva (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de uchuva (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de uchuva (25 mg/Kg/día/VO)

Grupos de tratamiento	Proliferación sinovial	Infiltración celular	Erosión del cartílago	Formación del pannus
Grupo satélite	Grado (0) No hay proliferación.	Grado (0) Sin cambios.	Grado (0) No hay cambios visibles.	Grado (0) No hay cambios.
Grupo control	Grado (3) Severa proliferación caracterizada por invasión del sinovio hiperplásico y desaparición del espacio articular, cartílago adyacente, hueso y tejido conectivo.	Grado (2) Extensa infiltración celular focal.	Grado (3) Cartílago con degradación extensa, profunda y en varias zonas.	Grado (3) Formación de pannus en más de cuatro sitios o formación extensa de pannus hasta en dos sitios.
Grupo patrón (Dexametasona)	Grado (2) Moderada proliferación en las 4 capas de sinoviocitos reactivos, incremento de la actividad mitótica y leve o ausencia de invasión celular adyacente al hueso y tejido conectivo.	Grado (1) Reducida infiltración celular focal.	Grado (2) Degradación profunda y localizada del cartílago.	Grado (1) Formación de pannus hasta en dos sitios.
Grupo E 100	Grado (3) Severa proliferación caracterizada por invasión del sinovio hiperplásico y desaparición del espacio articular, cartílago adyacente, hueso y tejido conectivo.	Grado (3) Extensa infiltración celular que invade la cápsula articular con formación de agregados.	Grado (3) Cartílago con degradación extensa, profunda y en varias zonas.	Grado (2) Formación de pannus hasta en cuatro sitios, con infiltración o sobrecrecimiento en la superficie articular.
Grupo E 50	Grado (2) Moderada proliferación en las 4 capas de sinoviocitos reactivos, incremento de la actividad mitótica y leve o ausencia de invasión celular adyacente al hueso y tejido conectivo.	Grado (1) Reducida infiltración celular focal.	Grado (2) Degradación profunda y localizada del cartílago.	Grado (1) Formación de pannus hasta en dos sitios.
Grupo E 25	Grado (3) Severa proliferación caracterizada por invasión del sinovio hiperplásico y desaparición del espacio articular, cartílago adyacente, hueso y tejido conectivo.	Grado (3) Extensa infiltración celular que invade la cápsula articular con formación de agregados.	Grado (3) Cartílago con degradación extensa, profunda y en varias zonas.	Grado (2) Formación de pannus hasta en cuatro sitios, con infiltración o sobrecrecimiento en la superficie articular.
involucion AR	Grado (3) Severa proliferación caracterizada por invasión del sinovio hiperplásico y desaparición del espacio articular, cartílago adyacente, hueso y tejido conectivo.	Grado (3) Extensa infiltración celular que invade la cápsula articular con formación de agregados.	Grado (3) Cartílago con degradación extensa, profunda y en varias zonas.	Grado (3) Formación de pannus en más de cuatro sitios o formación extensa de pannus hasta en dos sitios.

4.2 Parámetros inmunomoduladores

4.2.1 Cuantificación de interleucinas

La inducción de artritis con adyuvante de Freund y colágeno en ratas permite evaluar el potencial artrítico y antiinflamatorio de diferentes tratamientos, ya que presenta una fisiopatología y desarrollo clínico similar al de la enfermedad en humanos. Este proceso artrítico presenta inflamación aguda y crónica que involucra varios mediadores

proinflamatorios y citocinas. Uno de los síntomas característicos en la AR es hipertrofia de la cápsula sinovial, la cual es producida por la infiltración de macrófagos y su interacción con fibroblastos, que induce a una mayor presencia de citocinas proinflamatorias (principalmente IL-1 β y TNF α) que conducen a daño del cartílago y destrucción ósea. Para tal efecto, constantemente se buscan estrategias terapéuticas que tengan como diana células proinflamatorias o citocinas. Para esta investigación se cuantificó las citocinas IL-1 β y TNF α a través del Kit de ELISA tipo sándwich (SIGMA-Aldrich, Alemania) en muestras de plasma y homogenado de patas, con el fin de evaluar la posible actividad inmunomoduladora de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L.; para lo cual se tuvo en cuenta la curva de calibración planteada por la casa matriz (ver anexo **D**).

Actualmente, se ha evaluado la concentración de citocinas en el modelo de artritis inducida por (ACF) y colágeno en ratas, esperando encontrar en animales artríticos concentraciones superiores de las citocinas IL-1 β y de TNF α con respecto a animales sanos. Esto permite identificar posibles tratamientos inmunomoduladores al pretender encontrar concentraciones inferiores en animales con tratamientos experimentales con respecto a los valores presentados en animales artríticos. Lo anterior se vio reflejado en resultados obtenidos para la citocina IL-1 β , en un estudio realizado en ratas Wistar con artritis inducida por ACF y colágeno, en donde las muestras de homogenado de patas del grupo de animales artríticos presentó concentraciones de IL-1 β de 661 pg/mL mientras que el grupo tratado con dexametasona (1 mg/Kg) obtuvo concentraciones de IL-1 β de 66 pg/mL por lo que se concluyó que la dexametasona presentó actividad inmunomoduladora actuando sobre este marcador de inflamación. Por el contrario, en las muestras de los animales tratados con dexametasona se presentaron concentraciones mayores de TNF α (1095 pg/mL) con respecto a animales artríticos en donde la concentración fue de 714 pg/mL (Rojas, 2019). Por otra parte, se han reportado concentraciones menores de la citocina IL-1 β en ratas Wistar artríticas de 65.8 pg/ml con respecto al anterior estudio (Kamal et al., 2022).

Esta información permite caracterizar los niveles de citocinas presentes en el homogenado de patas en procesos artríticos en este modelo. Sin embargo, en nuestro caso los resultados obtenidos en las muestras de homogenado presentaron absorbancias inferiores al punto más bajo de la curva de calibración tanto de IL-1 β como TNF α , por ende, no se tuvieron en cuenta para su análisis.

En cuanto a las concentraciones de citocinas en plasma, se ha evidenciado en animales artríticos concentraciones de IL-1 β alrededor de 1100 pg/mL y de TNF α de 300 pg/mL. En el caso de animales tratados con dexametasona (0.4 mg/Kg) los resultados de IL-1 β se observaron alrededor de 400 pg/mL y de TNF α de 100 pg/mL (He et al., 2020a). La anterior información permite familiarizarse con las concentraciones de citocinas en el modelo e identificar el efecto inmunomodulador del fármaco dexametasona.

En nuestro caso, la concentración de IL-1 β presentó concentraciones inferiores en comparación con lo reportado en la literatura, por ejemplo, el grupo de animales artríticos presentó un promedio de 244 +/- 17 pg/mL y en el grupo tratado con dexametasona presentó una concentración de 319 +/- 7 pg/mL. Por otro lado, las concentraciones de TNF α en las muestras de plasma presentaron valores similares a los descritos en la literatura.

Actualmente, en publicaciones relacionadas a principios bioactivos se evidenció que el extracto n-butanol de *Gastrodia elata* en un modelo de artritis inducida por ACF y colágeno, presentó una disminución significativa de la concentración de IL-1 β y TNF α en plasma con respecto al grupo control de máximo daño, pero no similar a la del grupo de tratamiento con dexametasona, la cual logró reducir la concentración de estas citocinas en los individuos en mayor medida (He et al., 2020a). De igual manera, en el 2016 se evidenció disminución de las citocinas IL-1 β y TNF α en artritis inducida por ACF y colágeno en ratas Wistar tratadas con flavonoides totales de *Juniperus sabina* (500 y 250 mg/Kg) (Zhao et al., 2016).

En nuestro caso, las muestras de plasma no presentaron diferencias significativas en la concentración de IL-1 β entre los grupos control (animales artríticos) y patrón (animales tratados con dexametasona). Por el contrario, todas las dosis de la fracción butanólica presentaron concentraciones de IL-1 β significativamente menores con respecto tanto al grupo control (E100 p=0,0097, E50 p= 0,0040 y E25 p=0,0029) como al grupo patrón (E100 p= 0,0006, E50 p= 0,0003 y E25 p= 0,0003) (ver gráfica **4-6A**). Los anteriores hallazgos permiten concluir que la fracción butanólica presenta actividad inmunomoduladora de tipo inhibidor de la citocina IL-1 β . Sin embargo, se recomienda que este parámetro sea evaluado en la administración de las fracciones durante 30 días teniendo en cuenta las concentraciones de la citocina en animales sanos.

Por otra parte, los resultados obtenidos de la citocina TNF α en las muestras de plasma no presentaron diferencias significativas en la concentración de la citocina entre los grupos de tratamiento (ver gráfica **4-6B**).

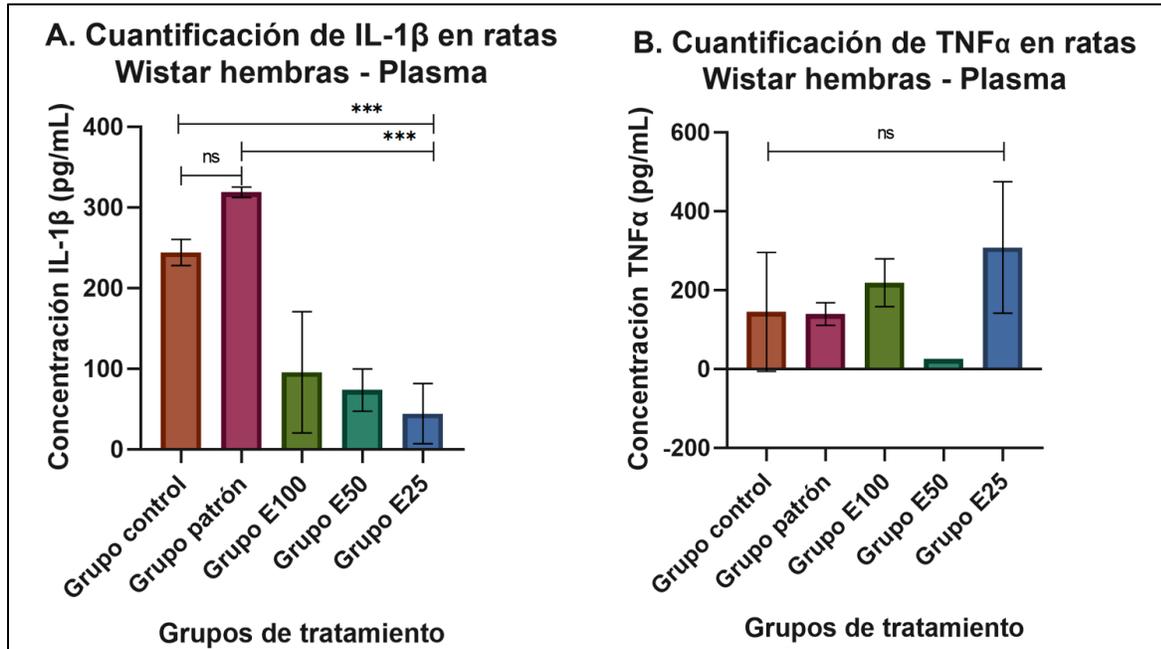
De acuerdo con lo anterior, la ausencia de las citocinas proinflamatorias en las muestras de homogenado de patas o bajas concentraciones detectadas de IL-1 β y TNF α en las muestras de suero, no concuerdan con el proceso artrítico detectado y descrito en la evaluación histopatológica y radiográfica, ya que se evidenció en algunos grupos de tratamiento un proceso artrítico establecido; presentando infiltración de células inflamatorias (macrófagos, monocitos y linfocitos) en el sinovio y destrucción del cartílago junto con erosión ósea en las articulaciones tibio – tarsal y metatarsianas; lesiones asociadas a la presencia de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF α activadas por macrófagos en AR.

Los resultados obtenidos durante esta investigación pueden estar sesgados por un deterioro de los marcadores biológicos asociados al tiempo (> 1 año desde su recolección) y temperatura (> -20°C) de almacenamiento de las muestras antes de su análisis. Con respecto a lo anterior, en investigaciones enfocadas a la estabilidad de las citocinas en muestras de plasma y suero se ha encontrado que existen múltiples factores que pueden inducir a fallas en la cuantificación de estas. Por ejemplo, la manipulación de la muestra. Se ha sugerido que las concentraciones de citocinas pueden aumentar o disminuir en las muestras de sangre, plasma o suero debido al uso de varios anticoagulantes, contaminación del tubo con endotoxinas y retrasos en el procesamiento de la sangre (centrifugación). Cuando se emplea heparina como anticoagulante puede promover la liberación de citocinas como la TNF α . Otro factor es la corta vida media de las citocinas que está sujeta a la rápida degradación durante la recolección y preparación de las muestras. Por último, está el efecto de congelación – descongelación en donde se ha evidenciado que las muestras cuando se someten 6 veces a congelación y descongelación presentan una disminución leve, pero significativa de las concentraciones de IL-1 β , lo que sugiere que para obtener un análisis preciso de las citocinas se recomienda no excederse de 3 ciclos de congelación y descongelación (Liu et al., 2021).

De acuerdo con lo anterior se recomienda que en futuras investigaciones se tenga presente el tiempo de vida media de las citocinas (TNF α), se emplee EDTA como anticoagulante

debido a que no altera las mediciones de citocinas como la heparina y que no se superen 3 ciclos de congelación y descongelamiento de las muestras.

Gráfica 4-6: Cuantificación de interleucinas en plasma de ratas Wistar hembras artríticas. A. Cuantificación de IL-1 β en ratas Wistar hembras – plasma // B. Cuantificación de TNF α en ratas Wistar hembras – plasma // Expresión de Concentración citocinas (pg/ml) // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100 g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1 mg/Kg/día/VO)// Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de uchuva (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de uchuva (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de uchuva (25 mg/Kg/día/VO) n=5 ratas Wistar hembra // ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05) // ns: Sin diferencia significativa.



4.3 Parámetros bioquímicos

En la artritis reumatoide el estrés oxidativo es un mecanismo fundamental subyacente asociado con la inflamación crónica, que ocasiona la presencia desmedida de especies reactivas de oxígeno (EOR) que a su vez provoca que las células inmunitarias liberen enzimas y citocinas inflamatorias contribuyendo al daño del tejido articular. Los antioxidantes pueden eliminar los radicales libres y reducir el daño tisular por la regulación negativa de IL-

1 β y TNF- α en la AR; sin embargo, se ha asumido un desequilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes alterando el mecanismo de defensa del organismo en esta enfermedad (Hussain et al., 2021).

De acuerdo con lo anterior, para fines de esta investigación, se analizó el comportamiento de la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. como posible antioxidante en el estrés oxidativo en muestras biológicas (plasma y homogenado de patas) a través del índice de peroxidación lipídica TBARs, parámetro FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) y actividad de superóxido dismutasa (SOD); a continuación, se presentan los resultados obtenidos.

4.3.1 Índice de peroxidación lipídica TBARs

La patogenia de la artritis reumatoide describe un aumento en la peroxidación lipídica ocasionado por el estrés oxidativo. Cuando los lípidos se oxidan se forman hidroperóxidos lipídicos que pueden descomponerse y formar aldehídos bioactivos como el 4-hidroxinonal (HNE) y el malondialdehído (MDA); moléculas electrófilas que pueden reaccionar con proteínas alterando su función. Se ha evidenciado niveles significativamente altos de MDA en muestras de sangre entera, plasma, suero, líquido sinovial, eritrocitos y orina relacionándose con la actividad de la enfermedad y los niveles de especies reactivas de oxígeno (Ferreira et al., 2021).

De acuerdo con lo anterior, se han analizado diferentes muestras biológicas con el fin de caracterizar las concentraciones de MDA en modelos murinos de artritis y así evaluar tratamientos terapéuticos y comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad. Por ejemplo, en un estudio realizado en ratas Wistar machos artríticos inducidos por ACF, se evaluó la peroxidación lipídica en los músculos de los individuos y se concluyó que los niveles más altos de TBARs estaban directamente relacionados con la elevada producción de especies reactivas de oxígeno (Hussain et al., 2021). Posiblemente, terapias que reduzcan los niveles de TBARs se les puede atribuir un efecto antioxidante.

Se espera que en animales artríticos se presenten niveles mayores de MDA con respecto a las concentraciones presentadas en animales sanos. Como fue reportado en una

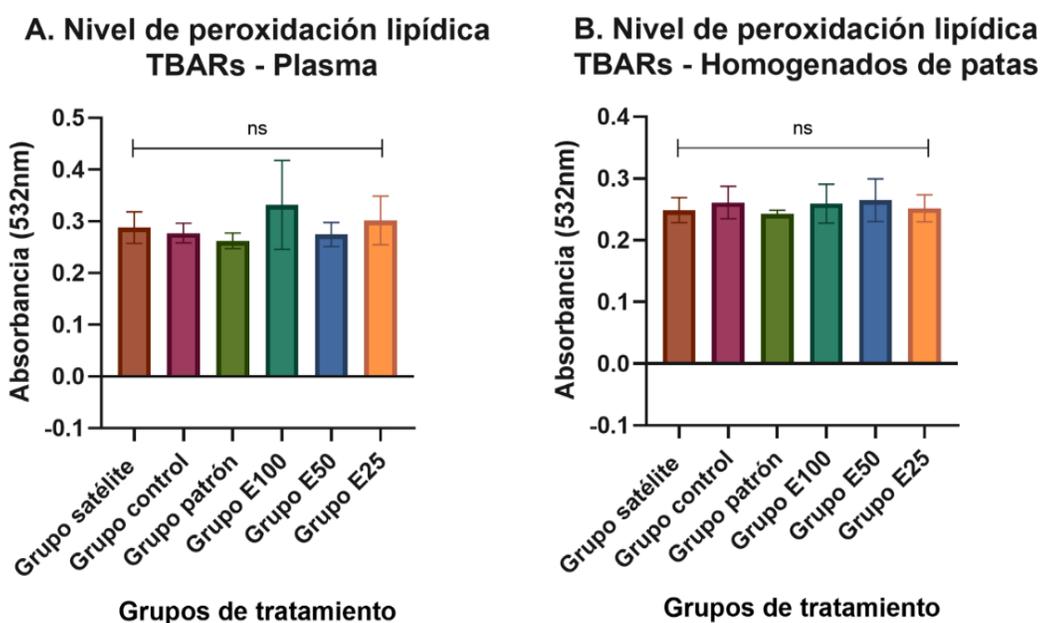
investigación en ratas artríticas inducidas por CFA, que presentaron un aumento en el nivel de MDA en suero del control artrítico ($64,67 \pm 3,01 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) mientras que el control normal presentó ($27,45 \pm 3,76 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). De acuerdo con lo anterior se espera que un tratamiento con actividad antioxidante sea capaz de reducir el nivel de MDA como ocurrió en los animales artríticos tratados con extractos de *Ricinus communis* L., *Withania somnifera* L. y el medicamento metotrexato logrando la disminución significativa del MDA (Hussain et al., 2021).

Un comportamiento similar se presentó en un modelo de artritis inducida por ACF en ratas Wistar en donde el grupo control de máximo daño presentó niveles elevados de MDA; mientras que los grupos de tratamiento presentaron una reducción significativa de MDA, en donde el menor daño oxidativo (MDA) lo presentó la dosis del extracto acuoso de *Allium ampeloprasum* L. (500 mg/Kg) (Kaur et al., 2023).

Los resultados obtenidos durante nuestra investigación sobre la actividad antioxidante de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en el modelo de artritis inducida por ACF y colágeno, no presentó diferencias significativas en los niveles de MDA entre los grupos de tratamiento tanto en las muestras de plasma y homogenado a diferencia de los resultados ya descritos (ver gráfica 4-7). Adicionalmente, el grupo patrón no presentó diferencias con respecto al grupo control de máximo daño a diferencia de los datos obtenidos en la estandarización del modelo de artritis inducida por ACF y colágeno en ratas Wistar; en donde el grupo del patrón (dexametasona) presentó una disminución significativa de MDA con respecto al grupo de máximo daño (Rojas, 2019).

Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje de MDA, siendo el 100 % el porcentaje esperado de presencia de MDA en un animal sano (grupo control) mientras que valores superiores corresponderían a animales artríticos. Se concluye que los animales artríticos no presentaron peroxidación lipídica superior a los niveles normales de un animal sano al ser evaluado por el método de TBARs (ver anexo F).

Gráfica 4-7: Nivel de peroxidación lipídica en ratas Wistar artríticas tratadas con la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L.: A. Nivel de peroxidación lipídica TBARs – Plasma // B. Nivel de peroxidación lipídica TBARs - Homogenado de patas // Absorbancia (532 nm) // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100 g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1 mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // n=26 ratas Wistar hembra // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA (*p < 0.05) // ns: Sin diferencia significativa



4.3.2 Determinación del parámetro FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

La determinación del parámetro FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) permite identificar aquellas sustancias que son capaces de reducir el hierro en su forma férrica (Fe^{+3}) a ferrosa (Fe^{+2}), este aspecto está relacionado con la capacidad de reducir otras especies reactivas de oxígeno que se encuentran en el plasma.

En procesos artríticos de acuerdo con referencias bibliográficas el comportamiento de la capacidad antioxidante se encuentra disminuida o no presenta un aumento significativo con respecto a animales sanos. Situación que fue evidenciada en ratas

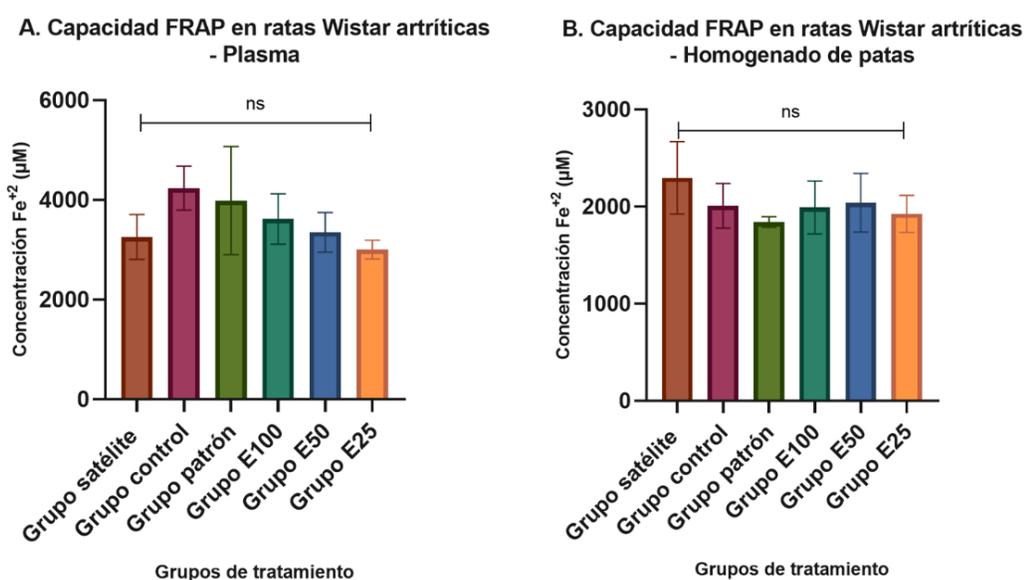
Sprague-Dawley artríticas inducidas por ACF y colágeno; en donde se evaluó el parámetro FRAP en los músculos gastrocnemio, músculo extensor digitorum longus (EDL) y sóleo y fueron comparados con animales sanos. Los resultados permitieron establecer que la capacidad antioxidante fue similar y no presentó cambios, a diferencia del músculo gastrocnemio que aumentó de manera significativa con respecto al grupo control (Oyenihi et al., 2019).

De acuerdo con lo anterior para el tratamiento de la AR sería ideal un agente capaz de aumentar la capacidad antioxidante, como se ha evidenciado en varias investigaciones con productos bioactivos. Por ejemplo, en el 2015 en ratas Wistar artríticas inducidas por ACF y colágeno tipo II, se evidenció un aumento de los niveles de FRAP después de administrar un extracto de raíz de *Withania somnifera* durante un periodo de 20 días alcanzando resultados comparables con el medicamento metotrexato (MTX) (Khan et al., 2015).

En otra investigación se reportó que en ratas Wistar artríticas inducidas por ACF y colágeno después de la administración de extracto acuoso de *Allium ampeloprasum* L. en una dosis de 500 mg/Kg/VO durante 28 días aumentó la capacidad antioxidante (FRAP) (Kaur et al., 2023). En otro caso, en ratas Holtzman artríticas inducidas por ACF se evidenció que al administrar extracto de orujo de uva de *Vitis vinifera* de la variedad Merlotun, se previno el deterioro de la capacidad antioxidante (Gonçalves et al., 2017).

De acuerdo con lo anterior, se puede evitar el deterioro de la capacidad antioxidante con productos bioactivos; sin embargo, en nuestra investigación los resultados reflejaron que la capacidad antioxidante no presentó cambios significativos entre los grupos de tratamiento tanto en las muestras de plasma como de homogenado de patas. Lo anterior puede deberse a que la dosis de 100 mg/Kg de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. es insuficiente para aumentar la capacidad antioxidante en las ratas Wistar en un periodo de 14 días. Situación por la cual se recomienda investigar dosis mayores de la fracción butanólica (ver gráfica 4-8).

Gráfica 4-8: Capacidad FRAP en ratas Wistar artríticas tratadas con la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L.: A. Capacidad FRAP en ratas Wistar artríticas - Plasma // B. Capacidad FRAP en ratas Wistar artríticas – Homogenado de patas // Expresión de concentración Fe^{+2} (μM) // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100 g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1 mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // n=28 ratas Wistar hembra // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05) // ns: Sin diferencia significativa.



4.3.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

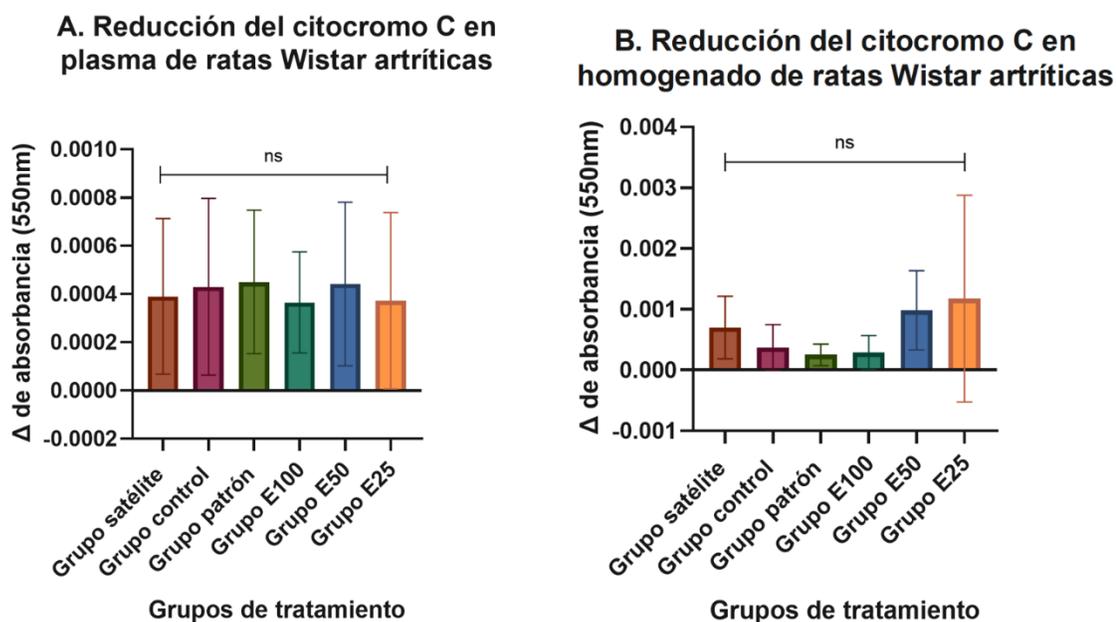
Los trastornos inmunitarios y el estrés oxidativo son los principales factores de la patogenia de la AR. Normalmente, el organismo tiene especies reactivas de oxígeno (hidroxilo y superóxido) pero a su vez cuenta con un sistema de antioxidantes que incluye la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa. Cuando se presenta estrés oxidativo en el organismo, los niveles de las especies reactivas de oxígeno superan a los antioxidantes como es en el caso de la AR, en donde disminuyen los niveles de la Superóxido dismutasa (SOD) y aumentan los niveles de MDA (Xie et al., 2019).

Actualmente, las plantas son una alternativa para identificar compuestos con actividad antioxidante e identificar posibles modos de acción para ser aplicados frente al estrés oxidativo. Se han detectado varios extractos provenientes de diferentes plantas que pueden considerarse como posibles candidatos para complementar los tratamientos convencionales de AR permitiendo reducir el estrés oxidativo al aumentar los niveles de SOD. Por ejemplo, un estudio realizado en ratas macho Sprague-Dawley artríticas inducidas por ACF, presentaron un aumento en los niveles de SOD después de recibir tratamiento con el compuesto *gentiopicrósido* por vía oral durante 14 días (Xie et al., 2019).

En otro caso se evidenció que ratas artríticas presentaron niveles bajos de SOD ($25,50 \pm 3,02$ U/mg de proteína) en comparación con el grupo de animales sanos ($64,67 \pm 3,39$ U/mg proteína). Pero que al realizar tratamiento con extractos hidroalcohólicos de hojas de *Ricinus communis* y raíces de *Withania somnifera* la actividad de la SOD aumentó significativamente con respecto al grupo de máximo daño (Hussain et al., 2021).

Con respecto a los resultados obtenidos en nuestra investigación no se evidenció diferencias significativas de la enzima SOD entre los grupos de tratamiento con fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. y del medicamento patrón dexametasona en las muestras de plasma y homogenado de patas. Así mismo el grupo control de máximo daño no presentó niveles inferiores de la SOD con respecto al grupo satélite. Por lo cual se concluye que los niveles de la SOD no se vieron afectados por el proceso artrítico establecido en el estudio preclínico de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L (ver gráfica 4-9).

Gráfica 4-9: Actividad de la enzima superóxido dismutasa en ratas Wistar artríticas tratadas con la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L.: A. Reducción citocromo C en plasma de ratas Wistar artríticas // B. Reducción citocromo C en homogenado de patas de ratas Wistar artríticas // Expresión en delta de absorbancia (550 nm) // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100 g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1 mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // n=24 ratas Wistar hembra // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA (p < 0.05) // ns: Sin diferencia significativa.



4.3.4 Resultados globales

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por un proceso crónico de inflamación, estrechamente relacionado con la alteración del estrés oxidativo en procesos metabólicos que contribuyen a una alteración del sistema inmunitario. Los principales síntomas clínicos en la AR incluyen la inflamación crónica de múltiples articulaciones que presentan: dolor, disminución del espacio articular y conforme avanza la enfermedad se evidencia deterioro de la cápsula articular, erosión ósea e inclusive anquilosamiento de las articulaciones (He et al., 2020).

Actualmente, son empleados para el tratamiento de la enfermedad medicamentos antiinflamatorios no esteroideos y los productos biológicos que, debido a una administración prolongada o sensibilidad a estos medicamentos, puede ocasionar la presentación de efectos adversos como: lesiones gastrointestinales, complicaciones cardiovasculares, reproductivas, entre otras (Zhao et al., 2016); Lo que despierta un mayor interés en la investigación enfocada a la medicina tradicional debido a su eficacia y reducidos efectos secundarios.

El presente estudio evaluó el posible efecto antiartrítico de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L., en un modelo de artritis inducido por ACF y colágeno en ratas Wistar hembras. El estudio inició con la inducción de artritis en los individuos con ACF y colágeno tipo II, que al cabo de 21 días de la primera inmunización presentaron inflamación crónica en miembros posteriores bilateral enfocada en la articulación del maléolo, zona plantar e interfalángica asociada a un proceso artrítico establecido.

Los individuos recibieron tratamiento con la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en dosis de 100, 50 y 25 mg/Kg/día/VO y dexametasona (1 mg/Kg/día/VO) durante 14 días. Los resultados de la medición del grosor de los miembros posteriores en individuos con artritis establecida en la zona interfalángica, plantar y de la articulación del maléolo, permitió evidenciar una mayor sensibilidad y menor variabilidad en las mediciones tomadas en la zona plantar y en la articulación del maléolo en comparación con la zona interfalángica que presentó menor precisión en los datos. De acuerdo con lo anterior, la información concerniente a la zona plantar se empleó para evaluar el efecto antiinflamatorio de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L.

Los hallazgos de las medidas volumétricas sugieren que el proceso artrítico inducido por ACF y colágeno en ratas Wistar después de 36 días desde la inmunización de los individuos no presenta involución en el grupo control de máximo daño, información que es respaldada por los resultados de histopatología en donde se evidenció proliferación sinovial, erosión del cartílago y formación del pannus acompañado de infiltración celular (linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares) mientras que a nivel radiográfico se observó erosión de la superficie ósea, disminución y destrucción del espacio articular.

En el caso del grupo patrón dexametasona (1 mg/Kg/Día/VO) en nuestra investigación presentó actividad antiinflamatoria a partir del día 26 de tratamiento y se evidenció un efecto antiinflamatorio recurrente hasta el día 36 del estudio. En cuanto a los hallazgos histopatológicos se encontró una disminución en la proliferación sinovial, erosión del cartílago, infiltración celular y formación del pannus con respecto al grupo control. Información que fue corroborada con el análisis radiográfico en donde se evidenció únicamente erosión de la superficie ósea.

En cuanto a los grupos de tratamiento de diferentes dosis de la fracción butanólica de *Physalis peruviana* L., se sugiere que la dosis de 100 y 25 mg/Kg presenta actividad antiinflamatoria significativa a partir del décimo día de tratamiento a diferencia de la administración por vía oral de la dosis de 50 mg/Kg, que presentó actividad antiinflamatoria significativa a partir del D26 de manera similar al grupo patrón teniendo en cuenta como parámetro de recuperación el mismo individuo. Sin embargo, a nivel radiográfico los grupos de tratamiento de la fracción no presentaron disminución de las lesiones osteoarticulares e inclusive en algunos casos se presentó anquilosamiento de la articulación. En cuanto al análisis histopatológico de los grupos patrón y E50 se evidenció una disminución en la proliferación sinovial, erosión del cartílago, infiltración celular y formación del pannus respecto al grupo control; mientras que el grupo E100 y E25 evidenciaron lesiones similares a las del grupo control de máximo daño.

Finalmente, se compararon las medidas volumétricas de los grupos de tratamiento en el día 36 y se concluyó que la dexametasona presentó actividad antiinflamatoria frente a los demás grupos de tratamiento. La fracción butanólica en diferentes dosis no presentó actividad antiinflamatoria con relación al grupo control, ni entre ellas. Por consiguiente, no existen evidencias suficientes para determinar que la fracción butanólica presenta una actividad antiinflamatoria superior entre las dosis manejadas durante la investigación.

Con respecto a la cuantificación de las citocinas IL-1 β y TNF α en plasma y homogenado de patas, no se identificaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. Este comportamiento se replicó en las pruebas de estrés oxidativo realizadas (TBARs, FRAP y SOD). Por ende, no fue posible en este estudio identificar el posible modo de acción de la fracción butanólica a nivel inmunológico y oxidativo. Se presume que la ausencia de la

actividad de los marcadores biológicos puede estar relacionada a la antigüedad de las muestras o fallas en el almacenamiento de estas; ya que, de acuerdo con el grosor de las articulaciones, hallazgos histopatológicos y radiográficos, el comportamiento de los marcadores debería mostrar diferencias significativas entre los grupos satélite, control y patrón.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El modelo de artritis inducida por adyuvante completo de Freund y colágeno generó un proceso de artritis establecida en los individuos sin presentar involución de acuerdo con la mediciones volumétricas, evaluación radiográfica y análisis histopatológico.

En las condiciones establecidas en nuestra investigación, la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. presentó actividad antiinflamatoria de acuerdo con el seguimiento realizado de las medidas de la zona plantar de los miembros posteriores en el modelo de artritis inducida por Adyuvante de Freund y colágeno en ratas Wistar.

La fracción butanólica en dosis de 100, 50 y 25 mg/kg administrado durante 14 días, presenta actividad inmunomoduladora debido a una disminución de la expresión de la citocina IL-1 β .

La fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. no presentó actividad antioxidante evaluada en los ensayos de: índice de peroxidación lipídica (formación de TBARs), capacidad reductora del hierro (técnica FRAP) y actividad de la enzima SOD.

5.2 Recomendaciones

Determinar la eficacia durante 14 días de dosis superiores a 100 mg/Kg de la fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. en el modelo de artritis inducida por adyuvante completo de Freund y colágeno e incluir el análisis de marcadores bioquímicos de especies reactivas de nitrógeno.

Se sugiere evaluar fracciones provenientes del extracto del fruto de *Physalis peruviana* L en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratas Wistar incluyendo el análisis de marcados inmunomoduladores de IL-1 β , TNF α e IL-6.

Caracterizar las medidas volumétricas en miembros posteriores de ratas Wistar sanas en la zona plantar y articulación del maléolo en un periodo superior a 14 días con el fin de establecer una correlación de las medidas con la edad de los individuos.

Realizar seguimiento de los marcadores inmunológicos y de estrés oxidativo en diferentes puntos de la administración de tratamientos superiores a 14 días con el fin de evaluar el comportamiento de los marcadores durante el tratamiento y no únicamente al final.

Bibliografía

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, *74*(4), 324–329. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.JBSPIN.2007.02.002>.
- Alañón, M., Áreas, V., Cuadra, J., Paulino, M., Ariza, A., Rodríguez, M. (2018). Utilización de fármacos biológicos en artritis reumatoide: monoterapia y terapia combinada. *Rev. OFIL ILAPHAR*, *28*(2), 129–136.
- Ali, E. A. I., Barakat, B. M., & Hassan, R. (2015). Antioxidant and angiostatic effect of spirulina platensis suspension in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *PloS One*, *10*(4). Retrieved from <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0121523>.
- Ben, I. O., Woode, E., Koffuor, G. A., Boakye-Gyasi, E., & Titiyoye, N. (2017). Effect of *Trichilia monadelpha* (Meliaceae) extracts on bone histomorphology in complete Freund's adjuvant-induced arthritis. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *6*(2), 177. Retrieved from <https://doi.org/10.5455/JICE.20170218092913>.
- Burrage, P., Mix, K., & Brinckerhoff, C. (2006). Matrix metalloproteinases role in arthritis. *Frontiers in Bioscience*, *11*, 529–543. Retrieved from <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2003.00402.x>.
- Campos, L., Hideo G., Fernandes R., Rizato M., Ishii L., & Salgueiro L. (2020). Superoxide dismutase: a review and a modified protocol for activities measurements in rat livers. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *126*(4), 292–299. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1520891>.
- Cantagrel, A., Degboé, Y., Constantin, A., & Davignon, J. L. (2017). Le TNF- α , l'interleukine-6 et l'interleukine-1: trois cytokines centrales de la polyarthrite rhumatoïde. *Revue Du Rhumatisme Monographies*, *84*(4), 325–330. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2017.08.005>.
- Carreño, M. (2015). Terapia médica actual en reumatología. *Rev. Med Clin Condes*, *23*(4), 413–422. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70332-2](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70332-2).

- Castro, J. (2013). Evaluación in vivo e in vitro del efecto del extracto total etéreo de los cálices de *Physalis peruviana* L., en un modelo de colitis en rata (Tesis de Maestría). Universidad de Cartagena.
- Chirino, Y., Orozco, M., & Pedraza, J. (2006). Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev. Invest Clin*, 58(4), 350–358.
- Cho, Y., Cho, M., Min, S., & Kim, H. (2007). Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, 7(1), 65–70. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2007.08.001>.
- Choudhary, N., Bhatt, L., & Prabhavalkar, K. (2018). Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Inmunopharmacology and Immunotoxicology*, 40(3), 193-200 Retrieved from <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1434793>.
- Cutolo, M., Paolino, S., & Gotelli, E. (2021). Glucocorticoids in rheumatoid arthritis still on first line: the reasons. *Expert Review of Clinical Immunology*, 17:5, 417-420 Retrieved from <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1903319>.
- Ballester J. (2016). Hidrólisis de proteínas sarcoplásmicas y generación de péptidos bioactivos durante la elaboración de jamón curado de proteínas sarcoplásmicas (Tesis de Maestría) Universitat Politècnica de València.
- Domínguez, G., Cardona, M., Sepúlveda, M., Echeverry, M., Oliveira, M., & Aragón, M. (2021). Matrix effects of the hydroethanolic extract of calyces of *Physalis peruviana* L. On rutin pharmacokinetics in Wistar rats using population modeling. *Pharmaceutics*, 13(4). Retrieved from <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13040535/S1>.
- Durán, E., González, E., Herranz, A., & Pernía, S. (2002). *Farmacia Hospitalaria*. Editorial SEFH. Retrieved from http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/reumatologia/tomo2_cap20.pdf.
- Edilova, M., Akram, A., & Abdul, A. (2021). Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Biomedical Journal*, 44(2), 172. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2020.06.010>.
- Espinoza, R., & García, I. (2013). Microbios y articulaciones: la relación entre infección y articulaciones. *Reumatología Clínica*, 9(4), 229–238. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.REUMA.2012.06.008>.
- Feldmann, M., Brennan, M., Foxwell, J., & Maini, N. (2001). The role of TNF and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmun*, 3, 188–199. Retrieved from <http://files/594/Feldmann et al. - The Role of TNF and IL-1 in Rheumatoid Arthritis.pdf>.
- Ferreira, B., Melo, T., Paiva, A., & Dominguez, R. (2021). Insights in the role of lipids, oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis unveiled by new trends in lipidomic

- investigations. *Antioxidants*, 10(1), 1–21. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10010045>.
- Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo (2016). Situación de la artritis reumatoide en Colombia 2016. Retrieved from https://cuentadealtocosto.org/site/images/Publicaciones/boletines/2017/SITUACIÓN_DE_LA_ARTRITIS_REUMATOIDE_EN_COLOMBIA_2016.pdf.
- Franco, A., Matiz, E., Calle, J., Pinzón, R., & Ospina, L. (2007). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomédica [online]*, 27, 110–115. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(08\)60099-6](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(08)60099-6).
- Gan, R., Shah, N., Wang, F., Lui, W., & Corke, H. (2017). Lactobacillus plantarum WCFS1 fermentation differentially affects antioxidant capacity and polyphenol content in mung bean (*Vigna radiata*) and soya bean (*Glycine max*) milks. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1). Retrieved from <https://doi.org/10.1111/JFPP.12944>.
- Giannini, D., Antonucci, M., Petrelli, F., Bilia, S., Alunno, A., & Puxeddu, I. (2020). One year in review 2020: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 38(3), 387–397. Retrieved from <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=15504>.
- Gonçalves, G., Soares, A., Correa, R., Barros, L., Haminiuk, C., Peralta, R., Ferreira, R., & Bracht, A. (2017). Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408–418. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.04.009>.
- Grant, C. (1997). Methotrexate pulmonary toxicity. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 23(4), 917–937. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(05\)70366-5](https://doi.org/10.1016/S0889-857X(05)70366-5).
- Grassi, W., de Angelis, R., Lamanna, G., & Cervini, C. (1998). The clinical features of rheumatoid arthritis. *European Journal of Radiology*, 27(SUPPL. 1). Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0720-048X\(98\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0720-048X(98)00038-2).
- Gul, A., Kunwar, B., Mazhar, M., Faizi, S., Ahmed, D., Shah, M., & Simjee, S. (2018). Rutin and rutin-conjugated gold nanoparticles ameliorate collagen-induced arthritis in rats through inhibition of NF-κB and iNOS activation. *International Immunopharmacology*, 59, 310–317. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2018.04.017>.
- Gupta, A., & Singh, S. (2014). Evaluation of anti-inflammatory effect of *Withania somnifera* root on collagen-induced arthritis in rats. *Pharmaceutical Biology*, 52:3, 308-320. Retrieved from <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.835325>.
- Hazes, J., Coulie, P., Geenen, V., Vermeire, S., Carbonnel, F., Louis, E., Masson, P., & De Keyser, F. (2011). Rheumatoid arthritis and pregnancy: evolution of disease activity and pathophysiological considerations for drug use. *Rheumatology*, 50(11), 1955–1968. Retrieved from <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker302>.

- He, P., Hu, Y., Huang, C., Wang, X., Zhang, H., Zhang, X., Dai, H., Wang, R., & Gao, Y. (2020). N-butanol extract of *Gastrodia elata* suppresses inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and complete freund's adjuvant- (CFA-) induced arthritis rats via inhibition of MAPK signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: vol. 2020, article ID 1658618, 11 pages*. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2020/1658618>.
- Hernández, C., & Martínez, C. (2009). Uso de fármacos modificadores de la enfermedad en artritis reumatoide. *Revista Terapeutica de Sistema Nacional de Salud*, 33(4), 99–109.
- Hitchon, C., & El-Gabalawy, H. (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 6(6), 265. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/AR1447>.
- Hussain, A., Aslam, B., Muhammad, F., Faisal, M., Kousar, S., Mushtaq, A., & Bari, M. (2021). Anti-arthritic activity of *Ricinus communis* L. and *Withania somnifera* L. extracts in adjuvant-induced arthritic rats via modulating inflammatory mediators and subsiding oxidative stress. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(7), 951. Retrieved from <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2021.55145.12355>.
- Inzunza, F., Araya, I. & Letelier, M. (2016). Activación oxidativa de udp-glucuroniltransferasa: efecto de agentes reductores sintéticos y extractos herbales (Tesis de pregrado). Universidad de Chile.
- Kamal, P., Pal, R., Nath, R., Sachan, A., Kamal, P., Pal, R., Nath, R., & Sachan, A. (2022). Protective effects of the ethanolic fenugreek seeds extract and its potentiation with nitric oxide modulators in adjuvant induced changes in arthritic index, proinflammatory/anti-inflammatory cytokines imbalance and oxidative stress markers in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 66(1), 45–54. Retrieved from https://doi.org/10.25259/IJPP_11_2022.
- Kaur, B., Kumar, N., Patel, M., Chopra, K., & Saxena, S. (2023). Validation of traditional claims of anti-arthritic efficacy of trans-Himalayan snow mountain garlic (*Allium ampeloprasum* L.) extract using adjuvant-induced arthritis rat model: A comparative evaluation with normal garlic (*Allium sativum* L.) and dexamethasone. *Journal of Ethnopharmacology*, 303, 115939. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2022.115939>.
- Khan, M., Subramanayaan, M., Arora, V., Banerjee, B., & Ahmed, R. (2015). Effect of *Withania somnifera* (Ashwagandha) root extract on amelioration of oxidative stress and autoantibodies production in collagen-induced arthritic rats. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, 12(2), 117–125. Retrieved from <https://doi.org/10.1515/JCIM-2014-0075>.
- Klinkhoff, A., & Teufel, A. (1995). How low can you go? Use of very low dosage of gold in patients with mucocutaneous reactions. *Journal of Rheumatology*, 22(9), 1657–1659. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8523340>.
- Kour, G., Haq, S., Bajaj, B., Gupta, P., & Ahmed, Z. (2021). Phytochemical add-on therapy to DMARDs therapy in rheumatoid arthritis: In vitro and in vivo bases, clinical evidence and

- future trends. *Pharmacological Research*, 169, 105618. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2021.105618>.
- Kumar, N., Naz, S., Quinn, M., Ryan, J., Kumke, T., & Sheeran, T. (2018). Treatment of rheumatoid arthritis with certolizumab pegol: Results from proactive, a non-Interventional study in the UK and Ireland. *Advances in Therapy*, 35(9), 1426–1437. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0758-1>.
- Kunsch C., Sikorski, J., & Sundell C. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Med. Chem. – Immun., Endoc. & Metab. Agents*, 5(3), 249–258. Retrieved from <https://doi.org/10.2174/1568013054022490>.
- Lee, Y. C., Agnew, J., Malspeis, S., Keyes, K., Costenbader, K., Kubzansky, L., Roberts, A., Koenen, K., & Karlson, E. (2016). Post-Traumatic Stress Disorder and Risk for Incident Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care & Research*, 68(3), 292–298. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/acr.22683>.
- Lin, Y., Anzaghe, M., & Schülke, S. (2020). Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis. *Cells 2020, Vol. 9, Page 880*, 9(4), 880. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/CELLS9040880>.
- Liu, C., Chu, D., Kalantar, K., George, J., Young, H., & Liu, G. (2021). Cytokines: from clinical significance to quantification. *Advanced Science*, 8(15), 2004433. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/ADVS.202004433>.
- Medina, S., Collado, J., Ferreres, F., Londoño, J., Jiménez, C., Guy, A., Durand, T., Galano, J., & Gil, Á. (2018). Potential of *Physalis peruviana* L. calyces as a low-cost valuable resource of phytoprostanes and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/jsfa.9413>.
- Morel, J. (2014a). Inmunopatología de la artritis reumatoide. *EMC - Aparato Locomotor*, 47(4), 1–10. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S1286-935X\(14\)69312-6](https://doi.org/10.1016/S1286-935X(14)69312-6).
- Morel, J. (2014). Inmunopatología de la artritis reumatoide. *EMC - Aparato Locomotor*, 47(4), 1–10. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S1286-935X\(14\)69312-6](https://doi.org/10.1016/S1286-935X(14)69312-6).
- Narvaez, J. (2016). Tratamiento de la artritis reumatoide. *Med Clin*, 28, 1–5. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.med.2017.02.011>.
- Nilles, J., Weiss, J., & Theile, D. (2022). Crystal violet staining is a reliable alternative to bicinchoninic acid assay-based normalization. *BioTechniques*, 73(3), 131–135. Retrieved from <https://doi.org/10.2144/BTN-2022-0064/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG>.
- Olivares, E., Hernández, D., Núñez, C., & Cabiedes, J. (2011). Proteínas citrulinadas en artritis reumatoide. *Reumatol Clin*, 7(1), 68–71. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2009.09.010>.

- Oyenihi, B., Ollewagen, T., Myburgh, K., Powrie, Y., & Smith, C. (2019). Redox status and muscle pathology in rheumatoid arthritis: Insights from various rat hindlimb muscles. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, Article ID 2484678, 11 pages Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2019/2484678>.
- Phull, A., Nasir, B., Haq, I., & Kim, S. (2018). Oxidative stress, consequences and EOR mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chemico-Biological Interactions*, 281, 121–136. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.12.024>.
- Rojas A. (2019). Implementación de un modelo de artritis en pequeños roedores de laboratorio para el estudio de sustancias con actividad antiinflamatoria. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76819/21047279.2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Sánchez, D., Hernández, R., Fernández, M., Valdés, R., Martínez, C., León, J., Martínez, S., & Villanueva, G. (2005). Producción de iNOS y nitración de proteínas en la aorta de ratas expuestas a ozono. *Rev Sanid Milit*, 59(4), 223–240. Retrieved from <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDREVISTA=88&IDARTICULO=7220&IDPUBLICACION=831>.
- Silpavathi, L., Das, M., & Das, D. (2021). Anti-arthritic potentials of aqueous and methanolic leaf extracts of *Ardisia solanacea* on complete Freund's adjuvant induced rheumatoid arthritis in rats. *Advances in Traditional Medicine*, 1–9. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/S13596-021-00591-6/METRICS>.
- Siouti, E., & Andreakos, E. (2019). The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. *Biochemical Pharmacology*, 165, 152–169. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2019.03.029>
- Snehalatha, U., Anburajan, M., Venkatraman, B. et al. (2013). Evaluación de la artritis completa inducida por adyuvante de Freund en un modelo de rata Wistar. *Z. Reumatol.* 72 , 375–382 Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00393-012-1083-8>.
- Smolen, J., Aletaha, D., Barton, A., Gerd, B., Emery, P., Gary, F., Kavanaugh, A., McInnes, I., Solomon, D., Strand, V., & Yamamoto, K. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18–20. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.2>.
- Toro, R., Aragón, D., Ospina, L., Ramos, F., & Castellanos, L. (2014). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activity of calyces from *Physalis peruviana*. *Natural Product Communications*, 9(11), 1573–1575. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25532284>.
- Van Delft, M., & Huizinga, T. (2020). An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 110, 102392. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2019.102392>.

- Van den Berg, W., Joosten, L., Kollias, G., & van de Loo, F. (1999). Role of tumour necrosis factor α in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1β in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis*, 58(1), 140–148. Retrieved from <https://doi.org/10.1136/ard.58.2008.i40>.
- Van den Berg, W., Joosten, L., & van de Loo, F. (1999). TNF and IL- 1β are separate targets in chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 17 (18), S105–S114. Retrieved from <https://www.clinexprheumatol.org/article.asp?a=1997>.
- Van Riel, P., Smolen, J., Emery, P., Kalden, J., Dougados, M., Strand, C., & Breedveld, F. (2004). Leflunomide: a manageable safety profile. *Journal of Rheumatology Supplement*, 71, 21–24.
- World Health Organization. (2004). The global burden of disease 2004 (Vol. 1). Retrieved from <https://doi.org/10.1038/npp.2011.85>.
- Xie, X., Li, H., Wang, Y., Wan, Z., Luo, S., Zhao, Z., Liu, J., Wu, X., Li, X., & Li, X. (2019). Therapeutic effects of gentiopicoside on adjuvant-induced arthritis by inhibiting inflammation and oxidative stress in rats. *International Immunopharmacology*, 76, 105840. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2019.105840>.
- Yalamati, P., Bhongir, A., Karra, M., & Beedu, S. (2015). Comparative analysis of urinary total proteins by bicinchoninic acid and pyrogallol red molybdate methods. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(8), BC01-4. Retrieved from <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13543.6313>.
- Yu, R., Song, D., DuBois, D., Almon, R., & Jusko, W. (2020). Modeling combined anti-inflammatory effects of dexamethasone and tofacitinib in arthritic rats HHS public access. *AAPS J*, 21(5), 93. Retrieved from <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0362-6>.
- Zhao, J., Liu, T., Xu, F., You, S., Li, C., & Gu, Z. (2016). Anti-arthritic effects of total flavonoids from *Juniperus sabina* on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *Pharmacognosy Magazine*, 12(47), 178. Retrieved from <https://doi.org/10.4103/0973-1296.186346>.
- Zhao, T., Xie, Z., Xi, Y., Liu, L., Li, Z., & Qin, D. (2022). How to model rheumatoid arthritis in animals: from rodents to non-human primates. *Frontiers in Immunology*, 13, 2487. Retrieved from <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.887460/BIBTEX>.

A. Anexo: Aval ético para el proyecto de tesis



COMITÉ DE ÉTICA FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, mayo 06 de 2019

Estudiante
Stefany Rocío Umaña Bautista
Departamento de Farmacia

Respetada Estudiante:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 06 de mayo de 2019 (Acta 04-2019), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

P1: Proyecto / Investigadores – Grupos – Dependencias / Observaciones.

Proyecto: Evaluación preclínica de la fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. en un modelo murino de artritis reumatoidea.

Responsables. **Stefany Rocío Umaña Bautista** (Tesis Maestría en Ciencias-Farmacología) y Luis Fernando Ospina Giraldo (Director de Tesis, Grupo Principios Bioactivos en Plantas Medicinales, COL0014832).

Observaciones:

Tipo de estudio. Modelo de artritis inducida en ratas por administración de adyuvante completo de Freund y colágeno tipo II.

Los principales **aspectos éticos, legales y ambientales** a tener en cuenta por los investigadores están relacionados con:

1. **Protocolos de bioseguridad.** BPL y sistema institucional de gestión ambiental.
2. **Guías y pautas normativas.** Buen cuidado y uso de animales de laboratorio. Permisos que contemplen colecta de material de la biodiversidad silvestre con fines de investigación científica no comercial.
3. Protección de los desarrollos y cumplimiento de normativas sobre **propiedad intelectual.** Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

Concepto: Proyecto Avalado.


Yazmin Yaneth Agámez Pertuz
Secretaria ad-hoc Comité de Ética



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
Secretaría de Facultad de Ciencias
Sede Bogotá

RESOLUCIÓN N° 077 DEL 10 DE OCTUBRE DE 2018

"Por la cual se actualiza la acreditación y de los miembros que conforman el Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede de Bogotá, para el periodo 2018-2020"

LA SECRETARIA DE FACULTAD

En uso de sus atribuciones legales y

CONSIDERANDO:

1. Que el Consejo de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá, en sesión de julio 31 de 2008 – Acta 24, atendiendo la normatividad vigente, estudió y definió la conformación del Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias, para un periodo institucional de dos (2) años.
2. Que se hace necesaria la modificación de la Resolución No. 055 de 2018 de la Secretaría de la Facultad de Ciencias, con el fin de actualizar la acreditación de los Miembros que conforman el Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, para el periodo 2018-2020, tomando en consideración la solicitud presentada por la Dirección del Departamento de Biología al Consejo de la Facultad, avalada en la sesión No. 24 del 04 de octubre de 2018, debido a la renuncia de la profesora Nubia Estella Matta Camacho, para lo cual, se reemplaza por la profesora Alia Rodríguez Villate.

En mérito de lo anterior

RESUELVE:

ARTÍCULO 1°. CONFORMACIÓN. Actualizar la acreditación de los miembros que conforman el COMITÉ PERMANENTE DE ÉTICA de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá para el periodo 2018-2020, así:

Prof. Alia Rodríguez Villate	Departamento de Biología
Prof. Edilberto Cepeda Cuervo	Departamento de Estadística
Prof. Yuly Edith Sánchez Mendoza	Departamento de Física
Prof. Nivea Cristina Garzón Gómez	Departamento de Geociencias
Prof. Agustín Moreno Cañadas	Departamento de Matemáticas
Prof. Yazmín Yaneth Agámez Pertuz	Departamento de Química
Prof. Clara Inés Orozco Pardo	Instituto de Ciencias Naturales
Prof. Santiago Vargas Domínguez	Observatorio Astronómico Nacional
Prof. Luis Fernando Ospina Giraldo - Coordinador	Departamento de Farmacia

ARTÍCULO 2°. CALIDADES. Los miembros del Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias deberán ser profesores de planta, con trayectoria académica reconocida, con experiencia y/o participación en reflexiones permanentes sobre el tema de la Ética. Podrán participar profesores pensionados de la Universidad.

SECRETARÍA FACULTAD DE CIENCIAS SEDE BOGOTÁ | RESOLUCIÓN N° 077 DE 2018

ARTÍCULO 3. FUNCIONES. Las funciones y calidades de los miembros del Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá, fueron reglamentadas originalmente en la Resolución No. 074 de 2010 del Consejo de la Facultad de Ciencias – Acta 07, así:

1. Formular criterios éticos institucionales, a partir de los principios y de las normas de nivel nacional e internacional.
2. Pronunciarse sobre la viabilidad y los demás aspectos éticos de proyectos de investigación sometidos a consideración, especialmente con seres vivos o materiales procedentes de los mismos, cuando sea consultado por las diferentes instancias de la Facultad de Ciencias de la Sede Bogotá.
3. Asesorar la toma de decisiones relacionadas con aspectos éticos de la investigación.
4. Rendir informes de actividades solicitados por la Dirección de la Facultad de Ciencias.
5. Las demás que señalen la Ley, los Estatutos, los Reglamentos y Disposiciones especiales de los órganos competentes nacionales y de la Universidad Nacional de Colombia.
6. Liderar en la Facultad de Ciencias la reflexión sobre la ética como parte de las buenas prácticas en la investigación.

ARTICULO 4º. REUNIONES. El Comité Permanente de Ética de la Facultad de Ciencias se reunirá periódicamente, por convocatoria del Secretario, nombrado entre los mismos miembros del Comité, o por solicitud formulada y motivada por parte de cualquiera de los miembros del Comité.

PARÁGRAFO 1º. La fecha, hora y sitio de las reuniones serán fijadas por el Secretario del Comité.

PARÁGRAFO 2º. De todas las sesiones quedará constancia escrita en acta numerada que elaborará el Secretario del Comité para ser enviada a la Secretaría de la Facultad de Ciencias.

PARÁGRAFO 3º. Las decisiones del Comité serán de carácter consensual.

ARTÍCULO 5º: VIGENCIA. La presente resolución entrará en vigencia a partir de la fecha de su expedición

COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá, D. C., a los diez (10) días del mes de octubre de dos mil dieciocho (2018)

CÉSAR AUGUSTO GÓMEZ SIERRA
Secretario

María Margarita Pinzón Márquez

B. Anexo: Estudios radiográficos

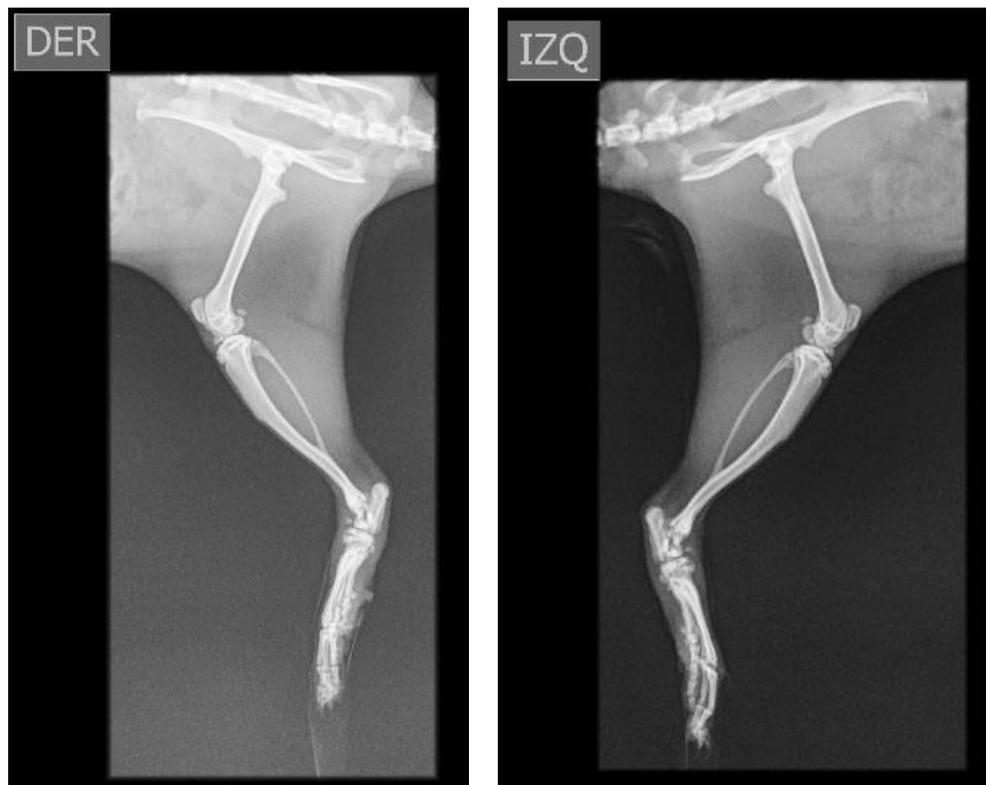
- **Placas radiográficas ratas Wistar hembras artríticas – Grupo Fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. 100 mg/Kg.**

Descripción radiográfica:

Vista medio-lateral miembro posterior izquierdo: Se evidenció *cambios marcados en los márgenes y superficies articulares tibiotalares e intertarsianas con leves quistes subcondrales en toda la superficie articular, marcada osteoesclerosis en todas las superficies, se evidencia una alteración y distanciamiento entre el calcáneo y el tarso y acumulación de líquido, se evidencia una severa alteración de tejidos blandos a nivel de la cápsula articular de todo el tarso con aumento de tamaño, neoformación en tarso proximal en la zona craneal.*

Vista medio-lateral miembro posterior derecho: se evidencia alteración severa de las márgenes y superficies articulares de toda la articulación desde la tibia distal hasta la articulación tarsometatarsiana con una severa osteoesclerosis de todas las superficies articulares, aumento marcado de los tejidos blandos a nivel de la cápsula articular con aumento en la radiopacidad y aumento del tamaño y una marcada neoformación osteofitaria en tarso proximal, craneal y caudal.

Vista dorso plantar: Se evidenció marcada alteración en márgenes y superficies articulares como en la tibia distal, talo e intertarsianos, hay una pérdida de la estructura anatómica del tarso y la articulación tarsometatarsiana, presencia moderada de quistes subcondrales en el miembro posterior derecho y severa en el miembro posterior izquierdo, osteoesclerosis moderada en ambas articulaciones y marcada alteración en tejidos blandos de la cápsula articular con aumento de tamaño, se evidencia en la cara medial de ambas articulaciones osteofitos periarticulares.



- **Placas radiográficas ratas Wistar hembras artríticas – Grupo Fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. 50 mg/Kg.**

Descripción radiográfica:

Vista medio-lateral miembro posterior izquierdo: Se evidencia alteración en los márgenes y superficies articulares, quistes subcondrales múltiples, presencia de osteoesclerosis en toda la superficie articular, se denota alteración marcada del tejido blando al nivel de la cápsula articular, aumento de la radiopacidad y tamaño articular, se evidencia neoformación osteofitaria periarticular craneal.

Vista medio-lateral miembro posterior derecho: Severa alteración de las márgenes y superficies articulares de tibia distal, articulación intertarsiana con presencia de quistes subcondrales múltiples junto con osteoesclerosis de todas las superficies articulares, alteración de tejidos blandos en la cápsula articular con aumento en la radiopacidad y de tamaño, severa formación de osteofitos en las márgenes articulares de toda la superficie.

Vista dorso plantar: Articulación tibiotarsiana con severa alteración de los márgenes y superficies articulares, osteoesclerosis presente en tibia - distal, talar, intertarsiana proximal, intertarsiana distal y

tarsometatarsiana, alteración sobre tejido blandos, aumento de la radiopacidad y de tamaño, múltiples neoformaciones osteofitarias periarticulares.



- **Placas radiográficas ratas Wistar hembras artríticas – Grupo Fracción butanólica de los cálices de *Physalis peruviana* L. 25 mg/Kg.**

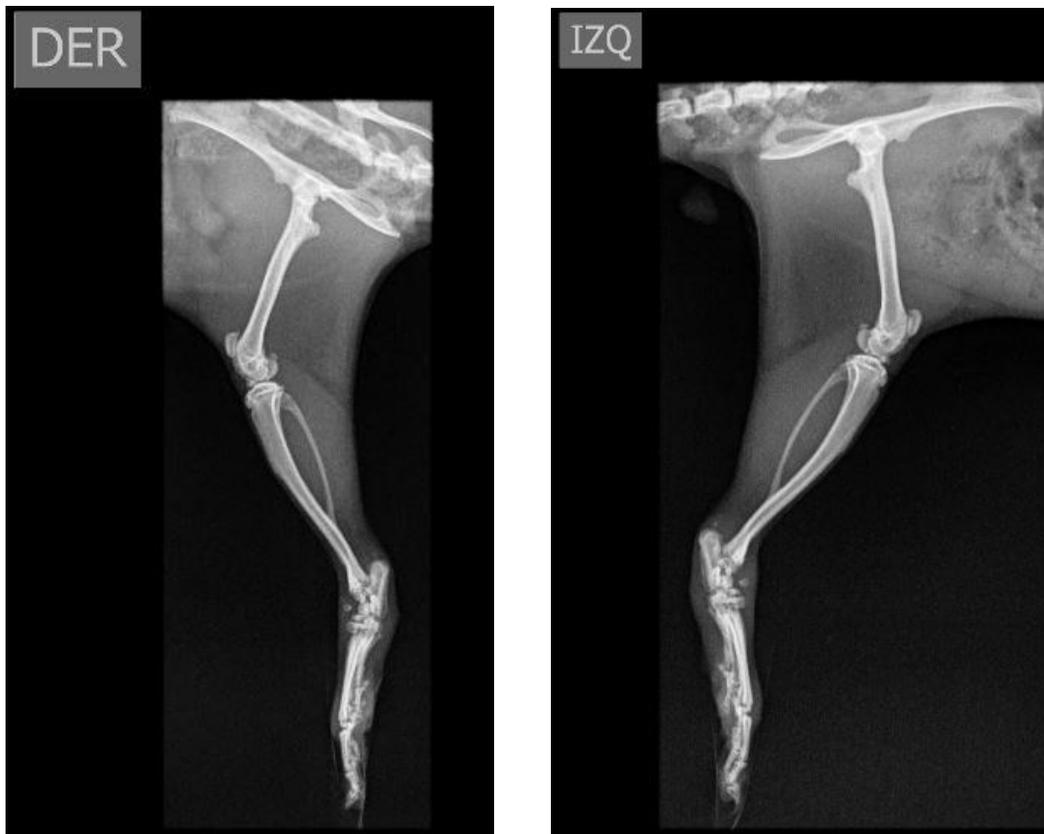
Descripción radiográfica:

Vista medio-lateral miembro posterior izquierdo: Se denotan una modificación importante a nivel de los márgenes articulares de la superficie de: la tibia distal, del talo, de la articulación intertarsiana y tarsometatarsiana, acompañada de quistes subcondrales a nivel de la tibia distal, del talo y sobre la superficie del calcáneo, se observó osteoesclerosis severa en los diferentes huesos a lo largo de toda la superficie articular, los tejidos blandos presentan respuesta inflamatoria, neoformación osteofitaria en la superficie craneal de la articulación intertarsiana.

Vista medio-lateral miembro posterior derecho: A nivel de la articulación tibiotarsiana se evidencia severa alteración de las márgenes y superficies articulares casi que con una pérdida completa de la continuidad de la superficie articular, al perderse por completo se puede decir que se trata de una artrosis. Proceso artrósico crónico de lesión articular. Presencia de quistes subcondrales en distintos puntos de la superficie articular, osteoesclerosis marcada de todas las superficies, hay un aumento

significativo de los tejidos blandos de la articulación intertarsiana y neoformación osteofitaria evidente sobre la superficie craneal.

Vista dorso plantar: Se observó alteración de las márgenes y superficie articulares, se evidencian quistes subcondrales en ambos miembros con osteoesclerosis marcada. Los tejidos blandos presentan aumento de tamaño de la cápsula articular y osteofitos periarticulares.



- **Placas radiográficas ratas Wistar hembras artríticas – ensayos preliminares: Máximo daño 43 días de evolución.**

Descripción radiográfica:

Vista medio-lateral miembro posterior izquierdo: Se observa márgenes y superficies articulares tibiotalares, intertarsiana y metatarsiana moderadamente alteradas, leve formación de quistes subcondrales, con una marcada osteoesclerosis en todas las superficies, moderada alteración de tejidos blandos con aumento de tamaño y presencia de osteofito tarsiano proximal.

Vista medio-lateral miembro posterior derecho: Leve cambio en las márgenes de la superficie articular tibio talar y alteración severa de las superficies y márgenes del tarso proximal intertarsiano y tarsometatarsiano con evidente distanciamiento de los huesecillos posiblemente por el aumento de la presión del líquido sinovial intraarticular, se evidenció moderado aumento de tamaño de la cápsula articular y presencia de pequeño osteofito a nivel del tarso proximal en su cara craneal.

Vista dorso plantar: Se evidenció cambios moderados a leves en los márgenes y superficies articulares tibio talar, con cambios severos a nivel del tarso y del tarsometatarso, distanciamiento de todos los huesecillos junto con pérdida de continuidad, no hay una estructura anatómica que se pueda definir de toda la zona del tarso, presencia de osteoesclerosis en ambas superficies tarsianas, moderada alteración en tejidos blandos y se evidencian pequeños osteofitos en la cara medial del tarso metatarso de ambos miembros.



C. Anexo: Cuantificación de interleucinas

- **Interleucina IL-1 β - Plasma.** Concentración IL-1 β expresada en (pg/mL) // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución n = 20 ratas Wistar hembras // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05) // ND. No determinado.

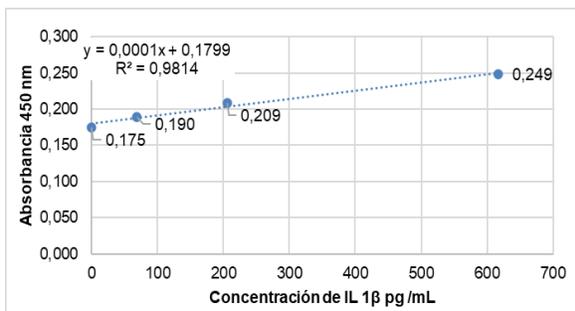
Tratamiento	ID Animal	Absorbancia por duplicado		Absorbancia media	Concentración IL 1 β (pg/mL)	Promedio	Desviación estandar	Coefficiente de variación (%)
Grupo satélite	B61	0,234	0,233	0,234	469	347	130	37
	B63	0,218	0,224	0,221	360			
	B65	0,186	0,222	0,204	211			
Grupo control	C21	0,189	0,224	0,207	233	244	17	7
	C31	0,193	0,221	0,207	237			
	C51	0,199	0,221	0,210	263			
Grupo patrón	C22	0,2	0,231	0,216	312	319	7	2
	C32	0,202	0,231	0,217	320			
	C42	0,2	0,234	0,217	325			
Grupo E100	C13	0,183	0,218	0,201	180	96	75	79
	C33	0,222	0,146	0,184	36			
	C43	0,222	0,154	0,188	71			
Grupo E50	C24	0,222	0,159	0,191	93	74	26	35
	C34	0,2	0,17	0,185	44			
	C44	0,198	0,181	0,190	84			
Grupo E25	C15	0,183	0,181	0,182	18	44	37	84
	C25	0,181	0,195	0,188	71			
	C35	0,146	0,191	0,169	ND			
Grupo de reversión	C01	0,154	0,191	0,173	ND	60	53	88
	C02	0,178	0,187	0,183	22			
	C03	0,195	0,187	0,191	97			

- **Interleucina TNF α - Plasma.** Concentración IL-1 β expresada en (pg/mL) // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución n = 20 ratas Wistar hembras // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05) // ND. No determinado.

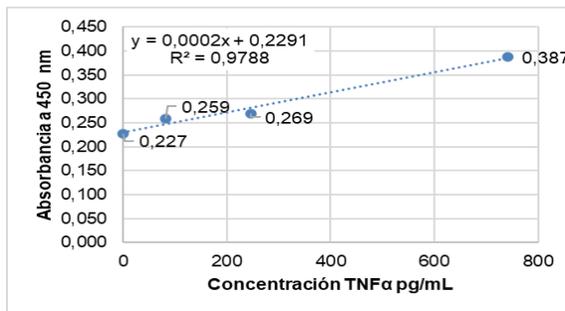
Tratamiento	ID animal	Absorbancia por duplicado		Absorbancia media	Concentración TNF α (pg/mL)	Promedio	Desviación estandar	Coefficiente de variación (%)
Grupo satélite	B61	0,368	0,215	0,292	297,91	214	108	50
	B63	0,296	0,268	0,282	252,56			
	B65	0,223	0,274	0,249	92,62			
Grupo control	C21	0,207	0,262	0,235	25,78	145	151	104
	C31	0,221	0,369	0,295	314,62			
	C51	0,249	0,249**	0,249	95,01			
Grupo patrón	C22	0,218	0,289	0,254	116,49	140	28	20
	C32	0,198	0,332	0,265	171,39			
	C42	0,207	0,306	0,257	130,81			
Grupo E100	C13	0,258	0,274	0,266	176,17	219	61	28
	C33	0,19	0,19**	0,190	ND			
	C43	0,22	0,348	0,284	262,10			
Grupo E50	C24	0,196	0,273	0,235	25,78	ND	ND	ND
	C34	0,209	0,234	0,222	ND			
	C44	0,179	0,259	0,219	ND			
Grupo E25	C15	0,331	0,337	0,334	500,81	308	167	54
	C25	0,255	0,291	0,273	209,59			
	C35	0,263	0,285	0,274	214,36			
Grupo de reversión	C01	0,271	0,289	0,280	243,01	112	118	105
	C02	0,206	0,284	0,245	75,91			
	C03	0,216	0,249	0,233	16,23			

D. Anexo: Curvas de calibración – interpolación de datos ensayos bioquímicos

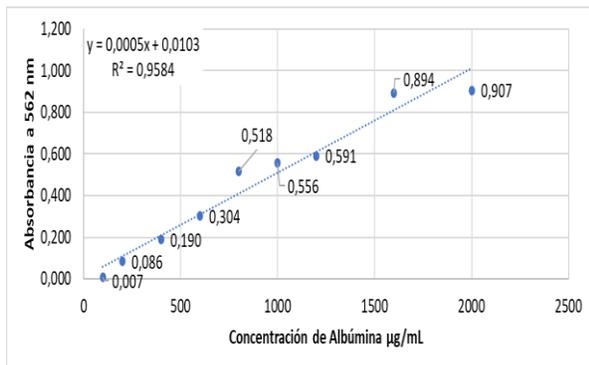
A: Curva de IL1 β – Actividad inmunomodulador



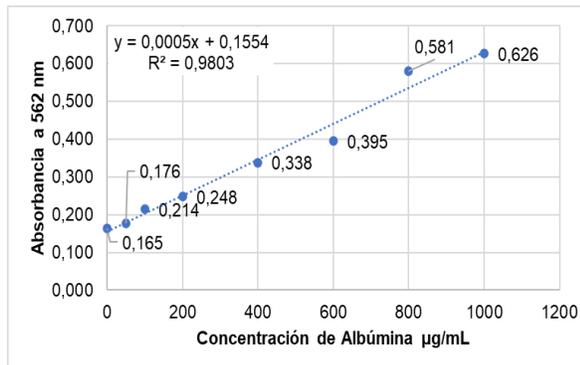
B: Curva de TNF α - Actividad inmunomodulador



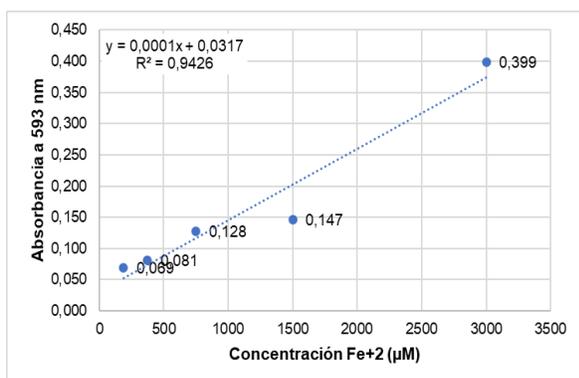
C: Curva de BSA – determinación de proteína para muestras de plasma



D: Curva de BSA – determinación de proteína para muestras de homogenado de patas



E: Curva de FRAP – Determinación de capacidad antioxidante para muestras de plasma



E. Anexo: Datos en prueba de ácido bicinconínico para determinación de proteína en plasma y homogenado

- Ácido bicinconínico - Plasma.** (*) Concentración de proteína ajustada de acuerdo con el factor de dilución 50 // (**) Descarte de datos por criterio Chauvenet // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución n = 20 ratas Wistar hembras // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05).

Tratamiento	ID Animal	Absorbancia por triplicado			Absorbancia media	Concentración Proteína (µg/mL)*50*	Concentración Proteína (mg/mL)	Promedio (mg/mL)	Desviación estandar	Coeficiente de variación (%)
Grupo satélite	B63	0,751	0,812	0,974	0,846	83292,78	83,29	81,15	4	4,67
	B64	0,7	0,79	0,851	0,780	76778,43	76,78			
	B65	0,736	0,851	0,953	0,847	83392,49	83,39			
Grupo control	C11	0,696	0,786	0,962	0,815	80201,79	80,20	96,97	30	31,05
	C21	1,12	1,121	1,183	1,141	112773,51	112,77			
	C31	0,494	0,544	0,561	0,533	52116,99	52,12			
	C41	0,857	1,506	1,4	1,254	124040,66	124,04			
	C51	1,148	0,96	1,405	1,171	115731,55	115,73			
Grupo patrón	C12	0,614	1,187	1,114	0,972	95856,15	95,86	80,35	22	27,29
	C52	0,612	0,924	0,446	0,661	64846,55	64,85			
Grupo E100	C13	0,8	0,968	1,27	1,013	99944,24	99,94	94,53	23	24,02
	C23	0,815	1,095	2,833**	0,955	94194,33	94,19			
	C33	0,525	0,795	0,785	0,702	68934,63	68,93			
	C43	0,664	0,83	0,963	0,819	80633,86	80,63			
	C53	1,099	1,508	2,648**	1,304	128943,04	128,94			
Grupo E50	C14	1,028	1,153	1,418	1,200	118589,89	118,59	112,90	27	24,01
	C24	1,406	1,335	1,475	1,405	139096,78	139,10			
	C34	0,708	0,814	9,999**	0,761	74850,72	74,85			
	C44	0,722	1,161	1,73	1,204	119055,20	119,06			
Grupo E25	C45	0,928	1,706	1,941	1,525	151028,66	151,03	151,03	N/A	N/A
Grupo de reversión	C03	0,905	0,948	1,041	0,965	95158,19	95,16	95,16	N/A	N/A

- Ácido bicinconónico – Homogenado de patas.** (*) Concentración de proteína ajustada de acuerdo al factor de dilución 5 // (**) Descarte de datos por criterio Chauvenet // Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución n = 27 ratas Wistar hembras // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05).

Tratamiento	ID Animal	Lateralidad	Absorbancia por triplicado			Absorbancia media	Concentración Proteína (µg/ml)*	Concentración Proteína (mg/ml)	Concentración Proteína promedio (mg/ml)	Media	Desviación estandar	Coefficiente de variación
Grupo satélite	B61	D	0,543	0,615	0,64	0,599	4662	4,66	4,32	0,69	15,98	
	B62	I	0,494	0,696	0,687	0,626	4939	4,94				
	B63	D	0,511	0,42	0,474	0,468	3287	3,29				
	B64	D	0,725	0,65	0,622	0,666	5359	5,36				
	B64	I	0,51	0,636	0,518	0,555	4193	4,19				
	B65	D	0,469	0,599	0,546	0,538	4018	4,02				
	B65	I	0,506	0,543	0,529	0,526	3892	3,89	3,96			
Grupo control	C11	D	0,519	0,593	0,537	0,550	4141	4,14	4,06	0,28	6,99	
	C11	I	0,466	0,555	0,591	0,537	4011	4,01				
	C21	D	0,514	0,448	0,588	0,517	3794	3,79				
	C31	I	0,512	0,47	0,565	0,516	3784	3,78				
	C41	D	0,539	0,531	0,589	0,553	4176	4,18				
	C41	I	0,451	0,638	0,567	0,552	4165	4,17				
	C51	I	0,464	0,675	0,602	0,580	4463	4,46	4,46			
Grupo patrón	C12	D	0,384	0,76	0,445	0,530	3931	3,93	3,91	0,52	13,40	
		I	0,422	0,627	0,558	0,536	3994	3,99				
	C22	D	0,412	0,589	0,579	0,527	3899	3,90				
	C32	I	0,314	0,65	0,587	0,517	3798	3,80				
	C42	I	0,651	0,641	0,553	0,615	4827	4,83				
	C52	D	0,384	0,429	0,57	0,461	3210	3,21				
	C52	I	0,353	0,511	0,674	0,513	3752	3,75	3,75			
Grupo E100	C13	D	0,347	0,486	0,462	0,432	2901	2,90	3,97	0,82	20,53	
		D	0,357	0,553	0,477	0,462	3224	3,22				
		I	0,488	0,649	0,755	0,631	4991	4,99				
	C33	D	0,612	0,683	0,609	0,635	5033	5,03				
	C43	I	0,543	1,242**	0,594	0,569	4338	4,34				
	C53	D	0,434	0,659	0,503	0,532	3955	3,96				
	C53	I	0,326	0,508	0,494	0,443	3017	3,02	3,49			
Grupo E50	C14	D	0,498	0,496	0,594	0,529	3927	3,93	4,17	0,79	18,93	
		I	0,432	0,638	0,74	0,603	4704	4,70				
	C24	I	0,421	0,455	0,468	0,448	3073	3,07				
	C34	D	0,432	0,474	0,795	0,567	4323	4,32				
	C44	D	0,431	0,662	0,789	0,627	4956	4,96	4,96			
Grupo E25	C15	I	0,427	0,489	0,438	0,451	3108	3,11	3,79	0,53	14,01	
		I	0,476	0,502	0,536	0,505	3668	3,67				
	C35	D	0,558	0,564	0,583	0,568	4337	4,34				
	C45	D	0,512	0,667	0,491	0,557	4214	4,21				
	C45	I	0,45	0,621	0,504	0,525	3882	3,88	4,05			
Grupo de reversion	CO1	D	0,486	0,447	0,602	0,512	3742	3,74	3,88	0,85	22,01	
		I	0,543	0,594	0,698	0,612	4792	4,79				
	CO3	I	0,35	0,49	0,512	0,451	3101	3,10				3,10

F. Anexo: Datos prueba TBARs

- TBARs – Plasma.** Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución // n=27 ratas Wistar hembra // Formación de TBARs expresado (%) // (*) Rechazo de datos criterio Chauvenet // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05).

Tratamiento	ID Animal	Absorbancia por triplicado			Absorbancia promedio	Formación de TBARS (%)	Promedio	Desviación estandar	Coefficiente de variación (%)
Grupo satélite	B61	0,28	0,282	0,29	0,284	100	100	NA	NA
	B62	0,294	0,298	0,292	0,295				
	B63	0,253	0,245	0,249	0,249				
	B64*	0,82	0,602	0,515	0,646				
	B65	0,302	0,343	0,325	0,323				
Grupo control	C11	0,304	0,309	0,298	0,304	106	96	7	7
	C21	0,257	0,269	0,274	0,267	93			
	C31	0,257	0,271	0,265	0,264	92			
	C41	0,251	0,266	0,266	0,261	91			
	C51	0,299	0,292	0,28	0,290	101			
Grupo patrón	C12*	0,57	0,572	0,6	0,581	202*	91	5	6
	C22	0,259	0,256	0,255	0,257	89			
	C32	0,308	0,256	0,25	0,271	94			
	C42	0,239	0,245	0,247	0,244	85			
	C52	0,266	0,275	0,291	0,277	96			
Grupo E100	C13	0,297	0,294	0,281	0,291	101	104	18	17
	C54	0,454	0,458	0,474	0,462	161*			
	C33	0,275	0,3	0,284	0,286	100			
	C43	0,258	0,234	0,25	0,247	86			
	C53	0,366	0,372	0,377	0,372	129			
Grupo E50	C14	0,27	0,277	0,273	0,273	95	95	8	8
	C24	0,236	0,247	0,256	0,246	86			
	C34	0,281	0,279	0,267	0,276	96			
	C44	0,3	0,304	0,306	0,303	105			
Grupo E25	C15	0,272	0,263	0,278	0,271	94	105	16	16
	C25	0,235	0,271	0,251	0,252	88			
	C35	0,343	0,323	0,349	0,338	118			
	C45	0,422	0,314	0,301	0,346	120			
Grupo de reversión	C01	0,282	0,306	0,35	0,313	109	97	10	11
	C02	0,252	0,26	0,25	0,254	88			
	C03	0,289	0,27	0,264	0,274	95			

- TBARs – Homogenado de patas.** Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución // n=27 ratas Wistar hembra // Formación de TBARS expresado (%) // (*) Rechazo de datos criterio Chauvenet // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05).

Tratamiento	ID Animal	Lateralidad patas	Absorbancia por triplicado			Absorbancia promedio	Formación de TBARS (%)	Promedio	Desviación estandar	Coeficiente de variación (%)
Grupo satélite	B61	D	0,255	0,231	0,245	0,244	100	100	NA	NA
	B62	I	0,262	0,288	0,291	0,280				
	B62	D	0,277	0,244	0,244	0,255				
	B63	D	0,221	0,221	0,205	0,216				
	B64	I	0,263	0,294	0,238	0,265				
	B64	D	0,26	0,247	0,271	0,259				
	B65	I	0,222	0,227	0,258	0,236				
	B65	D	0,231	0,228	0,243	0,234				
Grupo control	C11	I	0,27	0,253	0,278	0,267	107	105,11	10,58	10,07
	C11	D	0,284	0,299	0,294	0,292	118			
	C21	D	0,243	0,268	0,261	0,257	104			
	C31	I	0,203	0,195	0,244	0,214	86			
	C41	I	0,272	0,234	0,311	0,272	110			
	C41	D	0,241	0,23	0,259	0,243	98			
	C51	I	0,292	0,293	0,263	0,283	114			
Grupo patrón	C12	I	0,239	0,229	0,224	0,231	93	97,42	2,54	2,61
	C12	D	0,252	0,237	0,23	0,240	96			
	C22	D	0,237	0,251	0,245	0,244	98			
	C32*	I	0,21	0,198	0,227	0,212	85			
	C42	I	0,237	0,257	0,252	0,249	100			
	C52	I	0,249	0,238	0,248	0,245	99			
	C52	D	0,242	0,231	0,261	0,245	98			
Grupo E100	C13	D	0,232	0,255	0,225	0,237	95	99,95	7,27	7,28
	C54	I	0,327	0,313	0,302	0,314	126*			
	C54	D	0,243	0,268	0,231	0,247	99			
	C33	D	0,216	0,232	0,243	0,230	93			
	C43	I	0,249	0,248	0,252	0,250	100			
	C53	D	0,301	0,264	0,268	0,278	112			
Grupo E50	C14	I	0,281	0,267	0,283	0,277	111	106,58	13,81	12,96
	C14	D	0,217	0,227	0,214	0,219	88			
	C24	I	0,24	0,246	0,243	0,243	98			
	C34	D	0,263	0,346	0,315	0,308	124			
	C44	D	0,291	0,258	0,283	0,277	112			
Grupo E25	C15	I	0,219	0,211	0,216	0,215	87*	104,96	3,57	3,40
	C25	I	0,246	0,265	0,267	0,259	104			
	C35	D	0,247	0,246	0,254	0,249	100			
	C45	D	0,269	0,256	0,279	0,268	108			
	C45	I	0,264	0,264	0,274	0,267	108			
Grupo de reversión	CO1	D	0,256	0,247	0,264	0,256	103	105	13,67	13,02
	CO2	I	0,265	0,214	0,211	0,230	93			
	CO3	I	0,283	0,316	0,293	0,297	120			

G. Anexo: Datos método FRAP – Capacidad antioxidante

- FRAP – Plasma.** Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución // n =28 ratas Wistar hembra // Concentración de Fe²⁺ expresada (μM) // (*) Rechazo de datos criterio Chauvenet // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05).

Tratamiento	ID Animal	Absorbancia por triplicado			Absorbancia promedio	Concentración Fe ²⁺ (μM)	Promedio (Concentración Fe ²⁺ (μM))	Desviación estandar	Coefficiente de variación (%)
Grupo satélite	B61	0,436	0,474	0,500	0,470	3833	3259	450	13,82
	B62	0,371	0,383	0,347	0,367	2934			
	B63	0,463	0,434	0,453	0,450	3658			
	B64	0,390	0,334	0,400	0,375	3001			
	B65	0,362	0,339	0,379	0,360	2872			
Grupo control	C11	0,470	0,486	0,480	0,479	3909	4237	439	10,36
	C21	0,450	0,471	0,466	0,462	3764			
	C31	0,518	0,568	0,560	0,549	4522			
	C41	0,505	0,515	0,502	0,507	4161			
	C51	0,555	0,587	0,610	0,584	4830			
Grupo patrón	C12	0,593	0,652	0,652	0,632	5252	3989	1086	27,21
	C22	0,468	0,468	0,481	0,472	3854			
	C32	0,558	0,568	0,582	0,569	4701			
	C42	0,444	0,466	0,469	0,460	3742			
	C52	0,243	0,288	0,386	0,306	2398			
Grupo E100	C13	0,452	0,437	0,436	0,441	3584	3619	504	13,93
	C23	0,460	0,481	0,495	0,478	3907			
	C33	0,523	0,509	0,539	0,524	4305			
	C43	0,409	0,400	0,402	0,404	3253			
	C53	0,360	0,383	0,397	0,380	3046			
Grupo E50	C14	0,363	0,362	0,346	0,357	2845	3351	398	11,89
	C24	0,406	0,411	0,409	0,409	3298			
	C34	0,420	0,428	0,431	0,427	3453			
	C44	0,460	0,453	0,488	0,467	3806			
Grupo E25	C15	0,328	0,372	0,371	0,357	2844	3007	188	6,24
	C25	0,351	0,360	0,372	0,361	2882			
	C35	0,399	0,425	0,388	0,404	3255			
	C45	0,359	0,378	0,403	0,380	3046			
Grupo de reversión	C01	0,428	0,436	0,473	0,446	3620	3600	39,43	1,10
	C02	0,440	0,454	0,445	0,446	3626			
	C03	0,472	0,429	0,414	0,438	3555			

- FRAP – Homogenado de patas.** Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución // n =28 ratas Wistar hembra // Concentración de Fe²⁺ expresada (µM) // (*) Rechazo de datos criterio Chauvenet // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05).

Tratamiento	ID Animal	Lateralidad patas	Absorbancia por triplicado			Absorbancia promedio	Concentración Fe ²⁺ (µM)	Promedio (Concentración Fe ²⁺ (µM))	Desviación estandar	Coeficiente de variación (%)
Grupo satélite	B61	D	0,272	0,277	0,284	0,278	2152	2296	373	11,46
	B62	I	0,486	0,503	0,497	0,495	4052*			
		D	0,816	0,850	0,861	0,842	7089*			
	B63	D	0,347	0,359	0,352	0,353	2807			
		I	0,338	0,323	0,342	0,334	2648			
	B64	D	0,281	0,313	0,301	0,298	2332			
		I	0,236	0,235	0,263	0,244	1861			
B65	D	0,257	0,259	0,258	0,258	1979				
	I	0,210	0,231	0,234	0,267	2058				
Grupo control	C11	D	0,250	0,246	0,254	0,292	2280	2008	230	11,46
		I	0,186	0,207	0,189	0,257	1973			
	C21	I	0,250	0,268	0,317	0,214	1594			
	C41	I	0,248	0,239	0,268	0,272	2105			
		D	0,222	0,219	0,222	0,243	1851			
	C51	I	0,192	0,188	0,211	0,283	2195			
		D	0,557	0,564	0,547	0,231	1740			
Grupo patrón	C12	D	0,410	0,368	0,404	0,240	1819	1803	113	6,26
		I	0,212	0,225	0,217	0,212	1574			
	C22	D	0,269	0,294	0,287	0,244	1860			
	C32	I	0,184	0,198	0,203	0,249	1898			
		D	0,337	0,345	0,338	0,245	1866			
	C52	D	0,233	0,229	0,215	0,245	1863			
Grupo E100	C13	D	0,207	0,209	0,220	0,237	1798	1991	273	14,72
		I	0,209	0,213	0,220	0,314	2469			
	C54	D	0,318	0,321	0,320	0,247	1886			
		I	0,227	0,225	0,230	0,230	1737			
	C43	I	0,261	0,285	0,290	0,250	1906			
Grupo E50	C53	D	0,225	0,209	0,207	0,278	2151	2040	300	14,72
		I	0,217	0,221	0,219	0,277	2145			
	C14	D	0,319	0,310	0,329	0,219	1641			
		I	0,306	0,324	0,330	0,243	1848			
	C24	D	0,209	0,234	0,209	0,308	2417			
C44	D	0,193	0,211	0,215	0,277	2148				
Grupo E25	C15	I	0,221	0,212	0,221	0,215	1606	1925	191	9,90
		D	0,205	0,488	0,226	0,259	1991			
	C35	D	0,266	0,373	0,397	0,249	1901			
		I	0,205	0,236	0,250	0,268	2067			
	C45	I	0,290	0,305	0,316	0,267	2061			
Grupo de reversión	CO1	D	0,218	0,209	0,208	0,211	1571	1668	98	5,89
		I	0,229	0,229	0,244	0,234	1768			
	CO3	I	0,220	0,224	0,223	0,222	1666			

H. Anexo: Datos prueba de superóxido dismutasa (SOD)

- SOD - Plasma.** Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución // n =28 ratas Wistar hembra //Velocidad // (*) Rechazo de datos criterio Chauvenet // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05).

Tratamiento	ID animal												Velocidad	Promedio	Desviación estandar	Coeficiente de variación (%)
		0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5				
Grupo satélite	B63	0,551	0,544	0,547	0,541	0,548	0,546	0,547	0,545	0,547	0,543	0,551	0,00069	3,90E-04	0,0003	83
	B63	0,551	0,548	0,549	0,547	0,549	0,551	0,551	0,557	0,547	0,553	0,551	0,00096			
	B63	0,551	0,552	0,551	0,554	0,55	0,549	0,554	0,555	0,554	0,551	0,553	0,00035			
	B64	0,565	0,567	0,562	0,562	0,564	0,561	0,566	0,563	0,566	0,566	0,563	0,00017			
	B64	0,584	0,582	0,582	0,58	0,581	0,579	0,581	0,583	0,579	0,585	0,581	0,00018			
	B65	0,515	0,515	0,517	0,515	0,517	0,516	0,518	0,515	0,515	0,517	0,516	0,00006			
	B65	0,491	0,489	0,488	0,486	0,49	0,49	0,49	0,495	0,493	0,493	0,493	0,00147*			
	B65	0,543	0,541	0,54	0,538	0,543	0,54	0,542	0,542	0,543	0,539	0,542	0,00032			
Grupo control	C11	0,457	0,455	0,452	0,454	0,455	0,45	0,453	0,454	0,454	0,457	0,453	0,00021	4,30E-04	0,0004	86
	C21	0,528	0,527	0,524	0,524	0,526	0,523	0,525	0,526	0,527	0,526	0,526	0,00027			
	C21	0,561	0,557	0,556	0,556	0,556	0,555	0,557	0,558	0,556	0,562	0,567	0,00170*			
	C41	0,553	0,549	0,55	0,549	0,547	0,55	0,549	0,548	0,547	0,554	0,549	0,00024			
	C41	0,564	0,556	0,557	0,552	0,557	0,555	0,556	0,557	0,559	0,554	0,555	0,00007			
	C51	0,518	0,52	0,517	0,519	0,519	0,52	0,519	0,521	0,518	0,524	0,523	0,00092			
	C51	0,554	0,557	0,553	0,547	0,555	0,555	0,553	0,558	0,553	0,558	0,557	0,00087			
	C22	0,738	0,731	0,736	0,735	0,737	0,739	0,737	0,737	0,736	0,738	0,736	0,00075			
Grupo patrón	C32	0,6	0,599	0,6	0,604	0,605	0,604	0,602	0,603	0,602	0,602	0,602	0,00028	4,10E-04	0,0003	73
	C32	0,577	0,58	0,574	0,582	0,58	0,583	0,582	0,583	0,579	0,579	0,578	0,00012			
	C42	0,499	0,503	0,503	0,495	0,5	0,501	0,503	0,501	0,504	0,501	0,502	0,00033			
	C42	0,513	0,516	0,513	0,516	0,508	0,515	0,522	0,517	0,515	0,518	0,512	0,00034			
	C52	0,525	0,516	0,523	0,521	0,52	0,523	0,521	0,523	0,523	0,523	0,523	0,00097			
	C52	0,516	0,511	0,503	0,505	0,511	0,511	0,512	0,507	0,508	0,508	0,51	0,00036			
	C13	0,573	0,57	0,574	0,57	0,577	0,576	0,573	0,573	0,574	0,572	0,574	0,00033			
	C23	0,58	0,579	0,585	0,585	0,586	0,586	0,586	0,583	0,587	0,584	0,583	0,00036			
Grupo E100	C33	0,693	0,7	0,7	0,701	0,699	0,706	0,705	0,7	0,703	0,702	0,703	0,00064	3,67E-04	0,0002	57
	C43	0,604	0,604	0,608	0,602	0,606	0,607	0,608	0,611	0,611	0,612	0,609	0,00162*			
	C53	0,539	0,54	0,533	0,542	0,54	0,537	0,541	0,537	0,535	0,539	0,541	0,00013			
	C14	0,488	0,495	0,498	0,498	0,495	0,495	0,502	0,494	0,498	0,496	0,491	0,00033			
	C14	0,642	0,647	0,642	0,648	0,642	0,643	0,648	0,648	0,646	0,65	0,647	0,00084			
	C24	0,557	0,56	0,56	0,564	0,566	0,567	0,568	0,565	0,566	0,563	0,57	0,00144*			
	C34	0,571	0,58	0,58	0,586	0,586	0,588	0,59	0,59	0,59	0,59	0,593	0,00268*			
	C34	0,601	0,593	0,591	0,592	0,588	0,587	0,59	0,592	0,593	0,595	0,597	0,00102			
Grupo E50	C34	0,555	0,555	0,554	0,549	0,548	0,551	0,553	0,548	0,554	0,556	0,552	0,00017	4,41E-04	0,0003	77
	C44	0,535	0,534	0,536	0,54	0,536	0,532	0,54	0,538	0,536	0,537	0,534	0,00001			
	C54	0,505	0,517	0,514	0,512	0,516	0,511	0,514	0,514	0,517	0,517	0,517	0,00052			
	C54	0,534	0,538	0,535	0,538	0,54	0,543	0,54	0,54	0,536	0,539	0,539	0,00029			
	C54	0,515	0,518	0,514	0,516	0,519	0,517	0,511	0,519	0,52	0,52	0,515	0,00035			
	C15	0,487	0,496	0,497	0,496	0,492	0,492	0,493	0,496	0,494	0,497	0,495	0,00065			
	C15	0,556	0,55	0,552	0,551	0,552	0,553	0,553	0,551	0,552	0,553	0,55	0,00011			
	C25	0,478	0,481	0,483	0,483	0,484	0,481	0,478	0,477	0,481	0,482	0,484	0,00018			
Grupo E25	C25	0,491	0,486	0,489	0,488	0,492	0,488	0,489	0,49	0,488	0,489	0,487	0,00005	3,73E-04	0,0004	98
	C45	0,461	0,454	0,451	0,456	0,451	0,458	0,46	0,455	0,452	0,457	0,458	0,00087			
	C01	0,481	0,478	0,478	0,475	0,481	0,483	0,483	0,482	0,483	0,48	0,487	0,00125			
	C02	0,547	0,546	0,546	0,546	0,543	0,54	0,543	0,547	0,545	0,546	0,548	0,00034			
	C02	0,555	0,551	0,554	0,555	0,554	0,556	0,552	0,551	0,556	0,552	0,558	0,00050			
	C02	0,498	0,487	0,491	0,493	0,495	0,496	0,494	0,495	0,498	0,498	0,495	0,00096			
	C03	0,553	0,551	0,554	0,549	0,553	0,549	0,554	0,551	0,548	0,553	0,554	0,00017			
	C03	0,522	0,513	0,51	0,508	0,509	0,508	0,511	0,514	0,513	0,513	0,513	0,00078			

- SOD - Homogenado de patas** Grupo satélite: Sin inducción de daño // Grupo control: Máximo daño con administración de vehículo (1 ml/100g/día/VO) // Grupo patrón: Dexametasona (1mg/Kg/día/VO) // Grupo E100: Fracción butanólica de cálices de *Physalis peruviana* L. (100 mg/Kg/día/VO) // Grupo E50: Fracción butanólica de *Physalis peruviana* L. (50 mg/Kg/día/VO) // Grupo E25: Fracción butanólica de cálices *Physalis peruviana* L. (25 mg/Kg/día/VO) // Grupo de reversión: Máximo daño 43 días de evolución // n =28 ratas Wistar hembra //Velocidad // (*) Rechazo de datos criterio Chauvenet // Test Shapiro-Wilk (normalidad), Test Levene (homocedasticidad), ANOVA – Método de comparación múltiple Tukey (*p < 0.05).

Tratamiento	ID animal	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	Velocidad	Promedio	Desviación estandar	Coefficiente de variación (%)
Grupo satélite	C61	0,329	0,326	0,328	0,323	0,322	0,326	0,329	0,325	0,331	0,325	0,334	0,0007	7,26E-04	0,0009	118
	C62D	0,399	0,397	0,402	0,405	0,404	0,403	0,406	0,404	0,404	0,404	0,408	0,0013			
	C62D	0,382	0,382	0,379	0,379	0,377	0,386	0,379	0,38	0,39	0,383	0,382	0,0007			
	C62D	0,423	0,424	0,428	0,431	0,431	0,432	0,433	0,428	0,432	0,435	0,432	0,0014			
	C63	0,422	0,409	0,405	0,399	0,4	0,4	0,406	0,407	0,406	0,4	0,408	0,0002			
	C64	0,489	0,478	0,482	0,479	0,482	0,478	0,484	0,477	0,484	0,476	0,481	0,0000			
	C65	0,385	0,382	0,382	0,382	0,387	0,385	0,382	0,394	0,386	0,378	0,393	0,0010			
Grupo control	C65	0,38	0,382	0,383	0,378	0,377	0,375	0,376	0,382	0,383	0,382	0,382	0,0003	3,73E-04	0,0005	123
	C11	0,38	0,372	0,37	0,366	0,361	0,375	0,37	0,373	0,366	0,375	0,369	0,0005			
	C11	0,388	0,382	0,377	0,369	0,378	0,378	0,371	0,376	0,386	0,376	0,375	0,0000			
	C31	0,398	0,39	0,392	0,393	0,392	0,391	0,389	0,391	0,394	0,393	0,392	0,0003			
	C41	0,442	0,431	0,435	0,434	0,425	0,437	0,434	0,428	0,433	0,432	0,434	0,0001			
	C41	0,437	0,435	0,437	0,433	0,437	0,435	0,437	0,435	0,436	0,439	0,439	0,0005			
	C41	0,401	0,41	0,402	0,408	0,402	0,407	0,408	0,41	0,41	0,406	0,413	0,0011			
Grupo patrón	C51	0,42	0,415	0,417	0,419	0,413	0,417	0,419	0,423	0,415	0,415	0,42	0,0001	2,57E-04	0,0000	15
	C12	0,418	0,41	0,415	0,413	0,409	0,411	0,415	0,414	0,406	0,415	0,412	0,0000			
	C22	0,408	0,414	0,404	0,403	0,411	0,408	0,404	0,407	0,406	0,41	0,413	0,0003			
	C22	0,409	0,404	0,398	0,401	0,4	0,408	0,4	0,407	0,406	0,405	0,406	0,0005			
	C22	0,419	0,411	0,41	0,416	0,412	0,414	0,42	0,422	0,415	0,412	0,415	0,0003			
Grupo E100	C32	0,389	0,389	0,388	0,39	0,387	0,385	0,394	0,391	0,386	0,389	0,389	0,0001	2,88E-04	0,0002	74
	C52	0,402	0,395	0,406	0,399	0,403	0,402	0,395	0,404	0,403	0,405	0,399	0,0003			
	C13	0,436	0,433	0,431	0,436	0,435	0,433	0,432	0,432	0,433	0,439	0,434	0,0005			
	C33	0,419	0,413	0,411	0,418	0,412	0,413	0,412	0,41	0,412	0,417	0,412	0,0000			
	C33	0,385	0,381	0,383	0,381	0,382	0,386	0,382	0,385	0,386	0,387	0,386	0,0008			
	C43	0,411	0,414	0,412	0,412	0,411	0,413	0,412	0,414	0,416	0,414	0,414	0,0005			
	C43	0,391	0,393	0,383	0,387	0,385	0,387	0,389	0,386	0,387	0,389	0,388	0,0000			
	C53	0,437	0,435	0,44	0,436	0,437	0,437	0,44	0,435	0,44	0,432	0,439	0,0000			
Grupo E50	C53	0,379	0,371	0,369	0,372	0,368	0,369	0,371	0,368	0,365	0,372	0,376	0,0004	9,69E-04	0,0009	90
	C53	0,43	0,434	0,431	0,429	0,431	0,434	0,431	0,43	0,43	0,434	0,434	0,0002			
	C53	0,479	0,475	0,479	0,477	0,475	0,48	0,474	0,481	0,479	0,482	0,474	0,0002			
	C14	0,421	0,415	0,411	0,412	0,407	0,408	0,406	0,414	0,408	0,412	0,415	0,0001			
	C14	0,388	0,395	0,397	0,394	0,397	0,399	0,396	0,4	0,397	0,398	0,403	0,0012			
	C14	0,361	0,358	0,367	0,366	0,359	0,364	0,365	0,368	0,365	0,361	0,368	0,0009			
	C14	0,392	0,393	0,4	0,397	0,401	0,402	0,397	0,401	0,401	0,4	0,402	0,0012			
	C14	0,381	0,374	0,372	0,374	0,369	0,373	0,377	0,38	0,383	0,384	0,386	0,0021			
	C24	0,346	0,349	0,349	0,346	0,349	0,351	0,349	0,348	0,348	0,35	0,351	0,0004			
	C34	0,373	0,373	0,382	0,382	0,378	0,38	0,383	0,385	0,376	0,384	0,385	0,0014			
	C34	0,36	0,36	0,362	0,362	0,358	0,365	0,363	0,363	0,366	0,377	0,363	0,0019			
	C44	0,377	0,379	0,381	0,377	0,38	0,378	0,376	0,377	0,376	0,382	0,384	0,0004			
	C54	0,387	0,384	0,387	0,389	0,383	0,384	0,389	0,39	0,391	0,383	0,391	0,0009			
C54	0,354	0,356	0,354	0,353	0,35	0,355	0,355	0,358	0,353	0,354	0,354	0,0001				
C54	0,322	0,318	0,318	0,318	0,319	0,322	0,322	0,325	0,324	0,323	0,324	0,0012				
Grupo E25	C15	0,396	0,4	0,393	0,399	0,395	0,398	0,395	0,4	0,394	0,4	0,396	0,0000	1,07E-03	0,0004	40
	C15	0,441	0,428	0,427	0,421	0,419	0,437	0,447	0,441	0,444	0,446	0,443	0,0037			
	C15	0,427	0,426	0,426	0,431	0,426	0,428	0,427	0,428	0,43	0,427	0,431	0,0006			
	C25	0,399	0,397	0,395	0,394	0,393	0,39	0,394	0,398	0,394	0,394	0,399	0,0004			
Grupo de reversión	C45	0,385	0,375	0,381	0,377	0,377	0,377	0,381	0,38	0,38	0,379	0,38	0,0007	2,12E-03	0,0004885	23
	CO1	0,394	0,384	0,387	0,388	0,385	0,383	0,391	0,389	0,401	0,391	0,394	0,0025			
	CO1	0,412	0,395	0,395	0,399	0,39	0,397	0,397	0,397	0,402	0,403	0,401	0,0018			