Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Citoprotección, capacidad anti-apoptótica y anti-inflamatoria del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* sobre células Caco-2: modelo intestinal *in vitro*

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Leonardo Jesús GIRALDO BARDALAMA

ASESOR

Dra. Norma Julia RAMOS CEVALLOS

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

Referencia bibliográfica

Giraldo L. Citoprotección, capacidad anti-apoptótica y anti-inflamatoria del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* sobre células Caco-2: modelo intestinal *in vitro* [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Leonardo Jesús Giraldo Bardalama
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10728715
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9953-0957
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Norma Julia Ramos Cevallos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25469870
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4361-1330
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Américo Jorge Castro Luna
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25455526
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Mariella Ramos Gonzalez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43068125
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09597625
Datos de investigación	

Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos terapéuticos: (Estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos, procesos de industrialización).
Grupo de investigación	Recursos Tecnológicos: "Bosco"
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado: Proyecto con fondo monetario: PCONFIGI/ A20041391/ Resolución 01686-R-20
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las **15:00 hrs. del 31 de agosto de 2023** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Américo Jorge Castro Luna e integrado por los siguientes miembros: Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (asesora), Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa y la Dra. Mariella Ramos Gonzalez; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Citoprotección, capacidad anti-apoptótica y anti-inflamatoria del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* sobre células caco-2: modelo intestinal *in vitro*"**, presentado por el Magíster en Farmacología con mención en Farmacología Experimental **Leonardo Jesús Giraldo Bardalama.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

B - MUY BUENO - Dieciocho (18)

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Farmacología con mención en Farmacología Experimental **Leonardo Jesús Giraldo Bardalama**, el Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 15:00 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 16:15 hrs. del 31 de agosto de 2023

Dr. Américo Jorge Castro Luna (P. P. D.E.)
Presidente

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P.P. T.C.)
Miembro - Asesora

Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa (P. Asoc. T.P.)
Miembro

Dra. Mariella Ramos Gonzalez (P. Aux., T.C.)
Miembro

Observaciones:

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dra. Norma Julia Ramos Cevallos en mi condición de asesor acreditado con la Dictamen N°108-FFB-UPG-2019 de la tesis, cuyo título es: **Citoprotección, capacidad anti-apoptótica y anti-inflamatoria del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* sobre células Caco-2: modelo intestinal *in vitro*,** presentado por el Magíster **Leonardo Jesús Giraldo Bardalama** para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según larevisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documentoevaluado cuenta con el porcentaje de 18% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuarcon los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Firma de la Asesora_____

DNI: 25469870

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos



DEDICATORIA

Esta Tesis está dedicada a mi familia por el apoyo incondicional, a mi querida esposa Martha por ser mi compañera fiel en todos estos años, por darme la paz y tranquilidad que necesitaba y a mis maravillosos hijos Leonardo y Piero quienes me motivan a seguir adelante ante cualquier obstáculo.

AGRADECIMIENTOS

Primero y, antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres por educarme y convertirme en una persona de bien, integra y honesta.

A mi familia, por su apoyo incondicional, permanente aliento que hizo posible la realización de este trabajo; gracias por estar siempre a mi lado.

Mi más amplio agradecimiento a la Dra. Norma Julia Ramos Cevallos, a mi co-asesor el Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez y al Dr. Américo Jorge Castro Luna quienes con sus conocimientos, tiempo, paciencia e interés hicieron posible la realización de mi tesis y me brindaron todas las facilidades del laboratorio para ejecutar el trabajo de investigación.

Por último, agradecer a las personas compartieron su tiempo, familia, amigos, compañeros de estudio y trabajo, los mejores momentos de esta gran etapa de mi vida.
¡GRACIAS!

Índice

DEDICATORIA ii
AGRADECIMIENTOS iii
ABREVIATURAS v
RESUMEN vi
ABSTRACT vii
RESUMO viii
Índice de figuras ix
Índice de tablas x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 1
1.1. Objetivos 2
1.1.1. Objetivo general 2
1.1.2. Objetivos específicos 2
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO 3
2.1. Antecedentes 3
2.2. Aspectos teóricos 4
2.2.1. *Brunfelsia grandiflora* D. Don (Chiric Sanango) 4
2.2.2. Líneas Celulares 5
2.2.3. Actividad citotóxica 8
2.2.4. Muerte Celular 10
2.2.5. Apoptosis 10
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA 13
3.1 Tipo de investigación 13
3.2 Consideraciones éticas. 13
3.3 Diseño metodológico 13
CAPÍTULO IV. RESULTADOS 17
4.1 Análisis fitoquímico. 17
4.2 Ensayo de viabilidad celular por MTT 17
4.3 Evaluación de estrés oxidativo 20
4.4 Expresión de genes relacionados a inflamación (NFκB1, TNFα, IL1B, IL6) y muerte celular (APAF1, BAX y CASP-3) 24
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN 32
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES 38
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 39
CAPÍTULO VIII. ANEXOS 49

ABREVIATURAS

EABG: Extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Caco-2: Línea celular de adenocarinoma de colón humano

t-BOOH: terc-Butilhidroperóxido

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

ROS: Especies reactivas de oxígeno

DCFH-DA: diacetato de 2',7'-diclorofluorescina

DCFH: 2,7-diclorofluoresceína

DAF-FM-DA: Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2,7-difluorofluoresceína

ON: Oxido nítrico

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

APAF1: Factor activador de proteasa apoptótica 1

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2

Casp3: Caspasa 3

IL1β: Interleucina-1 beta

NFκB: Factor nuclear kappa B

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa

IL6: Interleucina 6

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

RESUMEN

Objetivo: El presente trabajo evaluó la capacidad citoprotectora, anti-inflamatoria y anti-apoptótica del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* (EABG) en células intestinales Caco-2. **Metodología**: Se recolectó la corteza de *Brunfelsia grandiflora* "Chiric sanango" en la comunidad nativa de Canaán de Cachiyacú ubicado en el distrito de Contamana, provincia de Ucayali, Departamento de Loreto en Perú. Se realizó la marcha fitoquímica. Se evaluó el efecto de EABG a diferentes concentraciones (10-1000 µg/mL) solo y en co-tratamiento simultaneo con t-BOOH sobre la viabilidad celular a través del ensayo MTT (con sales de tetrazolio), sobre la producción de ROS y óxido nítrico (ON) intracelular y sobre la expresión de genes relacionados a inflamación (NFκB1, TNFα, IL1β y IL6) y muerte celular (APAF1, BAX y CASP-3). **Resultado:** La marcha fitoquímica del EABG encontró una moderada cantidad de polifenoles, alcaloides, lactonas insaturadas, saponinas y antraquinonas. En la viabilidad celular del EABG en las concentraciones evaluadas (10-1000 µg/mL) no provocó ninguna lesión celular. Por otro lado, el EABG aumento la viabilidad celular en los co-tratados con t-BOOH, siendo este incremento dependientes de la concentración (19%; 29%; 25% y 42% a diversas concentraciones 100, 250, 500 y 1000 µg/mL respectivamente); para el estrés oxidativo el EABG proporcionó una disminución significativa de los niveles de ROS (25%, 30 %, 36 %, 39%, 50% y 54% a diversas concentraciones 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL respectivamente) y una reducción significativa en la producción de ON intracelular (25%, 34 %, 34 %, 42% y 45% a diversas concentraciones 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL respectivamente) frente a la agresión celular provocada por t-BOOH. Los efectos del co-tratamiento del EABG y t-BOOH sobre la expresión de genes relacionados a la inflamación (NFκB1, TNFα, IL1β y IL6) y apoptosis (APAF1, BAX y CASP-3) mostraron una reducción dependiente de la concentración (50, 100 y 200 µg/mL). **Conclusión**: El EABG tiene capacidad citoprotectora, anti-inflamatorio y anti-apoptótico frente al daño producido por t-BOOH en células intestinales Caco-2.

Palabras clave: Caco-2, anti-inflamatorio, estrés oxidativo, anti-apoptótico, *Brunfelsia grandiflora.*

ABSTRACT

Objective: The present work evaluated the cytoprotective, anti-inflammatory and anti-apoptotic capacity of aqueous extract of *Brunfelsia grandiflora* (EABG) in Caco-2 intestinal cells. **Methodology:** The bark of *Brunfelsia grandiflora* "Chiric sanango" was collected in the native community of Canaán de Cachiyacú located in the district of Contamana, province of Ucayali, Department of Loreto in Peru. The phytochemical march was carried out. The effect of EABG at different concentrations (10-1000 µg/mL) alone and in simultaneous co-treatment with t-BOOH on cell viability through the MTT assay (with tetrazolium salts), on the production of ROS and intracellular nitric oxide (NO) and on the expression of genes related to inflammation (NFκB1, TNFα, IL1β and IL6) and cell death (APAF1, BAX and CASP-3) was evaluated. **Result:** The phytochemical march of EABG found a moderate number of polyphenols, alkaloids, unsaturated lactones, saponins and anthraquinones. In cell viability EABG at the concentrations evaluated (10-1000 µg/mL) did not cause any cell injury. On the other hand, EABG increased cell viability in those co-treated with t-BOOH, being this increase concentration-dependent (19%; 29%; 25% and 42% at various concentrations 100, 250, 500 and 1000 µg/mL respectively); for oxidative stress EABG provided a significant decrease in ROS levels (25%; 30%; 36%; 39%; 50% and 54% at various concentrations 10, 50, 100, 250, 500 and 1000 µg/mL respectively) and a significant reduction in intracellular ON production (25%; 34%; 34%; 42% and 45% at various concentrations 50, 100, 250, 500 and 1000 µg/mL respectively) against cellular aggression elicited by t-BOOH. The effects of co-treatment of EABG and t-BOOH on the expression of genes related to inflammation (NFκB1, TNFα, IL1β and IL6) and apoptosis (APAF1, BAX and CASP-3) showed a concentration-dependent reduction (50, 100 and 200 µg/mL). Conclusion: EABG has cytoprotective, anti-inflammatory and anti-apoptotic capacity against t-BOOH damage in Caco-2 intestinal cells.

Key words: Caco-2, anti-inflammatory, oxidative stress, anti-apoptotic, *Brunfelsia grandiflora*.

RESUMO

Objetivo: O presente trabalho avaliou a capacidade citoprotetora, anti-inflamatória e antiapoptótica do extrato aquoso de *Brunfelsia grandiflora* (EABG) em células intestinais Caco-2. **Metodologia:** A casca da *Brunfelsia grandiflora* "Chiric sanango" foi coletada na comunidade nativa de Canaán de Cachiyacú, localizada no distrito de Contamana, província de Ucayali, Departamento de Loreto, no Peru. Foi realizada a marcha fitoquímica. Foi avaliado o efeito do EABG em diferentes concentrações (10-1000 µg/mL) sozinho e em co-tratamento simultâneo com t-BOOH na viabilidade celular por meio do ensaio MTT (com sais de tetrazólio), na produção de ROS e óxido nítrico intracelular (NO) e na expressão de genes relacionados à inflamação (NFκB1, TNFα, IL1β e IL6) e morte celular (APAF1, BAX e CASP-3). **Resultado:** A triagem fitoquímica do EABG encontrou uma quantidade moderada de polifenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, saponinas e antraquinonas. A viabilidade celular do EABG nas concentrações testadas (10-1000 µg/mL) não causou nenhuma lesão celular. Por outro lado, o EABG aumentou a viabilidade celular naquelas co-tratadas com t-BOOH, sendo esse aumento dependente da concentração (19%; 29%; 25% e 42% em várias concentrações 100, 250, 500 e 1000 µg/mL, respectivamente); para o estresse oxidativo, o EABG proporcionou uma diminuição significativa nos níveis de ROS (25%, 30%, 36%, 39%, 50% e 54% em várias concentrações 10, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL, respectivamente) e uma redução significativa na produção intracelular de ON (25%, 34%, 34%, 42% e 45% em várias concentrações 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL, respectivamente) contra o insulto celular por t-BOOH. Os efeitos do co-tratamento de EABG e t-BOOH na expressão de genes relacionados à inflamação (NFκB1, TNFα, IL1β e IL6) e apoptose (APAF1, BAX e CASP-3) mostraram uma redução dependente da concentração (50, 100 e 200 µg/mL). **Conclusão:** O EABG tem capacidade citoprotetora, anti-inflamatória e antiapoptótica contra os danos causados pelo t-BOOH nas células intestinais Caco-2.

Palavras-chave: Caco-2, anti-inflamatório, estresse oxidativo, antiapoptótico, *Brunfelsia grandiflora.*

Índice de figuras

Figura 1: Microfotografías de células CaCo-2 en cultivo. 7
Figura 2: Reducción de MTT en células vivas por reductasa mitocondrial 10
Figura 3: Esquema simplificado de las vías apoptóticas del receptor de muerte y mitocondrial 11
Figura 4: Viabilidad celular del extracto de *Brunfelsia grandiflora* 18
Figura 5: Citotoxicidad inducida por t-BOOH sobre las células Caco-2 después de un periodo de incubación de 24 h.. 19
Figura 6: Producción de ROS en células Caco-2 inducidas por t-BOOH después de un período de incubación de 24 h.. 21
Figura 7: Producción de ON intracelular (ONi) en células Caco-2 inducidas por t-BOOH después de un período de incubación de 24 h. 23
Figura 8: Expresión génica del NFκB1 por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora.* 25
Figura 9: Expresión génica del TNFα por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora*. 26
Figura 10: Expresión génica de IL1β por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora*. 27
Figura 11: Expresión génica del IL6 por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora.*. 28
Figura 12: Expresión génica del APAF1 por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora.* 29
Figura 13: Expresión génica del BAX por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora*.. 30
Figura 14: Expresión génica del CASP-3 por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora.* 31

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de *Brunfelsia grandiflora* D. Don..... 5
Tabla 2. Secuencias de cebadores directos e inversos para apoptosis e inflamación.. .. 16
Tabla 3. Análisis fitoquímico de *Brunfelsia grandiflora*..... 17
Tabla 4: Porcentaje de viabilidad celular en células control, tratadas con y sin t-BOOH con diferentes concentraciones del extracto acuoso de Brunfelsia grandiflora. 19
Tabla 5: Aumento de la viabilidad celular en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (100, 250, 500 y 1000 μg/mL) del extracto acuoso de Brunfelsia grandiflora. 20
Tabla 6: Porcentaje de Producción de ROS en células Control, tratadas con y sin t-BOOH y con diferentes concentraciones del extracto acuoso de Brunfelsia grandiflora. 21
Tabla 7: Reducción de la producción de ROS en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (10, 50, 100, 250, 500 y 1000 μg/mL) del extracto acuoso de Brunfelsia grandiflora. 22
Tabla 8: Porcentaje de Niveles de ON del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones con t-BOOH 23
Tabla 9: Reducción de la producción de ON en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100, 250, 500 y 1000 μg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*. 24
Tabla 10: Reducción de la expresión del gen NFκB1 en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*. 25
Tabla 11: Reducción de la expresión del gen TNFα en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*. 26
Tabla 12: Reducción de la expresión del gen IL1β en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora.* 27
Tabla 13: Reducción de la expresión del gen IL6 en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora.* 28

Tabla 14: Reducción de la expresión del gen APAF1 en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*. 30
Tabla 15: Reducción de la expresión del gen BAX en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*. 31
Tabla 16: Reducción de la expresión del gen CASP-3 en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora.* 31

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La curación con el empleo de plantas medicinales se realiza desde la antigüedad, esta conexión entre la búsqueda de drogas en la naturaleza por el hombre la cual data del pasado; de donde, existe una amplia evidencia de múltiples fuentes como: monumentos preservados, documentos escritos e incluso plantas medicinales originales. La utilización de plantas medicinales viene a ser, el resultado de muchos años de lucha contra diversas enfermedades y esto es, debido a que el ser humano aprendió a buscar drogas en diversas partes de la planta como: la corteza, semillas, frutos y otras. La ciencia actual ha reconocido su actividad, y ha incluido en la farmacoterapia moderna una variedad de medicamentos de origen vegetal, conocidos por antiguas civilizaciones y empleados a lo largo de milenios. El incremento del conocimiento de ideas relacionadas con el uso de plantas medicinales ha transformado la conciencia, aumentando la capacidad de los médicos y farmacéuticos en responder a los desafíos que surgen con esta difusión que facilitan la vida de las personas [1–3].

El sistema médico tradicional puede indicar seguridad, pero no la eficacia de los tratamientos, especialmente en medicina herbal donde la tradición se basa casi por completo en remedios que contienen principios activos en concentraciones muy bajas y ultra bajas, o que dependen de la magia. En la era de la globalización, evaluar la "transferibilidad" de los tratamientos entre diferentes culturas no es un objetivo relevante para la investigación clínica, mientras que la evaluación de eficacia y seguridad debe basarse en los patrones regulares de la corriente principal. Los remedios derivados de hierbas necesitan una evaluación poderosa y profunda de sus cualidades farmacológicas y seguridad, que en realidad se puede realizar mediante nuevas tecnologías biológicas como la metodología farmacogenómica, metabolómica y de microarrays. Debido al amplio y creciente uso de sustancias derivadas de la naturaleza en todo el mundo, no es prudente confiar también en la tradición o supuestas creencias milenarias; los estudios explicativos y pragmáticos son útiles y deben considerarse complementarios en la adquisición de datos confiables [4].

A pesar de las impresionantes propiedades medicinales de *Brunfelsia grandiflora* (chiric sanango) [5,6], no se ha encontrado estudios que puedan demostrar la seguridad del consumo del extracto de esta planta, tampoco estudios que confirmen su acción citoprotectora, anti-inflamatoria y anti-apoptótica a nivel bioquímico, celular y molecular.

Por este motivo, nuestro estudio inicia el intento de evidenciar que la administración del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* (corteza) no causa toxicidad y que sus propiedades medicinales reportadas en la medicina tradicional impliquen un beneficio en su uso. En este estudio utilizaremos diversas técnicas (espectrofotometría, espectrofluorimetría, lumniscencia y ensayo de qPCR [7,8] para intentar demostrar su potencial citoprotector en células intestinales Caco-2, como parte de un modelo intestinal *in vitro* en humanos.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad citoprotectora, anti-inflamatoria y anti-apoptótica del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en células intestinales Caco-2.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar los metabolitos secundarios del extracto acuoso de la corteza de *Brunfelsia grandiflora*.
- Determinar la actividad citotóxica inducida por el extracto de *Brunfelsia grandiflora* a través de ensayos de viabilidad celular (MTT) en células intestinales Caco-2.
- Determinar la capacidad citoprotectora del extracto de *Brunfelsia grandiflora* frente a la injuria ocasionada por t-BOOH, a través de ensayos de viabilidad celular (MTT) y estrés oxidativo (producción de ROS y ON) en células intestinales Caco-2.
- Determinar la capacidad anti-inflamatoria mediante la expresión de genes relacionados a inflamación en células intestinales Caco-2.
- Determinar la capacidad anti-apoptótica mediante la expresión de genes relacionados a apoptosis en células intestinales Caco-2.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Brunfelsia grandiflora es conocida tradicionalmente como "Chiric sanango", se cultiva extensamente en América del Sur como una planta ornamental, y también se usa en medicina tradicional. Su raíz se usa contra el reumatismo y la sífilis, y también tiene actividad febrífuga. En la Amazonía peruana la hoja de esta planta se bebe como terapia contra la artritis y el reumatismo y también puede ser usada para la preparación de bebidas alucinógenas como en el "ayahuasca" [9,10]. La caracterización química de *Brunfelsia grandiflora* aún se sigue investigando, pero ya se ha podido determinar la presencia de compuestos en raíces, tallos, hojas y corteza; encontrándose en la raíz, compuestos como escopoletina, cumarinas, brunfelsamidina, manacina, manaceína, escopolamina y cuscohigrina [11–13].

Kloucek *et al* estudiaron el extracto de nueve plantas dentro de las cuales se encontraba la *Brunfelsia grandiflora*, las cuales se utilizaban tradicionalmente en el distrito de Calleria ubicado en la Provincia de Coronel Portillo en el departamento de Ucayali; para el tratamiento de las afecciones que probablemente estén asociados con microorganismo, evaluando la actividad antimicrobiana contra nueve cepas bacterianas encontrando que todas las plantas probadas poseían actividad antibacteriana contra al menos cuatro cepas bacterianas (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*) a concentraciones de 16 mg/mL[14].

Fuchino *et al* aislaron una nueva saponina tipo furostan a partir del extracto metanólico de hojas de *Brunfelsia grandiflora*, junto con cuatro compuestos conocidos. La estructura química de la saponina tipo furostan fue determinada mediante análisis espectroscópico y reacción química; el compuesto saponina tipo furostan mostró una fuerte actividad leishmanicida *in vitro* frente a *Leishmania major* [15].

Ramos N. determino la actividad cicatrizante *in vivo* y antioxidante *in vitro*, la cual se determinó en pomadas a diferentes concentraciones; encontrando una cicatrización eficaz de 59,4 % con la pomada al 3 % del extracto, además se obtuvo una buena evolución histológica en el curso de la cicatrización, concluyendo que este desempeño era debido a los componentes químicos de naturaleza alcaloide indólica del extracto metanólico [16].

Kvist *et al* recolectaron material vegetal de varias plantas del departamento de Loreto n Perú, dentro de las cuales recolectaron *Brunfelsia grandiflora* para determinar la inhibición in vitro de los parásitos *Plasmodium* y *Leishmania* encontrando que presenta una actividad baja frente ambos parásitos [17].

Rojas M. determino la actividad de captación de radicales libres mediante el método de DDPH y ABTS del extracto de hojas de *Brunfelsia grandiflora* así como la correlación en el contenido para poli fenoles totales y la actividad inhibidora del radical DPPH y ABT encontrando que el extracto de hojas estudiada presentó actividad antioxidante, el cual estuvo asociado a su contenido de fenoles totales [18].

2.2. Aspectos teóricos

2.2.1. *Brunfelsia grandiflora* D. Don (Chiric Sanango)

Descripción Botánica

Planta que crece hasta cinco metros de altura, glabra. Con hojas alternas, apicalmente frondosas o dispersas en las ramas en floración, de 15 a 20 centímetros de largo y de cinco a ocho cm de ancho. Inflorescencia cimosa, flores pediceladas de 3,5 a 4 centímetros de longitud, de color morado y blanco con corola tubular, campanulada y con cinco grandes lóbulos, cáliz corto de 15 a 20 milímetros de longitud, anteras libres del estigma, pequeñas, obtusas, apendiculares en la base, ovario superior bicarpelar. Fruto en baya ovado-redondeado[19].

Clasificación taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Brunfelsia grandiflora* D. Don (Chiric Sanango)

Tabla 1. Taxonomía de *Brunfelsia grandiflora* D. Don

Taxonomía de *Brunfelsia grandiflora* D. Don	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Genero	Brunfelsia
Especie	*Brunfelsia grandiflora* D. Don

Fuente: Abadie y Medina 2014 [20]

Distribución Geográfica-Ecológica

Esta planta cuya especie *Brunfelsia grandiflora* D. Don, conocida como "Chiric sanango", es una planta nativa de la selva amazónica del Perú, se desarrolla en Sudamérica desde Venezuela hasta Bolivia. En nuestro país lo encontramos en la selva amazónica cuya altitud es 200 metros en los departamentos de San Martín ,Loreto y Cuzco, comprendiendo la Amazonía baja y alta [6].

Etnofarmacologia

Brunfelsia grandiflora D. Don es empleada para aliviar el dolor, hinchazón, rigidez y calor local en las articulaciones; contra las infecciones de transmisión sexual, producidos por bacterias, tales como la sífilis; mejora los síntomas del resfrío como: dolor de cuerpo, dolor de cabeza, cansancio y estornudos, también es empleado como alucinógeno, para la leishmaniasis, contra la malaria y la mordedura de serpiente, en quemaduras de tercer grado por su efecto cicatrizante en lesiones de la piel[19,21].

2.2.2. Líneas Celulares

Vienen a ser células de origen animal o humano que bien en cultivo, las cuales se han adaptado, poseen una capacidad de proliferación ilimitada, debido a que han experimentado un proceso de transformación, el cual puede ser espontáneamente o

inducido mediante compuestos químicos, radiaciones o virus; que lleva en si la alteración de las características de crecimiento [22] .

La difusión de líneas celulares necesita que la cantidad de células aumente constantemente, donde las condiciones de cultivo han sido escogidas para ayudar a la proliferación celular. Estas condiciones vienen a ser: disminución de la concentración de Ca^{2+}, disminución de la densidad celular y la presencia de factores de desarrollo. Las exigencias generales de un cultivo de línea celulares vienen a ser: condiciones de pH, medio de cultivo nutritivo, temperatura y ambiente controlado.

El medio nutritivo esencialmente debe ser un medio líquido, que contenga una fuente de carbono, aminoácidos esenciales, oligoelementos, un sistema regulador de pH, iones y factores de crecimientos aportados por el suero fetal bovino (FBS) con el que generalmente se complementa el medio. Adicionalmente los medios de cultivo celular contienen un indicador de pH (rojo de fenol), para permitir un monitoreo constante [22].

Línea Celular Caco-2

En la década de los 70 se establecieron varias líneas de células epiteliales a partir de tumores gastrointestinales. La finalidad fue estudiar los mecanismos en el crecimiento del cáncer y los efectos de la citoterapia. En parte debido a la heterogeneidad de las células epiteliales intestinales primarias tanto en morfología como en función, es decir, enterocitos del intestino delgado, células caliciformes, células enteroendocrinas, células de Paneth y células M, existía la necesidad de diferenciar las células tumorales en tipos de células más especializadas. Múltiples líneas celulares podrían diferenciarse parcialmente mediante la adición al medio de factores sintéticos o biológicos. Sin embargo, uno de ellos, Caco-2, fue único, ya que fue capaz de diferenciarse espontáneamente al llegar a la confluencia. Caco-2 (Cáncer coli-2) fue establecido a partir de un adenocarcinoma colorrectal humano por Jorgen Fogh en el Instituto de Investigación de Cáncer Sloan-Kettering [23].

Esta línea tumoral fue aislada originalmente a partir de un adenocarcinoma de colon de un hombre con 72 años, logrando establecerse en 1974. Su capacidad tumorgénica fue probada en una especie de ratón (nude mice) formándose adenocarcinomas moderadamente diferenciados, en el colon primario (grado II). Cuando llegan a la unión, estas células tienen como característica una diferenciación espontánea que involucra características morfológicas y funcionales propias de los enterocitos en condiciones

estándar de cultivo. Las células son no diferenciadas durante la fase de crecimiento exponencial y su diferenciación suele ocurrir cuando alcanza la convergencia celular, durante su fase estacionaria (Figura 1). Las células diferenciadas desarrollan una monocapa de células polarizadas, manifestando microvellosidades en su parte apical y separándose del dominio basolateral por firmes uniones estrechas.

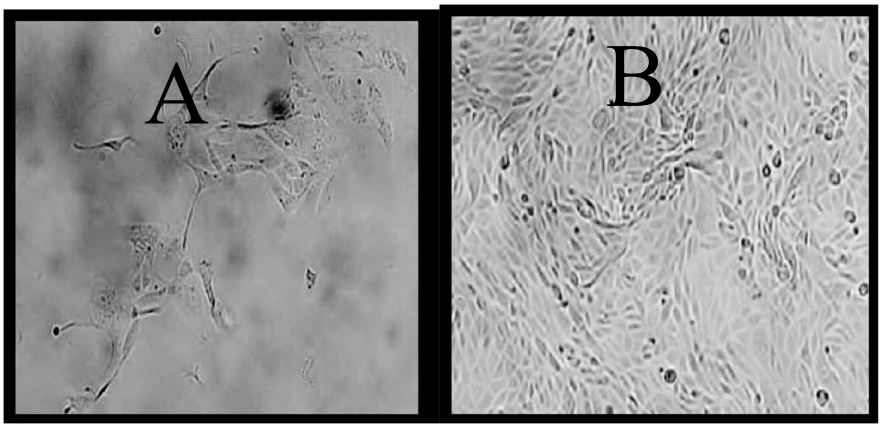


Figura 1. Microfotografías de células CaCo-2 en cultivo. (A), Células en un cultivo no confluente; (B), células en un cultivo confluente. Aumento original 10X. Microscopia de contraste de fases [23]

Los ensayos de cultivo celular han ofrecido nuevas e interesantes posibilidades en muchas disciplinas científicas. Si se utiliza correctamente, la línea celular Caco-2 puede proporcionar información sobre la base biológica y bioquímica de las propiedades de barrera de la mucosa intestinal, pero también puede desentrañar información valiosa sobre la absorción de fármacos y componentes dietéticos relevantes tanto para la industria farmacéutica como alimentaria. Por lo tanto, la línea celular Caco-2 se ha aprovechado para una variedad de aplicaciones, entre ellas las siguientes:

- Estudiar los mecanismos y efectos de la microbiota, los metabolitos de la microbiota, digestión de los alimentos y los componentes bioactivos de los alimentos sobre la función de barrera del epitelio intestinal [24].
- Determinar las vías para el transporte de fármacos o componentes alimentarios (por ejemplo, mecanismos paracelulares frente a transcelulares o pasivos frente a mecanismos mediados por portadores) a través del epitelio intestinal [25].
- En el estudio de los efectos tóxicos potenciales de los candidatos a fármacos o metabolitos de los alimentos en la mucosa intestinal [26].

Es así como encontramos estudios realizados por:

Sakuma *et. al.* [27] quienes realizaron un estudio para evaluar una posible influencia de la xantina / xantina oxidasa en la reproducción de la línea celular de cáncer colorrectal Caco-2;

Gorlach *et. al.* [28] estudiaron polifenoles extraídos de semillas de *Oenothera paradoxa* (producto de desecho industrial) como inductores de apoptosis en líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2.

Dinicola *et. al.* [29] evaluaron la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) el manejo de Ca+ intracelular y la activación de quinasa regulada por señales extracelulares en extractos de semilla de uva la cual inhibe el crecimiento celular e inhibe la apoptosis en las células de cáncer de colon humano Caco-2.

Tan *et. al.* [30] investigaron la citotoxicidad de las micelas mixtas de sal biliar y lecitina en el modelo de células Caco-2, evaluando la viabilidad por el método del MTT y la integridad de la monocapa de células Caco-2 y Martínez *et. al.* [31] evaluaron el efecto de los extractos de cultivo (CB08035-SCA y CB08035-SYP) de *Marinobacter Hydrocarbonoclasticus* (cepa CB08035) y los posibles efectos protectores atribuidos a mecanismos subyacentes a la respuesta antioxidante para sobrevivir a las lesiones por estrés oxidativo en células Caco-2.

2.2.3. Actividad citotóxica

Citotoxicidad

La citotoxicidad está definido como: “alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño fenotípico” [32] y esta varía dependiendo del estudio, si estas tienen su metabolismo alterado, respecto a las células. Estas pruebas son empleadas debido a su bajo costo, fácil de usar y reproducibles. Los experimentos *in vitro*, tienen la intención de determinar el potencial para la citotoxicidad de los compuestos investigados, por el uso como fármacos, cosméticos y tener que demostrar la atoxicidad o porque serán usados con agentes anticancerígenos y la citotoxicidad es crucial para su acción[22].

En los años 90’s, el hallazgo de agentes antitumorales de origen natural estuvo basado en ensayos de actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer empleando modelos *in vitro* o *in vivo*. Varios agentes anticancerígenos encontrados se usaron en ensayos mostrando producir una acción citotóxica mediante la interacción con la tubulina o por la

inhibición de la topoisomerasa. Identificando un aumento de blancos moleculares asociados con cierto tipo de cánceres, el develamiento de drogas anti cáncer se basa actualmente en el elevado rendimiento contra un rango de dichos blancos de compuestos seleccionados minuciosamente [33].

Las pruebas de citotoxicidad se clasifican en ensayos de viabilidad y supervivencia, los primeros son empleados en identificar la proporción de células que justo después de un tratamiento significativamente traumático, se encuentran intactas. Con estos ensayos se evalúan la citotoxicidad en términos de concentraciones letales (LC)[22], mientras que la concentración letal 50 (LC50) es la concentración que causa la muerte al 50% de las células presentes, evaluadas seguidamente después del tratamiento [34].

Las pruebas de viabilidad que se cimentan en la capacidad que tienen las células para exceptuar sustancias a las que son impermeables, ofrecen una interpretación instantánea. Estos test de viabilidad miden la tasa de supervivencia en seguida, las células expuestas al colorante no desarrollan color, se consideran viables y son de consideración para agentes tóxicos quienes ejercen sus efectos primarios en la integridad de la membrana [22].

Método del MTT para cuantificar la viabilidad celular

Variados ensayos biológicos requieren medir la proliferación y/o supervivencia de las células de mamíferos, esto puede lograrse por diversos métodos, para esto se desarrolló un ensayo colorimétrico versátil, rápido, y cuantitativo basado en una sal de tetrazolio MTT (metil tiazol tetrazolio), el cual mide sólo células vivientes y se mide espectrofotométricamente entre 540 y 570 nm. [35].

El MTT es una sal de tetrazolio (color amarillo) la cual mide la actividad y viabilidad celular por el rompimiento causado por la reducción del anillo de sal de tetrazolio MTT por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales: succinato-deshidrogenasas, para formar unos cristales violetas de formazán insolubles en agua, pero solubles en dimetil sulfoxido (DMSO) (Figura 2). La viabilidad celular es proporcional a la absorbancia, que presentan los cristales de formazán [36].

Este método está basado en la capacidad de las enzimas mitocondriales de las células viables de transformar la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán. El método se ha empleado eficazmente para monitorear la sensibilidad de células tumorales en humanos a agentes quimioterapéuticos [37,38].

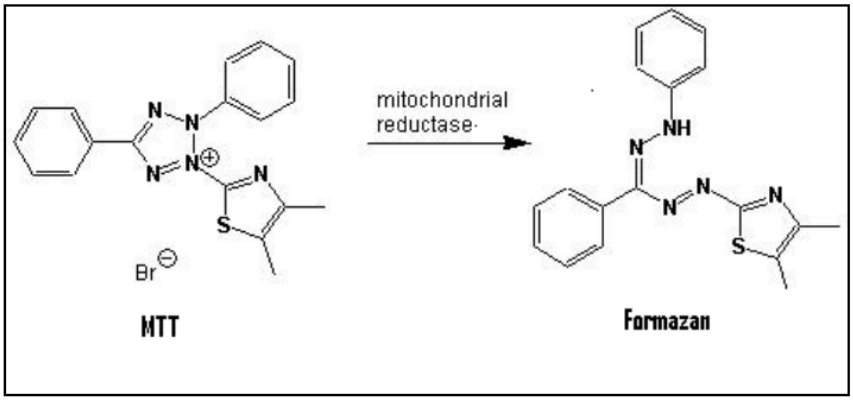


Figura 2. Reducción de MTT en células vivas por reductasa mitocondrial da como resultado la formación de formazán insoluble, caracterizado por alta absortividad a 570 nm. [39]

2.2.4. Muerte Celular

La muerte celular es una fase que está muy relacionada con el crecimiento fisiológico normal de tejidos, y ciertas enfermedades. Son numerosos mecanismos de muerte las cuales se basan en criterios morfológicos, por lo que se instituyo unos criterios de clasificación universales basados en cambios morfológicos y en aspectos bioquímicos. Según la definición del NCCD (Nomenclature Committe on Cell Death) [40] una célula se considera muerta de acuerdo a los siguientes criterios moleculares o morfológicos:

1. La célula perdió integridad de la membrana.
2. La célula, incluyendo el núcleo, sufrió fragmentación completa, mostrando cuerpos apoptóticos.
3. Los fragmentos de la célula se fagocitaron por las células adyacentes.

Necrosis, apoptosis y autofagia son tipos de muerte celular, siendo estos procesos regulados genéticamente y las vías de señalización están en muchos casos relacionados entre sí.[41].

2.2.5. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso de crecimiento celular muy importante durante el desarrollo embrionario[42], y durante la vida adulta para mantener el equilibrio celular. La apoptosis provoca la eliminación de células deterioradas, infectadas o que el cuerpo no necesita [43]. Dos vías distintas, pero en última instancia convergentes, inician la apoptosis: la vía regulada por el linfoma 2 mitocondrial,

intrínseco o de células B (BCL-2) y la vía extrínseca o del receptor de muerte (Figura 3) [44].

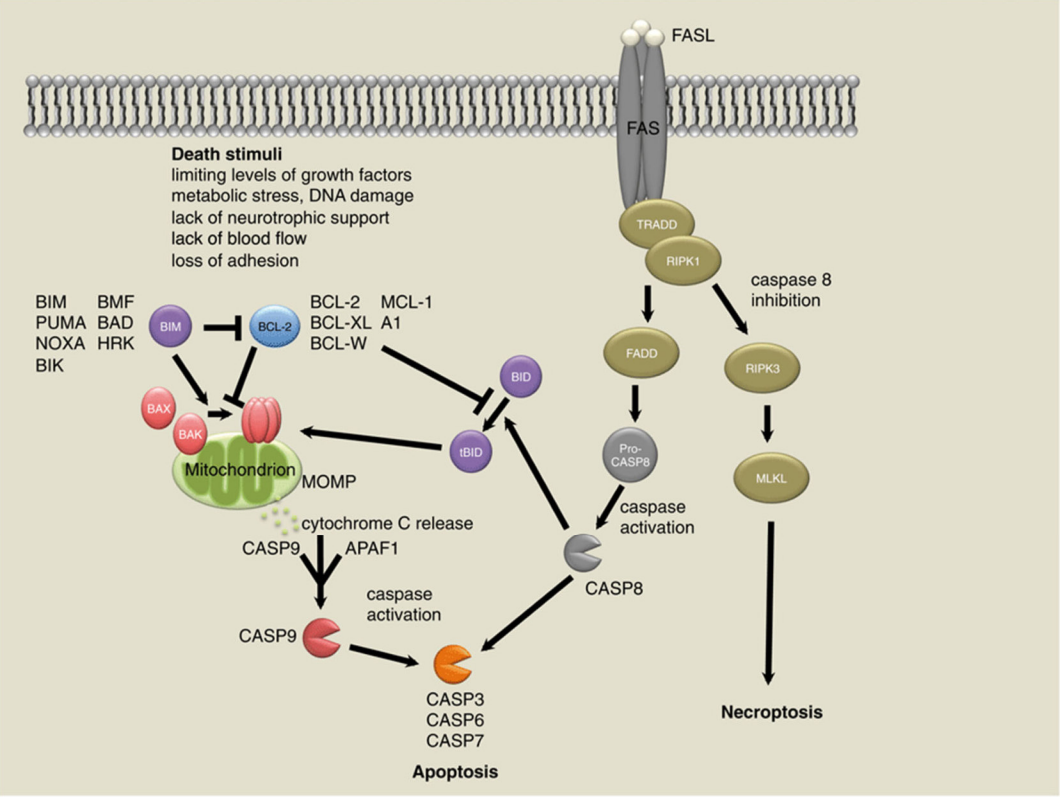


Figura 3. Esquema simplificado de las vías apoptóticas del receptor de muerte y mitocondrial.[44]

Existe un equilibrio de la proliferación y la muerte celulares en los tejidos. Superar este equilibrio está asociado a muchas enfermedades [45], para la falta de apoptosis (cáncer, enfermedades autoinmunes, etc.), como por exceso (enfermedades neurodegenerativas, infección por VIH, etc.)[46,47].

Kerr y colaboradores [48] introducen el termino apoptosis describiendo un proceso basado en los siguientes cambios morfológicos:

- Las células se van redondeando a la vez que retroceden sus pseudópodos.
- Reducción del volumen celular
- Picnosis
- Fragmentación nuclear

La apoptosis se distingue por mantener integra la membrana plasmática durante el desarrollo. El desarrollo de cuerpos apoptóticos, que se da en las últimas etapas, permite que sean fagocitados por células fagocíticas vecinas que se degradan rápidamente por medio de sus enzimas lisosomales. Por lo que es una muerte limpia, ya que de esta forma se evita la liberación del contenido citosólico y por consiguiente, que se desencadene un proceso inflamatorio no deseado [49]. Por otro lado las células fagocíticas procesan los desechos celulares produciendo la exhibición de antígeno y la correspondiente respuesta inmune específica (presentación cruzada) [50].

Bioquímicamente, la apoptosis viene a ser un proceso a través del cual varias señales intracelulares llevan a la activación de unas proteínas llamadas caspasas [51].

Caspasas

Pertenecen a una familia de cisteín-proteasas que tiene especificidad de corte tras un residuo aspártico (Asp). Se designan con la palabra caspasa seguida de un número. Estas se sintetizan como zimógenos inactivos, denominándose como pro-caspasa por su forma inactiva seguido de su correspondiente número [52]. Esta familia se encuentra inmensamente conservada y las diminutas variaciones estructurales que presentan entre sus miembros vienen a ser las responsables de la especificidad de sustrato[53]. Según su función se clasifican en 2 grupos: Las que intervienen en el proceso de inflamación (1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14) [54] o las que intervienen en los procesos de apoptosis (2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10), de donde existen las iniciadoras (2, 8, 9, 10) y las ejecutoras (3, 6, 7) [55].

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación es aplicada, experimental y analítico.

3.2 Consideraciones éticas.

Debido a que este estudio se desarrolla de forma *in vitro* con células intestinales Caco-2, no requiere el uso de animales de experimentación u otro modelo que requiera se emplee un comité de ética.

3.3 Diseño metodológico

El diseño metodológico longitudinal y prospectivo.

Recolección de la especie vegetal

Se recolectó la corteza de *Brunfelsia grandiflora*, conocido con el nombre común de "Chiric sanango" en la comunidad nativa de Canaán de Cachiyacú ubicado en el distrito de Contamana, provincia de Ucayali, Departamento de Loreto en Perú. La identificación botánica fue realizada por el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (No. 046-USM-NHN-2022). Ver Anexo 2.

Preparación del extracto acuoso.

75 g de corteza seca correspondiente al floema de *Brunfelsia grandiflora* se llevó a polvo; para luego someterlo a extracción con agua destilada por calentamiento a 100° C por 1 hora a reflujo a razón de 10 g/L. Posteriormente se filtró el sobrenadante en caliente en papel Whatman # 42; el líquido obtenido se concentró con ayuda de un evaporador rotatorio, obteniéndose aproximadamente 17 g de extracto acuoso; el cual se conservó en frasco de color ámbar a -20°C hasta el momento de su uso.

Análisis fitoquímico de *Brunfelsia grandiflora*

La determinación de los metabolitos secundarios se realizó en el Laboratorio del Instituto de Investigación de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM; según las técnicas descritas por Olga Lock empleando reactivos de precipitación y coloración[56].

Unidad de análisis

Se evaluó la actividad citoprotectora; capacidad anti-apoptótica y anti-inflamatoria utilizando cultivos celulares autenticados de la línea celular de carcinoma de colon humano (Caco-2) las cuales se obtuvieron de la colección europea de cultivos celulares autenticados (ECACC 86010202) y se realizó los análisis en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Madrid – España y en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Veterinaria – UNMSM.

Ensayo de viabilidad celular por MTT

El ensayo de viabilidad celular, o citotoxicidad, se basa en la capacidad de la actividad mitocondrial para reducir el reactivo MTT (Color amarillo) y convirtiéndolo a sal de formazan, (color purpura) que se determina mediante colorimetría. Las células Caco-2 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de $8x10^4$ cel/pocillo y se incubaron durante 24 h (temperatura 37°C, en atmósfera de CO_2 al 5% y un 95% de humedad relativa). Se procedió a la incubación de las células con el extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones (10-1000 µg/mL) y a la co-incubación del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*/t-BOOH (200 µM) por 24 h. Los tratamientos fueron preparados en medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), sin suero bovino fetal. Para el ensayo MTT se utilizó una concentración final de 0.5 mg/mL durante 2 horas, después se agregó 150 µL de DMSO. La determinación colorimétrica de la reducción de MTT se midió a 540 nm.[8].

Evaluación de estrés oxidativo.

A. Producción de ROS

El daño oxidativo a las células, debido al efecto de varias sustancias químicas, puede evaluarse por los niveles de producción celular de especies reactivas. Para la evaluación de este ensayo, las células fueron sembradas en placas negras de 96 pocillos e incubadas con los diferentes tratamientos (t-BOOH, t-BOOH + *Brunfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones (10 – 1000 µg/mL)) por 24h. Luego, 10µM de diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA) se adiciona a los pocillos por 30 minutos a 37°C. Posteriormente comenzó la oxidación de DCFH-DA por oxidantes intracelulares y se produce la liberación de DCFH, el cual es un compuesto fluorescente. La generación de

ROS se evaluó en un lector de microplaca de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm (Biotek, USA) [57].

B. Producción de óxido nítrico (ON) intracelular

El ON es un mensajero que señala múltiples procesos fisiológicos intracelulares e intercelulares. Los cambios en la secreción de ON se determinaron mediante medición directa utilizando el ensayo DAF-FM-DA. Las células fueron sembradas en placas negras de 96 pocillos e incubadas con los diferentes tratamientos (t-BOOH y t-BOOH + *Brunfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones (10 – 1000 μg/mL)) por 24 h. Luego, 10 μM de la sonda fluorescente 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluoresceina Diacetato (DAF-FM-DA) fueron adicionados a los pocillos por 30 minutos a 37°C. Posteriormente comenzará la oxidación de DAF-FM-DA mediante oxidantes intracelulares y se producirá la emisión de fluorescencia. La generación de ON intracelular fue evaluado en un lector de microplaca de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 515 nm (Biotek, USA) [58].

Expresión de genes relacionados a inflamación (NFκB1, TNFα, IL1β, IL6) y muerte celular (APAF1, BAX y CASP-3)

Las células fueron incubadas con los tratamientos (t-BOOH y t-BOOH + *Brunfelsia grandiflora*) por 24 h en flask de 25 mL, 6 flask por tratamiento. Tras 24 h de incubación con diferentes concentraciones (50, 100 y 200 μg/mL) las células fueron recogidas con PBS y luego centrifugadas, eliminándose el sobrenadante, tras ello, se extrajo el ARN total usando el método de extracción con el reactivo NucleoSpin®-RNA-Plus (Macherey-Nagel, Alemania, basado en el uso de columnas de sílice) de acuerdo con las condiciones del fabricante. La concentración final y la pureza de ARN fueron determinadas usando un nanoespectrofotómetro (Microdigital, Seúl, Corea), obteniendo relaciones A260/A280 cercanas a 2,0 en todas las muestras. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 μg de ARN total por transcripción inversa utilizando el kit de síntesis de ADNc qPCRBIO (PCRBiosystems, PA, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. Las reacciones por qPCR fueron corridos en un PCR en tiempo real (BioRad CFX, CA, EE. UU.), usando el ICgreen Mastermix (Nippon Genetics, Duren, Alemania) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los parámetros del termociclador fueron 95 °C por 2 min,

y 40 ciclos de 5 s a 95 °C y 30 s a 60 °C [59]. Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de cebadores directos e inversos para apoptosis e inflamación[32,60].

Genes	Secuencia del cebador directo	Secuencia del cebador inverso
APAF1	TCTTCCAGTGGTAAAGATTCAGTT	CGGAGACGGTCTTTAGCCTC
Bax	CCCCCGAGAGGTCTTTTTCC	CCTTGAGCACCAGTTTGCTG
Casp3	GTGGAGGCCGACTTCTTGTA	TTTCAGCATGGCACAAAGCG
IL1β	CCAGCTACGAATCTCCGACC	TATCCTGTCCCTGGAGGTGG
NFκB	TTTTCGACTACGCGGTGACA	GTTACCCAAGCGGTCCAGAA
TNFα	CTGGAAAGGACACCATGAGCA	TCTCTCAGCTCCACGCCATT
IL6	CCAGTACCCCCAGGAGAAGA	CAGCTCTGGCTTGTTCCTCA
GAPDH	GAGAAGGCTGGGGCTCATTT	AGTGATGGCATGGACTGTGG

Procesamiento de la información o de datos

Todos los resultados obtenidos serán el producto de los experimentos independientes realizando seis réplicas para cada condición experimental (tratamiento),. Los datos serán representados por la media. La prueba estadística usada fue el análisis de varianza de una vía, mejorando el poder de la prueba por el uso de Dunnett. Se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0 para análisis estadístico.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Análisis fitoquímico.

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos después de realizar el análisis preliminar fitoquímico del extracto acuoso de la corteza de *Brunfelsia grandiflora.*

Tabla 3. Análisis fitoquímico de *Brunfelsia grandiflora*

Reactivo	Metabolito secundario	Resultado
Dragendorff	Alcaloides	**+**
Mayer	Alcaloides	**+**
Wagner	Alcaloides	**+**
Popoff	Alcaloides	**++**
Bertrand	Alcaloides	**++**
Cloruro ferrico	Polifenoles	**++**
Shinoda	Flavonoides	**+**
Baljet	Lactonas insaturadas	**++**
Vainillina/H_2SO_4	Glicosidos	**++**
Bomtrager	Naftoquinonas, antraquinonas, antronas y antranoles.	**+**
Liebermann – Buchard	Esteroides y glicósidos triterpénicos	**++**
Gelatina	Taninos	**+**
Poder afrógeno	Saponinas esteroides y saponinas triterpenoides	**+**

Leyenda: Reacción positiva moderada (+); Reacción positiva intensa (++)

Fuente: Elaboración propia

4.2 Ensayo de viabilidad celular por MTT

Inicialmente se evaluó el efecto tóxico del extracto acuoso de *Brunfelsia* grandiflora (EABG) (10 – 1000 µg/mL) en las células Caco-2 realizando seis réplicas para cada condición experimental (tratamiento), tras un periodo de exposición por 24 horas; sirvió para calcular el porcentaje de viabilidad celular con la relación entre las absorbancias de las células tratadas y las células no tratadas (Control (C)); asignándoseles a estas últimas un valor correspondiente al 100% de viabilidad celular; tras un periodo de incubación de

24 horas con los extractos a concentraciones crecientes (10 – 1000 µg/mL) no causó ningún efecto significativo en la viabilidad celular en comparación con el control, como se aprecia en la Figura 4; por lo tanto la incubación a largo plazo (24 horas) con el extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* de hasta 1000 µg/mL no provocó algún daño celular y mantuvo a las células de manera regular. Observándose la inocuidad de las células.

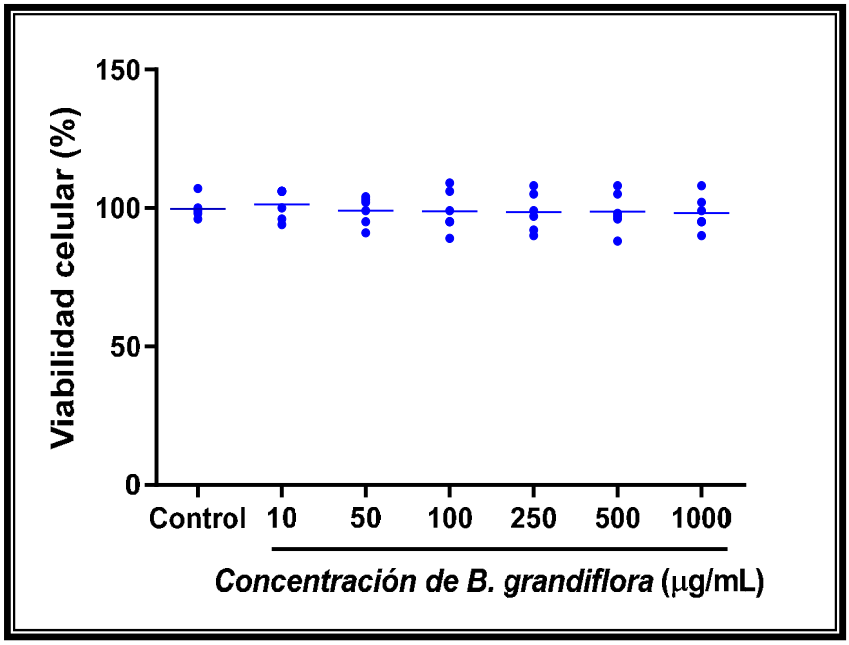


Figura 4: Viabilidad celular del extracto de *Brunfelsia grandiflora*

Así mismo se evaluó el efecto protector del co-tratamiento con el extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones (10 – 1000 µg/mL) por 24 h en células Caco-2 frente al estrés oxidativo inducido por el t-BOOH realizando seis réplicas para cada condición experimental, el cual se usó para generar un estrés oxidativo celular a una concentración de 200 uM de t-BOOH, un fuerte prooxidante. En este experimento se incluyó un control en células no tratadas con t-BOOH y un tratamiento solo con t-BOOH en células Caco-2, con la misma cantidad de t-BOOH y durante el mismo tiempo de incubación., como se aprecia en la Tabla 4, Tabla 5 y Figura 5, siendo el efecto del extracto frente al efecto citotóxico del t-BOOH concentración dependiente ya que se puede apreciar que a mayor concentración de EABG reducen el efecto del t-BOOH incrementando la viabilidad celular en un 19% en relación al t-BOOH y del 29%, 25% y 42% para las concentraciones de EABG de 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL respectivamente proporcionando un aumento significativo de la supervivencia celular en comparación con las tratadas con t-BOOH.

Tabla 4: Porcentaje de viabilidad celular en células control, tratadas con y sin t-BOOH con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora.*

	Control	t-BOOH	Concentración (µg/mL)					
			10	50	100	250	500	1000
Viabilidad celular (%)	98	58	55	76	75	90	88	99
	96	73	72	58	78	84	84	97
	107	65	66	64	79	85	87	89
	98	70	64	71	82	83	86	86
	99	66	63	52	82	91	85	99
	100	71	68	75	84	88	72	102

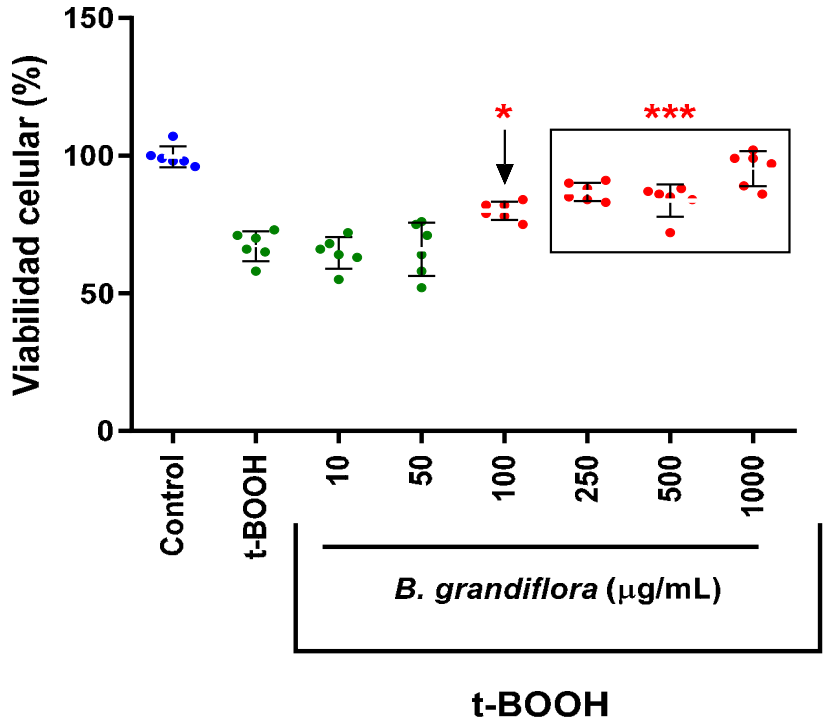


Figura 5: Citotoxicidad inducida por t-BOOH sobre las células Caco-2 después de un periodo de incubación de 24 h. donde la viabilidad celular se midió como reducción del MTT (ordenada) y los datos se normalizaron como % de control puntos azules; los tratados con t-BOOH y 10, 50 µg/mL de *B. grandiflora* con t-BOOH respectivamente puntos verdes se aprecia la reducción de la viabilidad celular y los tratados con 100, 250, 500 y 1000 µg/mL de *B. grandiflora* con t-BOOH respectivamente puntos rojos. Con una probabilidad (p) * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Tabla 5: Aumento de la viabilidad celular en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (100, 250, 500 y 1000 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

B. grandiflora (µg/mL)	↑ Viabilidad celular respecto al t- BOOH	Sig.
100	**19%**	* ***p*<0.05**
250	**29%**	*** ***p*<0.001**
500	**25%**	*** ***p*<0.001**
1000	**42%**	*** ***p*<0.001**

4.3 Evaluación de estrés oxidativo

4.3.1 Producción de ROS

Los tratamientos con t-BOOH por 24 h realizados en seis replicas por tratamiento mostraron un aumento de aproximadamente 118% en la generación de ROS intracelular en comparación con el control no estresado como se aprecia en la Tabla 6, Tabla 7 y Figura 6; el tratamiento de las células con el extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones (10 – 1000 µg/mL) disminuyo significativamente la producción de ROS en comparación con las células estresadas, siendo estas dependientes de la concentración observándose una reducción con la concentración de 10 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 25% de la generación de ROS en relación a la producción de ROS de las células tratada con t-BOOH, con la concentración de 50 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 30% de la generación de ROS en relación a la producción de ROS de las células tratada con t-BOOH, con la concentración de 100 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 36% de la generación de ROS en relación a la producción de ROS de las células tratada con t-BOOH, con la concentración de 250 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 39% de la generación de ROS en relación a la producción de ROS de las células tratada con t-BOOH, con la concentración de 500 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 50% de la generación de ROS en relación a la producción de ROS de las células tratada con t-BOOH y con la concentración de 1000 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 54% de la generación de ROS en relación

a la producción de ROS de las células tratada con t-BOOH como se aprecia en la Figura 6.

Tabla 6: Porcentaje de Producción de ROS en células Control, tratadas con y sin t-BOOH y con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora.*

	Control	t-BOOH	Concentración (µg/mL)					
			10	50	100	250	500	1000
Producción de ROS (%)	93	250	160	159	142	125	122	108
	92	263	155	158	143	129	112	109
	103	210	198	172	159	128	107	95
	98	198	170	135	129	145	109	109
	108	245	158	168	164	149	119	102
	107	199	179	160	139	152	118	101
Promedio	**100**	**228**	**170**	**159**	**146**	**138**	**115**	**104**

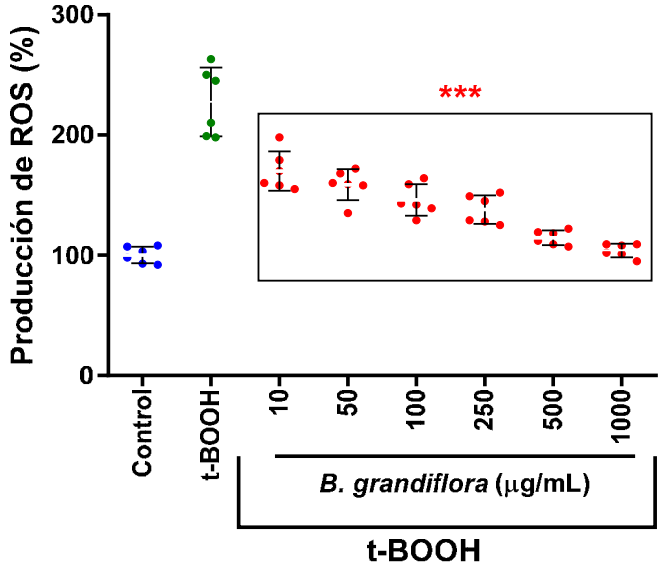


Figura 6: Producción de ROS en células Caco-2 inducidas por t-BOOH después de un período de incubación de 24 h. los datos se normalizaron como % de control puntos azules; los tratados con t-BOOH puntos verdes se aprecia el aumento de la producción de ROS y los tratados con 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL de *B. grandiflora* con t-BOOH respectivamente puntos rojos. Con una probabilidad (p) *** $p < 0{,}001$.

Tabla 7: Reducción de la producción de ROS en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (10, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

B. grandiflora (µg/mL)	↓ Producción de ROS	Sig.
10	**25%**	*** ***p*<0,001**
50	**30%**	*** ***p*<0,001**
100	**36%**	*** ***p*<0,001**
250	**39%**	*** ***p*<0,001**
500	**50%**	*** ***p*<0,001**
1000	**54%**	*** ***p*<0,001**

4.3.2 Producción de ON

De la misma manera se evaluó en las células Caco-2 realizando seis replicas por tratamiento, los niveles de óxido nítrico intracelular en células no tratadas (control) y en presencia de t-BOOH; donde se observa un incremento en los niveles de ON aproximadamente 84% en comparación con el Control; así también se evidencia la reducción de los niveles de ON intracelular por el tratamiento con el extracto acuoso de B*runfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones (10 – 1000 µg/mL) disminuyo significativamente los niveles de ON intracelularen comparación con las células estresadas con t-BOOH, siendo estas dependientes de la concentración observándose reducción de los niveles de ON intracelular con la concentración de 50 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 25% de los niveles de ON intracelular en relación a los niveles de ON intracelular de las células tratadas con t-BOOH, con la concentración de 100 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 34% de los niveles de ON intracelular en relación a los niveles de ON intracelular de las células tratadas con t-BOOH, con la concentración de 250 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 34% de los niveles de ON intracelular en relación a los niveles de ON de las células tratadas con t-BOOH, con la concentración de 500 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 42% de los niveles de ON intracelular en relación a los niveles de ON intracelular de las células tratadas con t-BOOH y con la concentración de 1000 µg/mL del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* en un 45% de los niveles de ON intracelular en relación a los niveles de ON intracelular de las células tratadas con t-BOOH como se aprecia en la Tabla 8, Tabla 9 y Figura 7.

Tabla 8: Porcentaje de Niveles de ON del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones con t-BOOH

	Control	t-BOOH	Concentración (µg/mL)					
			10	50	100	250	500	1000
Niveles de ONi (%)	102	192	165	127	128	112	105	102
	105	178	167	128	115	125	125	94
	112	199	174	135	110	141	94	96
	88	187	189	133	117	123	102	95
	87	170	168	145	125	110	106	105
	100	169	187	155	132	110	108	115
Promedio	99	183	175	137	121	120	107	101

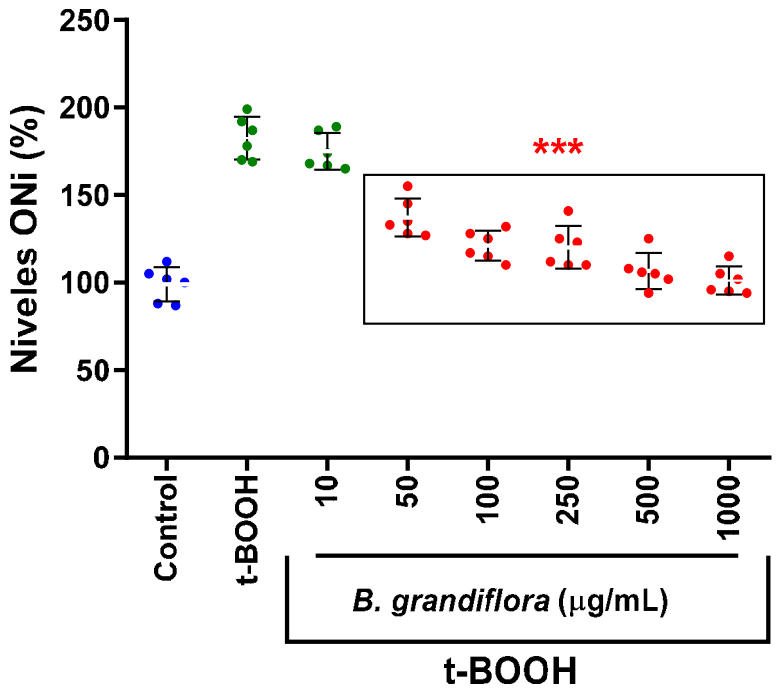


Figura 7: Producción de ON intracelular (ONi) en células Caco-2 inducidas por t-BOOH después de un período de incubación de 24 h. los datos se normalizaron como % de control puntos azules; los tratados con t-BOOH y t-BOOH + 10 µg/mL de *B. grandiflora* puntos verdes se aprecia el aumento de la producción de ON y los tratados con 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL de *B. grandiflora* con t-BOOH respectivamente puntos rojos. Con una probabilidad (p) *** $p < 0,001$.

Tabla 9: Reducción de la producción de ON en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora.*

B. grandiflora (µg/mL)	Reducción Niveles de ONi frente al t-BOOH	Sig.
10	**4%**	
50	**25%**	*** ***p*<0,001**
100	**34%**	*** ***p*<0,001**
250	**34%**	*** ***p*<0,001**
500	**42%**	*** ***p*<0,001**
1000	**45%**	*** ***p*<0,001**

4.4 Expresión de genes relacionados a inflamación (NFκB1, TNFα, IL1B, IL6) y muerte celular (APAF1, BAX y CASP-3)

El perfil de expresión de genes de inflamación fue analizado por PCR en tiempo real a partir del análisis de la expresión celular de 4 genes (NFκB1, TNFα, IL1β, IL6); se observa que las células Caco-2 tras un periodo de incubación con t-BOOH hay un incremento de la expresión génica del NFκB1 en un 102% respecto al control y al ser co tratadas con el extracto de *Brunfelsia grandiflora,* hay una disminución dependiente de la concentración, siendo la disminución significativa a concentración de 100 µg/mL (17%, ** p< 0,01) y 200 µg/mL (34%, *** p<0.001) (Figura 8 y Tabla 10) en relación a los tratados con t-BOOH; así también se ve el incremento de la expresión génica del TNFα en un 186% respecto al control y al ser co tratadas con el extracto de *Brunfelsia grandiflora,* hay una disminución dependiente de la concentración, siendo la disminución significativa a concentración de 50 µg/mL (12%, * p< 0,05) y para 100 y 200 µg/mL (35% y 52% respectivamente, *** p<0,001) (Figura 9 y Tabla 11) en relación a los tratados con t-BOOH; así mismo se ve el incremento de la expresión génica del IL1β en un 327% respecto al control y al ser co tratadas con el extracto de *Brunfelsia grandiflora,* hay una disminución dependiente de la concentración, siendo la disminución significativa a concentración de 50 µg/mL (10%, * p< 0,05) y para 100 y 200 µg/mL (37% y 51% respectivamente, *** p<0,001) (Figura 10 y Tabla 12) en relación a los tratados con

t-BOOH; de igual modo se ve el incremento de la expresión génica del IL6 en un 127% respecto al control y al ser co tratadas con el extracto de *Brunfelsia grandiflora,* hay una disminución dependiente de la concentración, siendo la disminución significativa a concentración de 200 µg/mL (33%, ** p<0,01) (Figura 11 y Tabla 13) en relación a los tratados con t-BOOH.

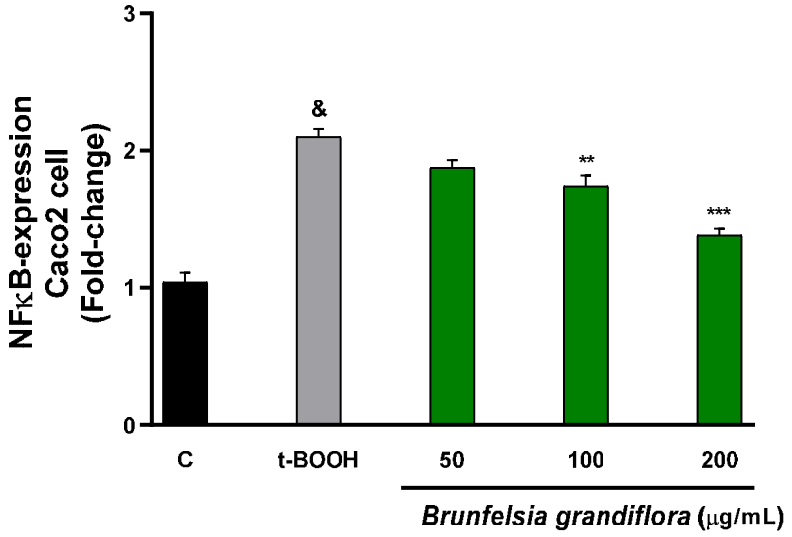


Figura 8: Expresión génica del NFκB1 por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y B. grandiflora. Efecto del t-BOOH en células Caco-2 después de un periodo de incubación por 24 h. sobre la expresión del gen NFκB1 (barra plomo); efecto del extracto de *B. grandiflora a* diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) en la expresión del gen NFκB1 inducidas con t-BOOH después de un periodo de incubación por 24 h. (barra verde). & $p < 0,001$ comparado con el control. Con una probabilidad (p) ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ comparado con el t-BOOH.

Tabla 10: Reducción de la expresión del gen NFκB1 en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

Tratamientos	↓ expresión del gen	Sig.
t-BOOH + *B. grandiflora* 50 µg/mL	**11%**	
t-BOOH + *B. grandiflora* 100 µg/mL	**17%**	** $p < 0,01$
t-BOOH + *B. grandiflora* 200 µg/mL	**34%**	*** $p < 0,001$

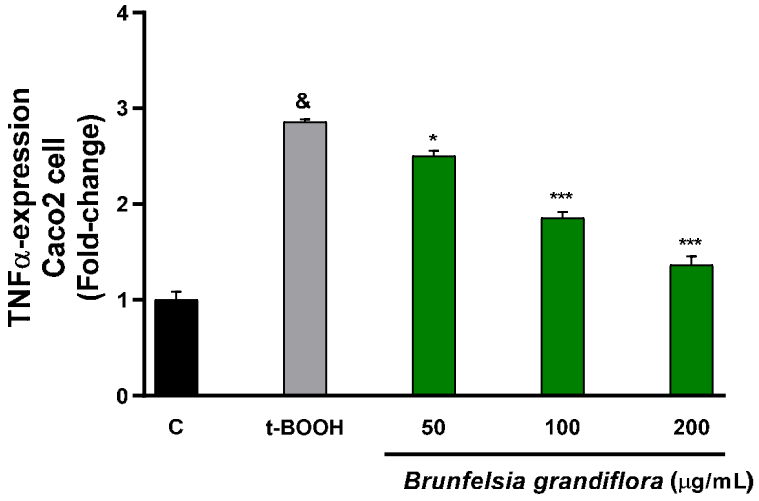


Figura 9: Expresión génica del TNFα por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora.* Efecto del t-BOOH en células Caco-2 después de un periodo de incubación por 24 h. sobre la expresión del gen TNFα (barra plomo); efecto del extracto de *B. grandiflora* a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) en la expresión del gen TNFα inducidas con t-BOOH después de un periodo de incubación por 24 h. (barra verde). & $p < 0,001$ comparado con el control. Con una probabilidad (p) * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ comparado con el t-BOOH.

Tabla 11: Reducción de la expresión del gen TNFα en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

Tratamientos	↓ expresión del gen	Sig.
t-BOOH + *B. grandiflora* 50 µg/mL	**12%**	* $p < 0,05$
t-BOOH + *B. grandiflora* 100 µg/mL	**35%**	*** $p < 0,001$
t-BOOH + *B. grandiflora* 200 µg/mL	**52%**	*** $p < 0,001$

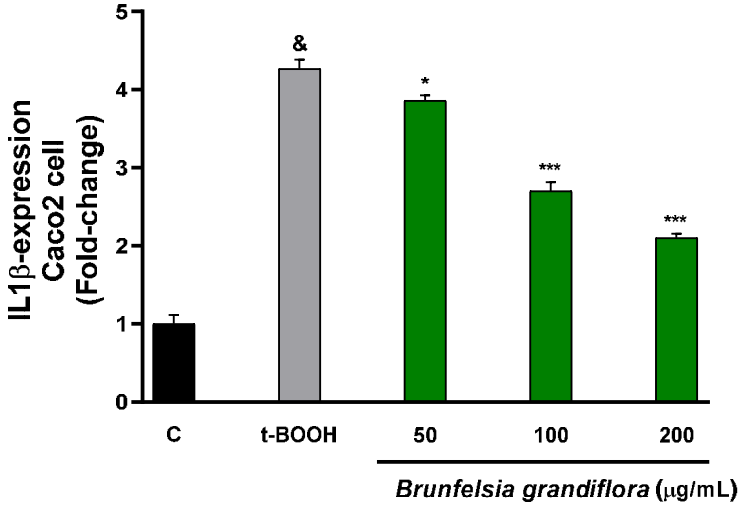


Figura 10: Expresión génica de IL1β por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora*. Efecto del t-BOOH en células Caco-2 después de un periodo de incubación por 24 h. sobre la expresión del gen IL1β (barra plomo); efecto del extracto de *B. grandiflora* a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) en la expresión del gen IL1β inducidas con t-BOOH después de un periodo de incubación por 24 h. (barra verde). & $p < 0,001$ comparado con el control. Con una probabilidad (p) * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ comparado con el t-BOOH.

Tabla 12: Reducción de la expresión del gen IL1β en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

Tratamientos	↓ expresión del gen	Sig.
t-BOOH + *B. grandiflora* 50 µg/mL	**10%**	* $p < 0,05$
t-BOOH + *B. grandiflora* 100 µg/mL	**37%**	*** $p < 0,001$
t-BOOH + *B. grandiflora* 200 µg/mL	**51%**	*** $p < 0,001$

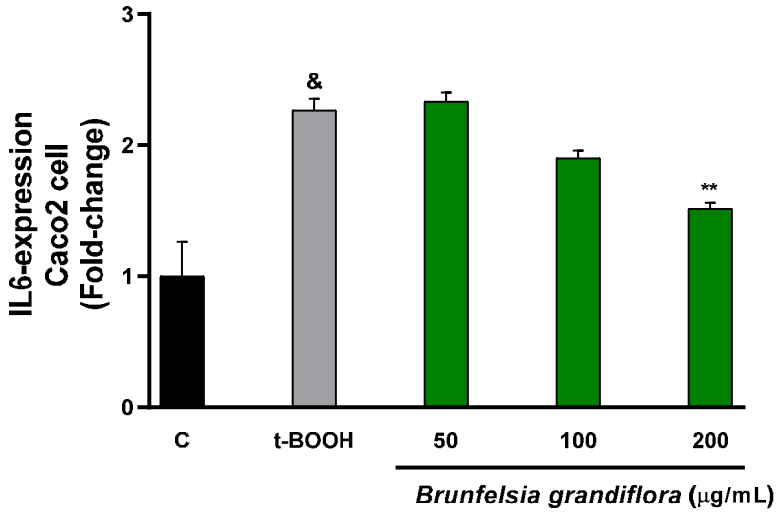


Figura 11: Expresión génica del IL6 por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora*. Efecto del t-BOOH en células Caco-2 después de un periodo de incubación por 24 h. sobre la expresión del gen IL6 (barra plomo); efecto del extracto de *B. grandiflora* a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) en la expresión del gen IL6 inducidas con t-BOOH después de un periodo de incubación por 24 h. (barra verde). & $p < 0,001$ comparado con el control. Con una probabilidad (p) ** $p < 0,01$ comparado con el t-BOOH.

Tabla 13: Reducción de la expresión del gen IL6 en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

Tratamientos	↓ expresión del gen	Sig.
t-BOOH + *B. grandiflora* 50 µg/mL	**-3%**	
t-BOOH + *B. grandiflora* 100 µg/mL	**16%**	
t-BOOH + *B. grandiflora* 200 µg/mL	**33%**	** $p < 0,01$

Con respecto a los efectos del t-BOOH y *Brunfelsia grandiflora* en la transcripción de genes relacionados con la apoptosis en la línea celular Caco-2, los niveles de ARNm de APAF1, BAX y CASP-3 aumentaron después de la exposición a t-BOOH; según se aprecia en la Figura 12 y Tabla 14 hay un incremento de la expresión génica del APAF1 en un 227% respecto al control y al ser co tratadas con el extracto de *Brunfelsia*

grandiflora, hay una disminución dependiente de la concentración, siendo la disminución significativa a concentración de 200 µg/mL (41%, *** p<0.001) en relación a los tratados con t-BOOH; de la misma manera se aprecia en la Figura 13 y Tabla 15 hay un incremento de la expresión génica del BAX en un 243% respecto al control y al ser co tratadas con el extracto de *Brunfelsia grandiflora,* hay una disminución dependiente de la concentración, siendo la disminución significativa a concentración de 100 y 200 µg/mL (33% y 51% respectivamente, *** p<0,001) en relación a los tratados con t-BOOH y de igual modo se aprecia en la Figura 14 y Tabla 16 un incremento de la expresión génica del CASP-3 en un 237% respecto al control y al ser co tratadas con el extracto de *Brunfelsia grandiflora,* hay una disminución dependiente de la concentración, siendo la disminución significativa a concentración de 100 µg/mL (37%, ** p<0,01) y 200 µg/mL (55%, *** p<0,001) en relación a los tratados con t-BOOH.

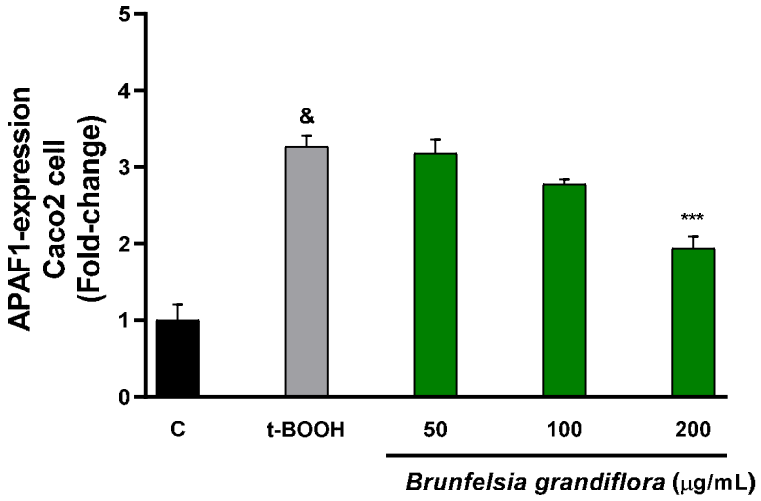


Figura 12: Expresión génica del APAF1 por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora*. Efecto del t-BOOH en células Caco-2 después de un periodo de incubación por 24 h. sobre la expresión del gen APAF1 (barra plomo); efecto del extracto de *B. grandiflora* a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) en la expresión del gen APAF1 inducidas con t-BOOH después de un periodo de incubación por 24 h. (barra verde). & p < 0,001 comparado con el control. Con una probabilidad (p) *** p < 0,001 comparado con el t-BOOH.

Tabla 14: Reducción de la expresión del gen APAF1 en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

Tratamientos	↓ expresión del gen	Sig.
t-BOOH + *B. grandiflora* 50 µg/mL	**3%**	
t-BOOH + *B. grandiflora* 100 µg/mL	**15%**	
t-BOOH + *B. grandiflora* 200 µg/mL	**41%**	*** p < 0,001

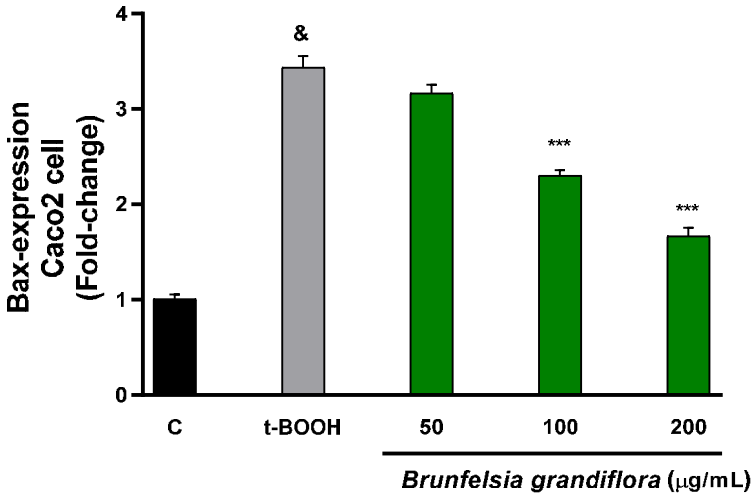


Figura 13: Expresión génica del BAX por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora*. Efecto del t-BOOH en células Caco-2 después de un periodo de incubación por 24 h. sobre la expresión del gen BAX (barra plomo); efecto del extracto de *B. grandiflora* a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) en la expresión del gen BAX inducidas con t-BOOH después de un periodo de incubación por 24 h. (barra verde). & p < 0,001 comparado con el control. Con una probabilidad (p) *** p < 0,001 comparado con el t-BOOH.

Tabla 15: Reducción de la expresión del gen BAX en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

Tratamientos	↓ expresión del gen	Sig.
t-BOOH + *B. grandiflora* 50 µg/mL	**8%**	
t-BOOH + *B. grandiflora* 100 µg/mL	**33%**	*** p < 0,001
t-BOOH + *B. grandiflora* 200 µg/mL	**51%**	*** p < 0,001

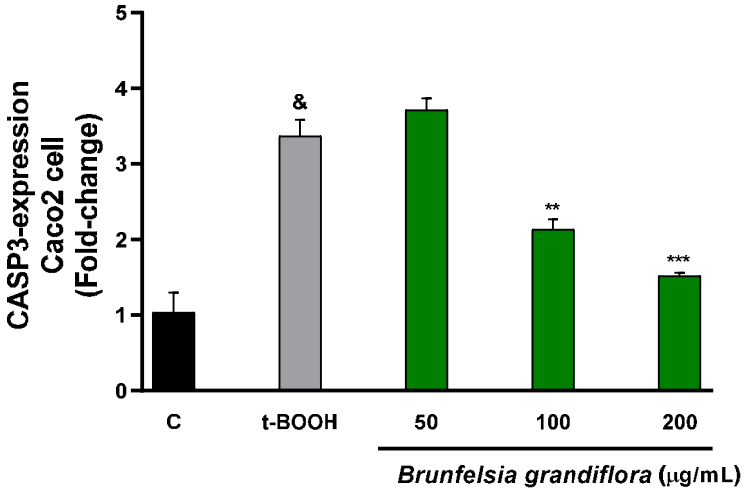


Figura 14: Expresión génica del CASP-3 por efecto del co-tratamiento de t-BOOH y *B. grandiflora*. Efecto del t-BOOH en células Caco-2 después de un periodo de incubación por 24 h. sobre la expresión del gen CASP-3 (barra plomo); efecto del extracto de *B. grandiflora* a diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) en la expresión del gen CASP-3 inducidas con t-BOOH después de un periodo de incubación por 24 h. (barra verde). & p < 0,001 comparado con el control. Con una probabilidad (p) ** p < 0,01, *** p < 0,001 comparado con el t-BOOH.

Tabla 16: Reducción de la expresión del gen CASP-3 en células Caco-2 tratados con t-BOOH y diferentes concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL) del extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora*.

Tratamientos	↓ expresión del gen	Sig.
t-BOOH + *B. grandiflora* 50 µg/mL	**-10%**	
t-BOOH + *B. grandiflora* 100 µg/mL	**37%**	** p < 0,01
t-BOOH + *B. grandiflora* 200 µg/mL	**55%**	*** p < 0,001

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales son una rica fuente de fitoquímicos bioactivos o bionutrientes, es por eso que una comprensión adecuada de la evaluación fitoquímica de las plantas es esencial para el descubrimiento de fármacos, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y la interpretación de los efectos alelopáticos de varias especies de plantas [61]. Los estudios realizados durante las últimas 2 a 3 décadas han demostrado que los fitoquímicos tienen un papel importante en la gestión de los ecosistemas y en la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer[62]. Los análisis químicos infieren el papel efectivo que juegan los extractos de plantas y el mecanismo por el cual funcionan, ya sea a nivel ecológico o terapéutico [63] [64]. Por este motivo siendo la *Brunfelsia grandiflora* conocida con el nombre de "chiric sanango" una planta empleada en recetas de los curanderos para tratar males específicos como la sífilis, problemas reumáticos, resfrió, fiebre amarilla y enfermedades venéreas en la amazonia y también se emplea en combinación con la ayahuasca en este estudio de investigación se procura demostrar que el extracto de *Brunfelsia grandiflora* tiene la capacidad de proteger las células intestinales humanas contra el daño ante sustancias oxidantes esto en dosis dependientes mediante la viabilidad celular, la generación de ROS y NO así como las vías de señalización de la apoptosis e inflamación en las células Caco-2.

Para este estudio se realizó la marcha fitoquímica del extracto de la corteza seca correspondiente al floema de *Brunfelsia grandiflora* (Chiric sanango) encontrando una moderada cantidad de polifenoles, alcaloides, lactonas insaturadas, saponinas y antraquinonas, así como los encontrados por Quico E. (2019) en el extracto hidroalcohólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* quien encontró la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides esteroides y/o terpenoides y flavonoides [65], Norma R. (2012) utilizando reactivos de coloración y precipitación encontró presencia de alcaloides lo cual corroboró mediante Cromatografía de Gases acoplado a Masas que el tipo de alcaloide era alcaloides indólicos en el extracto metanólico de la corteza de *Brunfelsia grandiflora* [16] y se corrobora con lo obtenido por Mateos R. y colaboradores (2022) quienes identificaron y cuantificaron los polifenoles de la corteza encontrando setenta y nueve polifenoles que fueron identificados usando LC-MS encontrando que los hidroxicinamatos fueron el grupo de compuestos más abundante (66,8 %), seguidos de

las hidroxicumarinas (15,5 %), los lignanos (6,1 %), los flavonoles (5,7 %), los simples fenólicos (3,1 %), los galatos (2,3 %), los flavanoles (0,3 %). %), y flavanonas (0,2%) de los cuales alrededor del 64% de los fenoles caracterizados estaban en sus formas glicosiladas cuantificando 2014,71 mg de compuestos fenólicos en 100 g de materia seca [66].

Así también, en este trabajo de investigación se expuso a las células Caco-2 a diferentes concentraciones para evaluar la viabilidad celular empleando el ensayo de MTT, la cual se basa en la capacidad de las células viables, mediante deshidrogenasas mitocondriales, de reducir el MTT, una sal de tetrazolio amarilla, a un producto de formazán de color azul, encontrando que a diferentes concentraciones el extracto de *Brunfelsia grandiflora* presenta inocuidad en las células lo que nos indica un porcentaje de viabilidad directamente proporcional a la cantidad de formazán presente[67], por lo tanto, la incubación a largo plazo (24 h) con el extracto hasta 1000 µg/mL no provocó ninguna lesión celular y mantuvo una célula regular, esto comparado con él control. Además se evaluó la muerte celular inducida por 200µM de t-BOOH después de un periodo de incubación con extracto de *Brunfelsia grandiflora* si es que podría revertirse, encontrando que el t-BOOH redujo la viabilidad celular en un 33% en comparación con el control; el tratamiento de células Caco-2 con el extracto de *Brunfelsia grandiflora* a diferentes concentraciones (10, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL) aumento la viabilidad celular afectado por el t-BOOH siendo este incremento dosis dependientes proporcionando un aumento significativo de supervivencia celular a concentraciones de 100, 250, 500 y 1000 µg/mL (19% *p<0,05; 29%; 25% y 42% *** p<0,001 respectivamente); estos resultados son comparados con los obtenidos por Martínez M. y colaboradores (2021) quienes evaluaron la viabilidad celular y efectos protectores atribuidos a los mecanismos moleculares subyacentes a la respuesta antioxidante para sobrevivir al estrés oxidativo a las células Caco-2 en un alga parda marina que se encuentra principalmente en las costas del Mar Báltico al sur de Mediterráneo[68], así como los obtenidos por Ferreira S. y colaboradores (2022) quienes evaluaron las bayas del sauco portugués por sus efectos anti-inflamatorios y poder antioxidante celular el efecto protector de los extractos de saúco contra t-BOOH fue realizado en células Caco-2, ya que estas representan un modelo de barrera intestinal y los alimentos ingeridos que protegen esta barrera contribuyen a un intestino sano, la exposición de células Caco-2 a 250 µM t-BOOH resultó en daño celular,

reduciendo la viabilidad de las células Caco-2 y las células Caco-2 con 50 µg/mL de extractos ricos en fenoles (M) o de crudo extractos de saúco (E) fue eficaz en la protección de las células contra el daño promovido por t-BOOH [69].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producen una muy buena indicación del daño oxidativo a células vivas, es así que la activación de ROS conduce a la peroxidación lipídica de membranas celulares y productos de la peroxidación se van a unir a biomoléculas, lo que va a llevar a la producción de algunas enfermedades; basados en que la 2,7-diclorofluorescina (DCFH), la cual es una sustancia no fluorescente que cruza la membrana celular y es oxidada por ROS intracelular a DCF la cual es altamente fluorescente, es así que se puede usar como un índice para cuantificar el total de estrés oxidativo (la fluorescencia de DCF intracelular) en las células; un prooxidante como t-BOOH puede oxidar directamente al DCFH a DCF fluorescente así también, puede generar peróxidos de lípidos y ROS y descomponerse en radicales peroxilo ($ROO^{\cdot}$) , aumentando así la fluorescencia, por lo que el estrés oxidativo va a estar asociado con un desequilibrio entre el ROS y antioxidantes del cuerpo humano donde la acumulación excesiva de ROS puede dañar directamente el ADN, los lípidos y las proteínas, lo que alteraría la función celular normal [57,70–73], El presente estudio demostró que el extracto de *Brunfelsia grandiflora* inhibe la generación de ROS inducido por t-BOOH en las células Caco-2 sembradas, retrasando o previniendo de esta manera las condiciones que favorecen al estrés oxidativo en células, Se observa un aumento considerable en la producción de ROS inducido por 200µM de t-BOOH en comparación con el control sin estrés (Fig. 3) El compuesto t-BOOH a una concentración de 200 µM aumentó la generación de ROS en un 128% con respecto a su control que no fue sometido a este compuesto. El tratamiento de las células Caco-2 con el extracto de *Brunfelsia grandiflora* (10 – 1000 µg/mL) atenuó significativamente la producción de ROS inducida por t-BOOH. El extracto de *Brunfelsia grandiflora* (10, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL) proporcionó una disminución significativa de los niveles de ROS (25%, 30 %, 36 %, 39%, 50% y 54%, respectivamente) frente a la agresión celular provocada por t-BOOH; por lo que el extracto de *Brunfelsia grandiflora* puede tener un papel importante en la eliminación de los radicales libres. Así mismo, se examinó la correlación entre el efecto protector del extracto de *Brunfelsia grandiflora* y la producción de NO inducida por t-BOOH ya que la producción de ON es un paso importante en la regulación de enfermedades mediadas por ON; ya que la reacción química entre el ON reactivo y el

superóxido genera peroxinitrito ($ONOO^-$), que es un agente oxidante latente, el cual tiene varios efectos negativos como la oxidación y nitración de las proteínas [74,75]. La exposición al extracto de *Brunfelsia grandiflora* en diferentes concentraciones (10 - 1000 µg/mL) tuvo un efecto sobre la producción de ON en las células Caco-2. Los hallazgos de nuestro estudio mostraron que las células Caco-2 que se incubaron con el t-BOOH a una concentración de 200 µM aumentó los niveles de ON en un 85% con respecto a su control y las células Caco-2 que se incubaron durante 24 h con t-BOOH y el extracto de *Brunfelsia grandiflora* (10 – 1000 µg/mL), para probar el efecto protector contra el estrés oxidativo a través de la producción de ON mostraron una reducción significativa en la producción de ON. El extracto de *Brunfelsia grandiflora* (50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL) proporcionó una disminución significativa de los niveles de ON (25%, 34 %, 34 %, 42% y 45%, respectivamente) frente a la agresión celular provocada por t-BOOH (Fig. 4). Otros estudios desarrollados *in vivo* como los de O'Sullivan A. y colaboradores (2011) que evaluaron algas marinas irlandesas encontrando un mayor potencial antioxidante, del extracto etanolico al 80% de *Ascophyllum nodosum* (AN) basado en su capacidad para proteger contra la oxidación inducida por oxidantes[76] y los estudios realizados por Wang S. y colaboradores (2016) quienes estudiaron los efectos de un extracto fenólico de uva en células Caco-2, que protegió a las células Caco-2 contra el estrés oxidativo inducido por t-BOOH [77].

El estrés oxidativo se considera cada vez más como un importante componente en la cascada de señalización involucrada en muchas de las funciones celulares, como la proliferación celular, las respuestas inflamatorias y la estimulación de moléculas de adhesión, las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS/RNS) generadas endógenamente o en respuesta al estrés se han implicado durante mucho tiempo en la lesión tisular en el contexto de una variedad de estados patológicos por lo que puede causar la muerte celular por vías no fisiológicas (necróticas) o reguladas (apoptóticas) mediante cascadas de señalización.[78–81]. La vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa/proteína quinasa-B (PI3K/Akt) que es un regulador fisiológico/patológico predominante, que afecta a los estados apoptótico, oxidativo, autofágico e inflamatorio, esta vía modifica los niveles de transcripción del NF-κB (factor nuclear kappa-B) y, posteriormente, sus citoquinas proinflamatorias descendentes, como el TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa), la IL-1β (interleucina 1-β) y la IL-6 (interleucina 6), estos mediadores contribuyen al reclutamiento hepático y a la activación de células

inmunitarias, por ejemplo macrófagos y neutrófilos; más concretamente, las interleucinas contribuyen a la resistencia a la insulina y a niveles más graves de apoptosis e inflamación hepática; por lo tanto, la sobreexpresión de estos mediadores facilita la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico a esteatohepatitis no alcohólica y daños hepáticos histológicos[82–84]; este estudio encontró que la expresión celular de 4 genes (NFκB1, TNFα, IL1β, IL6); en células Caco-2 incubadas con t-BOOH hay un incremento de la expresión génica del NFκB1, TNFα , IL1β y IL6 en un 102%, 186%, 327% y 127% respecto al control y al ser tratadas conjuntamente con el extracto de *Brunfelsia grandiflora*, hay una disminución dependiente de la concentración, disminuyendo significativamente en los 4 genes a 200 μg/mL, en 3 genes (NFκB1, TNFα y IL1β) a 100μg/mL y en 2 genes (TNFα y IL1β) a 50 μg/mL, esta disminución se asemeja a los obtenido por Olejnik A. y colaboradores (2015) quienes evaluaron las posibles propiedades terapéuticas del extracto de fruta de *Sambucus nigra*, que investigaron sus efectos anti-inflamatorios en macrófagos RAW264.7 activados por lipopolisacáridos y la absorción transepitelial se simuló utilizando una monocapa de células Caco-2 similar a los enterocitos, imitando la barrera intestinal, encontrando que el extracto digerido gastrointestinal, transportado a través del epitelio intestinal, regulaba a la baja la expresión de los principales genes de la vía inflamatoria, como IL-1β, IL-6, TNF-α y COX-2. También se observó una reducción de la secreción de IL-6, TNF-α y prostaglandina E2 como resultado del tratamiento con macrófagos estimulados por LPS. Además, la producción mejorada de óxido nítrico en respuesta a estímulos inflamatorios en células RAW264.7 fue controlada por la fracción digerida y permeable intestinal del extracto de saúco[85]. La apoptosis es otra vía que se estimula a medida que aumentan los niveles de estrés oxidativo, después ocurre la apoptosis el cual juega un papel en la patogénesis de muchas enfermedades; la apoptosis es efectiva en la eliminación de células dañadas en el proceso normal, pero pueden ocurrir enfermedades patológicas si aumenta la gravedad de la apoptosis. Es así que, con el aumento de ROS, se van a activar genes proapoptóticos como NF-κB y TNF-α y se induce la apoptosis, los miembros de la familia de las caspasas son los factores más importantes en la apoptosis porque son principal o indirectamente responsables de todas las etapas de la apoptosis y la Caspasa-3, es el miembro más importante de la familia de las caspasas ya que determina la ubicación de las células entre la vida y la muerte. Otra vía eficaz en la apoptosis es la vía mitocondrial (intrínseca) caracterizada por niveles elevados de citocromo C, que se libera de las

mitocondrias al citoplasma acá la APAF-1 1 es el regulador clave de la caspasa en esta vía mientras que BAX promueve la apoptosis al destruir los factores de crecimiento[86–89]; este estudio encontró que la expresión celular de 3 genes (APAF-1, BAX y CASP-3) relacionados a la muerte celular; en células Caco-2 incubadas con t-BOOH hay un incremento de la expresión génica del APAF-1, BAX y CASP-3 en un 227%, 243% y < 237% respecto al control y al ser tratadas conjuntamente con el extracto de *Brunfelsia grandiflora*, hay una disminución dependiente de la concentración, disminuyendo significativamente en los 3 genes a 200 μg/mL, (APAF-1, BAX y CASP-3) y a 100 μg/mL en 2 genes (BAX y CASP-3) por lo que el extracto de *Brunfelsia grandiflora* disminuye la expresión de los genes al ser sometidos a estrés por el t-BOOH.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* tiene capacidad citoprotectora, anti-inflamatoria y anti-apoptótica frente al daño producido por t-BOOH en células intestinales Caco-2.
2. El extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* tiene capacidad citoprotectora, dosis dependiente (100 – 1000 µg/mL) para la viabilidad celular, frente a la actividad citotóxica producido por t-BOOH en células intestinales Caco-2.
3. El extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* presenta disminución de la producción de ROS y ON dosis dependiente ante el estrés oxidativo en células intestinales Caco-2.
4. El extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* presenta disminución de la expresión de los genes relacionados a la inflamación dosis dependiente ante la injuria ocasionada por t-BOOH en células intestinales Caco-2.
5. El extracto acuoso de *Brunfelsia grandiflora* presenta disminución de la expresión de los genes relacionados a la apoptosis dosis dependiente ante la injuria ocasionada por t-BOOH en células intestinales Caco-2.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. Vol. 6, Pharmacognosy Reviews. 2012. p. 1–5.

2. Kelly K. The History of Medicine: Early Civiliazations - Prehistoric Times to 500 C.E. 2009. 1–174 p.

3. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective. Vol. 7, Journal of HerbMed Pharmacology. Nickan Research Institute; 2018. p. 1–7.

4. Firenzuoli F, Gori L. Herbal medicine today: Clinical and research issues. In: Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2007. p. 37–40.

5. Polesna L, Polesny Z, Clavo MZ, Hansson A, Kokoska L. Ethnopharmacological inventory of plants used in Coronel Portillo Province of Ucayali Department, Peru. Pharm Biol. 2011 Feb;49(2):125–36.

6. Castro L. AJ, Júarez E. JR, Ramos C. NJ, Raez G. JE, Retuerto P. FO, Gonzales E. SA. Análisis estructural del extracto etanólico del tallo de. Cienc Invest. 2012;15(2):71–7.

7. Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Maximiliano JE, et al. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. Environ Int. 2020 Feb 1;135.

8. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986;89(2):271–7.

9. Lloyd HA, Fales HM, Goldman ME, Jerina DM, Plowman T, Schultes RE. Brunfelsamidine: a novel convulsant from the medicinal plant brunfelsia grandiflora. Tetrahedron Lett. 1985;26(22):2623–4.

10. Brunner G, Burger U, Castioni P, Kapetanidis I, Christen P. A novel acylated flavonol glycoside isolated from Brunfelsia grandiflora ssp. grandiflora. Structure elucidation by gradient accelerated NMR spectroscopy at 14T. Phytochem Anal.

2000;11(1):29–33.

11. Nordegren T. The A-Z Encyclopedia of Alcohol and Drug Abuse. Universal Publishers. 2002. 684 p.

12. Gilman EF. Brunfelsia grandiflora Yesterday, Today, and Tomorrow 1 [Internet]. Available from: http://edis.ifas.ufl.edu.

13. Post NM. No garden of Eden. ENR (Engineering News-Record). 1997;238(8):22–5.

14. Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. J Ethnopharmacol. 2005;99(2):309–12.

15. Fuchino H, Sekita S, Mori K, Kawahara N, Satake M, Kiuchi F. A new leishmanicidal saponin from Brunfelsia grandiflora. Chem Pharm Bull. 2008;56(1):93–6.

16. Ramos N, Juárez J, Castro A. Composición química, actividad antioxidante in vitro y evaluación cicatrizante in vivo del extracto metanólico de corteza de brunfelsia grandiflora D. Don "chiric sanango." 2012.

17. Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. J Ethnopharmacol. 2006;106(3):390–402.

18. Rojas CM. Evaluación de la actividad antioxidante y polifenoles totales en extractos de las hojas de tres especies de plantas medicinales de Campo Verde, Ucayali-2018. 2019;21–3.

19. Rengifo Salgado E. Las ramas floridas del bosque: experiencias en el manejo de plantas medicinales Amazónicas. Inst Investig la Amaz Peru. 2007;49–51.

20. Abadie RE, Medina O R, Ruiz L, Tresierra-Ayala A. Antibacterial activity of plant extracts against nosocomial strains, Iquitos-Peru. Rev ECIPerú. 2014;11:31–8.

21. Castro AJ, Juárez JR, Ramos NJ, Raez JE, Retuerto P FO, Gonzales SA. Structural analysis of ethanol extract of the stem of Brunfelsia grandiflora D. Don and its neuropathological effect on rat cerebellum. Vol. 15, Ciencia e Investigación. 2012.

22. Freshney RI. CultuFreshney, R. I. (2010). Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications. Wiley-Blackwell.re of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications. 2010. 732 p.

23. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J Natl Cancer Inst. 1977;58(2):209–14.

24. Varela Rodríguez L. PLANTA REGIONAL Rhus trilobata EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PLANTA REGIONAL Rhus trilobata EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE COLON CaCo- 2 .". UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIHUAHUA; 2013.

25. Shimizu M. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. Biosci Biotechnol Biochem. 2010;74(2):232–41.

26. Knipp GT, Ho NFH, Barsuhn CL, Borchardt RT. Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: Effect of pertubation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. J Pharm Sci. 1997;86(10):1105–10.

27. Tang AS, Chikhale PJ, Shah PK, Borchardt RT. Utilization of a Human Intestinal Epithelial Cell Culture System (Caco-2) for Evaluating Cytoprotective Agents. Pharm Res [Internet]. 1993;10(11):1620–1626. Available from: https://doi.org/10.1023/A:1018976804403

28. Sakuma S, Abe M, Kohda T, Fujimoto Y. Hydrogen peroxide generated by xanthine/xanthine oxidase system represses the proliferation of colorectal cancer cell line Caco-2. J Clin Biochem Nutr. 2015;56(1):15–9.

29. Gorlach S, Wagner W, Podsędek A, Sosnowska D, Dastych J, Koziolkiewicz M. Polyphenols from evening primrose (Oenothera paradoxa) defatted seeds induce apoptosis in human colon cancer caco-2 cells. J Agric Food Chem. 2011;59(13):6985–97.

30. Dinicola S, Mariggiò MA, Morabito C, Guarnieri S, Cucina A, Pasqualato A, et al. Grape seed extract triggers apoptosis in Caco-2 human colon cancer cells through reactive oxygen species and calcium increase: Extracellular signal-regulated kinase involvement. Br J Nutr. 2013;110(5):797–809.

31. Tan Y, Qi J, Lu Y, Hu F, Yin Z, Wu W. Lecithin in mixed micelles attenuates the cytotoxicity of bile salts in Caco-2 cells. Toxicol Vitr. 2013;27(2):714–20.

32. Martínez MA, Ares I, Martínez M, Lopez-Torres B, Rodríguez JL, Maximiliano JE, et al. Protective effects of culture extracts (CB08035-SCA and CB08035-SYP) from Marinobacter hydrocarbonoclasticus (strain CB08035) against oxidant-induced stress in human colon carcinoma Caco-2 cells. Food Chem Toxicol. 2020 Nov 1;145.

33. Ordóñez Vásquez A, Gómez LJ, Ibata M, Suárez-Obando F. Técnica de Tinta China en células adherentes en cultivo China ink in adherents ceil in culture Artículo original producto de La investigación. 2016;1–4.

34. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol. 2005;100(1–2):72–9.

35. Patricia C, Camacho C, Ancizar F, Gutierrez A. Evaluacion preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales , empleando rnetodos colorirnetricos In vitro preliminary cytotoxicity testing of vegetal extracts , using colorimetric methods. Rev Colomb Biotecnol. 2003;4(1):100–6.

36. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1–2):55–63.

37. Castro Diaz SL. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana. 2006. Available from: http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis75.pdf

38. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. J Immunol Methods. 1990;131(2):165–72.

39. Brescia P, Banks P. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch ™ Microplate Spectrophotometer [Internet]. BioTek. 2009. p. 3. Available from: https://www.biotek.com

40. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on

cell death. Cell Death Differ. 2005;12:1463–7.

41. Duprez L, Wirawan E, Berghe T Vanden, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. Microbes Infect [Internet]. 2009;11(13):1050–62. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013

42. Penaloza C, Lin L, Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in development: Shaping the embryo. Histochem Cell Biol. 2006;126(2):149–58.

43. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495–516.

44. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. F1000Research. 2020;9:1–12.

45. Hetts SW. To Die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. Jama. 1998;279(4):300–7.

46. Twu C, Liu NQ, Popik W, Bukrinsky M, Sayre J, Roberts J, et al. Cardiomyocytes undergo apoptosis in human immunodeficiency virus cardiomyopathy through mitochondrion- and death receptor-controlled pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(22):14386–91.

47. Friedlander RM. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. N Engl J Med. 2003;348(14):1365–75.

48. Kerr JFR, Wyllie AH, Currier AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. Br J Cancer [Internet]. 1972;26(4):239–57. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2008650/

49. Krysko D V., Vandenabeele P. From regulation of dying cell engulfment to development of anti-cancer therapy. Cell Death Differ. 2008;15(1):29–38.

50. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. Nat Rev Immunol. 2008;8(1):59–73.

51. Zampieri C, Ganini C, Melino G. The biochemistry of cell death. Cell Death Dis [Internet]. 2020;11(4):10–2. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-2465-5

52. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 Protease Donald W. Nicholson3, Guy Salvesen4, Nomenclature. Cell [Internet]. 1996;87(171). Available from: https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81334-3

53. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. Trends Biochem Sci. 1997;22(8):299–306.

54. Iwata A, Nishio K, Winn RK, Chi EY, Henderson WR, Harlan JM. A Broad-Spectrum Caspase Inhibitor Attenuates Allergic Airway Inflammation in Murine Asthma Model. J Immunol. 2003;170(6):3386–91.

55. García M, Vecino E. Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. Arch Soc Esp Oftalmol [Internet]. 2012 [cited 2022 Nov 19];87(2):35–7. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-66912003000700004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

56. Ugaz OL De. Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda. Universidad FE de la P, Perú C del, editors. Lima; 1994.

57. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Radic Biol Med. 1999;27(5–6):612–6.

58. Barrios-Arpi L, Arias Y, Lopez-Torres B, Ramos-Gonzalez M, Ticli G, Prosperi E, et al. In Vitro Neurotoxicity of Flumethrin Pyrethroid on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Apoptosis Associated with Oxidative Stress. Toxics. 2022;10(3):1–15.

59. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.

60. Martínez MA, Lopez-Torres B, Rodríguez JL, Martínez M, Maximiliano JE, Martínez-Larrañaga MR, et al. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of Type II pyrethroids cyfluthrin and alpha-cypermethrin in SH-SY5Y cells. Food Chem Toxicol [Internet]. 2020;137(January):111173. Available from: https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111173

61. Anwar T, Qureshi H, Parveen N, Bashir R, Qaisar U, Munazir M, et al. Evaluation of bioherbicidal potential of carica papaya leaves. Brazilian J Biol. 2020;80(3):565–73.

62. Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Grupta A. Phytochemistry of medicinal plants. Med Plants Cent Asia Uzb Kyrg. 2013;1(6):13–4.

63. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. Plants. 2017;6(4).

64. Kamal Y, Khan T, Haq I, Zahra SS, Asim MH, Shahzadi I, et al. Phytochemical and biological attributes of Bauhinia variegata L. (Caesalpiniaceae). Brazilian J Biol. 2022;82:1–10.

65. Quico E. EFECTO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA CORTEZA DE Brunfelsia grandiflora (CHIRIC SANANGO) SOBRE LA ARTRITIS INDUCIDA A RATAS ALBINAS [Internet]. UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA; 2019. Available from: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/5909/TESIS_AYLLON AMASIFUEN.PDF?sequence=1&isAllowed=y

66. Mateos R, Ramos-Cevallos N, Castro-Luna A, Ramos-Gonzalez M, Clavo ZM, Quispe-Solano M, et al. Identification, Quantification, and Characterization of the Phenolic Fraction of Brunfelsia grandiflora: In Vitro Antioxidant Capacity. Molecules. 2022;27(19):1–14.

67. Vinken M, Rogiers V. Protocols in in vitro hepatocyte research. Protoc Vitr Hepatocyte Res. 2015;1250:1–390.

68. Martínez MA, Ares I, Martínez M, Lopez-Torres B, Maximiliano JE, Rodríguez JL, et al. Brown marine algae Gongolaria baccata extract protects Caco-2 cells from oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. Food Chem Toxicol. 2021;156(July).

69. Ferreira SS, Martins-gomes C, Nunes FM, Silva M. Elderberry (Sambucus nigra L .) extracts promote anti-inflammatory and cellular antioxidant activity. Food Chem X. 2022;15(August).

70. Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondys SC. Evaluation of the Probe 2‘,7‘-Dichiorofluorescin as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. Chem Res Toxicol. 1992;5:227–31.

71. Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang C. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. Front Physiol. 2018;9(May):1–14.

72. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Review Article Oxidative Stress : Harms and Benefits for Human Health. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017.

73. Zheng F, Gonçalves FM, Abiko Y, Li H, Aschner M, Kumagai Y. Redox Biology Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. Redox Biol [Internet]. 2020;34(February). Available from: https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101475

74. Patel RP, Mcandrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. Biochim Biophys Acta [Internet]. 1999;1411:385–400. Available from: https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00028-6

75. Mandal M, Sarkar M, Khan A, Biswas M, Masi A, Rakwal R, et al. Advances in Redox Research Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) in plants – maintenance of structural individuality and functional blend. Adv Redox Res [Internet]. 2022;5(June). Available from: https://doi.org/10.1016/j.arres.2022.100039

76. Sullivan AMO, Callaghan YCO, Gr MNO, Ha M, Kerry JP, Brien NMO. The effect of solv ents on the antio xidant acti vity in Caco-2 cells of Ir ish br own sea weed extr acts pr epar ed using acceler ated solv ent extr action (ASE â). 2013;5.

77. Bravo L, Wang S, Mateos R, Goya L, Sarri B. A phenolic extract from grape by-products and its main hydroxybenzoic acids protect Caco-2 cells against pro-oxidant induced toxicity. Food Chem Toxicol. 2016;88:65–74.

78. Feng Q, Kumagai T, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T, Uchida K. Anticarcinogenic Antioxidants As Inhibitors Against Intracellular Oxidative Stress. Free Radic Res [Internet]. 2001;35:779–88. Available from:

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11811529/

79. Liebert MA, Ryter SW, Kim HPYO, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, et al. Comprehensive Invited Review. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2007;9(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17115887/

80. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress , cell cycle , and neurodegeneration. Redox Signal Biol Dis. 2003;111(6):785–93.

81. Zhao Y, Forst C V, Sayegh CE, Wang I, Yang X, Zhang B. Molecular BioSystems in major human diseases †. Mol Biosyst [Internet]. 2016; Available from: http://dx.doi.org/10.1039/C6MB00240D

82. Wang M, Zhang J, Gong N. Role of the PI3K / Akt signaling pathway in liver ischemia reperfusion injury : a narrative review. Ann Palliat Med. 2022;11(2):806–17.

83. Srinivas AN, Suresh D, Santhekadur PK, Suvarna D, Riva A. Extracellular Vesicles as In fl ammatory Drivers in NAFLD. Front Immunol. 2021;11(February):1–8.

84. Luci C, Bourinet M, Leclère PS, Anty R, Gual P. Chronic In fl ammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis : Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11(December):1–14.

85. Olejnik A, Kowalska K, Olkowicz M, Rychlik J, Juzwa W, Myszka K. Anti-inflammatory effects of gastrointestinal digested Sambucus nigra L . fruit extract analysed in co-cultured intestinal epithelial cells and lipopolysaccharide-stimulated macrophages. J Funct Foods. 2015;19:649–60.

86. Caglayan C, Kandemir FM, Darendelioğlu E, Yıldırım S, Kucukler S, Dortbudak MB. Rutin ameliorates mercuric chloride-induced hepatotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. J Trace Elem Med Biol. 2019;56(July):60–8.

87. Chen J, Chen D, Li J, Liu Y, Gu X, Teng X. Cadmium-induced Oxidative Stress and Immunosuppression Mediated Mitochondrial Apoptosis via JNK-FoxO3a-PUMA pathway in Common Carp (Cyprinus carpio L.) Gills. Aquat Toxicol

[Internet]. 2021;233(October 2020):105775. Available from: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105775

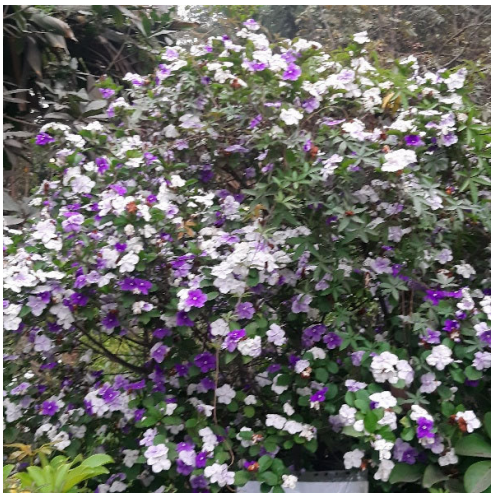
88. Toshiyuki M, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell. 1995;80(2):293–9.

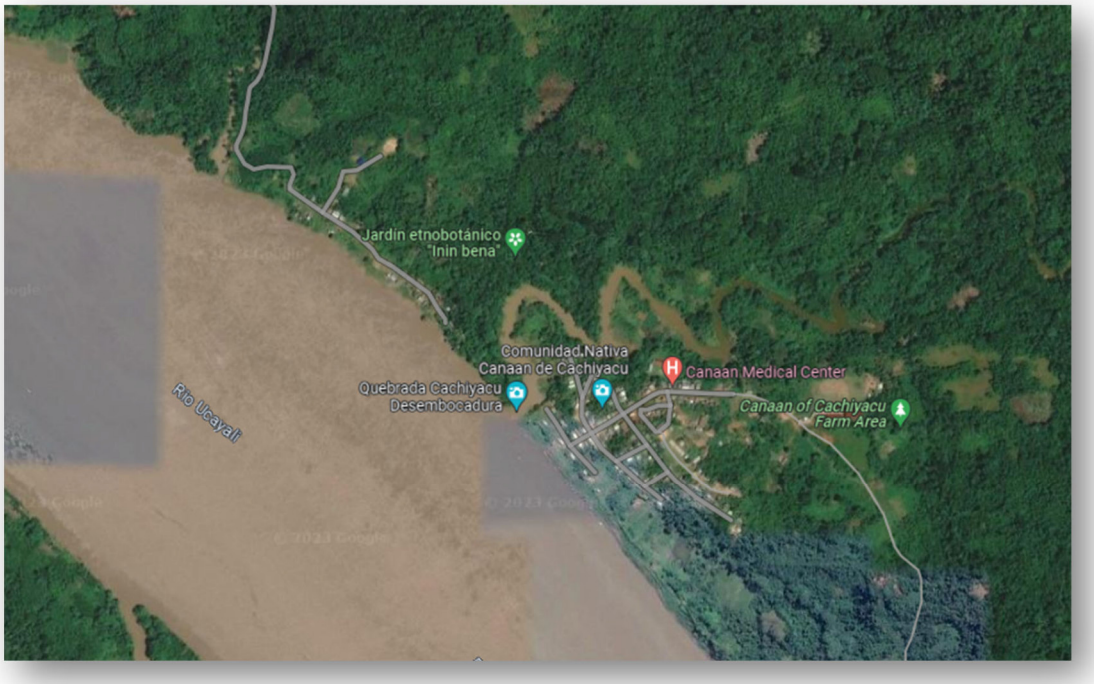
89. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(4):1–28.

CAPÍTULO VIII. ANEXOS

ANEXO 1: UBICACIÓN LA COMUNIDAD NATIVA DE CANAÁN DE CACHIYACÚ UBICADO EN EL DISTRITO DE CONTAMANA

Distrito :	Contamana
Provincia :	Ucayali
Región :	Loreto
Ubigeo :	160601
Latitud Sur :	7° 21' 30.1" S (-7.35835740000)
Longitud Oeste :	74° 58' 46.7" W (-74.97962501000)
Altitud :	167 m s. n. m.
Huso horario :	UTC-5





Fuente: Elaboración propia

ANEXO 2: CONSTANCIA DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL UNMSM

CONSTANCIA N° 046-USM-NHM-2022

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

CONSTANCIA Nº046-USM-NHN-2022

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama fértil), recibida de: **Leonardo Jesús GIRALDO BARDALAMA ,** estudiante de postgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Brunfelsia grandiflora*** D.Don.; y tiene la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016):

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Brunfelsia*

ESPECIE: *Brunfelsia grandiflora* D.Don.

Nombre vulgar: "chiric sanango".
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 08 de junio 2022

Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

MUSEO DE HISTORIA NATURAL - JEFE - Herbario San Marcos - USM

JAC/ddb

ANEXO 3: OBTENCION DEL EXTRACTO DE *Brunfelsia grandiflora*





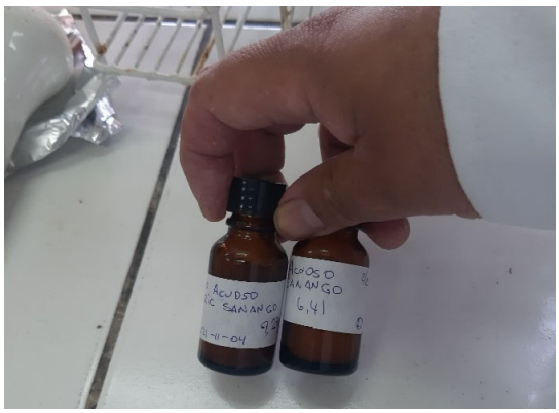












ANEXO 4: EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE *Brunfelsia grandiflora* CON CÉLULAS Caco-2

