



EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA PERSEA CAERULEA  
(RUIZ & PAV.) MEZ, Y SU ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE A  
ARTRITIS REUMATOIDE INDUCIDA EN RATAS LEWIS.

EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY OF PERSEA CAERULEA (RUIZ &  
PAV.) MEZ, AND ITS ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY AGAINST  
INDUCED RHEUMATOID ARTHRITIS IN LEWIS RATS.

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO  
CIRUJANO

AUTORES

ALEXANDER CORDERO CAMPOS

KARINA ALEJANDRA CHIN WU

LINDA MAYRA TARAZONA PEREZ

ASESORES

ABRAHAM JAIME VAISBERG WOLACH

JESUS ANGEL DE LA CRUZ MORON

CO-ASESORES

LEON FAUSTINO VILLEGAS VILCHEZ

ARCADIO IVAN LOZADA REQUENA

WILFREDO MORMONTOY LAUREL

KETTY VERONICA DOLORES CERNA

LIMA - PERÚ

2024



## **MIEMBROS DEL JURADO**

Presidente: Alfredo Enrique Berrocal Kasay

Vocal: Jesus Humberto Tamariz Ortiz

Secretario: Wendy Guisela Sotelo Diaz

Fecha de Sustentación: 08 de marzo de 2024

Calificación: Aprobado

## **ASESORES DE LA TESIS**

### **Abraham Vaisberg Wolach**

PhD. Biología en Brandeis University

Profesor emérito de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

ORCID: 0000-0003-1487-7770

### **Jesus Angel de la Cruz Moron**

Médico internista del Hospital Cayetano Heredia

Docente contratado de la Facultad de Medicina de la Universidad Peruana

Cayetano Heredia

ORCID: 0009-0009-4718-391X

## **CO-ASESORES**

### **Leon Faustino Villegas Vilchez**

Servicio de Control de Calidad - Laboratorios de Investigación y Desarrollo

ORCID: 0000-0001-6030-2877

### **Arcadio Ivan Lozada Requena**

Laboratorio de Inmunología - Laboratorios de Investigación y Desarrollo

ORCID: 0000-0002-3615-8964

### **Wilfredo Mormontoy Laurel**

Docente cesante de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

ORCID: 0000-0002-7461-9493

**Ketty Veronica Dolores Cerna**

Departamento Académico de Estadística, Demografía, Humanidades y Ciencias

Sociales - Facultad de Ciencias e Ingeniería

ORCID: 0000-0002-4369-8731

### **Dedicatoria**

Dedicado con mucho cariño a nuestros padres y abuelos, por su apoyo incondicional durante la realización del proyecto en plena pandemia del COVID-19, antes de la llegada de las vacunas.

### **Agradecimiento**

Agradecemos el apoyo que brindaron nuestros asesores desde la elaboración del protocolo de investigación, las facilidades recibidas durante la ejecución y las críticas constructivas para establecer la versión final del manuscrito. Asimismo, agradecemos a la familia Tejada-Reátegui por el apoyo económico que hemos recibido de su parte.

### **Fuentes de financiamiento**

El presente trabajo de investigación recibió financiación de la beca anual de medicina “Francisco Tejada y Semirramis Reátegui” en el 2018.

### **Declaración de conflicto de interés**

Todos los investigadores del presente trabajo negamos cualquier tipo de conflicto de interés.

## Resultado del informe de similitud

### EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LA PERSEA CAERULEA (RUIZ & PAV.) MEZ, Y SU ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA FRENTE A ARTRITIS REUMATOIDE INDUCIDA EN RATAS LEWIS

#### ORIGINALITY REPORT

**14%**

SIMILARITY INDEX

**13%**

INTERNET SOURCES

**4%**

PUBLICATIONS

**3%**

STUDENT PAPERS

#### PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<b>Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia</b> Student Paper	<b>1%</b>
<b>2</b>	<b>docplayer.es</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>idoc.pub</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>hdl.handle.net</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>www.researchgate.net</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>patents.google.com</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>7</b>	<b>www.sabiia.cnptia.embrapa.br</b> Internet Source	<b>1%</b>
<b>8</b>	<b>www.bdigital.unal.edu.co</b> Internet Source	<b>1%</b>

## **TABLA DE CONTENIDOS**

**RESUMEN**

**SUMMARY**

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>6</b>
<b>IV.RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>23</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>
<b>VIII. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS.....</b>	<b>30</b>

**ANEXOS**

## RESUMEN

**Antecedentes:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que causa daño articular y discapacidad. La *Persea caerulea*, planta utilizada en medicina tradicional peruana, podría tener efectos antiinflamatorios debido a sus flavonoides. **Objetivos:** Evaluar la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *P.*

*caerulea* y su actividad antiinflamatoria en ratas Lewis con AR. **Materiales y**

**métodos:** Se determinó la citotoxicidad de *P. caerulea* en células 3T3, Vero, DU145 y SH-SY5Y mediante su IC50. Treinta ratas Lewis se dividieron en seis grupos, cinco con AR inducida y tres de control. Tres grupos recibieron *P. caerulea* (250, 500 y 1000 mg/Kg) durante 42 días. Se evaluaron con scores de inflamación y grosor de patas. La histología y niveles de TNF-alfa se examinaron post-mortem.

**Resultados:** Los IC50 promedio fueron 60, 130, 194 y 20 µg/mL en 3T3, VERO, DU145 y SH-SY5Y, respectivamente. Los grupos tratados con 500 y 1000 mg/kg de *P. caerulea* presentaron mayor grosor articular ( $p < 0.05$ ), sin cambios significativos en el score de inflamación. Hubo más inflamación sinovial en ratas con 250 y 500 mg/kg de *P. caerulea* y más erosión ósea en ratas con 500 y 1000 mg/kg ( $p < 0.05$ ) en comparación con el grupo placebo. **Conclusión:** El extracto a  $\leq 250$  mg/mL no fue citotóxico para las líneas celulares. Mostró efectos antiinflamatorios en la primera semana, pero agrava la enfermedad posterior a esta.

Se necesitan más estudios para evaluar su efecto antiinflamatorio a corto plazo.

**Palabras clave:** Antiinflamatorio, Artritis Reumatoide, Caerulea, Citotoxicidad, Persea.

## ABSTRACT

**Background:** Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that causes joint damage and disability. *Persea caerulea*, a plant used in traditional Peruvian medicine, may have anti-inflammatory effects due to its flavonoids. **Objectives:** To evaluate the cytotoxicity of the hydroalcoholic extract of *P. caerulea* and its anti-inflammatory activity in Lewis rats with RA. **Materials and Methods:** The cytotoxicity of *P. caerulea* was determined on 3T3, Vero, DU145, and SH-SY5Y cells by its IC<sub>50</sub>. Thirty Lewis rats were divided into six groups, five with induced RA and three controls. Three groups received *P. caerulea* (250, 500, and 1000 mg/kg) for 42 days. They were evaluated with inflammation scores and leg thickness. Histology and TNF-alpha levels were examined post-mortem. **Results:** The average IC<sub>50</sub> values were 60, 130, 194, and 20 µg/mL in 3T3, VERO, DU145, and SH-SY5Y, respectively. Groups treated with 500 and 1000 mg/kg of *P. caerulea* showed increased joint thickness (p<0.05), with no significant changes in the inflammation score. There was more synovial inflammation in rats with 250 and 500 mg/kg of *P. caerulea* and more bone erosion in rats with 500 and 1000 mg/kg (p<0.05) compared to the placebo group. **Conclusion:** The extract at ≤ 250 mg/mL was not cytotoxic to the cell lines. It showed anti-inflammatory effects in the first week but aggravated the disease thereafter. Further studies are needed to evaluate its short-term anti-inflammatory effect.

**Keywords:** Anti-inflammatory, Rheumatoid Arthritis, Caerulea, Cytotoxicity, Persea

## **I. INTRODUCCIÓN**

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, autoinmune e inflamatoria que afecta a las articulaciones de las extremidades, destruyendo progresivamente cartílago y hueso, generando dolor y discapacidad. (1-3) También puede afectar al sistema nervioso y otros órganos como el corazón, pulmón y ojo, así como a los vasos sanguíneos. (4,5) Está ligada a factores ambientales como el tabaco y algunas infecciones, que inducen la modificación enzimática de proteínas propias; también se complementa con la predisposición genética para la enfermedad, pues genera el fallo en la tolerancia de las modificaciones de estas proteínas o epítopes. (1,5) Afecta al 0,3-1,2% de la población mundial, siendo más frecuente en mujeres mayores a 60 años. (6,7) Un estudio del 2007 determinó que la prevalencia era del 0,51% en un área urbana marginal. (8)

Uno de los problemas con esta patología es el costo elevado del tratamiento y el impacto que tiene la enfermedad en la calidad de vida. (9) Además, el tratamiento farmacológico presenta efectos secundarios como aumento de riesgo de osteoporosis, fracturas, hemorragia gastrointestinal, úlceras pépticas, entre otros que se detallan más adelante. (10) Uno de los pilares del tratamiento son los antiinflamatorios no esteroideos cuyo mayor efecto es la disminución del dolor y mejorar la funcionalidad de los pacientes, sin embargo la monoterapia de esta clase de medicamentos no altera el curso de la enfermedad. Debido a que son necesarias dosis de antiinflamatorios no esteroideos más altas de lo normal tiende a generar erosiones, úlceras y sangrado gastrointestinal, además altera la función renal y aumenta la presión arterial. (11)

Los corticoides forman parte del tratamiento en la AR debido a su efecto antiinflamatorio e inmunorregulador, y son útiles en la fase temprana de la enfermedad mientras se espera el efecto de los Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad. Los efectos adversos incluyen: facies cushingoide que desarrollan los pacientes, aumento de peso, aumento de la presión arterial y de los niveles de glucosa en sangre. También se ha asociado osteoporosis acelerada a dosis bajas de corticoides como prednisona a 10 mg por día. (11)

El tercer pilar del tratamiento son los Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad cuya función es alterar el curso de la enfermedad y se inicia cuando el diagnóstico es confirmado. La primera línea de Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad es el Metotrexate cuyos efectos adversos incluyen la cirrosis hepática, neumonitis intersticial y deficiencia de ácido fólico. La sulfasalazina es otro Fármaco Antirreumático Modificador de la Enfermedad, aunque es menos efectiva que el Metotrexate, reduce la sintomatología y enlentece el daño evidenciado a nivel radiográfico; además se ha evidenciado cierta predisposición a la hemólisis en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato. Otro Fármaco Antirreumático Modificador de la Enfermedad de la terapia triple con metotrexato y sulfalazina es la hidroxiclороquina, cuyo efecto adverso es la toxicidad ocular. (11)

En las últimas décadas se han aprobado Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad biológicos como el Infliximab y Adalimumab cuya función es neutralizar la actividad del factor de necrosis tumoral alfa, una citoquina proinflamatoria que está envuelta en el daño y destrucción articular. Los efectos adversos de estos antagonistas del factor de necrosis tumoral alfa es el aumento de

riesgo de infecciones respiratorias, infecciones urinarias y de la piel, así como la reactivación de tuberculosis latente. (11)

Otra opción de tratamiento es el Rituximab, cuyo mecanismo se basa en la depleción rápida y sostenida de linfocitos B, células especializadas en secretar citoquinas y diferenciarse en células plasmáticas para formar anticuerpos, lo que genera mejoría en pacientes cuyo manejo con antagonistas de TNF-alfa ha fracasado. Debido a su efecto inmunomodulador, hace que los pacientes sean susceptibles a infecciones y/o reactivar infecciones virales como la Hepatitis B. (11)

En Perú se han reportado diversas plantas usadas en la medicina tradicional con propiedades antiinflamatorias, lo que demuestra que la mayoría podría no tener un efecto placebo. (12-14) Sin embargo, se necesitaría realizar estudios para demostrar su actividad.

Las plantas del género *Persea*, están distribuidas en Mesoamérica, América del Sur y el Sudeste Asiático. En la medicina tradicional, se usan los miembros de este género como tratamiento contra la diarrea, enfermedades infecciosas e hipertensión; también como analgésico gástrico y antiinflamatorio. (15) Entre las especies que conforman este género, la *Persea americana* es la más conocida por su uso culinario.

Otra especie no tan conocida es la *Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez, cuya distribución está principalmente en Colombia, Bolivia, Ecuador, Perú y Venezuela. (14) Esta planta, conocida coloquialmente como “pumapara” o “aguacatillo”, es una planta utilizada en la medicina tradicional en norte del Perú. (15,16) Se ha determinado que tiene compuestos como los flavonoides, los cuales se han asociado con actividad antiinflamatoria. (15) Se ha determinado que la quercetina, uno de

sus flavonoides, inhibe la activación de neutrófilos, proliferación de sinoviocitos y la angiogénesis. (15,17,18)

Estos datos evidencian que sus componentes antiinflamatorios pueden servir para tratar la AR. Sin embargo, se necesitan estudios para demostrar que el extracto de la planta presenta tales efectos; por este motivo se plantea como objetivo del presente estudio la evaluación de la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la *Persea caerulea*, así como su actividad antiinflamatoria en ratas Lewis.

## **II. OBJETIVOS**

### General

- Evaluar la Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la Persea caerulea.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de la Persea caerulea en ratas Lewis.

### Específico

- Determinar el CI50 en líneas celulares de BALB/c 3T3, Vero y DU145.
- Comparar el proceso antiinflamatorio entre los grupos de ratas que fueron suministrados con el extracto de la planta en distintas concentraciones y también con respecto a los grupos control.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Aspectos éticos

Se asistió a una capacitación ofrecida por la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) donde nos presentaron los formatos requeridos para la aprobación por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales (CIEA), el cual otorgó su aprobación para la realización de la investigación en ratas Lewis, asimismo se solicitó un permiso por el Servicio Nacional Forestal (SERFOR) quienes mediante la resolución N° 361-2019-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS otorgó el permiso de colecta y consideraron que el proyecto no contempla la obtención ni utilización de recursos genéticos y sus derivados por lo que no enmarca un procedimiento para acceder a estos.

#### Colección de planta

La muestra de *Persea caerulea* fue recolectada en el Caserío Balsas – Choloque del Distrito de Santa Cruz de Cutervo (altitud 1, 606 msnm), Departamento de Cajamarca. Se recolectaron la corteza y la parte terminal de las ramas, la cual incluyó: flor, hojas y fruto; las cuales fueron transportadas a Lima para ser identificadas taxonómicamente por el Laboratorio de Dendrología y Herbario Forestal de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y la facultad de ciencias y filosofía, “Alberto Cazorla Talleri” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH); quienes lo avalaron mediante una constancia.

#### Extracción hidroalcohólica

Las muestras de corteza de *P. caerulea* fueron secadas a temperatura ambiente durante un período de 10 días en un entorno aislado, sin exposición directa a la luz solar. Luego, se pulverizaron y maceraron en alcohol al 80% durante 7 días. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a eliminar el solvente mediante destilación utilizando un rotavapor a 30 rpm a 55 °C al vacío. A continuación, el residuo resultante se mezcló con Dimetilsulfóxido al 100% para obtener una solución concentrada de 50 mg/mL. (19)

### Líneas celulares

Se evaluó la citotoxicidad in vitro del extracto hidroalcohólico crudo de *Persea caerulea* Ruiz & Pav. Mez sobre líneas celulares BALB/C 3T3 (fibroblastos normales de embrión de ratón BALB/c), Vero (células de riñón de mono verde africano), DU145 (carcinoma de próstata humano) y SH-SY5Y (neuroblastoma) proporcionadas por el LID-UPCH. Para ello se usaron dos placas de 96 pozos bajo la siguiente distribución:

- Placa 0: conteniendo una fila (12 pozos) de cada una de las líneas celulares.
- Placa 1:
  - Dos columnas fueron usadas como control de crecimiento del 100% de células.
  - Dos columnas fueron usadas como control positivo al que se añadió 5-flúor uracilo, una sustancia citotóxica.
  - Tres columnas en las cuales se añadió el extracto a concentración inicial de 250 µg/mL.

### Evaluación de la citotoxicidad

Las células fueron inoculadas en placas de cultivo de 96 pozos e incubadas por 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire para permitir la fijación de las células a las placas. Posteriormente, la placa 0, conteniendo cada una de las líneas celulares se fijó in situ con ácido tricloroacético para obtener luego los valores de las células a tiempo cero, antes de añadir los extractos. Después, la placa 1 recibió diluciones seriadas del extracto en estudio o del solvente utilizado, en este caso dimetilsulfóxido, y fueron incubadas por 48 horas adicionales. (Tabla 1) Aquellas que recibieron solo el solvente en el que fueron disueltos los extractos fueron los controles de crecimiento 100%. El ensayo se detuvo añadiendo ácido tricloroacético a las placas.

Las células fueron fijadas con ácido tricloroacético y se tiñeron por 20 minutos con una solución Sulforodamina B al 0.4% en ácido acético al 1%. La Sulforodamina B no unido a proteínas se removió lavando con ácido acético al 1%. Luego de secar las placas, la Sulforodamina B unido a las proteínas fue solubilizado con una solución de 10 mM de Tris base (pH 10.5) y se leyó la absorbancia a 510 nm en una lectora de microplacas. La concentración inhibitoria de crecimiento 50 (IC<sub>50</sub>) se determinó a partir del análisis de la regresión lineal en un archivo de Excel 2019.

(20)

### Manejo de animales

30 ratas Lewis de 2 meses de edad fueron adquiridas de la Unidad del Bioterio del LID de la UPCH y se aclimataron en el laboratorio a una temperatura de 22°C con libre acceso al alimento y agua.

Las ratas se distribuyeron en 6 grupos equitativamente:

- Grupo control 1: ratas sin Artritis Reumatoide suministradas con Carboximetilcelulosa 5%
- Grupo control 2: ratas con Artritis Reumatoide suministradas 1 ml/kg Carboximetilcelulosa al 5%
- Grupo control 3: ratas con Artritis Reumatoide suministradas con 0.2 mg/kg de Metotrexato, 2 veces por semana
- Grupo 4: ratas con Artritis Reumatoide suministradas con el extracto vía oral en dosis de 250 mg/kg
- Grupo 5: ratas con Artritis Reumatoide suministradas con el extracto vía oral en dosis de 500 mg/kg
- Grupo 6: ratas con Artritis Reumatoide suministradas con el extracto vía oral en dosis de 1000 mg/kg

El tratamiento fue administrado a través de sondas nasogástricas por 41 días.

#### Inducción de artritis reumatoide por colágeno

Las ratas Lewis muestran una respuesta autoinmune inducida por la administración de colágeno tipo II disuelto en Adyuvante Incompleto de Freund, lo que resulta en la activación de linfocitos T específicos para el colágeno tipo II y la producción elevada de anticuerpos dirigidos tanto contra el colágeno tipo II como contra el autoantígeno correspondiente. (21) La predisposición de este modelo animal al desarrollo de la artritis reumatoide (AR), similar a la observada en humanos, está vinculada a la expresión molecular del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II). (22) Para la inducción de AR, se usó 5 mg de colágeno bovino tipo II

en 5 ml Ácido acético 0,01 M, conservado a -20°C y emulsionado con Adyuvante Incompleto de Freund en partes iguales. El proceso se realizó en una cama de hielo para evitar la degradación de los reactivos. Las ratas fueron inoculadas con 3 dosis seguidas de 100 uL de emulsión en la base de la cola. (23)

#### Evaluación de parámetros físicos

Se realizó un control del peso de las ratas usando una balanza digital. La inflamación de las articulaciones fue evaluada a través de la medición de las patas con la ayuda de un Vrenier y un puntaje según el score de inflamación como se observa en el anexo 1. (24)

#### Colección de muestras sanguíneas

La recolección de la muestra sanguínea se obtuvo mediante punción cardiaca; la cual se realizó posterior a la administración de 3 mL/kg de ketamina/xilacina vía intraperitoneal antes de proceder a la apertura del abdomen y la caja torácica, removiendo el esternón para obtener acceso al corazón. La muestra obtenida fue colocada en tubos con EDTA para evitar la coagulación.

#### Colección de articulaciones

La recolección de las articulaciones se realizó mediante el corte de los huesos más alejados de la articulación objetivo para evitar alteraciones, en el caso de las patas traseras se procedió a cortar el fémur; en las delanteras, el húmero. Fueron recolectadas las 4 extremidades de los ratones para luego ser almacenadas en formol.

### Obtención del plasma

Los tubos con muestras sanguíneas fueron centrifugados a 3600 rpm por 20 minutos en una centrifugadora. Posteriormente se separó el plasma usando pipetas estériles y fueron colocados en tubos eppendorf para ser almacenados en una refrigeradora a -20 °C hasta su uso.

### Evaluación de TNF-alfa

Para la evaluación de la TNF-alfa se usó el kit BD Rat TNF Flex Set en conjunto con el kit BD CBA Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit. Estos kits permiten determinar cuantitativamente la concentración de TNF-alfa en muestras de suero de ratas.

### Preparación de la curva estándar para TNF-alfa

Primero se prepararon los estándares, los que se deben correr junto con las muestras problema, que fueron reconstituidos con 4 mL de diluyente de ensayo y posteriormente se realizaron diluciones seriadas (desde 1/2 a 1/256 o su equivalente desde 5000 ng/mL a 40 pg/mL).

### Preparación de los Beads de captura para TNF-alfa

Se determinó el número de muestras a ser ejecutadas en el experimento. Luego, cada vial se mezcló con el bead de captura durante 15 segundos. Posteriormente, se calculó el volumen total de beads diluidos requeridos para el experimento. Cada tubo necesitó 50 µL de beads diluidos, por lo que la cantidad de muestras multiplicada por este volumen representa la cantidad utilizada de beads de captura.

### Preparación del reactivo de detección de TNF-alfa y procedimiento de citometría

Se determinó el número de muestras a ser corridas incluyendo los estándares. Por cada muestra se requirieron 50 uL del reactivo de detección por lo que el volumen total fue el resultado de multiplicar 50 uL por todas las muestras. De la misma forma se determinó el volumen del diluyente del reactivo de detección necesario para ser agregado.

Se añadieron 50 µL de las diluciones estándar a los primeros 10 tubos de citometría, abarcando desde el estándar de 0 pg/mL hasta el estándar de 10000 pg/mL. Posteriormente, se incorporaron 50 µL de cada muestra de suero del animal en los tubos correspondientes, debidamente etiquetados. Los beads de captura fueron mezclados y se añadieron 50 µL a todos los tubos de citometría. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 50 µL del reactivo de detección a todos los tubos de citometría, seguido de una segunda incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Para la posterior preparación, se añadió 1 mL de buffer de lavado a cada tubo de citometría, los cuales fueron centrifugados a 1200 rpm durante 5 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se aspiró el sobrenadante de cada tubo, seguido de la adición de 300 µL de buffer de lavado a cada uno. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACS Calibur BD Biosciences, utilizando el software de análisis FCAP array para determinar la concentración de TNF-alfa en las muestras.

### Evaluación histológica

Se obtuvieron cortes histológicos a partir de las articulaciones anteriores y posteriores de cada animal para observar la presencia de células inflamatorias en el

tejido sinovial y la erosión del hueso. La evaluación de ambos indicadores fue realizada por el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la UPCH, usando los siguientes score detallados en los anexos 2 y 3. (24)

#### Evaluación estadística

Como se mencionó previamente, el análisis del IC50 se llevó a cabo utilizando una regresión lineal ( $R^2 > 95\%$ ) mediante el software Excel 2019. Para evaluar el impacto del extracto de la *P. caerulea* en el espesor de la pata, se empleó STATA 17 para llevar a cabo un análisis de varianza (ANOVA) junto con una prueba de Bonferroni. Además, para evaluar el efecto del extracto en los scores de inflamación, erosión ósea e inflamación sinovial, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. La prueba de Dunn's Pairwise se realizó posteriormente en los resultados del score de inflamación sinovial.

#### IV. RESULTADOS

Se inició el proyecto con 30 ratas Lewis de las cuáles 2 fallecieron días posteriores a la última medición articular, antes de la colección de muestras para el análisis histológico. Una de las ratas perteneció al grupo que recibió Metotrexate (MTX), y la otra al grupo que recibió *P. caerulea* 500 mg/kg.

##### Efecto citotóxico de la *Persea caerulea*

Debido a que se realizó un ensayo triple para el extracto en cada línea celular, se calculó el promedio del IC50, con su respectiva desviación estándar para cada una. (Tabla 2). Se observa que el promedio de IC50 en la línea celular DU145 fue de 194.22 µg/mL, esto refleja que la concentración a la cual el extracto de *Persea caerulea* inhibirá el crecimiento del 50% de la línea celular es 194.22 µg/mL, siendo esta la mayor en comparación con el efecto en las otras líneas celulares. Asimismo, se obtuvieron los IC50 en las líneas celulares BALB/C y VERO, aunque fueron menores a las de DU145. El menor IC50, fue hallado en la línea celular SH-SY5Y con un promedio de 20.67 µg/mL. Por otra parte, se hizo el cálculo del IC50 con 5-FU para cada línea celular, siendo estos inferiores a los promedios de IC50 que recibieron el extracto.

##### Efecto de la *Persea caerulea* en ratas inducidas con Artritis reumatoide

El gráfico 1 muestra la progresión del espesor de las patas de los animales durante las semanas de tratamiento.

Se observó cierta disminución en el espesor de patas en los grupos que recibieron el extracto de *P. caerulea* a concentración de 500 y 1000 mg/kg, siendo incluso

menor a los grupos que recibieron placebo y MTX, para la semana 2. Sin embargo, el espesor aumentó en la tercera semana. En el caso del grupo que recibió 250 mg/kg, el espesor de sus patas fue aumentando hasta la semana 3, posterior a este tiempo fue disminuyendo.

A los 42 días, se obtuvieron las medidas de las articulaciones de las 4 extremidades y se promedió para cada grupo como se evidencia en la tabla 3 y en el gráfico 2.

Se hizo el análisis de varianza de los promedios mediante ANOVA, pues cumplía con los criterios de homogeneidad, normalidad. Se identificó que existían al menos 2 grupos en los que el espesor de patas varió con respecto a los demás ( $p=0,002$ ), por lo que se hizo la una prueba Post Hoc (Bonferroni) donde se evidencio que la variación fue entre el grupo que recibió el extracto de *P. caerulea* a concentraciones de 500 mg/kg ( $p=0,003$ ) y 1000 mg/kg ( $p=0,037$ ) con respecto al grupo de ratas sanas. No se evidenció variación del grupo que recibió MTX o el extracto de *P. caerulea*, en cualquier concentración, con respecto al grupo de ratas que recibió placebo ( $p>0,05$ ).

Para la evaluación de varianza del score de inflamación en el día 42 se usó la prueba de Kruskal-Wallis, mediante la cual se determinó que no existía una variación significativa de medianas ( $p>0.05$ ). Las medianas obtenidas fueron similares con respecto al grupo 2 como se observa en el gráfico 3.

En la figura 1 se muestran las fotos representativas de las medias obtenidas del score de inflamación. En la Figura 1.A se evidencia la pata delantera con un score de 0, que fue la media hallada en el grupo de ratas sanas. En la Figura 1.B se evidencia hinchazón en más de 2 articulaciones, lo que da un score de 3, que fue la media hallada en el grupo que recibió metotrexato. Y en la figura 1.C, se ve artritis severa

en la pata completa, dando un score de 4, que fue la media en los grupos placebo y en quienes recibieron *P. caerulea* 250 y 1000 mg/kg.

#### Análisis histológico del tejido sinovial y erosión de hueso

Se determinó que existía varianza en las medianas del score de inflamación de tejido sinovial entre los grupos mediante la prueba de Kruskal Wallis ( $p=0,0001$ ). Estas medianas fueron: 0 en el grupo de ratas sanas, 1 en el grupo de ratas con AR que recibieron placebo, 2 en los grupos con AR que recibieron MTX, 250 mg/kg y 1000 mg/kg de *P. caerulea*, y 3 en el grupo que recibió 500 mg/kg de *P. caerulea*. Posteriormente se usó la prueba Dunn's Pairwise y se halló que las medianas del score de inflamación de tejido sinovial en los grupos de ratas con AR que recibieron 250 mg/Kg ( $p=0,044$ ) y 500 mg/Kg ( $p=0,006$ ) de *P. caerulea* varían significativamente con respecto al grupo que solo recibió placebo. Estos dos grupos tuvieron medianas de score de inflamación de tejido sinovial mayor que el grupo con placebo como se ve en el gráfico 4.

En la figura 2.A se puede evidenciar que corte histológico del grupo de ratas sanas muestra un tejido sinovial normal, con presencia de condrocitos y el espacio articular sin alteraciones (flechas rojas); mientras que en grupo placebo (figura 2.B), se observa el cartílago y espacio articular conservado (flechas rojas), y la presencia de escasas células inflamatorias en la membrana sinovial (cuadro verde).

En los grupos que recibieron metotrexato (figura 2.C), se evidencia el engrosamiento de membrana sinovial con presencia leve de células inflamatorias (flecha roja); mientras que el grupo que recibió extracto de *P. caerulea* 250 mg/kg (figura 2.D) muestra erosión del cartílago articular con presencia leve de células

inflamatorias y osteoclastos (flecha verde) y engrosamiento de membrana sinovial con presencia de células inflamatorias y fibrosas (flecha roja). En el grupo que recibió *P. caerulea* 500 mg/kg (figura 2.E) se observa pérdida de cartílago articular y una gran cantidad de células inflamatorias (flecha verde), y engrosamiento de membrana sinovial con células inflamatorias y fibrosas (flecha roja). Finalmente en el grupo que recibió *P. caerulea* 1000 mg/kg (figura 2.F) se evidencia erosión del tejido óseo y cartilaginosa, además de gran cantidad de células inflamatorias y osteoclastos (cuadro verde).

De la misma forma, se encontró diferencia significativa en las medianas del score de erosión de hueso en los grupos de ratas con AR que recibieron 500 mg/kg ( $p=0,039$ ) y 1000 mg/kg ( $p=0,007$ ) de *P. caerulea* con respecto al grupo que recibió placebo. El grupo placebo tuvo una mediana de 1; mientras que los grupos de 500 mg/kg y 1000 mg/kg de *P. caerulea* tuvieron 3 y 2, respectivamente (Gráfico 5). El grupo que recibió 250 mg/kg de *P. caerulea* también tuvo una mediana de 2. Por otro lado, la mediana del grupo MTX fue de 1,5.

La figura 3 muestra cortes histológicos del tejido óseo de las ratas. En el grupo control (Figura 3.A) se observa que el tejido óseo es normal, con la matriz y osteocitos sin alteraciones (flecha blanca). En los grupos placebo (Figura 3.B) y MTX (Figura 3.C) se evidencia una escasa presencia de osteoclastos (flechas amarillas). El resto de los grupos (Figura 3.D, 3.E y 3.F) presentan zonas de erosión ósea y presencia de osteoclastos (flechas negras).

#### Evaluación de TNF-alfa

Debido a que las muestras de sangre se encontraban hemolizadas, no se obtuvieron resultados concluyentes.

## V. DISCUSIÓN

El extracto hidroalcohólico de *P. caerulea* no mostró citotoxicidad a concentraciones de 250 mg/mL o en alguna de las 6 diluciones comparado con el 5-FU. También se observó que el efecto citotóxico fue mayor para la línea celular SH-SY5Y, comparado con las otras líneas celulares, pero sin superar al 5-FU. Por otra parte, un estudio en Colombia determinó que el extracto hidroalcohólico de corteza de *P. caerulea* presentaba actividad citotóxica moderada para las líneas celulares: A549 (carcinoma de pulmón), HT-29 (carcinoma de colon), Hep G2 (carcinoma hepatocelular), MDA-MB 231 (cáncer de seno) y Hela (cáncer de cérvix). (25)

En la actualidad el American College of Rheumatology recomienda fuertemente el uso de Metotrexato sobre la Hidroxicloroquina o sulfasalazina para pacientes que no hayan sido tratados previamente con Medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad. (26)

La artritis inducida por colágeno es un modelo animal similar a la AR en cuanto a la patogénesis molecular y los cambios histopatológicos. La inmunopatogénesis de este modelo incluye principalmente a las células B, que producen anticuerpos anti-colágeno tipo II y contra el autoantígeno correspondiente; y las células T, que a su vez activan otras células como los macrófagos sinoviales. (27) También está vinculada a la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) lo que hace que su predisposición sea similar a la observada en humanos. (22) Otro mecanismo importante en la patogénesis es la acción de las citoquinas proinflamatorias como el TNF-alfa, el cual es producido por fibroblastos y macrófagos sinoviales, que promueve la activación del Factor Nuclear kB (NF-kB),

un factor de transcripción que regula la inflamación. (28) Las citoquinas también influyen en el metabolismo del hueso al aumentar la expresión del ligando del Receptor Activador para el Factor Nuclear kB (RANKL), favoreciendo la reabsorción ósea. (27)

En la segunda semana de tratamiento de nuestro estudio se observó que el extracto de *P. caerulea* a concentraciones de 500 y 1000 mg/kg presentaba mejor respuesta que el MTX, pues tenía un menor espesor de pata. Sin embargo, a partir de la tercera semana, el efecto de la *P. caerulea* a concentración de 500 mg/kg tuvo una respuesta inferior al MTX, al tener un mayor espesor de pata. Este mismo efecto tuvo el extracto a concentración de 1000 mg/kg a partir de la cuarta semana. Por lo que se puede rescatar que el extracto de *P. caerulea* tiene un mejor efecto que el MTX en la segunda semana de tratamiento, pero empeora la enfermedad si se usa por un tiempo prolongado, como se puede observar en el gráfico 1.

Con respecto a la técnica de extracción de los diversos componentes de la *Persea Caerulea*, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides, se cuentan actualmente con diversos tipos, los cuales se pueden dividir en tres grupos: las técnicas de extracción modernas, las técnicas de extracción tradicionales y las técnicas de extracción por reflujo y Soxhlet. (29) En nuestro estudio se utilizó la técnica tradicional por maceración por 7 días en alcohol etílico al 80% a temperatura ambiente, posterior al secado de la planta a temperatura ambiente. Dentro de las técnicas tradicionales de extracción de flavonoides, la maceración posee diversas desventajas, entre las cuales se encuentran: un mayor tiempo de extracción y una menor selectividad y eficiencia de extracción en comparación con otros métodos como podrían ser la extracción por percolación u otros métodos

modernos como la extracción asistida con microondas, la extracción asistida por ultrasonido, entre otros. (29) Por este motivo, la elección del método de extracción podría haber influenciado en una menor obtención de ciertos flavonoides y, por ende, tener cierto impacto en los resultados de la evaluación antiinflamatoria. Se recomienda realizar un estudio utilizando otras técnicas de extracción. Sin embargo; pese a ello, pudo observarse un efecto beneficioso en la segunda semana de tratamiento comparado con el placebo. Por otro lado, respecto a la elección del solvente; el etanol, el cual es un solvente polar junto al metanol y la acetona, son comúnmente utilizados en la extracción de alcaloides, polifenoles, saponinas y flavonoles, dentro de los cuales se encuentra la quercetina. (30) En un estudio realizado por Morales et al. comparando la eficacia del etanol y metanol en *Salvia hispánica* L. se determinó que metanol al 80% obtuvo una mayor actividad antioxidante, atribuida a los flavonoides y otros componentes, que el etanol al 80%; por ende, el uso de etanol como solvente en este estudio pudo impactar en la obtención de flavonoides e incidir en los resultados obtenidos. (31)

Finalmente, en los últimos años se han hecho estudios acerca de los beneficios de la *P. caerulea*. En uno de ellos se evaluó el efecto gastroprotector del extracto hidroalcohólico de corteza de *P. caerulea* en ratones Balb/c, a quienes se les indujo úlcera gástrica con 2 dosis de 40mg/kg p.o. de Indometacina. Se demostró que el extracto de *P. caerulea* a dosis oral de 100 y 200 mg/Kg tuvo un efecto antiulceroso gástrico similar a la ranitidina, un antagonista de los receptores de H<sub>2</sub> de la histamina que es usado para tratar úlceras gástricas y reflujo gastroesofágico. (32) Otro estudio evaluó la actividad antioxidante, antimicrobiana y fungistática del aceite esencial de *P. caerulea* obtenido de las hojas; en los resultados se describe

que su actividad antioxidante es baja en comparación al estándar de referencia (Trolox®). (33) Por otra parte, *Álvarez-Caballero y colaboradores* evaluaron el efecto antimicrobiano de algunos componentes aislados a partir del extracto etanólico de las hojas de *P. caerulea* a nivel in vitro. Se demostró que los componentes de *P. caerulea* presentaban actividad solo frente a MRSA, siendo la Caerulina B el componente con mayor actividad. (34) Asimismo, en un estudio se demostró que el extracto de *P. caerulea* disminuyó el tiempo de regeneración de *Girardia festae*, demostrando un posible uso en el manejo de heridas. (35) Estos estudios evidencian las diferentes propiedades de la planta, sin embargo los reportes en los últimos 5 años son escasos.

### Limitaciones

TNF-alfa es una citoquina que favorece la inflamación y la reabsorción ósea en la artritis reumatoide, sin embargo, debido a que las muestras de sangre de las ratas se encontraban hemolizadas, la cuantificación de TNF-alfa no obtuvo resultados concluyentes.

La respuesta clínica del Metotrexate se da entre la semana 3 y 6 de tratamiento, lo que influye en la comparativa de las primeras semanas de tratamiento de las ratas en nuestro estudio. (36)

Las líneas celulares utilizadas en este estudio estuvieron sujetas a la disponibilidad del laboratorio y el presupuesto con el que se contó para la realización del estudio; por este motivo, se recomienda el uso de otras líneas celulares para la ampliación de la evaluación sobre su actividad citotóxica.

## VI. CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico de *P. caerulea* a concentración de 250 mg/mL o menor, no es citotóxico para las líneas celulares BALB/C 3T3, Vero, DU145 y SH-SY5Y. Posterior al tratamiento por 42 días se concluyó que el extracto de *P. caerulea* no ejerció ningún efecto significativo que aumentara o disminuyera el espesor de patas y el score de inflamación, con respecto al grupo de ratas que recibió placebo ( $p>0.05$ ).

Se evidenció que en la segunda semana de tratamiento, los extractos de *P. caerulea* a concentraciones de 500 y 1000 mg/kg tuvieron un efecto beneficioso en el espesor de patas en comparación a los grupos que recibieron metotrexato o placebo; sin embargo, este efecto se perdió posteriormente.

También se evidenció que el score de inflamación en el tejido sinovial aumentó significativamente ( $p<0.05$ ) en aquellos grupos que recibieron el extracto de *P. caerulea* a concentración de 250 y 500 mg/kg; mientras que el score de erosión de hueso se incrementó significativamente ( $p<0.05$ ) en los grupos que recibieron *P. caerulea* a concentración de 500 y 1000 mg/Kg.

Este estudio demuestra que el extracto hidroalcohólico de *P. caerulea* tiene efectos beneficiosos en la segunda semana de tratamiento, pero agrava la enfermedad si se usa durante un tiempo prolongado. Por esta razón se necesitan más estudios para evaluar el efecto antiinflamatorio a corto plazo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smolen J, Aletaha D, Barton A, Burmester G, Emery P, Firestein G, *et al.* Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 4: 180001.
2. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 8va ed. Barcelona: *Elsevier*; 2015.
3. Sarzi-Puttini P, Salaffi F, Di Franco M, Bazzichi L, Cassisi G, Casale R, *et al.* Pain in rheumatoid arthritis: a critical review. *Reumatismo*. 2014; 66(1): 18-27.
4. Nyhäll-Wåhlin B, Petersson I, Jacobsson C, *et al.* Extra-articular manifestations in a community-based sample of patients with rheumatoid arthritis: incidence and relationship to treatment with TNF inhibitors. *Scand J Rheumatol* 2012; 41:434.
5. McInnes I, Schett Georg. The pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *NEJM*. 2011; 365:2205-19.
6. Carmona L. Epidemiología de la Artritis Reumatoide. *Rev Esp Reumatol*. 2002;29(2):86-9.
7. CDC [Internet]. April 3, 2018. Rheumatoid Arthritis. [Consultado 23 de Agosto del 2018]. Disponible en <https://www.cdc.gov/arthritis/basics/rheumatoid-arthritis.html>
8. Acevedo-Vásquez E. Algunos aspectos de la artritis reumatoide en el Perú. *Rev Soc Peru Med Interna*. 2012;25(1):31-7.
9. Lee Y. Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013; 15: 300.

10. Deal C. Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. *Curr Rheumatol Rep.* 2012; 14:231.
11. Rheumatoid arthritis treatment [Internet]. Johns Hopkins Arthritis Center. 2024 [citado el 11 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://www.hopkinsarthritis.org/arthritis-info/rheumatoid-arthritis/ra-treatment/>
12. Ramírez E. Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “Huamanpinta” [Tesis doctoral] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
13. Villena C, Arroyo J. Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica. *Ciencia e Investigación.* 2012;15(1):15-19.
14. Acostupa F, Chávez A, Mejía S, Pauta M, Tucunango J. Efecto antiinflamatorio *in vitro* de los extractos etanólicos de cuatro plantas medicinales peruanas. *Rev Peru Med Integrativa.* 2017; 2(2):79-85.
15. Alvares J, Cuca L, Carrasco-Pancorbo A, Ruiz-Muelle A, Fernández I, Fernández-Gutiérrez A. Phenolic constituents of leaves from *Persea caerulea* Ruiz & Pav; Mez (*Lauraceae*). *Biochem Syst Ecol.* 2016; 67: 53-7.
16. Medina M, Ramos M. Terapias alternativas de las familias en el tratamiento de enfermedades crónicas en los adultos mayores del distrito de Pátapo - 2013. [Tesis] Chiclayo: Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo; 2014.

17. Jackson J, Higo T, Hunter W, Burt H. The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflammation Research*. 2006;55(4):168-75.
18. Vicente-Vicente L, Prieto M, Morales A. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Rev. Toxicol*. 2013;30:171-181.
19. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, et al. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev Cubana Med Trop* 2009;61(3):254-8.
20. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. 2006;1(3): 1112-16.
21. Rosloniec E., Whittington K, Proslovsky A, Brand D. Collagen-induced arthritis mouse model. *Curr. Protoc*. 2021; 1: e313
22. Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011; 22: 339–344
23. Earp J, DuBois D, Molano S, Pyszczynski N, Almon R, Jusko W. Modeling Corticosteroid Effects in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis II: Mechanistic Pharmacodynamic Model for Dexamethasone Effects in Lewis Rats with Collagen-Induced Arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 326(2): 546–54.
24. Campagnuolo G, Bolon B, Feige U. Kinetics of bone protection by recombinant osteoprotegerin therapy in Lewis rats with adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002 Jul;46(7):1926-36. doi: 10.1002/art.10369.

25. Alvarez J. Estudio químico comparativo de Metabolitos Fijos y Aceite Esencial de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez y evaluación de su actividad biológica. 2016. Tesis doctoral, Facultad de ciencias básicas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia – Bogotá, Colombia.
26. Fraenkel L, Bathon J, England B, St.Clair E, Arayssi T, Carandang K, et al. 2021 American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 2021;73(7):924–39. Disponible en: <https://assets.contentstack.io/v3/assets/bltee37abb6b278ab2c/blt9e44ccb701e1918c/63360f6775c0be225b8d943a/ra-guideline-2021.pdf>
27. Poutoglidou F, Pourzitaki C, Dardalas I, Manthou ME, Samoladas E, Kouvelas D. The Use of Collagen-Induced Arthritis Animal Model on Studying Bone Metabolism. *Calcif Tissue Int.* 2020;107(2):109-120.
28. Peng C, Perera P, Li Y, Fang W, Liu L, Li F. Anti-inflammatory effects of *Clematis chinensis* Osbeck extract(AR-6) may be associated with NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and COX-2 in collagen-induced arthritis in rat. *Rheumatol Int.* 2012;32:3119–25.
29. Liga S, Paul C, Péter F. Flavonoids: Overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques. *Plants* [Internet]. 2023;12(14). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/plants12142732>
30. Pertiwi RD, Suwaldi, Martien R, Setyowati EP. Radical scavenging activity and quercetin content of *Muntingia calabura* L. leaves extracted by various ethanol concentration. *J Food Pharm Sci* [Internet]. 2020;1. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.22146/jfps.581>

31. Gema M-O, Marlon R-L, Joel D-R, Flor de Fátima R-C, Silvia L-S. Effect of ethanol and methanol on the total phenolic content and antioxidant capacity of Chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Sains Malays* [Internet]. 2020;49(6):1283–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2020-4906-06>
32. Calderón-Peña A, Aspajo-Villalaz C, Silva-Correa C, La Torre V, González-Blas M, Pretel-Sevillano O, et al. Total Phenol Content and Gastric Anti-Ulcer Activity of Hydroalcoholic Extract of *Persea caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez. Bark. *Pharmacognosy Journal*. 2021;13(5):1072-1078
33. Damián G. Composición química, actividad antioxidante, antimicrobiana sobre *E. coli* y *S. aureus* y efecto fungistático sobre *Candida albicans* del aceite esencial de hojas de *Persea caerulea* (Ruiz & Pav) Mez (junjulí) [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2020.
34. Álvarez-Caballero J, Cuca-Suárez L, Coy-Barrera E, Carrasco-Pancorbo A, Olmo-García L, Martín J, et al. Caerulines A and B, Flavonol Diacylglycosides from *Persea caerulea*. *ACS Omega*. 2021;6(48):32631-32636.
35. Rodríguez-Soto J, Rodríguez-Ruiz J, Contreras-Quiñones M, Quiñones-Cerna C, Ruiz W, Ramírez R, et al. *Persea caerulea*: una alternativa para la regeneración de heridas. *Medicina Naturista*. 2023;17(1):10–5.

36. Weinblatt M. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2013;124:16-25. PMID: 23874006; PMCID: PMC3715949.

## VIII. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

**Tabla 1.** Diluciones del extracto de *Persea*

*caerulea* (Ruiz & Pav.) Mez

<i>Persea caerulea</i> (Ruiz & Pav.) Mez (mg/mL)	
Diluciones	
1	250
2	125
3	63
4	31
5	16
6	8

**Tabla 2.** Valores de IC50 frente a las líneas celulares.

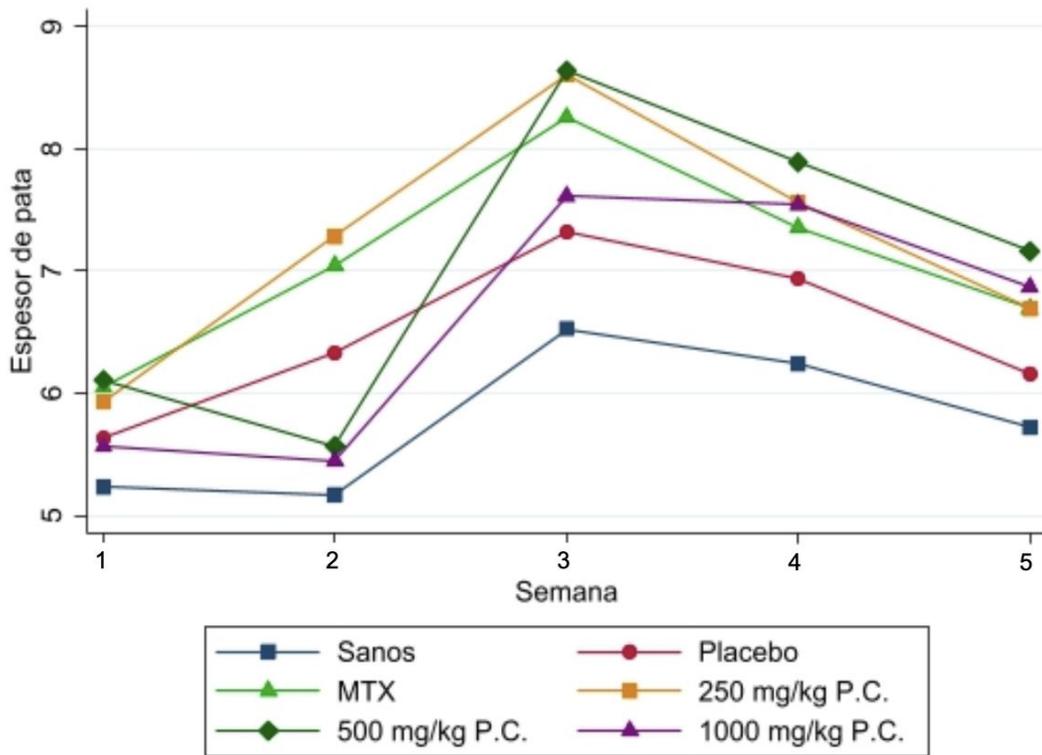
Línea celular	Promedio IC50 de 3 ensayos del extracto ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DE	Promedio de IC50 de 5-FU ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DE
BALB/C 3T3	63.91 $\pm$ 4.125	0.00190 $\pm$ 0.00268
VERO	132.74 $\pm$ 3.846	0.26 $\pm$ 0.05938
DU145	194.22 $\pm$ 13.067	0.29 $\pm$ 0.06756
SH-SY5Y	20.67 $\pm$ 3.103	0.43 $\pm$ 0.09765

*DE: desviación estándar.*

**Tabla 3.** Espesor de patas en el día final del estudio.

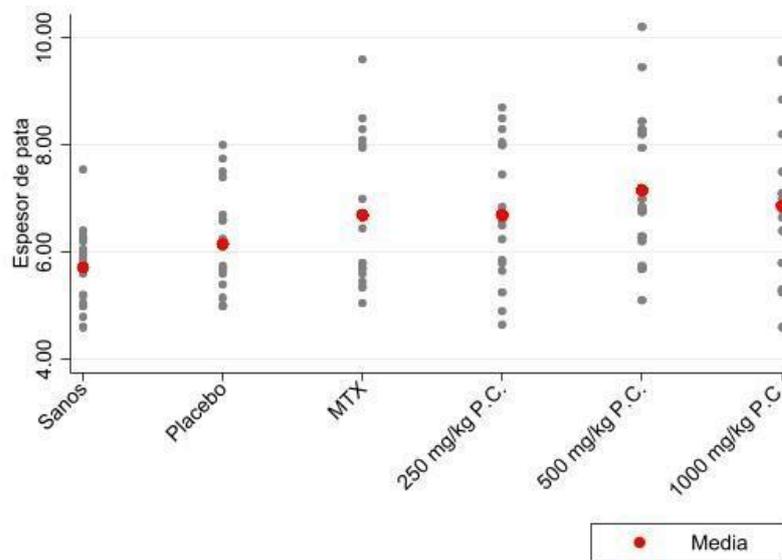
Grupo	Promedio de espesor de patas (mm)	DE (mm)
Sanos	5,715	0,711
Placebo	6,155	0,938
MTX	6,69	1,304
250 mg/kg <i>P. caerulea</i>	6,6925	1,259
500 mg/kg <i>P. caerulea</i>	7,1575	1,332
1000 mg/kg <i>P. caerulea</i>	6,87	1,378

*DE: desviación estándar*

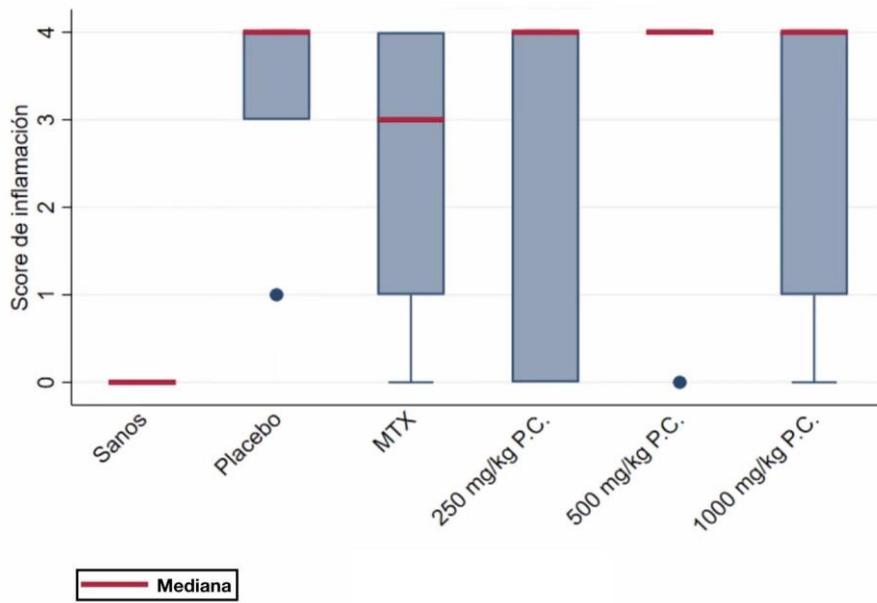


**Gráfico 1.** Espesor de pata (promedio) por semana en cada grupo. MTX:

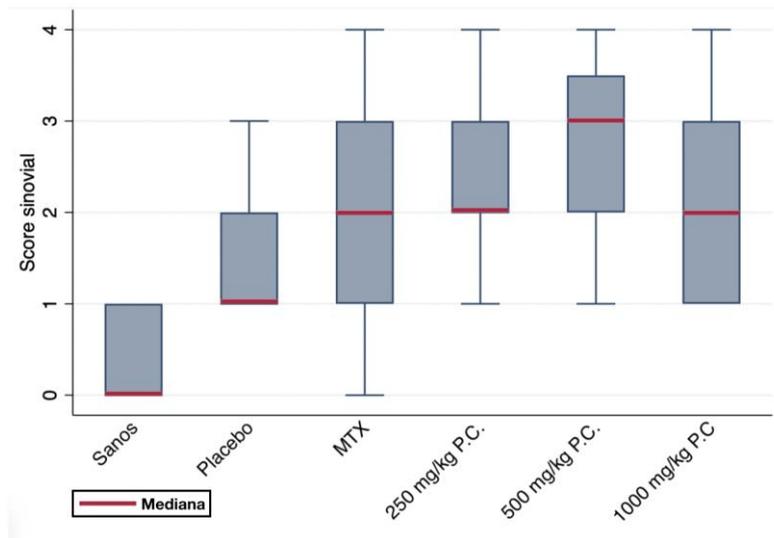
Metotrexato. P.C.: *Persea caerulea*.



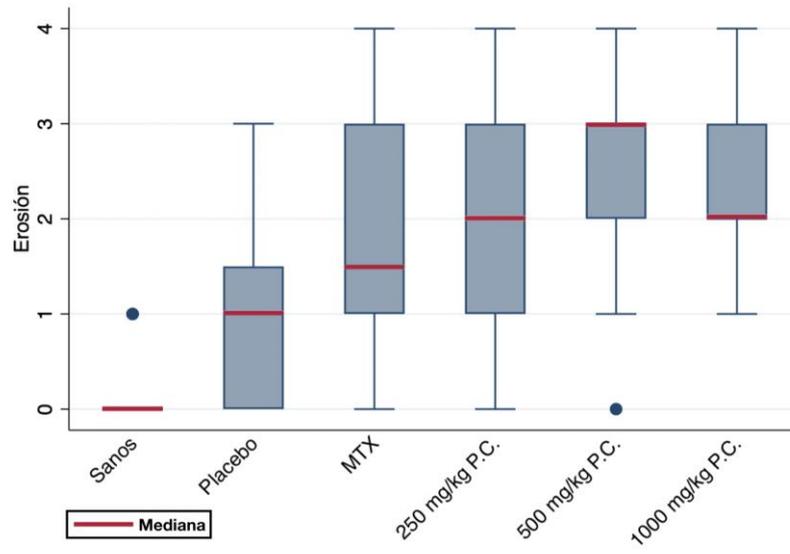
**Gráfico 2.** Espesor de pata



**Gráfico 3.** Score de inflamación



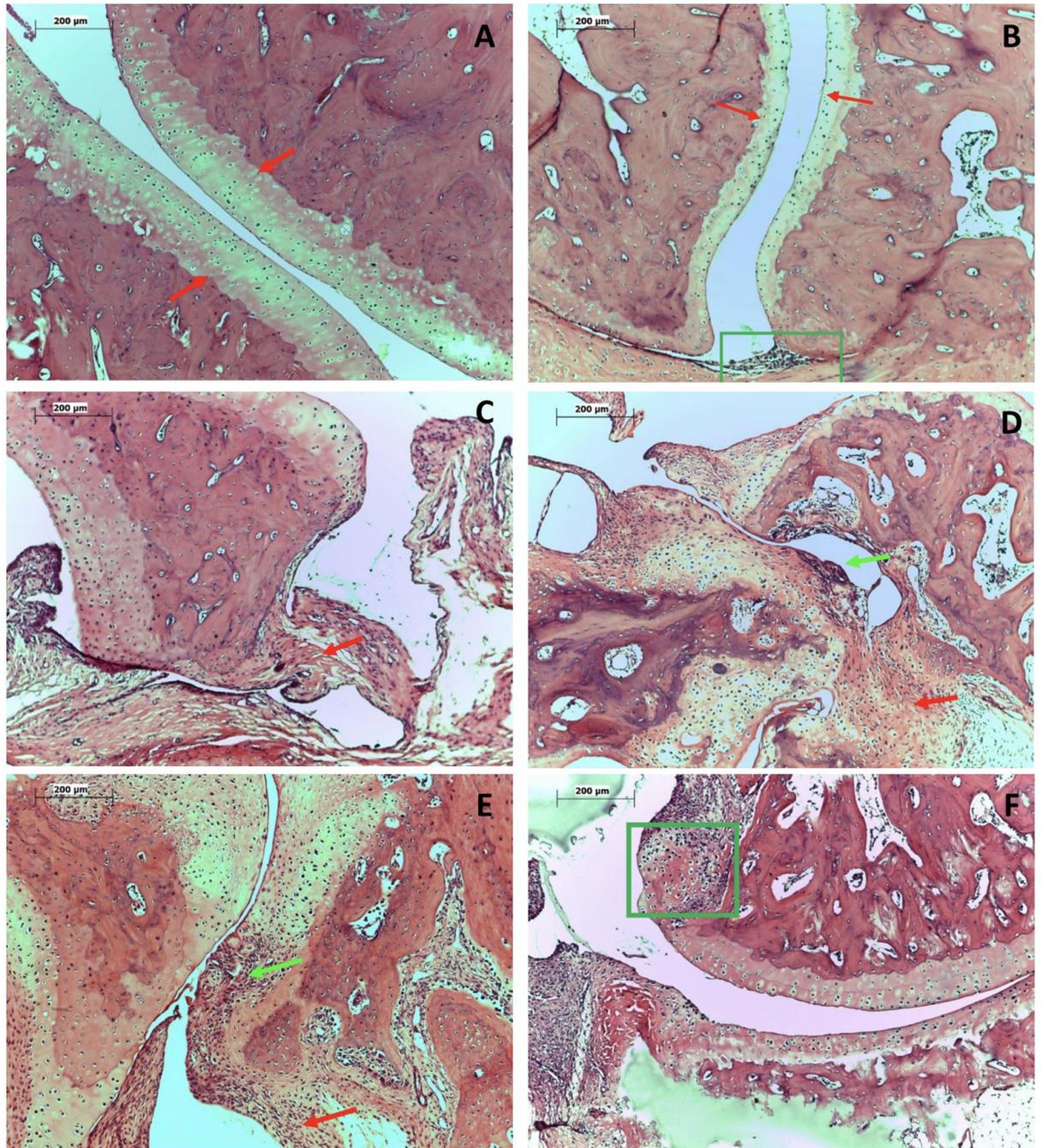
**Gráfico 4.** Score de inflamación en el tejido sinovial.



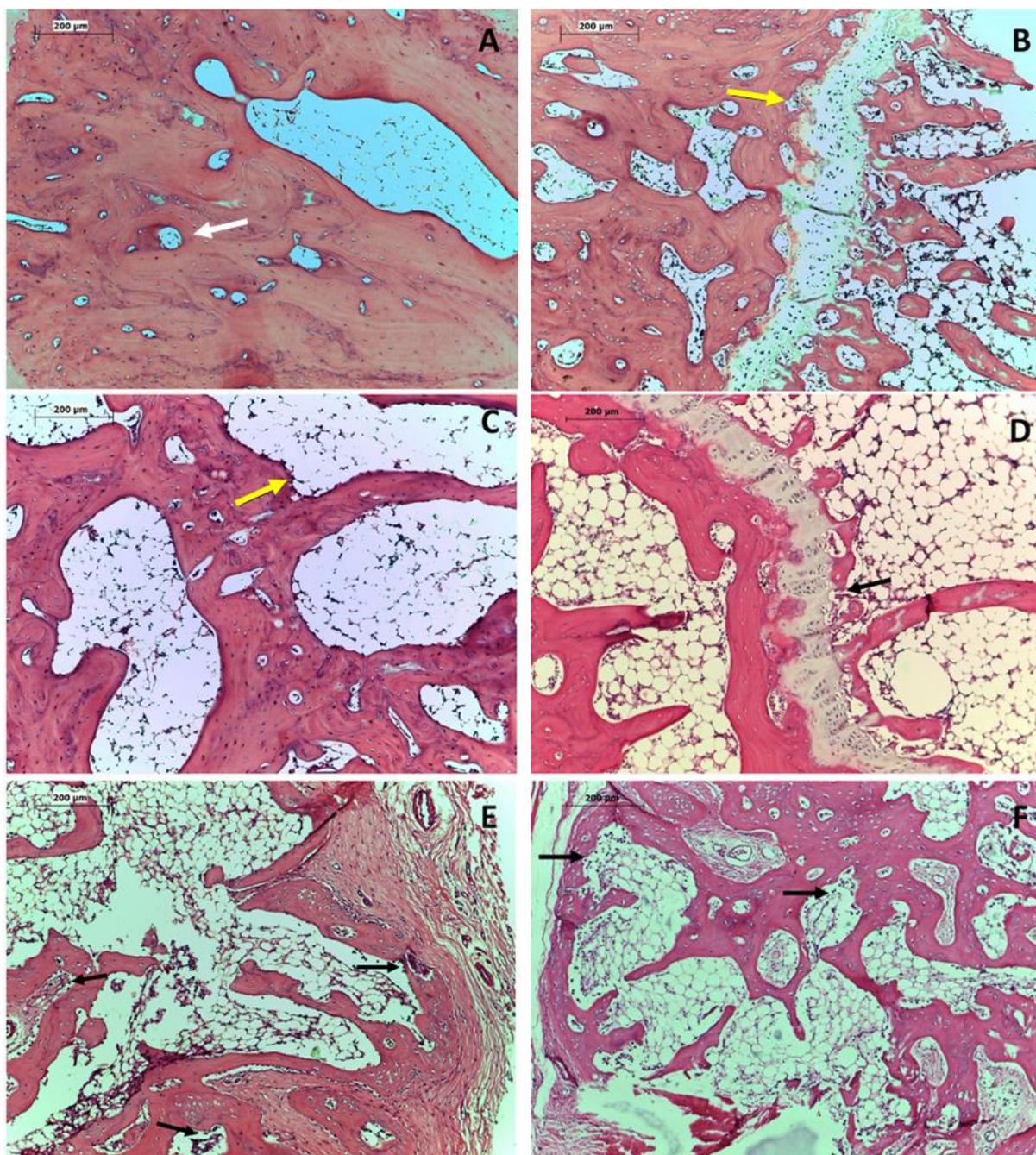
**Gráfico 5.** Score de erosión de hueso.



**Figura 1.** A: Pata delantera score 0. B: score 3. C: score 4.



**Figura 2.** Cortes histológicos del tejido sinovial de las ratas. A: grupo control. B: grupo placebo. C: grupo MTX. D: grupo 250 mg/kg de *P. caerulea*. E: grupo 500 mg/kg de *P. caerulea*. F: grupo 1000 mg/kg de *P. caerulea*.



**Figura 3.** Cortes histológicos del tejido óseo de las ratas. A: grupo control. B: grupo placebo. C: grupo MTX. D: grupo 250 mg/kg de *P. caerulea*. E: grupo 500 mg/kg de *P. caerulea*. F: grupo 1000 mg/kg de *P. caerulea*

## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Score de inflamación**

Score	Interpretación
0	No hay presencia de hinchazón o enrojecimiento de la piel.
1	Hinchazón o inflamación de un dedo.
2	Hinchazón de dos articulaciones de dos dedos.
3	Hinchazón en más de dos articulaciones.
4	Artritis severa en la pata completa.

### **Anexo 2. Score de inflamación en el tejido sinovial de las ratas**

Score	Interpretación
0	Normal, sin presencia de células inflamatorias y osteoclastos
1	Presencia de algunas células inflamatorias
2	Leve (poca presencia de células inflamatorias y osteoclastos)
3	Moderada (presencia moderada de células inflamatorias y osteoclastos)
4	Agresiva (alta presencia de células inflamatorias y osteoclastos)

**Anexo 3.** Score de erosión de hueso de las ratas

Score	Interpretación
0	Normal, sin presencia de osteoclastos
1	Mínima (superficial en 1-2 zonas del hueso)
2	Leve (poco profunda en 1-4 zonas del hueso)
3	Moderada (profunda, que se extiende en más de 5 zonas en el hueso)
4	Marcada (destrucción parcial del hueso)
5	Extensiva (fragmentación del hueso)