

**Valoración de marcadores de muerte producidos por un fitoterapéutico  
antiviral en células intestinales humanas polarizadas C2BBel.**



**PRESENTADO POR:**

**ALICIA ANDREA CASTELBLANCO MORA**

Trabajo de Grado

Microbióloga Industrial

**DIRECTOR:**

**JUAN CARLOS ULLOA RUBIANO, Ph.D**

Departamento de Microbiología

Pontificia Universidad Javeriana

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
BOGOTÁ D.C**

Valoración de marcadores de muerte producidos por un fitoterapéutico antiviral en  
células intestinales humanas polarizadas C2BBE1.

Alicia Andrea Castelblanco Mora

---

Concepción Judith Puerta, Ph.D  
Decana Facultad de Ciencias

---

Marcela Franco Correa, Ph.D  
Directora de Carrera

Valoración de marcadores de muerte producidos por un fitoterapéutico antiviral en  
células intestinales humanas polarizadas C2BBE1.

Alicia Andrea Castelblanco Mora

---

Juan Carlos Ulloa Rubiano, Ph.D  
Director.

---

Claudia Patricia Urueña, Ph.D  
Evaluadora.

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

*Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1946.*

*“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
Enfermedad diarreica aguda (EDA).....	6
Generalidades del rotavirus y su ciclo de replicación.....	6
Fitoterapéuticos.....	7
<i>Achyrocline bogotensis</i> .....	8
Antecedentes .....	8
Toxicidad predictiva intestinal y marcadores de muerte celular.....	9
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
General.....	10
Específico.....	10
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>11</b>
Cultivo celular y Producto fitoterapéutico (PFT).....	11
Determinación del efecto citotóxico medidado por la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, ejercido por el PFT de <i>A. bogotensis</i> (segundo lote) en células intestinales - C2BBe1. ....	11
Determinación de marcadores de muerte asociados a apoptosis producidos por el PFT de <i>A. bogotensis</i> (segundo lote) en las células intestinales - C2BBe1.....	12
Estadística .....	12
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>12</b>
Efecto citotóxico ejercido por PFT de <i>A. bogotensis</i> en células polarizadas - C2BBe1. ....	12
Determinación de los marcadores de muerte producidos por el PFT de <i>A. bogotensis</i> en células polarizadas - C2BBe1.....	15
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA:</b> .....	<b>17</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evaluación de la actividad succinato deshidrogenasa mitocondrial en células polarizadas C2BBe1 tratadas con 15 concentraciones del PFT piloto obtenido de *A.bogotensis*. .....13

Figura 2. Evaluación de marcadores de muerte producidos por 5 concentraciones del PFT piloto obtenido de *A.bogotensis* en células polarizadas C2BBe1. ....15

## RESUMEN

La Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) es originada por diferentes microorganismos, entre los cuales, los virus son los agentes causales de mayor distribución (70-80%), siendo el rotavirus la principal causa de esta enfermedad. Siendo así y con el fin de prevenir la infección por dicho virus, se encuentran comercialmente dos vacunas disponibles. Sin embargo, aunque estas hayan generado una disminución significativa de la enfermedad, presentan diversas desventajas, ya que pueden causar eventualmente reacciones adversas como la intususcepción, no ofrecen protección contra nuevas estirpes genéticas y por último, no en todos los países se tienen disponibles. Todo lo anterior indica que se continúa con una problemática de salud pública generada por el rotavirus, pues adicionalmente, en la actualidad no existen tratamientos específicos contra la infección causada por este virus. Dada esta situación y como estrategia al tratamiento de la EDA, se han estudiado múltiples plantas medicinales como alternativa de tratamiento dentro de las cuales se encuentra *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC (*Compositae*) que es una planta endémica de Colombia conocida ampliamente por sus usos tradicionales, además que ha sido muy estudiada por el Departamento de Química de la misma PUJ. A partir de esto, Téllez y colb., en 2015 reportaron por primera vez la actividad antiviral *in vitro* de la fracción (F1/HM1) obtenida esta especie vegetal y posteriormente se continuó con la formulación de un producto fitoterapéutico (PFT) a escala piloto industrial fabricando dos lotes con buenas prácticas de manufactura (BPM). Estos lotes fueron evaluados nuevamente por su actividad antiviral y se encontró de manera consistente que son capaces de inhibir la infección *In vitro* por el rotavirus. Por otra parte, el primer lote se utilizó para avaluar la toxicidad oral sub-aguda que ejerce y se obtuvo que éste no generó efectos adversos en lechones de producción recién nacidos, confirmando la baja toxicidad de *A. bogotensis* descrita en el Vademécum de Plantas Medicinales de Colombia. No obstante, es preciso mencionar que cualquier sustancia con actividad antiviral, debe ser suficientemente estudiada por su toxicidad *In vitro* e *In vivo*. Teniendo en cuenta que el PFT de *A. bogotensis* está diseñado para consumo oral, el presente trabajo evaluó si este ejerce efectos sobre tres marcadores de muerte celular utilizando como modelo la línea intestinal humana - C2BBE1.

## INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) es considerada una de las principales causas de mortalidad infantil a nivel mundial [1, 2]. El Rotavirus es el principal agente etiológico (88%) de esta enfermedad [3,4] debido a que anualmente causa entre 120.000 y 215.000 muertes en menores de cinco años [5, 6] y genera aproximadamente el 40% de las hospitalizaciones [7,8]. Por su parte, la EDA en Colombia es una de las primeras cinco causas de hospitalización de menores de cinco años y se estiman 40.000 hospitalizaciones cada año [9], además de que el rotavirus es el responsable de aproximadamente el 50% de estas [10, 11].

En la actualidad no existe un tratamiento específico para la EDA incluyendo la causada por la infección por rotavirus, por lo cual, como primera opción se busca reemplazar los líquidos y electrolitos del paciente mediante el uso de sales de rehidratación (SRO) con sales de zinc [12,13]. Adicionalmente, la enfermedad producida por esta infección es prevenible a través de las vacunas Rotarix® y Rotateq®, incluidas en programas nacionales de inmunización [14, 15,16] donde se encuentra incluida Colombia [17]. No obstante, pese a que éstas han reducido entre un 36% al 50% la mortalidad de niños menores de 5 años [18,19], la eficacia de las vacunas difiere de manera significativa con respecto al lugar donde son aplicadas, por ejemplo, países desarrollados (80%-90%) y países en vía de desarrollo (30%-50%) [20, 21]. En Latinoamérica y el Caribe la eficacia de las vacunas se encuentra cerca al 80% [22, 23, 24].

Así, la eficacia de las vacunas contra rotavirus depende de varios factores; primero, la distribución de cepas de rotavirus varía en comparación con los países en donde las vacunas mencionadas son desarrolladas, probadas e introducidas inicialmente [25]. Segundo, los niveles de anticuerpos específicos contra el rotavirus suficientes para la neutralización del virus, se encuentra entre un 30% y 50% [26]. Y por último, las vacunas no ofrecen protección contra nuevas estirpes genéticas virales que surgen a partir de reordenamientos genéticos entre las cepas vacunales con las silvestres [27, 28, 29]. Por otra parte, el efecto de estas vacunas es esencialmente prevenir o disminuir los efectos de la enfermedad, pero no previene la infección, ni inhibe la multiplicación viral [31,23].

Ahora bien, como una alternativa para el tratamiento de la infección por rotavirus se ha planteado el uso de plantas medicinales conocidas por su uso tradicional y su amplio rango terapéutico [30,31]. El presente trabajo involucra la especie medicinal *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC. (*Compositae*), nativa de Colombia y ampliamente reconocida por sus usos tradicionales para el tratamiento de enfermedades de la piel, prostatitis, dolores renales, entre otros [12,32]. De acuerdo con el Vademécum colombiano de plantas medicinales, esta especie ha sido estudiada por su potencial antibacteriano, antimicótico y anti-inflamatorio.

*A. bogotensis* fue utilizada en un estudio realizado por Téllez y colaboradores en la Pontificia Universidad Javeriana, a partir del cual se reportó por primera vez en 2015 que contiene sustancias con actividad antiviral las cuales hacen parte de una de sus fracciones obtenidas por extracción líquido – líquido continuo denominada F1(HM1). En este estudio, se demostró que la fracción bioactiva F1 contiene fenoles, flavonoides, terpenos,

esteroles, esteroides y sesquiterpenlactonas. Posteriormente se formuló un producto fitoterapéutico (PFT) piloto (PFT), constituido por el extracto total de las partes aéreas de la planta, en el cual se encuentra la fracción F1 (HM1), junto con excipientes farmacéuticamente aceptados para consumo oral y se prepararon dos lotes con Buenas Prácticas de Manufactura a escala piloto industrial.

Estudios posteriores del grupo de investigación evaluaron la actividad *In vitro* antirotavirus de los dos lotes mencionados mediante inmunocitoquímica, demostrando que ambos ejercían la actividad antiviral previamente determinada para la fracción F1(HM1) y posteriormente, los resultados de dicha actividad fueron validados mediante citometría de flujo. Se realizó también la determinación de la citotoxicidad en células susceptibles de infección por rotavirus Ma104, encontrando baja toxicidad del producto [33]. Paralelamente se realizó un estudio de toxicidad oral usando como modelo lechones comerciales privados de calostro a partir del cual se demostró la ausencia de efectos compatibles con toxicidad.

A partir de los resultados colectados y con el ánimo de completar la evidencia científica que soporte la baja toxicidad oral del producto acorde a los lineamientos y recomendaciones internacionales [34], se hace necesario realizar ensayos *In vitro* que demuestren con modelos celulares intestinales el efecto sobre biomarcadores específicos involucrados en toxicidad y muerte celular [35, 36]. Así, en el presente trabajo se buscó valorar el efecto que ejerce el PFT de interés sobre tres marcadores diferentes de muerte haciendo uso de la línea celular de adenocarcinoma intestinal humano C2BBel1 (clon de CaCo2), caracterizada por su homogeneidad morfológica determinada por formar monocapas polarizadas con borde apical en cepillo, expresar enzimas similares a los enterocitos maduros humanos y expresar bombas de detoxificación, características que las hace ser una buena herramienta para evaluaciones de toxicidad, como ha sido reportado [37,38,39]. Finalmente es preciso comentar que lamentablemente no se dispone en la actualidad de un modelo celular intestinal no tumoral de origen humano, siendo una alternativa el uso de células normales de origen porcino.

## **PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La EDA por el rotavirus causa un impacto significativo en salud pública, ya que genera del 24 al 37 % de las muertes, 2.3 millones de hospitalizaciones en niños menores de 5 años a nivel mundial [16, 40] y en el caso de los países en vía de desarrollo, los niños contraen la infección antes de los 12 meses de edad [23]. En Colombia, de acuerdo con las estadísticas del Instituto Nacional de Salud, para la semana 42 del 2019, se reportaron 426.225 casos de EDA en niños entre 1 y 4 años de edad, siendo este el grupo que representa la mayor incidencia de esta enfermedad con un 88,5 % por cada 1.000 habitantes. Además de esto, desafortunadamente la infección por rotavirus no es de reporte obligatorio en el país, y por tanto se desconoce en cuántos de ellos fue el agente causal.

Si bien se dispone de dos vacunas vivas atenuadas (Rotarix® y Rotateq®) contra el rotavirus; estas no evitan la infección por el rotavirus pero sí disminuyen la gravedad de la enfermedad que produce [41], y se han reportado algunos casos con la presentación de invaginación intestinal [42]. Sin embargo, en vista de que el rotavirus genera un gran número de hospitalizaciones, el beneficio de la vacunación supera el riesgo porque se conoce que las dos vacunas reducen la duración de la enfermedad [41].

Dado este comportamiento la terapéutica a seguir una vez el paciente presenta diarrea, es la pronta hidratación haciendo uso de sueros con sales de rehidratación oral, preferiblemente con Zinc [43]. No obstante, este tratamiento suele no ser efectivo en pacientes infectados por rotavirus porque la proteína NSP4 deteriora las células intestinales al inhibir el co-transporte de sodio y glucosa. Así, lo anterior indica que no se dispone de un tratamiento específico para la EDA producida por rotavirus, como estrategia, se ha planteado el uso de las plantas medicinales [44, 45, 40].

Con base en lo anterior, en el Laboratorio de Virología se ha investigado desde hace más de 10 años la actividad antirotaviral de *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC. (*Compositae*). Así, se ha logrado comprobar de manera consistente que compuestos de esta especie vegetal son capaces de reducir la infección *In vitro*, en su mayoría cuando son puestos en contacto directo con las partículas virales infecciosas [12, 33]. Asimismo, se han realizado evaluaciones de toxicidad tanto *In vivo* como *In vitro*, en lechones de producción recién nacidos evaluando la toxicidad oral subaguda con prueba límite y en células MA104 evaluando la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, respectivamente. En ambos casos se obtuvieron resultados que mostraron bajos niveles de toxicidad ejercida por el PFT de *A. bogotensis*.

No obstante lo anterior, los análisis *In vitro* se han realizado en las células susceptibles de infección viral como la línea MA104 procedente de riñón de mono verde, faltando la evaluación de toxicidad intestinal hasta la realización del presente trabajo. La importancia de realizar el presente trabajo radica en que el PFT de interés está diseñado para ser consumido por vía oral, de manera que es relevante acopiar evidencia científica que demuestre con suficiencia la poca o baja alteración de marcadores que conduzcan a la muerte celular.

Todo lo anterior correlaciona con lo reportado en el Vademécum colombiano de plantas medicinales, donde se describe que el extracto obtenido de dicha planta evidencia baja toxicidad asociado con la administración del mismo. Sin embargo, sigue teniendo importancia la investigación sobre si se generan o no reacciones adversas y el monitoreo de seguridad por el uso de los productos naturales, pues cualquier actividad biológica debe ser suficientemente demostrada y documentada en diferentes condiciones [31, 46, 47]. Ha sido reportado que agentes tóxicos pueden por ejemplo inducir y liberar compuestos que afectan directamente la estructura del ADN y la membrana celular causando apoptosis [48, 49, 50].

Finalmente, pese a que en los estudios realizados con PFT por el grupo de investigación han demostrado la baja toxicidad del producto, existen autoridades internacionales como la FDA, OCDE, Organización Mundial de la Salud y la Conferencia Internacional de Armonización, entre otras, las cuales recomiendan implementar pruebas *In vitro* de citotoxicidad, fragmentación de DNA, apoptosis, entre otras, además por supuesto de pruebas *In vivo*.

## MARCO TEÓRICO

### Enfermedad diarreica aguda (EDA).

La Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) se define como la deposición de tres o más veces al día de heces líquidas y representa una infección del tracto digestivo transmitida por el consumo de agua o alimentos contaminados [51]. A nivel mundial, la diarrea es considerada un problema en la salud pública porque representa el 10% de todas las muertes de niños menores de 5 años [52]. Dentro de los síntomas se encuentran; la diarrea acuosa, vómito, fiebre y dolor de cabeza [53]. Además, esta enfermedad tiene varios agentes causales como bacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Vibrio* spp), virus enteropatógenos (rotavirus, norovirus, sapovirus) y protozoos parásitos (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*) [54]. Dentro de los cuales, el agente causal más común de la diarrea en niños menores de cinco años es el rotavirus con un 70% aproximadamente [23], y se estima que el 90% de las muertes causadas por este virus ocurren en África y Asia [55].

### Generalidades del rotavirus y su ciclo de replicación.

El rotavirus es un virus desnudo de estructura icosaédrica que pertenece a la familia *Reoviridae*. Éste posee una cápside de tres capas protéicas; la cápside más externa se encuentra conformada por las proteínas estructurales VP7 y VP4, la intermedia por VP6 y la nucleocápside por VP2 [56]. Su genoma está compuesto por 11 segmentos de RNA de doble cadena, los cuales codifican 6 proteínas no estructurales (NSP1- NSP5/NSP6) y 6 proteínas estructurales (VP1-VP6) [57]. Por su parte, las proteínas estructurales se encuentran implicadas en la entrada celular, la especificidad del hospedero y funciones enzimáticas asociadas con la replicación y transcripción del genoma viral [58]. Mientras que, dentro de las proteínas no estructurales, la NSP4 cumple un rol importante en el ciclo replicativo del virus y en su patogenicidad, pues al unirse a la membrana del retículo endoplasmático, ayuda al ensamblaje de nuevos viriones [59]. Y al ser secretada al medio extracelular produce en las células vecinas un desbalance osmótico causado por una abundante liberación de calcio mitocondrial [60]. Por otro lado, esta proteína se transloca a la mitocondria e induce apoptosis formando poros en la membrana mitocondrial, a través de los cuales se liberan factores apoptóticos en el citosol [61, 62,63].

Siendo así, la replicación del rotavirus inicia mediante el clivaje de la proteína de cápside externa VP4, por efecto de la tripsina, en VP5 y VP8. La adherencia del virus a las células epiteliales del intestino (enterocitos maduros) se da mediante los receptores celulares primarios (ácido siálico) y secundarios (integrinas). Posteriormente, el

virus atraviesa la membrana celular y se internaliza en endosomas, donde por acción del pH y la baja concentración de calcio pierde la capa más externa de la cápside, quedando como partículas DLPs [64]. Estas partículas salen del endosoma al citosol, dando comienzo a los procesos de transcripción y traducción mediante las proteínas VP1 y VP3 [56]. Las proteínas NSP2 y NSP5 son componentes esenciales de las estructuras citoplasmáticas llamadas viroplasma, y dentro de estas, las proteínas virales interactúan con los ARN dando lugar a la replicación y ensamblaje de partículas subvirales de doble capa (DLPs) [20]. Éstas partículas geman a través del retículo endoplasmático e interactúan con la proteína NSP4, la cual sirve de receptor intracelular y se encuentra implicada en la maduración de las partículas. Actúa también como viroporina liberando iones  $Ca^{2+}$  y finalmente se obtiene el ensamblaje completo de la cápside, convirtiéndose en partículas (TLPs). Luego, los viriones se liberan de las células a través de lisis celular o mediante un mecanismo de transporte vesicular independiente de Golgi en células polarizadas [27].

En la actualidad se han clasificado 10 diferentes grupos de rotavirus (A-J). El grupo A es la causa más común de infecciones en humanos y hasta la fecha hay 32 genotipos G y 46 genotipos P [27]. Así, los genotipos de rotavirus más predominantes que circulan por a nivel mundial son; G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] y G9P[8], mientras que G12[P6] y G12[P8] son genotipos emergentes [55]. Y en el caso de Colombia, los genotipos más frecuentes son G3P[8] (32,7%), G2P[4] (21,1%) y G1P[8] (19,1%) [65, 66].

### **Fitoterapéuticos.**

Según la OMS (2002), las plantas medicinales son utilizadas para desarrollar fitoterapéuticos como una alternativa para el tratamiento de enfermedades ya que el 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para su atención primaria de salud. Así la OMS (2002) define estas preparaciones como productos herbales que contienen como ingrediente activo, partes o material de plantas en estado crudo o procesados, además de excipientes (diluyentes, conservantes o solventes)

Por su parte, en Colombia, el Decreto 2266 de 2004 define los fitoterapéuticos como “productos medicinales empacados y etiquetados, cuyas sustancias activas provienen de material de la planta o asociaciones de estas, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica que se usan con fines terapéuticos”. De esa misma manera, según la resolución 2834 de 2008, el Vademécum colombiano de plantas medicinales es el responsable de construir un listado de plantas aprobadas para la elaboración de los productos fitoterapéuticos.

Los productos hechos a base en plantas medicinales han demostrado tener un potencial importante en los tratamientos de enfermedades, ya que tienen un amplio rango terapéutico y menos efectos secundarios negativos [31]. Sin embargo, es importante indicar que la complejidad de los extractos de las plantas medicinales dificulta la producción de preparaciones estandarizadas y definidas [67,68], además de que en la mayoría de los casos el principio activo se desconoce [31,57]. Debido a esto, la seguridad de dichos productos ha venido obteniendo

importancia nivel mundial [31], pues la evaluación de la seguridad de estas preparaciones debe tener estudios toxicológicos documentados [69].

### ***Achyrocline bogotensis***

En el Vademécum colombiano de plantas medicinales (2008) se encuentra registrada la planta *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC. (*Compositae*), según su descripción, se distribuye en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Nariño, y es comúnmente llamada “vira-vira, cenizo, o suso”. Alcanza un metro de altura aproximadamente, presenta inflorescencia amarilla y las hojas poseen aceites esenciales. Es ampliamente reconocida por sus usos tradicionales, dentro de los cuales se encuentra la decocción de hojas y tallos, la infusión de sus ramas y finalmente, la decocción de sus hojas, tallos y flores. El primero se usa para tratar las enfermedades de la piel, el segundo para el tratamiento de prostatitis, dolores renales y procesos inflamatorios, y el tercero para tratamiento de la tos crónica.

En este mismo se indica que el extracto de las partes aéreas de *A. bogotensis* tiene actividad antifúngica, antibacteriana y antiinflamatoria, y dentro de sus principales constituyentes se encuentran; alcaloides, flavonoides, taninos, quercetina, pinorresinol y escoporoan, entre otros. Adicionalmente, se menciona que dicha planta tiene baja toxicidad, la cual ha sido evidenciada en estudios realizados con anterioridad [70]. Por otro lado, no se encuentra incluido el reporte realizado por Téllez y col. en 2015, en el cual se evidenció la actividad antiviral contra rotavirus y astrovirus ejercida por la fracción F1(HM1) [12].

### **Antecedentes**

En 2015 Téllez y colaboradores evaluaron la actividad antiviral de extractos y fracciones obtenidos a partir de un fraccionamiento químico con diferentes solventes. Se tomaron las hojas, tallos y flores de la planta *A. bogotensis* y se llevaron a sequedad en temperatura ambiente. Así se obtuvieron tres extractos; extracto 1 (cloroformo), extracto 2 (hexano) y extracto 3 (etanol). Con éste último se realizó un fraccionamiento líquido-líquido, con el cual se determinaron tres fracciones; fracción 1 (hexano), fracción 2 (diclorometano) y fracción 3 (acetato de etilo). Para la evaluación antiviral de los extractos y fracciones mencionadas, se utilizaron tres estrategias virológicas: bloqueo, actividad virucida y actividad post-infección. Como resultado se determinó que la fracción F1 (HM1) a una concentración de 3,91 µg/mL, presentó un porcentaje de inhibición de la infectividad viral (Virucida) correspondiente a 33,5% (1 hora), 30,5% (2 horas) y 41,8% (4 horas).

A partir de estos resultados, se continuó con la formulación y preparación a escala piloto industrial con Buenas Prácticas de Manufactura de un primer lote de un producto fitoterapéutico (PFT), líquido para consumo oral, que contiene un extracto total libre de solventes y excipientes (vehículo y conservante). Éste fue evaluado por su actividad citotóxica (MTT) y antirotaviral (Inmunocitoquímica) por Valle C y Ulloa JC (datos no publicados) en células susceptibles de infección por rotavirus MA 104, determinando las concentraciones atóxicas del

producto (0,06 mg/mL a 0,49 mg/mL) y de actividad virucida (0,49 mg/mL) con un porcentaje de inhibición de 53%.

Posteriormente, se llevó a cabo la preparación del segundo lote del fitoterapéutico, el cual fue utilizado en el estudio realizado por Ramírez MC y Ulloa JC en 2017 (En preparación). De igual forma que para el primer lote de PFT, se realizó la evaluación de la actividad citotóxica y virucida determinando el rango de concentraciones atóxicas (0,015 mg/mL hasta 0,49 mg/mL) y máxima reducción del porcentaje de infectividad (60%) para la concentración 0,49 mg/mL. También se obtuvieron resultados a partir de la evaluación de los excipientes, comprobando de esa manera que el glicerol al 50% actúa como potenciador de la actividad antiviral pues se obtuvo un porcentaje de infectividad de 31% y de UFF/mL de 63%. Posteriormente, en un estudio realizado por Méndez KJ y Ulloa JC en 2018, validaron los resultados de la actividad virucida del producto mediante citometría de flujo, demostrando nuevamente que la concentración 0,49 mg/mL es la que ejerce el mayor efecto de reducción de la infectividad rotaviral con un valor de 35,1% [33].

Posteriormente, en otro estudio del mismo grupo de investigación de Virología, Amaya y col. en 2015 evaluaron la toxicidad oral sub-aguda con prueba límite usando lechones de producción recién nacidos y privados de calostro, tratándolos con dos concentraciones del producto de 1.000 y 5.000mg/Kg de peso corporal durante 14 días. Como resultado se observó ausencia de efectos adversos asociados a la administración del producto y como hallazgo interesante se encontró una aparente actividad hipoglicemiante. Los animales además no presentaron cambios en su patrón natural de conducta.

Finalmente, es importante mencionar que la fracción bioactiva y la formulación del PFT de *A. bogotensis* fueron patentadas en 2017 (Patente No. 16-017515 Superintendencia de Industria y Comercio Colombia).

### **Toxicidad predictiva intestinal y marcadores de muerte celular.**

La toxicología predictiva se encarga de utilizar diferentes herramientas entre ellas las OMICAS las cuales permiten predecir posibles efectos de compuestos químicos en sistemas *In vivo* [71]. Una de estas herramientas es el uso de modelos celulares (*In vitro*) y en el caso de la línea celular C2BBel ha sido un ejemplo de utilidad para análisis de toxicidad de xenobióticos [72,73,74].

El estudio de marcadores de muerte celular proporciona información sobre los efectos que potencialmente se pueden dar después de la exposición a sustancias, además de permitir su cuantificación. En muchos casos, los marcadores que se pueden evaluar *In vitro* coinciden con los marcadores *In vivo* y por esto, representan una herramienta que permite la evaluación y predicción de los efectos adversos producidos por sustancias que son suministradas a los humanos [75].

Uno de los marcadores más estudiados es la apoptosis o muerte celular programada. Las sustancias que generan apoptosis, activan una cascada de señalización intracelular generada por la unión entre ligandos específicos y receptores de muerte que se encuentran en la membrana celular [76]. A partir de estas cascadas de señalización, las células expresan diferentes marcadores, indicando el proceso en el que se encuentran [77]. Además, se activan enzimas intracelulares específicas para coordinar la descomposición de estructuras celulares, y además en estos procesos las señales se controlan mediante moduladores e inhibidores [60].

Así, las células que experimentan la apoptosis temprana translocan el fosfolípido (fosfatidilserina) desde el interior hacia la parte externa de la membrana plasmática antes de que ocurra la apoptosis, por lo que dicho fosfolípido actúa como indicador de alteraciones en la estructura de la membrana plasmática [78].

Por otra parte, la fragmentación nuclear es un indicador de la muerte celular apoptótica tardía, pues es uno de los eventos finales e irreversibles en dicho proceso. La degradación del ADN ocurre en respuesta a varios estímulos apoptóticos, el aumento del calcio intracelular activa las caspasas, las cuales a su vez activan la ADNasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , fragmentando el ADN [79]. Además de esto, puede haber disfunción mitocondrial mediada por algunas moléculas que pueden inhibir la cadena respiratoria. Por lo cual, la mitocondria es un indicador de toxicidad significativa, pues cumple un rol importante en la respuesta a estímulos, cambios redox, mantenimiento de la homeostasis celular, entre otros [80].

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Evaluar la producción de marcadores de muerte por parte de un fitoterapéutico antiviral en células intestinales humanas polarizadas C2BBE1.

### **Específico**

- Evaluar el efecto producido sobre la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, estabilidad estructural de la membrana plasmática y la fragmentación del DNA, en células intestinales humanas polarizadas C2BBE1 tratadas con un fitoterapéutico antirotaviral.

## METODOLOGÍA

### **Cultivo celular y producto fitoterapéutico (PFT) de *A. bogotensis*.**

Se utilizó la línea celular C2BBE1-ATCC 2102™ proveniente de células de adenocarcinoma de colon humano (subclon CaCo2). Las células se cultivaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de atmósfera húmeda en medio de cultivo Advanced DMEM (Invitrogen™) suplementado con 5% de suero fetal bovino, antibiótico/antimicótico y L-glutamina (2mM).

El PFT de *A. bogotensis* utilizado para el desarrollo del presente trabajo provino del segundo lote preparado a escala industrial con buenas prácticas de manufactura. Asimismo, previo a los ensayos el PFT fue filtrado por membrana con tamaño de poro de 0,8 µm a fin de evitar interferencia de la lectura espectrofotométrica por los sólidos suspendidos del extracto vegetal. Adicionalmente es preciso aclarar que las concentraciones del PFT evaluadas en el presente trabajo estuvieron en el orden de mg/mL, debido a que está preparado con el extracto total de las partes aéreas de la planta y no solamente con la fracción antiviral F1 (HM1). Esto se permite lograr la biodisponibilidad de los compuestos de F1 en los ensayos, los cuales corresponden aproximadamente al 10% del extracto total según estudios cromatográficos previamente realizados por nuestro grupo de investigación. Finalmente el uso del extracto total en el PFT permite a su vez reducir los costos de producción y la ausencia de solventes orgánicos.

### **Determinación del efecto citotóxico medido por la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, ejercido por el PFT de *A. bogotensis* (segundo lote) en células intestinales - C2BBE1.**

Para determinar el efecto citotóxico ejercido por el fitoterapéutico piloto de interés sobre las células C2BBE1, se utilizó el método de MTT que mide la actividad metabólica dependiente de la respiración mitocondrial. Para esto entonces se sembraron 10.000 células por pozo diluidas en Advanced DMEM durante 14 días para lograr su polarización. Así, las células fueron tratadas durante 48 horas con 15 concentraciones del PFT, realizando diluciones base dos, desde la concentración de 250 mg/mL hasta 0,01 mg/mL. Cada concentración fue evaluada por triplicado dejando como controles células sin tratamiento y como control de actividad citotóxica células expuestas a 50 mM de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Transcurrido el tiempo de exposición, se continuó con la medición de la viabilidad celular utilizando el reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol – Sigma-Aldrich® Cat# M2128) siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, se agregaron 50 µL del reactivo a concentración final de 0,17 µg/pozo y las placas se incubaron a 37°C por 4 horas. A cabo de este tiempo se retiró todo el contenido líquido del pozo y se agregaron 100 µL de DMSO (Merck, Cat# 317275). Luego, las placas fueron agitadas a 550 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y finalmente se realizó una lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540<sub>nm</sub> utilizando el fotómetro de placas Multiskan FC (Thermo Scientific). Las absorbancias obtenidas de tres experimentos independientes fueron normalizadas a porcentaje teniendo en cuenta que el valor de los

controles sin tratamiento correspondió al 100% de la viabilidad celular y posteriormente se promediaron los resultados de todos los experimentos.

### **Determinación de marcadores de muerte asociados a apoptosis producidos por el PFT de *A. bogotensis* (segundo lote) en las células intestinales - C2BBe1.**

Para la determinación de marcadores de muerte producidos por el fitoterapéutico piloto en las células C2BBe1, se usó el estuche comercial ApoDETECT™ - Annexin V-FITC - Kit (Catálogo # 33-1200/Invitrogen™) con medición por fluorometría. En este caso se buscó medir la fosfatidilserina translocada y la fragmentación del DNA, y para esto, de igual manera que en el paso anterior, se cultivaron 10.000 células en placas negras fondo claro de 96 pozos (Costar® Cat # 3603) diluidas en el medio Advanced DMEM por 14 días hasta su polarización. Posteriormente, las células fueron tratadas por triplicado con 5 concentraciones del fitoterapéutico (250/62,5/15,62/3,9/0,97mg/mL), que representan un rango de las 15 concentraciones evaluadas mediante el método de MTT, durante 24 horas. Como control de tratamiento se usaron células sin tratamiento. No se logró realizar un ensayo adicional previsto para probar un control de inducción de apoptosis por el cierre de la Universidad por la situación actual de pandemia.

Al cabo de las 24 horas y siguiendo las instrucciones de fabricante, se agregaron en oscuridad los reactivos: Anexina V conjugada con el FITC (Fluorescein isothiocyanate) y el fluorocromo de Yoduro de propidio (20µg/mL). Posteriormente, se midió la fluorescencia utilizando el lector de placas Omega FLUOStar® con filtros de 488<sub>nm</sub> y 617<sub>nm</sub>, respectivamente. Los resultados de tres experimentos independientes se expresaron en Unidades de Fluorescencia Relativa (UFR).

### **Estadística**

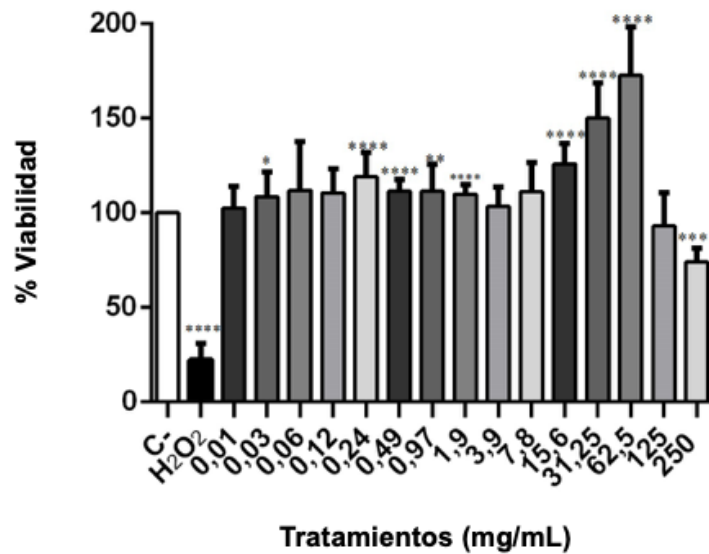
Los resultados correspondientes a cada prueba fueron analizados utilizando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, con un nivel de confianza del 95% (significancia <0.05) mediante el uso del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Efecto citotóxico ejercido por PFT de *A. bogotensis* en células polarizadas - C2BBe1.**

Para evaluar el efecto producido sobre la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial, se expusieron las células polarizadas C2BBe1 a 15 concentraciones de PFT de *A. bogotensis* en el rango de 250 mg/mL hasta 0,01 mg/mL. La **Figura 1** corresponde a la representación gráfica de los porcentajes de viabilidad obtenidos a partir del ensayo de MTT. A partir de los resultados, se determinó que las concentraciones del PFT ≤62,5 mg/mL mantienen una viabilidad celular mayor al 95%. Sin embargo, se observó que las concentraciones de 62,5 mg/mL y 31,25 mg/mL mostraron un incremento significativo de 182% y 160%, respectivamente.

Finalmente, las concentraciones que mostraron ejercer disminución de la viabilidad o citotoxicidad (Viabilidad menor al 95%), fueron 125mg/mL y 250mg/mL.



**Figura 1.** Evaluación de la actividad succinato deshidrogenasa mitocondrial en células polarizadas C2BBE1 tratadas con 15 concentraciones del PFT piloto obtenido de *A. bogotensis*. Como control de tratamiento se usó medio de cultivo sin suero fetal bovino (C-) y como control de actividad citotóxica 50 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado y todos los valores se expresan como promedio  $\pm$  d.s./ \*(p <0,05) Prueba U de Mann-Whitney.

Las mismas concentraciones del PFT presentadas en la **Figura 1**, fueron las evaluadas por Ramírez y Ulloa en 2017, quienes determinaron un rango de concentraciones atóxicas ( $\leq 95\%$  de viabilidad) desde 0,01mg/mL hasta 0,49mg/mL en células normales de riñón de mono MA104. Los resultados de citotoxicidad obtenidos en el presente trabajo concuerdan con el rango utilizado por los autores mencionados, pues las concentraciones que permitieron mantener una viabilidad  $\geq 95\%$ , oscilaron entre 0,01mg/mL hasta 62,5 mg/mL. Es bien conocido que las células tumorales son más resistentes a diferentes compuestos en comparación con células normales, toda vez que tienen alteradas sus vías de señalización, metabolismo y división celular [83, 84]. Para el presente trabajo se intentó buscar un control de actividad pro-apoptótica y desde la literatura se determinó que las células CaCo2, línea progenitora de las C2BBE1, son resistentes a una colección de compuestos antitumorales como la doxorubicina, irinotecan y cisplatino [85, 86, 87].

Por otro lado, se observó que concentraciones mayores de 62,5mg/mL del PFT son capaces de producir toxicidad en las células de adenocarcinoma de colon C2BBE1, resultado relevante porque podría estudiarse otro

uso para este producto. Thomas y colaboradores reportaron en 2012 que *A. bogotensis* contiene isómeros de flavona A y B, los cuales ejercen citotoxicidad en CaCo2 [90]. En este reporte se describe que las posiciones de los grupos-OH y -OCH<sub>3</sub> de estos isómeros alteran la conformación y localización de los compuestos que se captan por la célula porque generan deslocalización de carga en estos. Como resultado de esta característica en las flavonas se ha visto que hay un comportamiento diferencial entre el efecto citotóxico que ejercen los compuestos en células normales y células tumorales [90].

No obstante lo anterior, anteriores resultados coinciden con lo mencionado en el estudio de Pombo y colab., en el cual se realizó la caracterización fitoquímica y farmacológica de un extracto de *A. bogotensis*, determinando que la planta se encuentra dentro del grupo denominado “prácticamente no tóxicos” de acuerdo con la tabla de clasificación de Williams [89]. Como se mencionó anteriormente, *A. bogotensis* contiene diversos compuestos entre ellos una proporción de flavonoides [90, 12], para lo cuales se ha reportado consistentemente que ejercen un papel tanto protector como citotóxico dependiendo de las concentraciones de uso [91] no obstante el PFT de *A. bogotensis* por contener un número no determinado a la fecha de compuestos, la citotoxicidad observada es el resultado de los efectos sinérgicos de sus compuestos.

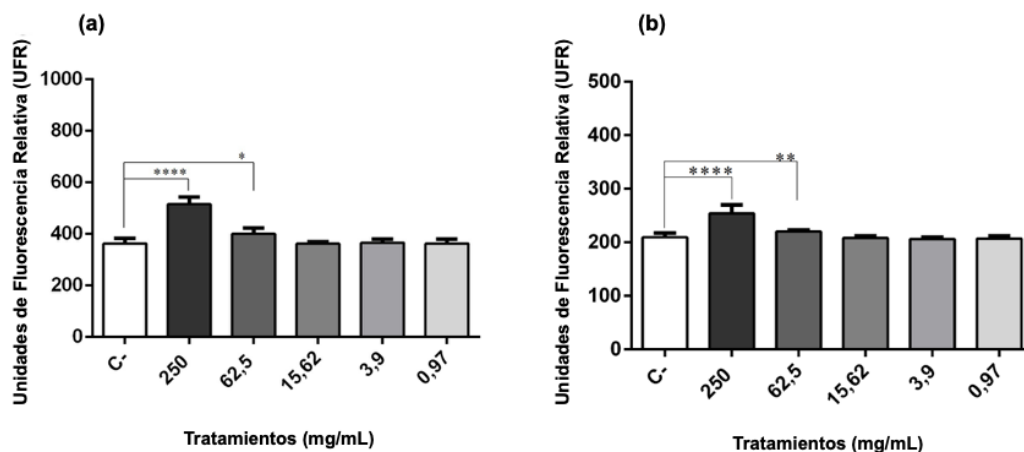
Ahora bien, las concentraciones de 31,25mg/mL y 62,5mg/mL mostraron ejercer una estimulación de la respiración mitocondrial a través de la significativamente mayor actividad observada de la enzima succinato deshidrogenasa por la prueba de MIT. Esto puede conllevar a eventos intracelulares intensamente pro-oxidantes, lo que teóricamente lleva a la apoptosis celular. De recordar que el modelo *In vitro* trabajado corresponde a células polarizadas, las cuales no se didiven porque se encuentran diferenciadas formando una barrera intestinal en forma de cepillo, por tanto, la respuesta de aumento de viabilidad no corresponde al aumento de la proliferación celular. Los resultados que se muestran más adelante pueden estar relacionados con esta condición.

Para tratar de explicar un poco más los resultados anteriores, se puede especular que hubo una continua generación de ROS en las células, lo cual llevaría al aumento del valor en el porcentaje de viabilidad en comparación con el control negativo. Esto podría deberse a que la enzima succinato deshidrogenasa se encuentra involucrada en la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS), pudiendo en este caso permitir la producción de ROS [92, 93, 94]. De acuerdo a esto, los flavonoides presentes en el PFT evaluado podrían estar involucrados, pues según el estudio de Kunzt y colaboradores, los flavonoides con los grupos orto-OH en el anillo B incrementan los niveles de las especies reactivas de oxígeno en las células tumorales. Esto se debe a que los flavonoides con este tipo de estructura tienen un radical fenoxilo de alto potencial de oxidación, el cual permite la formación de radicales en lugar de eliminarlos. Además, según lo reportado en la literatura, este tipo de flavonoides produce un aumento desde 30 a 50 veces la formación de estas especies [95], pudiendo generar incluso la oxidación de lípidos [96, 97, 98].

Finalmente, los taninos, otro constituyente del PFT, pueden estar involucrados en la reducción de la viabilidad en células tumorales, debido a que generan citotoxicidad dependiendo de las concentraciones [99]. De modo que, en este caso, al exponer las células a una concentración tan alta como la es 250 mg/mL, los taninos podrían estar causando disfunción mitocondrial al incrementar la concentración del radical anión superóxido [100], el cual afecta el equilibrio oxidante-antioxidante.

### Determinación de los marcadores de muerte producidos por el PFT de *A. bogotensis* en células polarizadas - C2BBe1.

Para evaluar la pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática y la fragmentación del DNA como marcadores de muerte celular ejercidos por el fitoterapéutico piloto de *A. bogotensis*, se expusieron las células polarizadas C2BBe1 a 5 concentraciones de este, en el rango de 250 mg/mL hasta 0,97 mg/mL. La **Figura 2** muestra que las concentraciones  $\leq 15,62$  mg/mL no generan fragmentación del DNA y no comprometen la estabilidad de la membrana. En contraste, concentraciones  $\geq 62,5$  mg/mL producen la pérdida de la estructura de la membrana plasmática y le fragmentación del DNA.



**Figura 2.** Evaluación de marcadores de muerte producidos por 5 concentraciones del PFT piloto obtenido de *A. bogotensis* en células polarizadas C2BBe1. (a) Medición mediada por la translocación de la fosfatidilserina (488nm) y (b) fragmentación del DNA (617nm). El control sin tratamiento (C-) corresponde a las células tratadas con Advanced DMEM sin suero fetal bovino. Todos los valores se expresan como promedio  $\pm$  d.s. / \*( $p < 0,05$ ) Prueba U de Mann-Whitney.

Como se ha mencionado la mitocondria juega un papel fundamental en las respuestas generadas tras la exposición a diferentes compuestos debido a que en ésta se encuentra un sistema complejo de sensores que detectan perturbaciones en la homeostasis intracelular. Como se observa en la **Figura 2**, los resultados de efectos negativos sobre las células C2BBe1 mediados por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y fragmentación celular, se correlacionan con los resultados observados en los ensayos de citotoxicidad celular

mediada por la respiración mitocondrial con la prueba de MTT. Las concentraciones que muestran de manera consistente los efectos deletéreos sobre la línea celular son aquellas  $\geq 62,5\text{mg/mL}$ , y se puede afirmar que el efecto es agresivo toda vez que se produce la desestabilización estructural de la membrana y del material genético.

En este caso, es muy probable a que la perturbación se deba al estrés oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) [101] generadas por las altas concentraciones del fitoterapéutico. De esa manera los resultados sugieren que hubo apoptosis extrínseca porque la mitocondria recibe señales extrínsecas de estrés para ejecutar la muerte celular [101, 60]. Los xenobióticos estimulan los procesos apoptóticos porque expresan ligandos extracelulares que son recibidos por los receptores de muerte de la membrana [102,103]. Esto podría deberse a que, compuestos del fitoterapéutico como los terpenos y fenoles, tienen la capacidad de inducir la pérdida de potencial de la mitocondria, activando la caspasa 8 (involucrada en la vía extrínseca), la cual a su vez activa las caspasas ejecutoras (3 y 7), llevando a las células a la muerte [104, 105]. La activación de las caspasas ejecutoras, generan una cascada proteolítica que causa la escisión de proteínas celulares, en la cual se encuentra incluida la proteína inhibidora de la DNasa, la cual fragmenta el DNA nuclear [48].

Ahora bien, teniendo en cuenta que los resultados muestran ser positivos para los dos fenómenos evaluados, se sugiere que la apoptosis producida es tardía. Pues luego de la fragmentación del DNA, ocurre también la translocación de la fosfatidilserina por la desintegración de la membrana celular causada por la activación de señales enzimáticas [106,107]. Posiblemente ensayos de cinética a la exposición al PFT podrían esclarecer este proceso.

Finalmente, y por otro lado, otra posible explicación para estos resultados, es que puede haber inhibición de la proteína quinasa en las células tumorales pues esta participa en la transmisión de señales de supervivencia. No obstante, reportes han indicado que dependiendo de los componentes de los extractos de las plantas medicinales, puede presentarse la regulación negativa de la proteína mencionada, generando de esa manera factores pro-apoptóticos [108,109].

## **CONCLUSIÓN**

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se sugiere que el producto fitoterapéutico antirotaviral de *A.bogotensis* ejerce baja toxicidad intestinal *In vitro* lo que correlaciona con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación tanto *In vitro* como *In vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Anwari P, Debellut F, Pecenka C, Parwiz SM, Clark A, Groman D, et al. Potential impact and cost-effectiveness of rotavirus vaccination in Afghanistan. *Vaccine*, 2018.
2. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *The Lancet*, 209–22, 2013.
3. Shah MP, Tate JE, Mwenda JM, Steele AD, Parashar UD. Estimated reductions in hospitalizations and deaths from childhood diarrhea following implementation of rotavirus vaccination in Africa. *Expert Review of Vaccines*. 2017;16(10):987–95.
4. Anwari P, Safi N, Payne DC, Jennings MC, Rasikh S, Waciqi AS, et al. Rotavirus is the leading cause of hospitalizations for severe acute gastroenteritis among Afghan children <5 years old. *Vaccine*, 36:7765–8, 2018.
5. Clark A, Black R, Tate J, Roose A, Kotloff K, Lam D, et al. Estimating global, regional and national rotavirus deaths in children aged <5 years. *PLoS One*, 12(9), 2017.
6. Chawla-Sarkar M, Banerjee A, Lo M, Mitra S, Okamoto K, Deb A, et al. A decade-long temporal analyses of human group-A rotavirus among children with gastroenteritis: Prevacination scenario in West Bengal, eastern India. *Journal of Medical Virology*, 2020.
7. Burnett E, Jonesteller CL, Tate JE, Yen C, Parashar UD. Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. *Journal of Infectious Diseases*, 2017.
8. Burnett E, Tate JE, Kirkwood CD, Nelson EAS, Santosham M, Steele AD, et al. Estimated impact of rotavirus vaccine on hospitalizations and deaths from rotavirus diarrhea among children <5 in Asia. *Expert Review of Vaccines*, 2018.
9. Pertuz Meza Y. Incidencia Y Factores De Riesgo Asociados a Enfermedad Diarreica Aguda Por Rotavirus, Santa Marta, 2012. *Hacia la Promoción de la Salud*, 2014.
10. Martínez-Gutiérrez M, Arcila-Quiceno V, Trejos-Suárez J, Ruiz-Saenz J. Prevalence and molecular typing of rotavirus in children with acute diarrhoea in Northeastern Colombia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 61, 2019.
11. Cáceres DC, Peláez D, Sierra N, Estrada E, Sánchez L. La carga de la enfermedad por rotavirus en niños menores de cinco años, Colombia, 2004. *Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health*, 20:9–21, 2006.
11. Blanco Díaz MA, Reyes Romagosa DE. Análisis estadístico de la enfermedad diarreica aguda en pacientes atendidos en servicio de urgencias durante el 2012-2013. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 2015.
12. Téllez MA, Téllez AN, Vélez F, Ulloa JC. In vitro antiviral activity against rotavirus and astrovirus infection exerted by substances obtained from *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC. (*Compositae*). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

13. Parashar UD, Nelson EAS, Kang G. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *BMJ (Online)*, 2013.
14. Kollaritsch H, Kundi M, Giaquinto C, Paulke-Korinek M. Rotavirus vaccines: A story of success. *Clinical Microbiology and Infection*, 68:9–18, 2015.
15. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013 - Recommendations. *Vaccine*, 88:49–64, 2013.
16. Pecenka C, Debellut F, Bar-Zeev N, Anwari P, Nonvignon J, Shamsuzzaman M, et al. Re-evaluating the cost and cost-effectiveness of rotavirus vaccination in Bangladesh, Ghana, and Malawi: A comparison of three rotavirus vaccines. *Vaccine*, 2018.
17. De la Hoz F, Alvis N, Narváez J, Cediel N, Gamboa O, Velandia M. Potential epidemiological and economical impact of two rotavirus vaccines in Colombia. *Vaccine*, 28:3856–64, 2010.
18. Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Global Impact of Rotavirus Vaccination on Diarrhea Hospitalizations and Deaths Among Children <5 Years Old: 2006–2019. *The Journal of Infectious Diseases*, 2020.
19. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, et al. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatrics*, 2018.
20. Desselberger U. Differences of rotavirus vaccine effectiveness by country: Likely causes and contributing factors. *Pathogens*, 6:1–13, 2017.
21. Gruber JF, Hille DA, Liu GF, Kaplan SS, Nelson M, Goveia MG, et al. Heterogeneity of Rotavirus Vaccine Efficacy among Infants in Developing Countries. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 2017.
22. López-Medina E, Parra B, Dávalos DM, López P, Villamarín E, Pelaez M. Acute gastroenteritis in a pediatric population from Cali, Colombia in the post rotavirus vaccine era. *International Journal of Infectious Diseases*, 73:52–9, 2018.
23. Velázquez RF, Linhares AC, Muñoz S, Seron P, Lorca P, De Antonio R, et al. Efficacy, safety and effectiveness of licensed rotavirus vaccines: A systematic review and meta-analysis for Latin America and the Caribbean. *BMC Pediatrics*, 2017.
24. Oliveira LH de, Camacho LAB, Coutinho ESF, Ruiz-Matus C, Leite JPG. Rotavirus vaccine effectiveness in Latin American and Caribbean countries: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*, 33:248–54, 2015.
25. Burnett E, Parashar U, Tate J. Rotavirus Vaccines: Effectiveness, Safety, and Future Directions. *Pediatric Drugs*, 2018.
26. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *New England Journal of Medicine*, 354:23–33, 2006.
27. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 2017.
28. Bucardo F, Rippinger CM, Svensson L, Patton JT. Vaccine-derived NSP2 segment in rotaviruses from vaccinated children with gastroenteritis in Nicaragua. *Infection, Genetics and Evolution*, 1282–94, 2012.

29. Hemming M, Vesikari T. Detection of RotaTeq vaccine-derived, Double-reassortant rotavirus in a 7-year-old child with acute gastroenteritis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 33:655–6, 2014.
30. Gandhi GR, Barreto PG, Lima B dos S, Quintans J de SS, Araújo AA de S, Narain N, et al. Medicinal plants and natural molecules with in vitro and in vivo activity against rotavirus: A systematic review. *Phytomedicine*, 2016.
31. Ekor M. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Neurology*, 4, 2014.
32. Bojer P, Lam Ruiz Pav GD. Vademecum colombiano de plantas medicinales. Missouri Botanical Garden, 2007.
33. Ramírez C, Méndez K, Castelblanco A, Quijano S, Ulloa J. Evaluation of *In vitro* anti-rotavirus activity and intestinal predictive toxicity exerted by a phytotherapeutic prototype of *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC. Artículo en preparación.
34. US FDA. Guidance for Industry and Other Stakeholders Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. *Human Studies*, 2007.
35. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Current Opinion in HIV and AIDS, 2010.
36. Wilmes A, Limonciel A, Leonard MO, Jennings P. Translational Biomarkers, *In Vitro* and *In Vivo*. In *In Vitro Toxicology Systems*, 459–78, 2014.
37. Armstrong D, Li S, Frieauff W, Martus H-J, Reilly J, Mikhailov D, Whitebread S, Urban L. *Predictive Toxicology: Latest Scientific Developments and Their Application in Safety Assessment*, (2), 2017.
38. Peterson MD, Mooseker MS. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2(BBe) clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *Journal of Cell Science*, 102:581–600, 1992.
39. McCracken C. Toxicity of Food-Relevant Nanoparticles in Intestinal Epithelial Models, 2015.
40. Esona MD, Gautam R. Rotavirus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35:363–91, 2015.
41. Cecílio AB, Faria DB De, Oliveira PDC, Caldas S, Oliveira DA De, Sobral MEG, et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*, 141:975–8, 2012.
41. Vesikari T. Rotavirus vaccination: A concise review. *Clinical Microbiology and Infection*, 18:57–63, 2012.
42. Weintraub ES, Baggs J, Duffy J, Vellozzi C, Belongia EA, Irving S, et al. Risk of intussusception after monovalent rotavirus vaccination. *New England Journal of Medicine*, 114:255–62, 2014.
43. Gebremedhin S, Mamo G, Gezahign H, Kung’U J, Adish A. The effectiveness bundling of zinc with Oral Rehydration Salts (ORS) for improving adherence to acute watery diarrhea treatment in Ethiopia: Cluster randomised controlled trial. *BMC Public Health*, 16:1–10, 2016.
44. AL-Ballawi ZFS, Redhwan NA, Ali M. In Vitro Studies of Some Medicinal Plants Extracts for Antiviral Activity against Rotavirus. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(2):53–8, 2017.

45. Gonçalves JLS, Lopes RC, Oliveira DB, Costa SS, Miranda MMFS, Romanos MTV, et al. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3):403–7, 2005.
46. U.S. Food & Drug Administration. Botanical Drug Development - Guidance for industry. US Department of Health and Human Services, 2016.
47. Pelkonen O. Predictive toxicity: Grand challenges. *Frontiers in Pharmacology*, 2010.
48. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: Modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015.
49. Zhang Y. Cell toxicity mechanism and biomarker. *Clinical and Translational Medicine*, 7–34, 2018.
50. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*, 332(2):237–48, 2013.
51. Yeom JS, Kim YS, Jun JS, Do HJ, Park JS, Seo JH, et al. NSP4 antibody levels in rotavirus gastroenteritis patients with seizures. *European Journal of Paediatric Neurology*, 21(2):367–73, 2017.
52. Nonvignon J, Atherly D, Pecenka C, Aikins M, Gazley L, Groman D, et al. Cost-effectiveness of rotavirus vaccination in Ghana: Examining impacts from 2012 to 2031. *Vaccine*, 36:215–21, 2018.
53. Jiang N, Shi L, Lin J, Zhang L, Peng Y, Sheng H, et al. Comparison of two different combined test strips with fluorescent microspheres or colored microspheres as tracers for rotavirus and adenovirus detection. *Virology Journal*, 2018.
54. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS ONE*, 8(9), 2013.
55. Sadiq A, Bostan N, Yinda KC, Naseem S, Sattar S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Reviews in Medical Virology*, 2018.
56. Desselberger U. 63. Rotaviruses. *Virus Research*, 190:75–96, 2014.
57. Pohjala L, Tammela P, Samanta SK, Yli-Kauhaluoma J, Vuorela P. Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays. *Analytical Biochemistry*, 362:221–8, 2007.
58. Kumar D, Singh A, Kumar P, Uversky VN, Rao CD, Giri R. Understanding the penetrance of intrinsic protein disorder in rotavirus proteome. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140:892–908, 2020.
59. Kumar S, Ramappa R, Pamidimukkala K, Rao CD, Suguna K. New tetrameric forms of the rotavirus NSP4 with antiparallel helices. *Archives of Virology*, 163:1531–47, 2018.
60. Galluzzi L, Kepp O, Krautwald S, Kroemer G, Linkermann A. Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 35:24–32, 2014.
61. Cabotanz PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15:49–63, 2014.

62. Mukherjee A, Patra U, Bhowmick R, Chawla-Sarkar M. Rotaviral nonstructural protein 4 triggers dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fragmentation during infection. *Cellular Microbiology*, 2018.
63. Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Chanda S, Nandi S, Bagchi P, et al. Rotaviral enterotoxin nonstructural protein 4 targets mitochondria for activation of apoptosis during infection. *Journal of Biological Chemistry*, 287:35004–20, 2012.
64. Lever A, Desselberger U. Rotavirus replication and the role of cellular lipid droplets: New therapeutic targets? *Journal of the Formosan Medical Association*, 6(389), 2016.
65. Cotes K, Alvis-Guzmán N, Rico A, Porras A, Cediel N, Chocontá Piraquive LA, et al. Impact assessment of the rotavirus vaccine in Colombia using rapid evaluation methods. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, 34(4):220–6, 2013.
66. Santos VS, Marques DP, Martins-Filho PRS, Cuevas LE, Gurgel RQ. Effectiveness of rotavirus vaccines against rotavirus infection and hospitalization in Latin America: Systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases of Poverty*, 5(83):1–12, 2016.
67. Carmona F, Pereira AMS. Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(2):379–85, 2013.
68. Cravotto G, Boffa L, Genzini L, Garella D. Phytotherapeutics: An evaluation of the potential of 1000 plants. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 35:11–48, 2010.
69. World Health Organization (WHO) [Internet]. 2002. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14878e/s14878e.pdf>.
70. Bernal HY, *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC. (*Compositae*). Plantas medicinales nativas de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2012.
71. Singh S, Singhal NK, Srivastava G, Singh MP. Omics in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2010.
72. McCracken C, Zane A, Knight DA, Dutta PK, Waldman WJ. Minimal intestinal epithelial cell toxicity in response to short- and long-term food-relevant inorganic nanoparticle exposure. *Chemical Research in Toxicology*, 2013.
73. McCracken C, Zane A, Knight DA, Hommel E, Dutta PK, Waldman WJ. Oxidative stress-mediated inhibition of intestinal epithelial cell proliferation by silver nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 29:1793–808, 2015.
74. Singh A, Sweeney MF, Yu M, Burger A, Greninger P, Benes C, et al. TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers. *Cell*, 2012.
75. Huggett RJ, Klmerle RA, Mehrle PM, LaPoint TW. Biomarkers: Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*, 2018.
76. Li K, Wu D, Chen X, Zhang T, Zhang L, Yi Y, et al. Current and emerging biomarkers of cell death in human disease. *BioMed Research International*, 2014.

77. Green DR, Llambi F. Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2015.
78. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology*, 2015.
79. McIlroy D, Sakahira H, Talanian R V., Nagata S. Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene*, 18:4401–8, 1999.
80. Palmeira CM, Duarte F V., Teodoro JS, Varela AT, Rolo AP. Biomarkers of mitochondrial dysfunction and toxicity. *In: Biomarkers in Toxicology*, 847–61, 2014.
81. Demchenko AP. Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*, 65:157–72, 2013.
82. Wan CP, Sigh R V., Lau BHS. A simple fluorometric assay for the determination of cell numbers. *Journal of Immunological Methods*, 1994.
83. Kumari S, Badana AK, Murali Mohan G, Shailender G, Malla RR. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker Insights*, 13:1–9, 2018.
84. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010.
85. Fale PL, Altharawi A, Chan KLA. In situ Fourier transform infrared analysis of live cells’ response to doxorubicin. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2640–8, 2015.
86. Kaku Y, Tsuchiya A, Kanno T, Nishizaki T. Irinotecan induces cell cycle arrest, but not apoptosis or necrosis, in Caco-2 and CW2 colorectal cancer cell lines. *Pharmacology*, 2015.
87. Kitada N, Takara K, Minegaki T, Itoh C, Tsujimoto M, Sakaeda T, et al. Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 62:577–584, 2008.
88. Fang Y, Cao W, Xia M, Pan S, Xu X. Study of structure and permeability relationship of flavonoids in caco-2 cells. *Nutrients*, 9:1–15, 2017.
89. Williams P, Burson J.J. Industrial Toxicology Safety and Health Application in the Work Place. Ed Vaan Nostrand Rein Hold Company, New York, 1985.
90. Thomas CM, Wood RC, Wyatt JE, Pendleton MH, Torrenegra RD, Rodriguez OE, et al. Anti-neoplastic activity of two flavone isomers derived from *Gnaphalium elegans* and *Achyrocline bogotensis*. *PLoS ONE*, 2012.
91. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacognosy Reviews*, 2014.
92. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 187:1086–101, 2016.
93. Huang S, Millar AH. Succinate dehydrogenase: The complex roles of a simple enzyme. *Current Opinion in Plant Biology*, 16:344–9, 2013.

94. Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1807:1432–43, 2011.
95. Rietjens IMCM, Boersma MG, Haan L de, Spenkeliink B, Awad HM, Cnubben NHP, et al. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11:321–33, 2002.
96. Skulachev VP. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*, 11:473–85, 2006.
97. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010.
98. Forouzesh F. Cytotoxic Activity of the Root of *Euphorbia Tebranica* Ethanolic Extract Against Caco-2 Colorectal Cancer Cell Line. *Multidisciplinary Cancer Investigation*, 2(2):2–7, 2018.
99. Haq Ihsan IU, Ullah N, Bibi G, Kanwal S, Ahmad MS, Mirza B. Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical analysis of *Euphorbia wallichii* root extract and its fractions. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1):241–9, 2012.
100. Omar U, Aloqbi A, Yousrl M, Howell NK. Effect of punicalagin on human colon cancer CACO-2 cells. *Malaysian Journal of Nutrition*, 22(1):125–36, 2016.
101. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: Master regulators of danger signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012.
102. Nair P, Lu M, Petersen S, Ashkenazi A. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. In: *Methods in Enzymology*, 99–121, 2014.
103. Wnuk A, Kajta M. Steroid and Xenobiotic Receptor Signalling in Apoptosis and Autophagy of the Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 18:1–26, 2017.
104. Reyes-Zurita FJ, Rufino-Palomares EE, Medina PP, Leticia García-Salguero E, Peragón J, Cascante M, et al. Antitumour activity on extrinsic apoptotic targets of the triterpenoid maslinic acid in p53-deficient Caco-2 adenocarcinoma cells. *Biochimie*, 95:2157–6, 2013.
105. George BPA, Tynga IM, Abrahamse H. In vitro antiproliferative effect of the acetone extract of *rubus fairholmianus* gard. Root on human colorectal cancer cells. *BioMed Research International*, 2015.
106. Holdenrieder S, Stieber P. Apoptotic markers in cancer. *Clinical Biochemistry*, 37:605–17, 2004.
107. Aitio A, Anderson D, Blain P, Bond J, Buratti M, Calder I, et al. Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles. *Environmental Health Criteria*, 1993.
108. Amar Y, Meddah B, Bonacorsi I, Costa G, Pezzino G, Saija A, et al. Phytochemicals, antioxidant and antiproliferative properties of *rosmarinus officinalis* L on U937 and CaCo-2 cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(1):315–27, 2017.
109. Galkin A, Evaluation of natural products in apoptosis, protein kinase c activation and caco-2 cell permeability, 2008.

110. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38:133–42, 1999.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Juan Carlos Ulloa, por su acompañamiento y compromiso con el presente trabajo.

Al Dr. José Iglesias, por su colaboración en el desarrollo de la investigación.

A mi familia por estar presente siempre, por brindarme su confianza y apoyo en todo momento.

A mis amigos, quienes me han enseñado a disfrutar de las experiencias.

A Andrés Pascagaza por sus consejos y amistad incondicional.