



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Actividad anticancerígena de extractos de
maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) en
células de cáncer de colon humano.

Valentina Ramírez Maldonado

Tutora: Sandra Sulay Arango Varela Bióloga M.Sc

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín
Escuela de Biociencias
Maestría en Ciencias - Biotecnología
Octubre, 2015.

Actividad anticancerígena de extractos de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) en células de cáncer de colon humano.

Valentina Ramírez Maldonado

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Magíster en Ciencias – Biotecnología

Director:

Bióloga M. Sc. Sandra Sulay Arango Varela

Codirectores:

phD, Maria Elena Maldonado Celis

Biólogo M. Sc. Juan Bautista López Ortíz

Línea de Investigación:

Mutagénesis y Cáncer

Grupos de Investigación:

Grupo de Investigación e Innovación Biomédica (GI²B)- Instituto Tecnológico
Metropolitano- ITM. Grupo de Investigación Impacto de los Componentes
Alimentarios en la Salud (ICAS)- Universidad de Antioquia. Grupo de
Biotecnología Animal- Universidad Nacional, Sede Medellín.

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Escuela de Biociencias

Maestría en Ciencias – Biotecnología

Octubre, 2015.

“Si todo te da igual, estás haciendo mal las cuentas”.

Albert Einstein

Agradecimientos

A mi familia: a mi mamá por ser el mejor ejemplo de disciplina y esfuerzo y por su apoyo incondicional. A mi papá por regalarme su curiosidad por las cosas que parecen simples y por motivarme a seguir en el camino del aprendizaje. Y a mi hermano “sancho” quien ha sido y será un motivo más para seguir hacia adelante.

A mi “papá científico”. El profesor Juan Bautista López Ortiz por su entrega incondicional, por su nobleza, su amabilidad, respeto y por su pasión por el conocimiento. Por guiarme en todo mi proceso de formación académica y por mantenerme los pies sobre la tierra recordándome que los grandes conocimientos implican grandes responsabilidades.

A la profesora Sandra S. Arango por su confianza y por aceptarme en su grupo de investigación; por su disponibilidad, formalidad y asertividad en apreciaciones y consejos para el buen desarrollo de los diferentes trabajos que realizamos, y por su acompañamiento durante mi formación académica y el desarrollo de esta maestría.

A la profesora Maria Elena Maldonado por compartirme sus conocimientos y hacerme parte de este proyecto de investigación. Gracias por su amabilidad y disposición para el desarrollo de esta tesis, y por su profesionalismo, dedicación y entrega en cada una de las etapas de este proceso.

Agradezco también a Johanny Aguillón por los extractos y por sus aportes al planteamiento y desarrollo de esta investigación.

En especial debo agradecer a todos las personas que motivaron este proceso. A Andrés Pulgarín “Nano”, quien me hizo soñar con esta etapa y me regaló bases importantes para este proceso investigativo. A Mauricio de la Ossa quien me mostró que “si se quiere, se puede” y en general, a mis compañeros de laboratorio por estar conmigo en estos importantes momentos de aprendizaje.

Al Laboratorio de Investigación e Innovación Biomédica (*G²B*) del Instituto Tecnológico Metropolitano (ITM) y al laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia por brindar los espacios para el desarrollo de los experimentos. Finalmente, debo agradecer a Colciencias y al ITM quienes me patrocinaron con el programa de becas como joven investigadora durante un año para la realización de este proyecto.

Resumen

Actividad biológica anticancerígena de extractos de maracuyá evaluados en células de cáncer de colon humano.

Ramírez Maldonado, Valentina.^{1,2}; Arango Varela Sandra S²., Maldonado Celis Maria³ E., López Ortiz, Juan B.¹

¹Grupo de Investigación en Biotecnología Animal, Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.²Grupo de Investigación e Innovación Biomédica (GI²B)- Instituto tecnológico Metropolitano.³Grupo de Investigación Impacto de los Componentes Alimentarios en la Salud (ICAS).Escuela de Nutrición y dietética, Universidad de Antioquia.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y muerte a nivel mundial. Entre estas neoplasias el Cáncer de Colón (CC) ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad. Debido a que su etiología muestra una correlación directa con hábitos dietarios no saludables, se ha ampliado la búsqueda de constituyentes alimenticios puedan contribuir a la prevención y tratamiento de esta enfermedad. Algunos estudios de extractos y fitoquímicos de especies del género *Passiflora L.* han mostrado actividad biológica promisoría. Sin embargo, es poca la investigación sobre la compleja mezcla de fitoquímicos de especies como *Passiflora edulis* que podrían interactuar y presentar actividad anticancerígena. El objetivo de este trabajo fue evaluar propiedades biológicas del extracto acuoso del fruto y el extracto etanólico de hojas de maracuyá en células de adenocarcinoma de colon Caco-2, SW480 y su derivada metastásica SW620, y sobre la línea celular no tumoral CHO-K1. Se realizó la marcha fitoquímica preliminar de ambos y se evaluó el efecto sobre la viabilidad celular mediante MTT y exclusión del colorante azul de tripano, el efecto antiproliferativo por sulforodamina B y eficiencia de clonación, el efecto inductor de muerte celular y sobre el ciclo celular por citometría de flujo, la actividad de caspasa 3 y la proporción de glutatión oxidado como medida del estrés oxidativo. Se encontró un mejor efecto del extracto etanólico con una Dosis letal media (DL₅₀) de 167,62µg/ml a las 24 horas y una concentración umbral en proporciones superiores a 229µg/ml, una inhibición de la proliferación de hasta 50% a las 24 de horas de tratamiento con la DL₅₀ y una reducción en la eficiencia de clonación relativa de hasta 76.6% para una concentración de 160.3µg/ml. Se observó un incremento en el número de células necróticas en cultivos tratados durante 48 horas y un incremento en las poblaciones SubG1 y G2/M. Además se aumentó la actividad de Caspasa3 y se probó una acumulación del glutatión oxidado y una selectividad celular con un mayor efecto en células SW620 y menor en células CHO-K1. En su conjunto, esta investigación sugiere que *P. edulis* es una fuente potencial de compuestos fitoquímicos con propiedad antiproliferativa y se constituye como una aproximación a la aplicación biotecnológica para el uso de esta especie.

Palabras clave: *Passiflora edulis*, apoptosis, ciclo celular, cáncer.

Abstract

Anticancer activity of extracts of passion fruit evaluated on human colon cancer cell lines.

Ramírez Maldonado, Valentina.^{1,2}; Arango Varela Sandra S²., Maldonado Celis Maria³ E., López Ortiz, Juan B.¹

¹Grupo de Investigación en Biotecnología Animal, Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.²Grupo de Investigación e Innovación Biomédica (GI²B)- Instituto tecnológico Metropolitano.³Grupo de Investigación Impacto de los Componentes Alimentarios en la Salud (ICAS).Escuela de Nutrición y dietética, Universidad de Antioquia.

Cancer is a major cause of morbidity and death worldwide. Among these neoplasms colon cancer (CC) is ranks fourth in incidence and mortality. Because its etiology shows a direct correlation with unhealthy dietary habits, it has expanded the search for food constituents can contribute to the prevention and treatment of this disease. Some studies of extracts and phytochemicals species of *P. edulis* have shown promising biological activity. However, there is little research on the complex mixture of phytochemicals *Passiflora edulis* species as they could interact and present anticancer activity. The aim of this study was to evaluate biological properties of aqueous extract of the fruit and the ethanol extract of leaves in the adenocarcinoma of colon cell lines Caco-2, SW480 and its metastatic derived SW620, and the non-tumor cell line CHO-K1. A preliminary phytochemical analysis was performed and the effect on cell viability was evaluated by MTT and exclusion of trypan blue dye methods. Sulforhodamine B and clonogenic assay were employed using the LD₅₀ to determinate the antiproliferative effect. Inducing cell death effect and the cell cycle was assessed by flow cytometry , caspase 3 activity was performed to. Finally, the proportion of oxidized glutathione was used like a measure of oxidative stress. A better effect of the ethanol extract was found with a LD₅₀ of 167,62 µg/ml at 24 hours of treatment and there was a threshold concentration in excess of 229 µg/ml proportions, inhibition of proliferation up to 50% at 24 hours of treatment was found with LD₅₀ and a reduction in relative cloning efficiency 76.6% up to a concentration of 160.3 µg/ml. An increase in the number of necrotic cells in cultures treated for 48 hours and an increase in subG₁ and G₂/M populations were observed. In addition Caspasa3 activity was increased and an accumulation of oxidized glutathione and cell selectivity was tested with a greater effect on SW620 and smaller cells in CHO-K1 cells. Taken together, this research suggests that *P. edulis* is a potential source of phytochemical compounds with antiproliferative source property and establishes itself as an approach to biotechnological application for the use of this species.

Keywords: *Passiflora edulis*, apoptosis, cell cycle, cancer.

Contenido

| | Pág. |
|--|------|
| Resumen | IX |
| Abstract | X |
| Lista de figuras | XIII |
| Lista de tablas | XVI |
| Lista de Anexos | XVII |
| Abreviaturas y símbolos | XX |
| | |
| 1. Introducción | 2 |
| 1.1 Características generales del Cáncer de colon..... | 2 |
| 1.2 Características generales de la familia Passifloraceae..... | 4 |
| 1.2.1 El género Passiflora: Actividad Biológica y algunos metabolitos secundarios..... | 5 |
| | |
| 2. Objetivos | 7 |
| | |
| 3. Materiales y Métodos | 8 |
| 3.1. Localización | 8 |
| 3.2 Material Vegetal..... | 8 |
| 3.2.1 Preparación del Extracto acuosos del fruto de maracuyá..... | 9 |
| 3.2.2 Preparación del extracto etanólico de Hojas maracuyá..... | 9 |
| 3.2.3 Marcha fitoquímica preliminar..... | 9 |
| 3.2 Líneas celulares..... | 10 |
| 3.2.1 Condiciones de cultivo y mantenimiento..... | 11 |
| 3.3 Ensayos biológicos..... | 12 |
| 3.4.1. Evaluación del efecto de los extractos de maracuyá sobre la viabilidad celular..... | 13 |
| • <i>Prueba de MTT</i> | 13 |
| • <i>Coloración vital de azul de Tripano</i> | 14 |
| 3.4.2. Evaluación del efecto antiproliferativo de extractos de maracuyá..... | 15 |
| • <i>Sulforodamina B</i> | 15 |
| • <i>Eficiencia de Clonación</i> | 16 |
| 3.4.3 Efecto del extracto etanólico de hojas de maracuyá sobre el ciclo celular..... | 17 |
| 3.4.4.Efecto inductor de muerte celular del extracto etanólico de Maracuyá..... | 18 |

| | |
|--|----|
| • <i>Detección de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V y contratinción con Yoduro de Propidio</i> | 18 |
| • <i>Actividad de Caspasa 3</i> | 19 |
| 3.4.5. Estrés oxidativo..... | 20 |
| 3.5 Análisis estadístico..... | 20 |
| 4. Resultados | 21 |
| 4.1 Marcha fitoquímica preliminar..... | 21 |
| 4.2 Ensayos biológicos..... | 22 |
| 4.2.1 Efecto sobre la viabilidad celular de los extractos de maracuyá, mediante el método de MTT..... | 22 |
| 4.2.2 Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por el método de exclusión de colorante azul de Tripano..... | 29 |
| 4.2.3 Efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de maracuyá evaluado mediante Sulforodamina B..... | 35 |
| 4.2.4 Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por el método de SRB..... | 37 |
| 4.2.5 Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por Eficiencia de clonación..... | 41 |
| 4.2.6 Efecto sobre el ciclo celular del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por citometría de flujo..... | 43 |
| 4.2.7 Efecto inductor de muerte celular del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por citometría de flujo..... | 44 |
| 4.2.8 Efecto del extracto etanólico de hojas de maracuyá sobre la actividad de la caspasa 3..... | 46 |
| 4.2.9 Efecto en el contenido de glutatión oxidado en células tratadas con el extracto etanólico de Hojas de maracuyá..... | 47 |
| Discusión | 49 |
| Conclusión | 56 |
| Anexos | 57 |
| Referencias | 76 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1-1. Modelo del desarrollo de cáncer de colon. (Tomado de: Inflammation and colon cancer. Terzic, 2010)..... | 3 |
| Figura 3-1. Ilustración de Maracuyá (<i>P. edulis f. flavicarpa</i>). Autor desconocido..... | 8 |
| Figura 3-2. Células de adenocarcinoma de colon humano SW480 (izquierda), y sus derivadas metastásicas SW620 (derecha) con objetivo de 40X (400X de Magnificación)..... | 10 |
| Figura 3-3. Células de adenocarcinoma de colon Caco-2 (izquierda), y células no tumorales CHO-K1 (derecha) con objetivo de 10X (100X de Magnificación)..... | 11 |
| Figura 3-4. Representación esquemática del proceso de degradación de sustrato mediado por caspasa 3 y caspasa 7. (Tomada de la guía de usuario del Kit ApoToxGlo®)..... | 19 |
| Figura 4-1. Efecto sobre la viabilidad celular de los extractos de <i>P. edulis</i> en células SW480 y SW620..... | 22 |
| Figura 4-2. Absorbancia promedio a 560nm obtenida mediante el método de MTT en cultivos tratados con el extracto etanólico de hojas de maracuyá..... | 24 |
| Figura 4-3. Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células SW480 evaluado mediante la prueba de MTT..... | 25 |
| Figura 4-4. Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células SW620 evaluado mediante la prueba de MTT..... | 26 |
| Figura 4-5. Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células Caco-2 evaluado mediante la prueba de MTT..... | 27 |
| Figura 4-6. Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células CHO-K1 evaluado mediante la prueba de MTT..... | 28 |
| Figura 4-7. Efecto del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre la viabilidad en células SW480..... | 30 |
| Figura 4-8. Efecto del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre la viabilidad en células SW620..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Figura 4-9. Efecto del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> sobre la viabilidad en células CHO-K1..... | 33 |
| Figura 4-10. Efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de <i>P edulis</i> en células SW480..... | 36 |
| Figura 4-11. Efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de <i>P edulis</i> en células SW620..... | 36 |
| Figura 4-12. Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células SW480..... | 37 |
| Figura 4-13. Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células SW620..... | 38 |
| Figura 4-14. Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células CHO-K1..... | 39 |
| Figura 4-15. Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células Caco-2..... | 40 |
| Figura 4-16: Cultivos de la línea celular Caco-2 tratados con el extracto etanólico de <i>P. edulis</i> durante 48 horas..... | 42 |
| Figura 4-17: Colonias representativas de la línea celular Caco-2 teñidos con cristal violeta..... | 42 |
| Figura 4-18. Efecto sobre el ciclo celular del extracto etanólico de Hojas de <i>P. edulis</i> en cultivos de células SW480 tratados con durante 48 horas..... | 43 |
| Figura 4-19. Efecto sobre el ciclo celular del extracto etanólico de Hojas de <i>P. edulis</i> en cultivos de células Caco-2 tratados con durante 48 horas..... | 44 |
| Figura 4-20. Efecto de muerte por apoptosis/necrosis del extracto etanólico de hojas de <i>P.edulis</i> en células SW480 tratadas durante 48 horas..... | 45 |
| Figura 4-21. Efecto de muerte por apoptosis/necrosis del extracto etanólico de hojas de <i>P.edulis</i> en células Caco-2 tratadas durante 48 horas..... | 46 |
| Figura 4-22: Efecto del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en la actividad de las caspasa3 en células Caco-2 y SW480..... | 47 |

| | |
|---|----|
| Figura 4-23: Efecto del extracto etanólico de <i>P. edulis</i> en el contenido de Glutati3n oxidado en c3lulas SW480 y Caco-2..... | 48 |
|---|----|

Lista de Tablas

| | Pag. |
|---|-------------|
| Tabla 3-1. Concentración de extractos evaluados y su equivalencia en relación peso-volumen..... | 13 |
| Tabla 4-1: Evaluación cualitativa de metabolitos presentes en los extractos de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> | 21 |
| Tabla 4-2: DL ₅₀ estimada mediante regresión lineal del extracto etanólico de hojas de maracuyá..... | 29 |
| Tabla 4-3: DL ₅₀ estimada para el extracto etanólico de hojas de maracuyá mediante la prueba de exclusión de colorante azul de Tripano en células SW480..... | 31 |
| Tabla 4-4: DL ₅₀ estimada para el extracto etanólico de hojas de maracuyá mediante la prueba de exclusión de colorante azul de Tripano en células SW620..... | 31 |
| Tabla 4-5: DL ₅₀ estimada para el extracto etanólico de hojas de maracuyá mediante la prueba de exclusión de colorante azul de Tripano en células CHO-K1..... | 34 |
| Tabla 4-6: Índice de selectividad del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en el modelo de cáncer de colon SW480-SW620 respecto a células no malignas CHO-K1..... | 34 |
| Tabla 4-7: Resumen de valores de DL ₅₀ del extracto etanólico de maracuyá a 48 horas de tratamiento en las diferentes líneas celulares..... | 35 |
| Tabla 4-8: CI ₅₀ del extracto etanólico del fruto de maracuyá determinado mediante SRB en células SW480..... | 38 |
| Tabla 4-9: Eficiencia de clonación de células de adenocarcinoma de colon tratadas con el extracto etanólico de maracuyá durante 48 horas..... | 41 |
| Tabla 4-10: Coeficiente de determinación correspondiente a la actividad de Caspasa 3 en cultivos tratados con el extracto etanólico de hojas de maracuyá..... | 47 |
| Tabla 4-11: Coeficiente de determinación para luminiscencia relacionada con la proporción de Glutati6n oxidado en cultivos tratados con el extracto etan6lico de maracuyá..... | 48 |

Lista de Anexos

| | Pág. |
|---|------|
| Figura A-1. Efecto biológico de las diferentes proporciones de extracto etanólico de Hojas de <i>P.edulis</i> en células SW480 expuestas durante 48 horas. (<i>Fotografías de campo claro con objetivo de 10X</i>)..... | 57 |
| Figura A-2. Efecto biológico de las diferentes proporciones de extracto etanólico de Hojas de <i>P.edulis</i> en células SW620 expuestas durante 48 horas. (<i>Fotografías de campo claro con objetivo de 10X</i>)..... | 58 |
| Figura A-3. Efecto biológico de las diferentes proporciones de extracto etanólico de Hojas de <i>P.edulis</i> en células CHO-K1 expuestas durante 48 horas. (<i>Fotografías de campo claro con objetivo de 10X</i>). | 59 |
| Tabla A-1: ANOVA y comparación múltiple de los valores de absorbancia obtenidos por MTT en cultivos de SW480 tratados con extracto acuoso del fruto de <i>P. edulis</i> | 60 |
| Tabla A-2: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480, evaluado por MTT..... | 60 |
| Tabla A-3: ANOVA y comparación múltiple para los valores de absorbancia obtenidos en cultivos de SW620 tratados con extracto acuoso del fruto de <i>P. edulis</i> | 61 |
| Tabla A-4: ANOVA y Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW620, evaluado por MTT. | 62 |
| Tabla A-5: ANOVA y Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células Caco-2, evaluado por MTT. | 62 |
| Tabla A-6: ANOVA y Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células CHO-K1, evaluado por MTT..... | 63 |
| Tabla A-7: ANOVA de dos vías para efecto antiproliferativo obtenido por SRB en células SW480 del extracto acuoso del fruto de <i>P. edulis</i> | 64 |
| Tabla A-8: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de <i>P. edulis</i> en células SW480..... | 64 |
| Tabla A-9: ANOVA de dos vías para efecto antiproliferativo obtenido por SRB del extracto acuoso del fruto de <i>P. edulis</i> en células SW620. | 64 |
| Tabla A-10: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de <i>P. edulis</i> en células SW620..... | 65 |

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla A-11: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de fruto de <i>P. edulis</i> en células SW480, evaluado por SRB. | 65 |
| Tabla A-12: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de fruto de <i>P. edulis</i> en células SW620, evaluado por SRB..... | 66 |
| Tabla A-13: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células CHO-K1, evaluado por SRB. | 66 |
| Tabla A-14: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480, evaluado por Azul de tripano..... | 67 |
| Tabla A-15: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW620, evaluado por Azul de tripano..... | 68 |
| Tabla A-16: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células CHO-K1, evaluado por Azul de tripano. | 68 |
| Tabla A-17: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto antiproliferativo (% de clonación absoluta) del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células Caco-2, evaluado por eficiencia de clonación..... | 69 |
| Tabla A-18: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto antiproliferativo (% de clonación relativa) del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células Caco-2, evaluado por eficiencia de clonación..... | 69 |
| Tabla A-19: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto antiproliferativo (% de clonación absoluta) del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480, evaluado por eficiencia de clonación..... | 70 |
| Tabla A-20: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto antiproliferativo (% de clonación relativa) del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480, evaluado por eficiencia de clonación..... | 70 |
| Tabla A-21: ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células Caco-2 (Eventos de apoptosis temprana)..... | 71 |
| Tabla A-22: ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células Caco-2 (Eventos de apoptosis tardía)..... | 71 |

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla A-23: ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células Caco-2 (Eventos de necrosis)..... | 72 |
| Tabla A-24: ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células Caco-2 (Eventos negativos para los marcajes). | 72 |
| Tabla A-25: ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480 (Eventos de apoptosis temprana)..... | 73 |
| Tabla A-26: ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480 (Eventos de apoptosis tardía)..... | 73 |
| Tabla A-27: ANOVA y comparación múltiple para el ^{efecto} inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480 (Eventos de Necrosis)..... | 73 |
| Tabla A-28: ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480 (Eventos negativos para los marcajes) | 74 |
| Tabla A-29: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células Caco-2, evaluado por GSH/GSSG GLO [®] | 74 |
| Tabla A-30: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto del extracto etanólico de hojas de <i>P. edulis</i> en células SW480, evaluado por GSH/GSSG GLO [®] | 75 |

Abreviaturas y Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|--------------------------|
| °C | Grados centígrados. |
| λ | Longitud de Onda. |
| rpm | Revoluciones por minuto. |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------------|--|
| ANOVA | Análisis de varianza de una vía |
| IARC | De las Iniciales en Inglés de <i>International Agency for Research on Cancer</i> . |
| ITM | Instituto Tecnológico Metropolitano |
| NCI | De las Iniciales en Inglés de <i>National Cancer Institute</i> |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------|--|
| AT | Azul de Tripano. |
| CC | Cáncer de colon. |
| DMSO | Dimetilsulfóxido. |
| DO | Densidad óptica. |
| ECA | Eficiencia de clonación absoluta. |
| ECR | Eficiencia de clonación relativa. |
| IP | Yoduro de Propidio. |
| ITS..... | Medio RPIMI640, suplementado con Insulina, Transferrina y Selenio. |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol |
| NA | No Aplica. |
| PAF | Poliposis Adenomatosa Familiar |
| PBS | Tampón Fosfato salino. |
| ROS | Especies Reactivas de Oxígeno |
| SFB | Suero Fetal Bovino. |
| SRB | Sulforodamina B. |

1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y muerte a nivel mundial y constituye un grupo de enfermedades con grandes repercusiones emocionales, sociales y económicas. En el año 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes y se calcula que cada año se presentan más de 14 millones de nuevos casos en el mundo (OMS, 2015). y alrededor del 30% de estos casos son prevenibles según su etiología. Entre los tipos más comunes se encuentran el cáncer de pulmón, estómago, colon, hígado y mama. Siendo estos mismos los que causan más muertes cada año (GLOBOCAN, 2015).

1.1 Características generales del Cáncer de colon (CC):

El cáncer de colon ocupa el tercer puesto en incidencia entre todas las neoplasias y es la cuarta causa de mortalidad por cáncer de todo el mundo. En el 2015 se presentaron 95,270 de nuevos casos solo en estados unidos y se diagnosticó más de 1 millón de nuevos casos de en todo el mundo (Datos estadísticos, American Cancer Society, 2016). La etiología de esta enfermedad es variable. Algunos estudios muestran que el factor de riesgo genético por mutaciones sólo constituye entre 5 y 10% para el desarrollo de la enfermedad (Ospina, 2013), que entre el 15-20% se encuentra asociado a enfermedades que generan lesiones premalignas como la poliposis adenomatosa familiar (PAF), el síndrome de Lynch y el síndrome de Gardner, mientras que entre el 70% y 90% corresponde a la forma esporádica de la enfermedad que se encuentra ligada y relacionada con factores y agentes exógenos que potencian eventos de la transformación celular (Nuñez, 2006).

La “forma esporádica” como se ha descrito, consta de tres fases: (i) la fase de iniciación caracterizada por la aparición de focos de criptas aberrantes correspondiente a un grupo localizado de células alargadas, y cuya transformación surge como consecuencia de daño genotóxico por acción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y/o activación metabólica de carcinógenos (Renehan, 2002). (ii) la Fase de promoción cuyo periodo de duración es variable (de 10 a 20 años) y en la que una pequeña proporción de focos de criptas aberrantes se transforman en pólipos adenomatosos no invasivos, por acumulación de células preneoplásicas con división anormal. (iii) la fase de progresión, en la que el crecimiento del tumor avanza hacia carcinoma y adquiere su potencial metastásico en un periodo de entre de 1 a 5 años (Calvert et al, 2002, bousserouel et al, 2010).

Los cambios morfológicos de la secuencia adenoma-carcinoma están asociados con alteraciones progresivas de genes del epitelio normal como la inactivación de genes supresores de tumor, activación de oncogenes, y mutaciones de múltiples genes (Figura 1-4) que pueden afectar la regulación y la expresión de genes involucrados en el ciclo celular, apoptosis, adhesión y angiogénesis (Terzic et al, 2010).

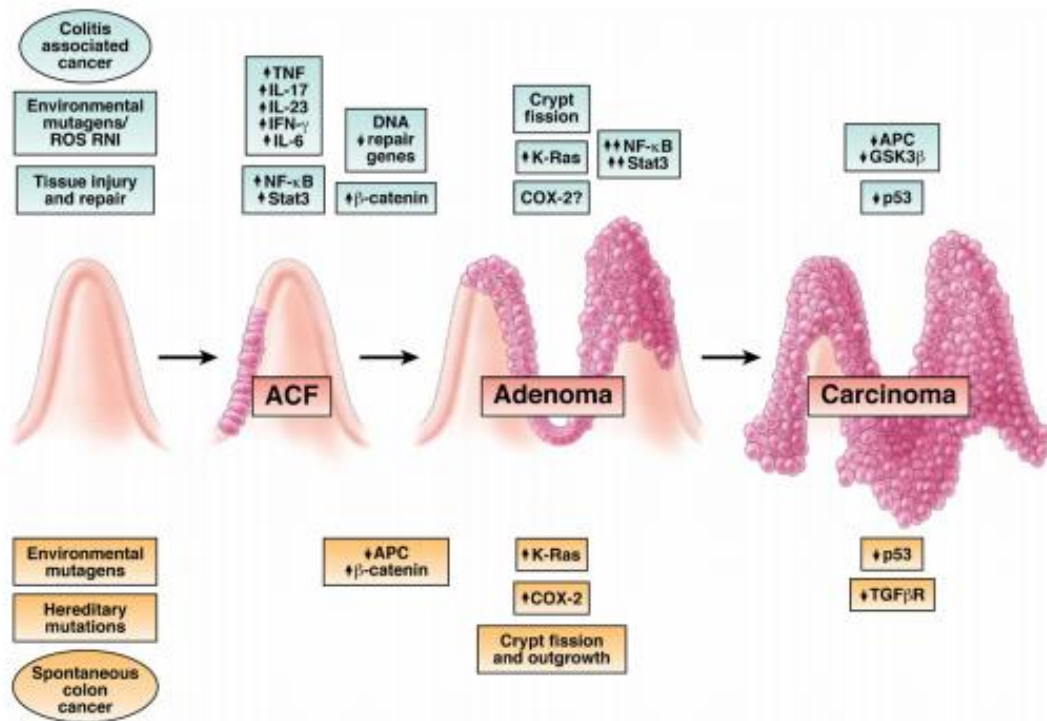


Figura 1-1. Modelo del desarrollo de cáncer de colon. (Tomado de: Inflammation and colon cancer. Terzic, 2010)

Muchas investigaciones sugieren que las alteraciones moleculares y celulares que se presentan en la forma esporádica del cáncer de colon, presentan una correlación directa con los hábitos dietarios y que algunos factores pueden incrementar el riesgo de la enfermedad como una ingesta reducida de fibra, frutas y vegetales (Tenesa, et al 2009, Bingham, 2008), una dieta alta en calorías, carne y grasa, falta de actividad física, consumo de tabaco y alcohol, entre otros (Sanabria et al, 2009). De acuerdo a este planteamiento, se ha sugerido que los hábitos alimenticios y el consumo de algunos constituyentes dietarios pueden favorecer la aparición y desarrollo del cáncer, o por el contrario pueden ser una buena fuente preventiva o terapéutica de esta enfermedad. Desde esta perspectiva, se han planteado diferentes investigaciones como el programa para la investigación de productos naturales y el desarrollo de terapias del Instituto Nacional del cáncer de Estados unidos (NCI) y el programa de productos naturales en contra del cáncer (IRIS research) del Reino Unido. Las cuales están dirigidas hacia la búsqueda e identificación de compuestos derivados de alimentos y/o de productos naturales que sean capaces de bloquear la fase de iniciación del cáncer, o que tengan la capacidad para retardar o revertir el proceso de carcinogénesis.

Entre los compuestos a los que se les ha atribuido actividad biológica antitumoral se incluyen vitaminas, minerales, saponinas, alcaloides, entre otros. La mayoría de estos

son derivados de productos naturales y particularmente de plantas (Gragg, 2005), las cuales constituyen una fuente importante de nuevos compuestos y una forma más productiva para el desarrollo de potenciales fármacos (Harvey, 2008; Mondal S, 2012). Según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos han sido identificados y ya registrados alrededor de 50.000 fitoquímicos con potencial actividad anticancerosa (NCI, 2015).

Entre las diferentes fuentes de productos naturales se encuentran las especies pertenecientes a la familia Passifloraceae, Este grupo taxonómico presenta un interés particular para la búsqueda de compuestos con actividad biológica. Como se describe a continuación, Especies de este grupo han sido empleada por la medicina tradicional en diferentes poblaciones y constituye una enorme riqueza no solo en términos de diversidad y de recurso genéticos, si no a nivel económico respecto al uso nutricional de algunas de sus especies (Bugallo, 2011).

1.2 Características generales de la familia Passifloraceae:

Esta familia comprende 18 géneros con 660 especies con gran diversidad en su forma de crecimiento, posicionamiento de las hojas y en su composición floral. Pueden ser lianas o enredaderas que trepan por medio de zarcillos, o especies arbóreas. Respecto a su filotaxia pueden presentar hojas alternas con láminas foliares que generalmente son enteras, pero también pueden ser lobadas con o sin estípulas. Sus pecíolos pueden o no llevar glándulas las cuales pueden ser sésiles o estipitadas y casi siempre pareadas. Las flores tienen un androginóforo prominente pero con menor frecuencia, pueden presentar solamente ginóforo. Presentan una corona extraestaminal bien desarrollada, aunque en algunas especies se ve reducida a una fila de pequeños tubérculos o dientecillos. Respecto al fruto, presenta generalmente bayas, pero raramente pueden presentar cápsulas (Ocampo et al, 2007).

La distribución de estas especies es pantropical con presencia desde el sudeste de Asia y Australia, y un centro de diversidad que se presenta en América Central y del Sur, en donde la mayoría de las especies son endémicas. En esta región se encuentran cuatro géneros: *Ancistrothyrus*, *Dilkea*, *Mitostemma* y *Passiflora*, alcanzando alrededor de 500 especies (Escobar, 1986). Este último género ha cobrado interés desde varios puntos de vista: para la industria Agrícola y de alimentos es de relevancia económica por presentar el mayor número de especies frutales comestibles (Albert L. 1993, Tafur. 2005) y un centro de diversidad amplio que se extiende desde los Andes colombianos y ecuatorianos hasta el Brazil (Hernandez, 2000), algunas especies como *Passiflora edulis* (maracuyá), *Passiflora ligularis* (granadilla) y *Passiflora mollissima* (curuba) aparecen en los principales renglones de exportación para consumo, mientras que otras como *P. amethystina* y *P. umbilicata* se comercializan como ornamentales por la vistosidad de sus flores y la curiosa forma de sus hojas (Bugallo, 2011). Desde la perspectiva biomédica, las especies del género *Passiflora* L. han cobrado interés especialmente por parte de las

industrias farmacéuticas y cosméticas, ya que algunas especies han sido empleadas por la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades (Dhawan, 2004) y podrían ser usadas para la búsqueda de potenciales fármacos y el desarrollo de nuevos productos (Perry et al, 1991).

1.2.1 El género *Passiflora*: Actividad Biológica y algunos metabolitos secundarios:

Este género ha sido empleado por la medicina tradicional en diferentes países. Se ha usado para el tratamiento de alteraciones como el insomnio y la ansiedad, neurosis, neuralgia e histeria (Deng et al 2010), y como analgésico, antiespasmódico, y antiasmático (Rodríguez, 2008). En poblaciones del Brazil por ejemplo, diferentes partes de las plantas de especies de este género se emplean para el tratamiento de dismenorrea, epilepsia, quemaduras, hemorroides, y como diurético y analgésico (Dhawan, 2004). En la India se ha empleado para disminuir la dependencia a opiáceos por sus propiedades ansiolíticas (Ingale, 2010). En Europa se ha empleado para el tratamiento de constipaciones e infecciones leves. En América, es el grupo más comúnmente utilizado en la fitoterapia occidental contemporánea. A este género, se le han atribuido propiedades anti-inflamatorias (Pizzetti et al, 2007) y se ha empleado como tratamiento para enfermedades cardiovasculares como la hipertensión (Rojas et al, 2009), la hipertrigliceremia y la hipercolesterolemia, problemas de la piel, enfermedades respiratorias como la bronquitis, asma, entre otras (Dhawan, 2004).

El conocimiento tradicional de *Passiflora L.* se encuentra bien soportado por estudios científicos, los cuales han demostrado *in vitro* e *in vivo* su actividad biológica (Miroddi, 2013). Entre los diferentes efectos de plantas de este género se incluyen el efecto sedativo, antiespasmódico, antihipertensivo, antiinflamatorio, antidiabético y antibacterial (Calapai G et al, 2012). Las propiedades biológicas han sido atribuidas a la variedad de compuestos presentes en especies de este género. Estudios fitoquímicos de sus hojas y frutos han mostrado la presencia de Flavonoides, alcaloides y glucósidos, y en extractos de sus hoas saponinas y polifenoles (Yoshikawa, 2000), Además flavonas C-glicósidos tales como vitexina, isovitexin, orientina e isoorientina que presentan propiedades antioxidantes (Chassagne, 1998). La información fitoquímica de *Passiflora edulis Sims* por ejemplo, demuestra la presencia de glucósidos como passiflorina, además de luteolina-6-C-chinovósido, triterpenos, antocianinas, eugenol, γ -lactonas, carotenos, ácido L-ascórbico, ésteres, aceites volátiles, aminoácidos, carbohidratos, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, calcio, hierro y fósforo (Silva et al, 2012).

La presencia de diferentes compuestos en especies del género *Passiflora L.* con actividad biológica promisoriosa y al conocimiento etnofarmacológico y científico de algunas de sus especies, plantea la necesidad de conocer y evaluar la capacidad anticancerígena de diferentes extractos de esta plantas. Debido a que el extracto etanólico de hojas de especies como *P. foetida* y *P. incarnata* han mostrado efecto citotóxico *in vivo* (Asadujjaman, 2014) y citotóxico y anti-tumoral *in vitro* (Ożarowski, 2013; Sujana,2012)

y a que se conoce poco sobre la actividad biológica de *P. edulis f. flavicarpa*, se planteó la valoración del efecto citotóxico, antiproliferativo, inductor de muerte celular y efecto antioxidante de extractos de esta especie. En especial, de la porción comestible del fruto que hasta ahora solo se emplea para consumo humano, y para la cual no se han reportado actividades de este tipo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar la actividad anticancerígena del extracto acuoso de la pulpa del fruto y del extracto etanólico de hojas de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) en células de cáncer de colon humano.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto sobre la viabilidad celular de extractos de maracuyá en las células de cáncer de colon humano.
- Evaluar el efecto de extractos de maracuyá en la proliferación, ciclo celular y la eficiencia de clonación de células de cáncer de colon humano.
- Establecer la capacidad pro-apoptótica de extractos de maracuyá en células de cáncer de colon humano.
- Establecer el estado oxidativo de células de cáncer de colon humano expuestas a extractos de maracuyá.

3. Materiales y Métodos

3.1. Localización

El fruto de *Passiflora edulis* se recolectó en la finca El Mirador (Vereda La Herradura, Municipio de La Tebaida, Armenia, Quindío), ubicada en las coordenadas geográficas globales 4.4376°N, 75.8489°W a 1165msnm. Las muestras se transportaron al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío, donde se procedió a realizar el lavado del material y la obtención de los extractos. Posteriormente, los extractos liofilizados se transportaron a los laboratorios de Ciencias Biomédicas del Instituto Tecnológico Metropolitano (ITM) y al laboratorio de Genética la Universidad Nacional de Colombia en la Ciudad de Medellín donde se realizaron los ensayos biológicos.

3.2 Material Vegetal

Las hojas y el fruto de *P. edulis* se recolectaron entre las 6:00 am y 8:00 am verificando que el vegetal estuviera completamente sano. Es decir, que por observación visual directa no se evidenciaran lesiones sobre los tejidos causada por plagas, enfermedades o el ambiente. El fruto debía presentar madurez; la cual fue determinada por su coloración amarilla y su cascara dura. Las muestras vegetales una vez adquiridas, fueron transportadas en bolsas de cierre hermético al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío para su procesamiento.



Figura 3-1. Ilustración de Maracuyá (*P. edulis* f. *flavicarpa*). Autor desconocido

Para llevar a cabo los objetivos fue necesaria la obtención de los extractos y la de descripción de una marcha fitoquímica preliminar. Para ello se siguió con la siguiente metodología:

3.2.1 Preparación del extracto acuoso del fruto de Maracuyá

Para la obtención del jugo, el fruto maduro de *P. edulis* se lavó con agua de grifo y posteriormente con agua destilada. La cáscara fue removida y la porción comestible del fruto se licuó por métodos mecánicos, se coló para eliminar las semillas y se filtró (poro de 1mm) para garantizar su homogeneidad. Posteriormente se liofilizó y el sólido resultante (previamente pesado) se resuspendió en agua destilada. Finalmente, el extracto se filtró con poro de 0,22 μm para conservar su esterilidad y se almacenó protegido de la luz a una temperatura de 4°C hasta su uso.

3.2.2 Preparación del extracto etanólico de las hojas de Maracuyá

Las hojas de *P. edulis* fueron inicialmente lavadas con agua de grifo y luego con agua destilada para eliminar suciedades. El material vegetal se desecó en un horno de aire circulante a una temperatura constante de 40°C. Una vez seco, fue pulverizado utilizando un molino y se lixivió durante 8 días usando 500 ml de etanol al 96% (el lixiviado fue recirculado constantemente). Luego, se procedió a separar la clorofila del extracto etanólico mediante una extracción líquido-líquido con etanol-agua (1:1) (Aguillon J, et al 2013) y se filtró con tamaño de poro de 25 μm y carbón activado de acuerdo a la metodología de Bilbao, 1997. El etanol fue evaporado a presión reducida (60mbar) y a temperatura < 40°C en un rotaevaporador. El sólido resultante (previamente pesado) se resuspendió en una solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 20% y se filtró con poro de 0,22 μm para conservar su esterilidad. Se almacenó protegido de la luz a 4°C hasta su uso.

3.2.3 Marcha fitoquímica preliminar

La marcha fitoquímica preliminar se realizó en el extracto acuoso del fruto del maracuyá y una fracción etanólica de las hojas. Se estableció un perfil químico de presencia o ausencia de metabolitos secundarios y algunos glúcidos. Se realizaron pruebas cualitativas para la caracterización de compuestos como: taninos, flavonoides, quinonas, esteroides, saponinas, glucósidos cardiotónicos, lactonas terpénicas, cumarinas y alcaloides y aminoras cuaternarias, y para la identificación de azúcares reductores (Bilbao, 1997, Sanabria, 1983).

3.3 Líneas celulares

Se evaluaron tres líneas tumorales y una línea celular no tumoral. Las células SW480 y SW620 fueron donadas por el Dr. Francis Raul, (laboratorio de prevención nutricional del cáncer, IRCAD, Francia) quien las obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC Manassas, USA). Las Líneas celulares fueron derivadas de las diferentes etapas de la progresión de un tumor de cáncer colorrectal de un mismo paciente (Leibovitz et al., 1976). La línea celular SW480 se originó a partir de una fracción quirúrgica de un tumor primario, moderadamente diferenciado (Duke's, tipo B) y se caracteriza por su cariotipo hipotriploide y por la presencia de entre 11 y 12 cromosomas marcadores que incluye cromosomas dicéntricos; además presenta mutaciones en el gen p53. La línea SW620 fue aislada de un nódulo linfático del mismo paciente, correspondiente al proceso de metástasis (Duke's tipo C). Puede caracterizarse por su cariotipo hiperdiploide (número modal entre 46 y 53 cromosomas) con los mismos marcadores de la línea SW480 (Leibovitz et al., 1976, Gagos S, et al. 1995)

Finalmente, La línea celular Caco-2 correspondiente a células epiteliales derivadas de adenocarcinoma colorrectal humano. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada para estudios *in vitro* relacionados con función de asimilación de compuestos debido a que presentan características similares a las células intestinales maduras tales como enterocitos o células mucosas. Se caracteriza por su número modal de 96 cromosomas y por la presencia de 10 cromosomas marcadores entre los que se incluyen alteraciones como 10q-, t(11;17) y t(15;?) (Rao A.L, 2009). Esta línea celular fue proveída por el laboratorio de Genética, Reparación y Cáncer de la Universidad de Antioquia.

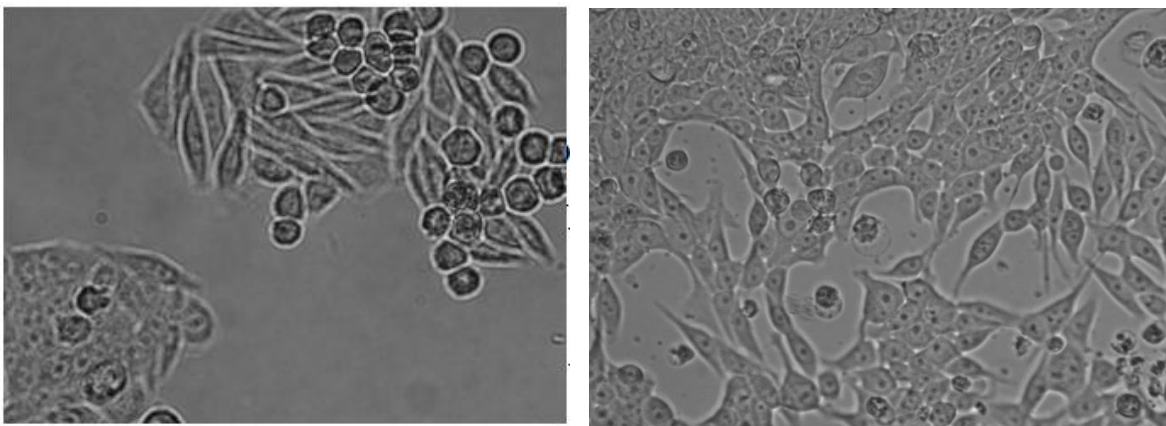


Figura 3-2. Células de adenocarcinoma de colon humano SW480 (izquierda), y sus derivadas metastásicas SW620 (derecha) con objetivo de 40X (400X de Magnificación).

Como línea celular no tumoral se empleó la línea celular CHO-K1. Un subclon derivado de la línea parental CHO obtenida y establecida a partir de un explante de tejido de ovario de *Cricetulus griseus* (Nolan y Lee, 2012). Es empleada comúnmente para la

evaluación de compuestos *in vitro* y para la producción de proteínas recombinantes (Xu et al, 2011). Esta línea se caracteriza por su cariotipo heteromórfico con número modal de entre 20 y 21 cromosomas (Kao, Puck 1974). Estas células fueron cedidas por el laboratorio de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, y se emplearon para determinar el Índice de Selectividad (SI) de los tratamientos (R Moo Puc, et al 2009).

$$SI = \frac{DL_{50} \text{ en las células CHO} - K1}{DL_{50} \text{ en las células de cancer de colon}} \quad (1)$$

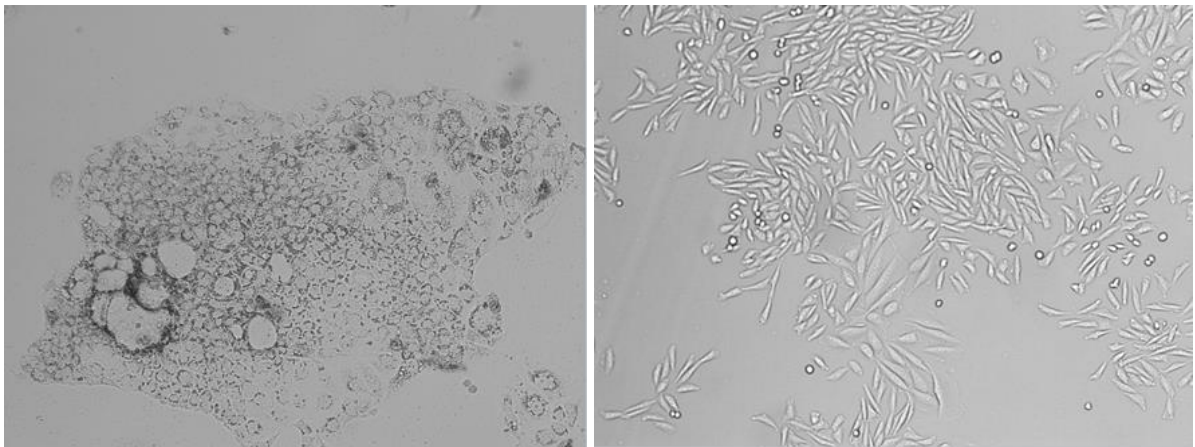


Figura 3-3. Células de adenocarcinoma de colon Caco-2 (izquierda), y células no tumorales CHO-K1 (derecha) con objetivo de 10X (100X de Magnificación).

3.3.1 Condiciones de cultivo y Mantenimiento

Las células SW480, SW620 y Caco-2 fueron mantenidas y propagadas en frascos de cultivo Falcon de 25 cm² en medio Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM) (Gibco) con 25 mM de glucosa y 2 mM de L-glutamina, suplementado con 10% suero de caballo (HS)(Gibco), 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina (Gibco) y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco). Esta solución se rotuló y empleó como "Medio de mantenimiento".

Para la propagación de las líneas celulares, el medio sobrenadante de cada cultivo fue removido y reemplazado cada 48 horas y cada 8 días (tiempo en el que se observó una confluencia superior al 80%) se realizaron procedimientos de subcultivo. Para cada transferencia se descartó el sobrenadante dejando las células adheridas y se lavó la superficie de Adhesión celular con tampón verseno (1X), se adicionó 1ml de tripsina-EDTA (GIBCO) a una concentración de 0.25% durante 5 minutos y luego se bloqueó la actividad enzimática con 2 ml de solución STOP (Medio DMEM Suplementado con 20%

de suero de caballo, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina). La suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo cónico de polipropileno estéril y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se descartó nuevamente el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 1ml de medio sin suero. Se estimó la viabilidad y concentración celular en cámara de Neubauer y por exclusión de colorante con Azul de tripano 0.4% (Gibco). En cada subcultivo se transfirieron 5×10^4 células por frasco T25 en un volumen final de 5 ml medio de cultivo de mantenimiento (Maldonado, 2013).

La línea celular CHO-K1 fue mantenida bajo condiciones y métodos equivalentes a los descritos anteriormente. Sin embargo, estas fueron expandidas con medio de cultivo RPMI1640 (Gibco) suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina (Gibco). Además fueron transferidas 7×10^4 células por frasco T₂₅ para alcanzar la confluencia deseada cada 8 días (de acuerdo a lo establecido en el laboratorio de genética de la Universidad Nacional, Sede Medellín).

Todos los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda (>95%) y 5% CO₂ y los diferentes tratamientos se realizaron mientras las células se encontraban en fase exponencial. El medio de cultivo fue removido y sustituido cada 48 horas.

3.4 Ensayos Biológicos

Los controles empleados en cada ensayo fueron: células en medio de mantenimiento y sin tratamiento como control negativo (C-), células a las que se adicionó H₂O₂ (250 µM) al medio de cultivo como control positivo (C+), y células expuestas a DMSO a una concentración de 0.2% en un periodo de exposición igual a la duración de cada tratamiento como control solvente (CS).

Para todos los experimentos el medio se modificó. El suero se redujo al 3% y a los cultivos de las líneas SW480, SW620 y Caco-2 se les suplementó con 10 µg/ml de Insulina, 5 µg/ml de Transferrina, y 5 ng/ml de Selenio (medio ITS).

A continuación se presentan las metodologías empleadas para la evaluación de la actividad biológica de los extractos. Para ambos, se emplearon diferentes concentraciones adicionándolas en los cultivos celulares como relaciones volumen/volumen.

Tabla 3-1. Concentración de extractos evaluados y su equivalencia en relación peso-volumen.

| Porcentaje del Tratamiento (%V/V) | Concentración del extracto Etanólico de Hojas ($\mu\text{g/ml}$) | Concentración del extracto Acuoso del fruto ($\mu\text{g/ml}$) | Concentración DMSO (%v/v)* |
|-----------------------------------|--|--|----------------------------|
| 10 | 229 | 264 | 0.2 |
| 7 | 160.3 | 184.8 | 0.14 |
| 5.5 | 125.9 | 145.2 | 0.11 |
| 5 | 114.5 | 132 | 0.1 |
| 2.5 | 57.3 | 66 | 0.05 |
| 2 | 45.8 | 52.8 | 0.04 |
| 1.5 | 34.4 | 39.6 | 0.03 |
| 1 | 22.9 | 26.4 | 0.01 |

*Las concentraciones de DMSO se emplearon para descartar efecto de solvente en ensayos correspondientes al extracto etanólico.

3.4.1 Evaluación del efecto de los extractos de maracuyá sobre la viabilidad celular

- Prueba de MTT

El ensayo de MTT es comúnmente empleado para determinar la viabilidad celular. Esta prueba está basada en la funcionalidad metabólica asociado a oxidorreductasas dependientes de NADP(H) (Mosmann, T. 1983) y en la capacidad celular para la transformación de la sal MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico). Este compuesto de color amarillo es captado por las células y reducido por la enzima Succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble como formazán (de color púrpura). Este compuesto queda retenido en las células pero puede ser liberado y solubilizado para ser cuantificado mediante un método colorimétrico (Riss, et al. 2013). En este caso, la cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la viabilidad celular siempre y cuando las células se encuentren en fase exponencial (Arencibia et al. 2003).

Para el desarrollo de esta prueba se emplearon cultivos con viabilidad superior al 95% de las líneas celulares SW480, SW620, y Caco-2 a partir de los cuales se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos: 5000 células/pozo; y 6000 células/pozo de la línea CHO-K1 en un volumen final de 100 μl de medio de mantenimiento. Los cultivos se dejaron por un tiempo de establecimiento de 48 horas, y el efecto se evaluó a 24, 48, 72 y 96 horas.

Para evitar el agotamiento de nutrientes, el medio de cultivo fue sustituido cada 48 horas manteniendo la concentración de los tratamientos.

Posterior al tiempo de exposición a cada extracto, se adicionó a cada pozo 20 µl de MTT (5mg/ml en PBS) (SIGMA) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas en oscuridad y agitación orbital continua. Se agregó 100 µl de Isopropanol ácidificado (Triton X-100 10%, HCl 0.8%) frío a cada pozo y se agitó de forma orbital durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, se tomaron las medidas de absorbancia en el equipo Glomax™Promega a una longitud de onda de 560 nm, y se estimó el porcentaje de viabilidad (respecto al control negativo) usando la ecuación 2.

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{DO_T}{DO_C} \times 100 \quad (2)$$

DO_T= Densidad óptica de cultivos tratados

DO_C= Densidad óptica control Negativo (células sin tratamiento).

Este ensayo se realizó usando 7 réplicas de cada tratamiento y controles. Se construyeron gráficas de la absorbancia promedio para cada tiempo y de porcentaje de viabilidad celular. Además se determinó la dosis letal media (DL₅₀) por regresión lineal.

- **Coloración vital de azul de Tripano**

El azul de Tripano ha sido empleado para colorear tejidos o células muertas de forma selectiva debido a que es una molécula de gran tamaño y de carga negativa haciendo que su tránsito a través de la membrana sea restringido. Estas características hacen que el colorante solo ingrese a células que no poseen una adecuada integridad en sus membranas, mientras que las células viables están en capacidad para excluir el colorante. Las células con membranas dañadas se tiñen de un color azul distintivo que puede observarse fácilmente bajo el microscopio de campo claro (Tran et al. 2011)

Para la evaluación, se inocularon 5000 células por pozo de cada una de las líneas celulares en placas de cultivo de 24 pozos en un volumen final de 1 ml de medio ITS durante un tiempo de 48 horas, posterior al cual se removió el sobrenadante y se adicionaron los tratamientos. El ensayo se realizó por duplicado y se evaluó la viabilidad a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). Para evitar el agotamiento de nutrientes, el medio fue sustituido cada 48 horas manteniendo la concentración del extracto. Posterior al tiempo de tratamiento, se empleó el método para subcultivos descrito previamente y cual se obtuvieron alícuotas de cada uno de los cultivos tratados. Estas suspensiones celulares se mezclaron en proporción 1:1 con azul de Tripano (0.4%) y se incubaron por 3 minutos a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se tomaron 10 µl de dicha la

mezcla y se sirvieron en cada campo de la cámara de Neubauer para hacer el recuento usando un objetivo de 40X.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó usando la ecuación 3, descrita como:

$$\% \text{ de viabilidad} = \left(\frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número de células totales}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Los resultados de esta prueba se reportaron como porcentaje de viabilidad promedio y se construyeron gráficas de viabilidad respecto a la concentración de tratamiento adicionado para la evaluación Dosis-respuesta y la determinación de la Dosis letal media (DL₅₀) por regresión lineal.

3.4.2. Evaluación del efecto antiproliferativo de extractos de maracuyá

- **Sulforodamina B**

Este ensayo es comúnmente utilizado para estimar el contenido de proteína celular *in vitro* (Skehan et al. 1990) y para la evaluación de compuestos con actividad biológica y descubrimiento de agentes neoplásicos. Su implementación se debe a la interacción de Sulforodamina (SRB) que en su estructura química que presenta 2 grupos sulfónicos (-SO₃⁻), con a cationes presentes en diferentes estructuras biológicas o a biomoléculas como proteínas en sus residuos aminoácidos básicos. Esta interacción puede incrementarse en condiciones ácidas haciendo que se una con mayor afinidad y se mantenga. De este modo se puede emplear para determinar el aumento en el contenido de proteínas fijadas debidas a proliferación celular (Escobar et al. 2009).

El ensayo se realizó de acuerdo a lo establecido por Rahman et al. 2001 con algunas modificaciones. Para esta prueba se cultivaron 3000 células/pozo de cada una de las líneas celulares en placas de cultivos de 96 pozos en un volumen final de 100 µl de medio ITS y se incubaron a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 días) en presencia de las diferentes concentraciones de los extractos. Para evitar la pérdida por evaporación del medio, y el agotamiento de nutrientes, el medio fue reconstituido cada 48 horas manteniendo la concentración de los tratamientos. Una vez transcurrido el periodo de exposición a los extractos, los cultivos fueron interrumpidos adicionando 100 µl de Ácido tricloroacético frío (MERCK) a una concentración de 50% v/v a cada pozo. Inmediatamente, los cultivos se incubaron a 4°C durante 1 hora en oscuridad. Después de este periodo, se removió el ácido y se adicionó 100 µl de Sulforodamina B (0.4% p/v diluida en ácido acético 1%) por pozo. La solución de colorante se mantuvo en las células adheridas y fijadas por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente los excesos de SRB se removieron lavando la superficie de adhesión con ácido acético (1% v/v en agua destilada). Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante un día.

Para la lectura de absorbancia, la SRB unida a las proteínas se solubilizó adicionando 200 μ l de buffer Tris-HCl (10 mM pH10.5) a cada pozo y se agitó de forma orbital durante 20 minutos. La densidad óptica se obtuvo a 490 nm por espectrofotometría.

Este ensayo se realizó usando 7 réplicas de cada tratamiento y controles. Para los resultados se construyeron gráficas de absorbancia promedio para cada tiempo y se reportó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) para cada tratamiento por regresión.

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \left(\frac{DO_T}{DO_C} \right) \times 100 \quad (4)$$

DO_T = Densidad óptica de cultivos tratados

DO_C = Densidad óptica control Negativo (células sin tratamiento).

- **Eficiencia de clonación:**

Esta prueba se empleó para determinar la capacidad proliferativa de las células con previa exposición a los tratamientos, de acuerdo a lo establecido por Franken et al. 2006, y Rafehi et al. 2011. Para esta prueba, se emplearon únicamente cultivos de las líneas celulares SW480 y Caco-2 como modelos.

A partir de cultivos en fase exponencial se inocularon 10000 células/pozo de cada una de las líneas celulares SW480 y Caco-2 en placas de cultivo de 6 pozos y usando como volumen final de suspensión 2 ml de medio ITS. Los cultivos fueron mantenidos en incubación durante 48 horas para el establecimiento (condiciones descritas previamente). Se adicionaron proporciones del extracto etanólico correspondientes a 5%, 5.5% y 7% debido a que en este rango de proporciones se incluyó la DL_{50} encontrada por Azul de tripano y SRB. Posterior al tiempo de tratamiento, se recolectó el sobrenadante de cada cultivo tratado en un tubo cónico de polipropileno estéril de 15 ml (tubo A) y las células adheridas al sustrato se lavaron con PBS (1X), se les adicionó 500 μ l de tripsina/EDTA (0.25%) a 37°C, y se incubaron durante 5 minutos a esta misma temperatura. Posteriormente la acción de la Tripsina se bloqueó con solución STOP (Medio DMEM Suplementado con 20% de suero de caballo, 100 UI/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomomicina), y la suspensión celular obtenida para cada cultivo se recolectó y se sirvió en el tubo A. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se removió el sobrenadante para liberar a las células de los tratamientos solubles y el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio DMEM libre de suero. A partir de cada tubo se tomó una alícuota de 10 μ l que se empleó para recuento por microscopia en cámara de Neubauer y se estimó el volumen necesario de cada suspensión celular para la obtención de 200 células. Dicho volumen, se mezcló con 2 ml de medio ITS y se sirvió en un nuevo pozo en placas de cultivo de 6 pozos. Las muestras se incubaron durante 7 días (el medio libre de tratamientos, fue reemplazado cada 48 horas). Después de este periodo, se removió el sobrenadante y se lavó dos veces la superficie de adhesión celular con 1 ml de PBS.

Las células adheridas se fijaron con solución de Carnoy (Metanol- ácido acético en proporción 3:1 respectivamente) y se tiñeron con cristal violeta (0.5% p/v) durante 10 minutos. Luego, se lavaron con abundante agua destilada y se dejaron secar de forma horizontal a temperatura ambiente. En microscopio invertido se contó el número de colonias formadas (usando como criterio de inclusión a colonias con 50 o más células) en cada uno de los tratamientos y se relacionaron con el número de células inoculadas y el número de colonias encontradas en el control negativo.

Este ensayo se realizó por duplicado en dos momentos independientes y los resultados se expresaron como porcentaje de eficiencia de clonación absoluta (ECA) y eficiencia de clonación relativa (ECR). Esta última, se empleó para determinar el efecto antiproliferativo de cada tratamiento.

$$ECA = \left(\frac{\text{Número de colonias de tratamiento}}{\text{Número de células inoculadas}} \right) \times 100 \quad (5)$$

$$ECR = \left(\frac{ECA \text{ de tratamiento}}{ECA \text{ de control negativo}} \right) \times 100 \quad (6)$$

3.4.3 Efecto del extracto etanólico de hojas de maracuyá sobre el ciclo celular

La distribución del ciclo celular fue analizada mediante el marcaje de ADN con Yoduro de propidio (IP) (Darzynkiewicz, S et al. 1992). En este ensayo, se realizó un proceso análogo al del numeral anterior en las fases de cultivo, tratamiento y recolección celular por tripsinización.

A partir de la suspensión celular obtenida se tomó una alícuota de cada uno de los cultivos tratados y se contó en cámara de Neubauer. Se estimó el volumen necesario para obtener 1×10^5 células y se fijaron con 1 ml de Metanol-PBS en proporción 9:1 (v/v). Las suspensiones celulares se almacenaron a -20°C durante 2 horas y luego se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. Se removió el sobrenadante y el exceso de metanol se removió lavando dos veces con PBS frío y centrifugaciones sucesivas. Los botones celulares obtenidos se resuspendieron en 500 μl PBS (250 $\mu\text{g/ml}$ RNAsaA, 10 $\mu\text{g/ml}$ de IP), y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad. Las suspensiones celulares de cada tratamiento y control se analizaron con el Citómetro de flujo FACSCantoll de la Unidad de Citometría de la sede de Investigaciones Universitaria (Universidad de Antioquia).

Este ensayo se realizó por duplicado en dos momentos independientes y los resultados se presentaron como porcentajes promedio en cada fase del ciclo celular y se analizaron con los programas FlowJo (versión 6.0) y ModFit LT™ (Versión 4.0).

3.4.4. Efecto inductor de muerte celular del extracto etanólico de Maracuyá

- **Detección de apoptosis por citometría de flujo con Anexina V y contratención con Yoduro de Propidio**

El efector inductor de apoptosis se evaluó mediante la captación de Yoduro de propidio (IP) y la unión de Anexina V que permite identificar la Fosfatidilserina (Hingorani et al. 2011). Este componente fosfolipídico usualmente se encuentra en la cara interna de la membrana celular (hacia el lado citosólico), y se expone hacia la superficie externa de la misma por acción de la Flipasa como un evento celular de apoptosis temprana (Engeland et al. 1998).

El efecto del extracto etanólico a concentraciones de 5%, 5.5%, y 7% v/v se evaluó por duplicado en dos momentos independientes en las líneas celulares SW480 y Caco-2. Para ello se inocularon 3×10^5 células/pozo en 2 ml de medio ITS en placas de 6 pozos. Los cultivos se incubaron durante 48 horas para su establecimiento como se describió previamente y posteriormente fueron tratados durante 48 horas. Al finalizar el periodo de exposición, se recolectó el sobrenadante de cada uno de los cultivos y se transfirió en un tubo cónico de polipropileno (tubo A). Las células adheridas se lavaron 2 veces con PBS a 37°C, se les adicionó 500 μ l/poro de tripsina/EDTA (0.25%) y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. El bloqueo enzimático se realizó con adición de 2 ml de solución STOP (Medio DMEM Suplementado con 20% de suero de caballo, 100 UI/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomina). La suspensión celular obtenida en cada caso, se recolectó y se adicionó sobre el medio recolectado inicialmente en el Tubo A. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 1ml de medio DMEN y se estimó el volumen necesario para obtener 1×10^6 células por ml. Este volumen, se transfirió a un tubo de poliestireno para citometría (tubo B) y se centrifugó. Luego se realizaron lavados con 1 ml de PBS (1X) y se centrifugó dos veces a 2500 rpm durante 5 minutos. Las células obtenidas se mezclaron con 1 ml tampón de unión a Anexina V (10 mM HEPES; 0.14 M NaCl; 2.5 mM CaCl_2 ; pH 7.4) y se adicionó 4 μ l de anexina V-FITC (annexin-V-FLUOS staining kit) y 10 μ L de IP (1 mg/mL). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 4°C en oscuridad y posteriormente se centrifugaron para remover el sobrenadante con excesos de Anexina V y IP. Se adicionó 1 ml de PBS 1X y se analizaron en el Citómetro de flujo FACSCantoll.

Esta prueba se realizó por duplicado en dos momentos independientes. Los resultados se presentan de forma gráfica y se analizaron con FlowJo (versión 6.0) para reportar los valores promedio de eventos positivos para cada población celular analizada: Células

viables (anexinaV- Negativo, IP-Negativo), Células con apoptosis temprana (AnexinaV-positivo, IP-negativo), células con apoptosis tardía (AnexinaV-positivo, IP-Positivo), y células necróticas (AnexinaV-negativo, IP-Positivo).

- **Actividad de Caspasa 3:**

La actividad de la enzima Caspasa 3 se estimó usando el Kit ApoTox-Glo™ TriplexAssay (Promega). En el desarrollo de esta prueba se empleó un sustrato (Caspase-Glo®) para la Caspasa 3 como biomarcador de apoptosis (Figura 3-4). Este sustrato contiene el tetrapéptido de secuencia DEVD (Residuos amonoacídicos glutamato-Aspartato-valina-Glutamato), que al ser transformado enzimáticamente produce una señal luminiscente que es proporcional a la actividad de la caspasa.

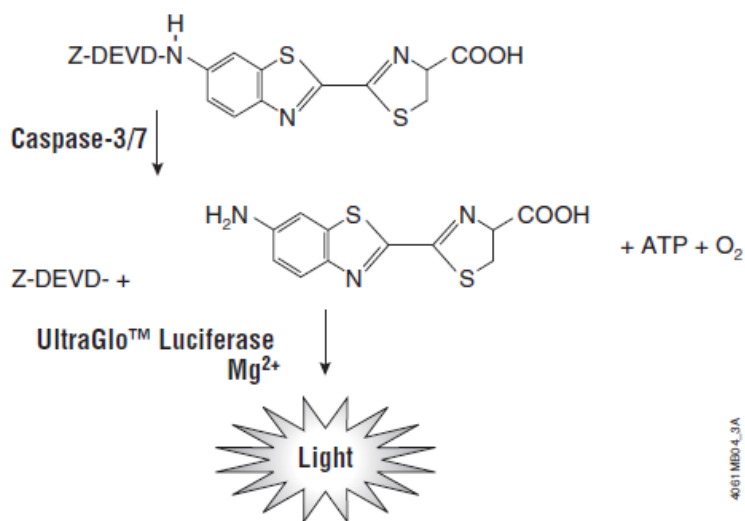


Figura 3-4. Representación esquemática del proceso de degradación de sustrato mediado por caspasa 3 y caspasa 7. (Tomada de la guía de usuario del Kit ApoToxGlo®)

Para la evaluación se emplearon las líneas celulares SW480 y Caco-2 tratadas con concentraciones de 5%, 5.5% y 7% del extracto etanólico de hojas de *P. edulis*. Para ello se sembraron 3000 células/pozo en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo de mantenimiento en placas de cultivo de 96 pozos, y se incubaron durante 24 horas para el establecimiento. Al finalizar este periodo se removió el medio y se adicionaron las diferentes concentraciones del extracto en medio ITS para estimar el efecto durante 24 horas. Posterior al tiempo de exposición al extracto, se añadieron 50µl del sustrato Caspase-Glo® 3/7 a todos los pocillos, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se les midió la luminiscencia en el equipo GLOMAX (Promega).

El ensayo se realizó por cuadruplicado y los resultados se presentaron como unidades arbitrarias de luminiscencia (RLU) y se compararon respecto al control negativo.

3.4.5. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo de las células expuestas a los extractos se evaluó usando el Kit de luminiscencia GSH/GSSG-Glo™ (Promega). En este caso, se tomó el Glutati6n Oxidado (GSSG) como un buen indicador del estr6s oxidativo celular ya que algunos compuestos pueden reaccionar con el Glutati6n reducido (GSH) y formar aductos incrementando los niveles de GSSG (Sies, H, 1999). Este hecho reduce la proporci6n GSH/GSSG y provoca una disminuci6n de la capacidad antioxidante natural del Glutati6n (Griffith, 1999), lo que se asocia a da6os en el ADN y a alteraciones en eventos de se6alizacion celular (Denzoin et al, 2013).

Para los ensayos se cultivaron 5.000 c6lulas/pozo de las l6neas SW480 y Caco-2 en un volumen final de 100 μ l de Medio ITS por pocillo usando en placas de cultivo de 96 pozos. En este ensayo el tiempo de establecimiento y de exposici6n a los tratamientos fue de 24 horas. Se evaluaron concentraciones de 5%, 5.5% y 7% v/v. y la acumulaci6n de glutati6n oxidado (GSSG) Se calcul6 asi: Se removió el medio de cultivo de cada pozo e inmediatamente se adicion6 25 μ l de reactivo de lisis para glutati6n oxidado (0,5 μ l de Luciferina-NT, 0,25 μ l de NEM 25 mM, 5 μ l de Buffer de lisis 5X, 19,25 μ l de agua destilada) y se dej6 actuar durante 5 minutos con agitaci6n orbital y a temperatura ambiente. Luego, se adicion6 25 μ l de reactivo de generaci6n de Luciferina (0,7 μ l de DTT 10 mM, 1,5 μ l de Glutathion-S-Transferasa y 22,8 μ l de Buffer de reacci6n de Glutati6n) a cada pozo y se mantuvieron las placas durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido en cada pozo fue transferido a una placa de cultivo de 96 pozos blanca (dise6ada para el equipo GLOMAX™ promega) y se mezcl6 con 50 μ l/pozo del reactivo de detecci6n de Luciferina durante 15 minutos. Finalmente, se obtuvo la luminiscencia en el equipo Glomax™ (Promega).

Este ensayo se realiz6 usando 4 r6plicas de cada tratamiento por plato y dos ensayos independientes para reproducibilidad. Los resultados se reportaron como luminiscencia promedio en unidades arbitrarias de luminiscencia (LRU) y se compararon respecto al control negativo.

3.5 An6lisis estadístico

Para todos los ensayos se us6 un Dise6o experimental completamente al azar con "Proporci6n de tratamiento" como 6nico factor. Los datos se analizaron mediante los programas GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) y Excel para el An6lisis de varianza de una v6a (ANOVA) y una prueba de Tukey para comparaciones m6ltiples. Adem6s una prueba Duncan de contraste entre cada tratamiento respecto al control negativo. En todos los casos se consideraron diferencias estadisticamente significativas cuando los valores p fueron menores que 0.05.

4. Resultados.

4.1 Marcha fitoquímica preliminar.

Los resultados de la marcha fitoquímica preliminar se presentan como presencia o ausencia de cada metabolito. Cuando se compararon ambos extractos, se encontró presencia de compuestos similares entre los extractos como Flavonoides, Quinonas, Glicósidos cardiotónicos, Alcaloides, deoxiazúcares, azúcares reductores, carotenoides y carbohidratos (Tabla 4-1). La diferencia se observó en la presencia de Taninos en el extracto etanólico, y de Esteroles presentes únicamente en el extracto acuoso.

Tabla 4-1: Evaluación cualitativa de metabolitos presentes en los extractos de *P. edulis Sims f. flavicarpa*.

| Metabolito | Extracto acuoso del fruto | Extracto Etanólico de hoja |
|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Taninos | - | + |
| Flavonoides | + | + |
| Quinonas | + | + |
| Esteroles | + | - |
| Saponinas | - | - |
| Glicósidos cardiotónicos | + | + |
| Lactonas terpénicas | - | - |
| Cumarinas | - | - |
| Alcaloides y/o aminas cuaternarias | + | + |
| Deoxiazúcares | + | + |
| Azúcares reductores | + | + |
| Carotenoides | + | + |
| Carbohidratos | + | + |

*(-) Ausencia del metabolito, (+) presencia del metabolito.

4.2 Ensayos biológicos

4.2.1 Efecto sobre la viabilidad celular de los extractos de maracuyá, mediante el método de MTT:

El efecto citotóxico se evaluó inicialmente en células SW480 y SW620. La respuesta a las diferentes concentraciones de los extractos y un periodo de exposición de 24 horas se estimó calculando el Porcentaje de viabilidad como la relación entre Absorbancias de células tratadas y células no tratadas.

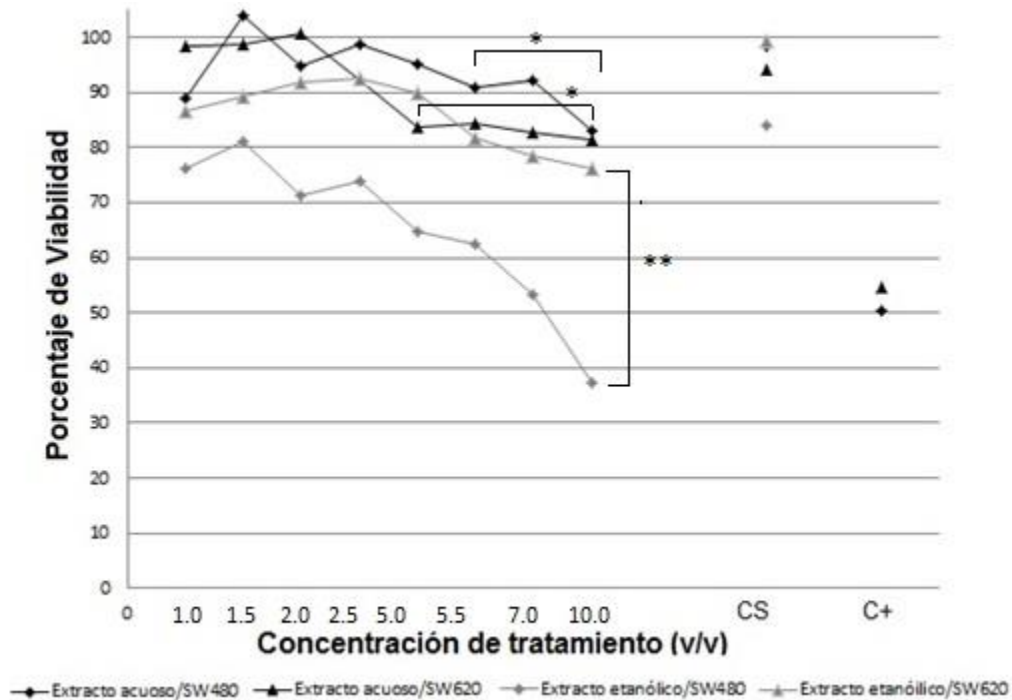


Figura 4-1. Efecto sobre la viabilidad celular de los extractos de *P. edulis* en células SW480 y SW620. CS: células tratadas con 10% de Agua destilada (como control vehículo para el extracto acuoso), y con DMSO 0,2% (como control vehículo para el extracto etanólico). C+: Células expuestas a H₂O₂ 250 μM durante 6 horas.*diferencias significativas.

Ambos extractos mostraron un efecto reductor en el Porcentaje de Viabilidad en células SW480. De acuerdo al análisis de varianza se encontró que el extracto acuoso presentó un efecto significativo ($p < 0.0001$) entre al menos 2 de los tratamientos. La prueba de contraste mostró que dicha diferencia se presentó a partir de la concentración de 5.5% y hasta 10% con respecto al control negativo (Anexo, Tabla A-1). El mayor efecto fue generado por la concentración de 10%, la cual disminuyó la viabilidad en un 16.98%. Para este extracto, no se encontró efecto del solvente empleado ($p = 0.5225$).

El extracto etanólico también redujo significativamente ($p < 0.0001$) la viabilidad de las células SW480 incluso con concentraciones bajas (Tabla A-2). En este caso la viabilidad

se redujo como mínimo en un porcentaje de 18.95% para la concentración de 1.5%, y como máximo en 62.72% para la concentración de 10%. Aunque los cultivos tratados con DMSO 0.2% como control solvente (CS) presentaron una disminución en la viabilidad de 16.06%, esta diferencia no resultó significativa y por lo tanto, solo se atribuyeron los efectos sobre esta línea celular a los compuestos presentes en el extracto.

El efecto de los extractos sobre la línea celular SW620 fue variable. Para el extracto acuoso se observó diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre las absorbancias y por tanto en la viabilidad celular para al menos dos tratamientos. La prueba de contraste mostró que la disminución en la absorbancia resultó significativa a partir del tratamiento de 5.5% y se mantuvo hasta la concentración de 10% (Anexos, tabla A-3). El menor efecto sobre la viabilidad se obtuvo con la concentración de 1% (26,4 µg/ml) para la cual la viabilidad disminuyó en 1.49%, y el mayor efecto sobre la viabilidad con la concentración de 10% (264 µg/ml), con la cual la viabilidad disminuyó en 18.50%.

Para probar si el efecto sobre la viabilidad celular fue dependiente de la dosis y estimar la DL_{50} se realizó una Regresión lineal. Para el extracto acuoso no se encontró un ajuste lineal ni en células SW80 ($R^2=0.2352$), ni en células SW620 ($R^2=0.2352$) y por lo tanto la dosis letal media no se determinó por este método. En contraste, el efecto sobre la viabilidad celular generado por el extracto etanólico sí presentó un ajuste lineal para las células SW480 ($R^2=0.8411$) y SW620 solo para concentraciones superiores a 5% ($R^2=0.699$) (Anexos, Tabla A-4). De acuerdo a estos resultados se estimó una DL_{50} de 7.32% equivalente a 167.62 µg/ml y de 25.80% respectivamente; valor que supera a la concentración máxima evaluada en este estudio. Los controles de solvente (10% de Agua destilada y DMSO 0.2%) no mostraron diferencias significativas y por lo tanto se atribuyó el efecto a los compuestos presentes en el extracto.

De acuerdo a los resultados descritos anteriormente y debido a que se obtuvo un mayor efecto citotóxico del extracto etanólico sobre ambas líneas celulares, se determinó continuar las demás pruebas únicamente con este extracto. Además se incluyeron las líneas celulares Caco-2 (derivada de adenocarcinoma) y CHO-K1 como línea celular no maligna para evaluar la selectividad del extracto y evaluar su efecto para diferentes tiempos de exposición.

Debido a que se encontró un mejor efecto del extracto etanólico, se evaluó el efecto de éste a diferentes tiempos de exposición y se incluyeron las líneas celulares Caco-2 y CHO-K1. Los resultados se presentan como valores de absorbancia promedio y (Figura 4-2) y como porcentajes de viabilidad respecto al control negativo en cada caso (Figuras 4-3 a 4-6).

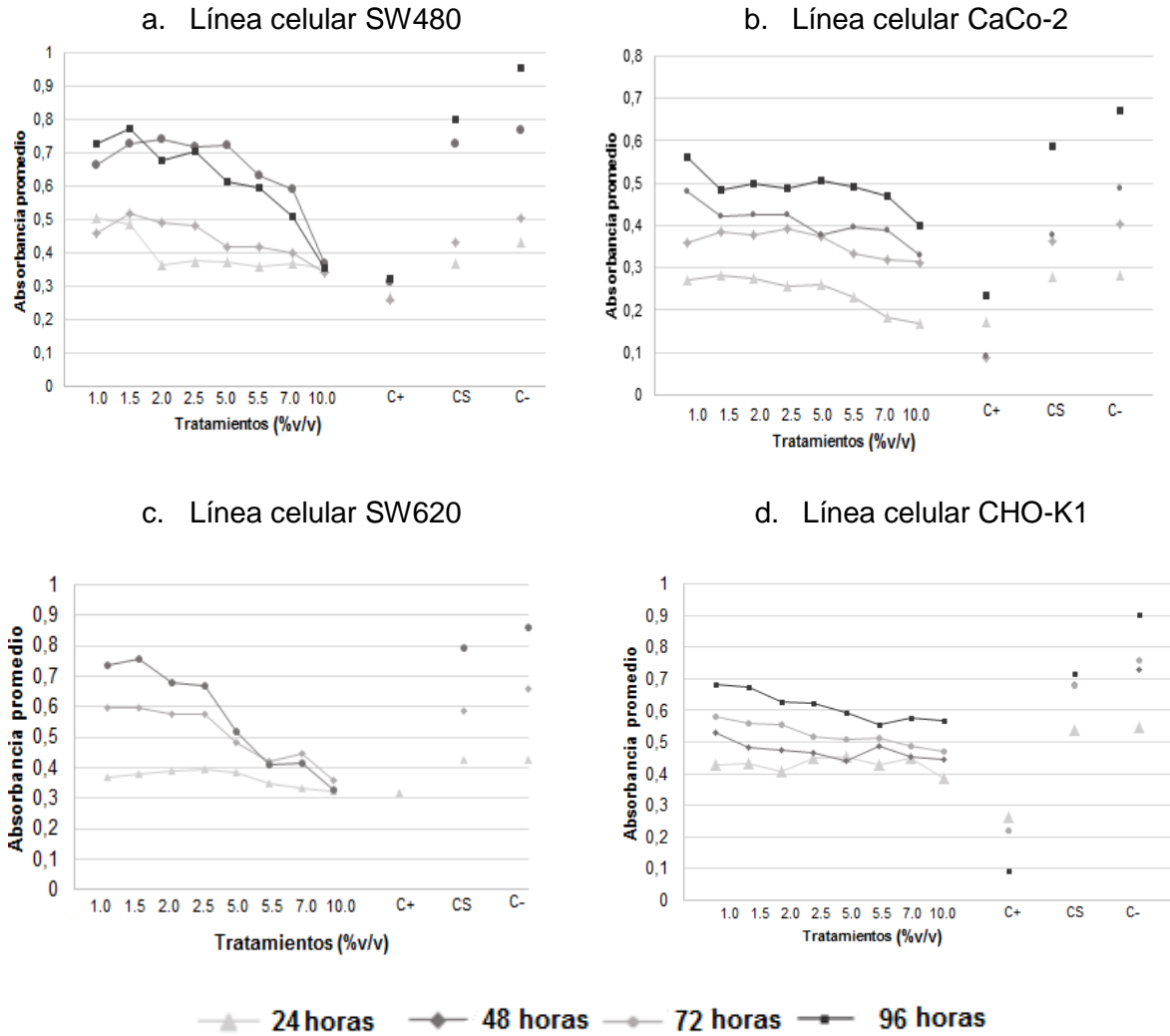


Figura 4-2. Absorbancia promedio a 560nm obtenida mediante el método de MTT en cultivos tratados con el extracto etanólico de hojas de maracuyá. CS: Células tratadas con DMSO 0.2%(durante el mismo tiempo de tratamiento). C+: Células expuestas a H₂O₂ 250 µM durante 6 horas, C-: Células sin tratamiento.

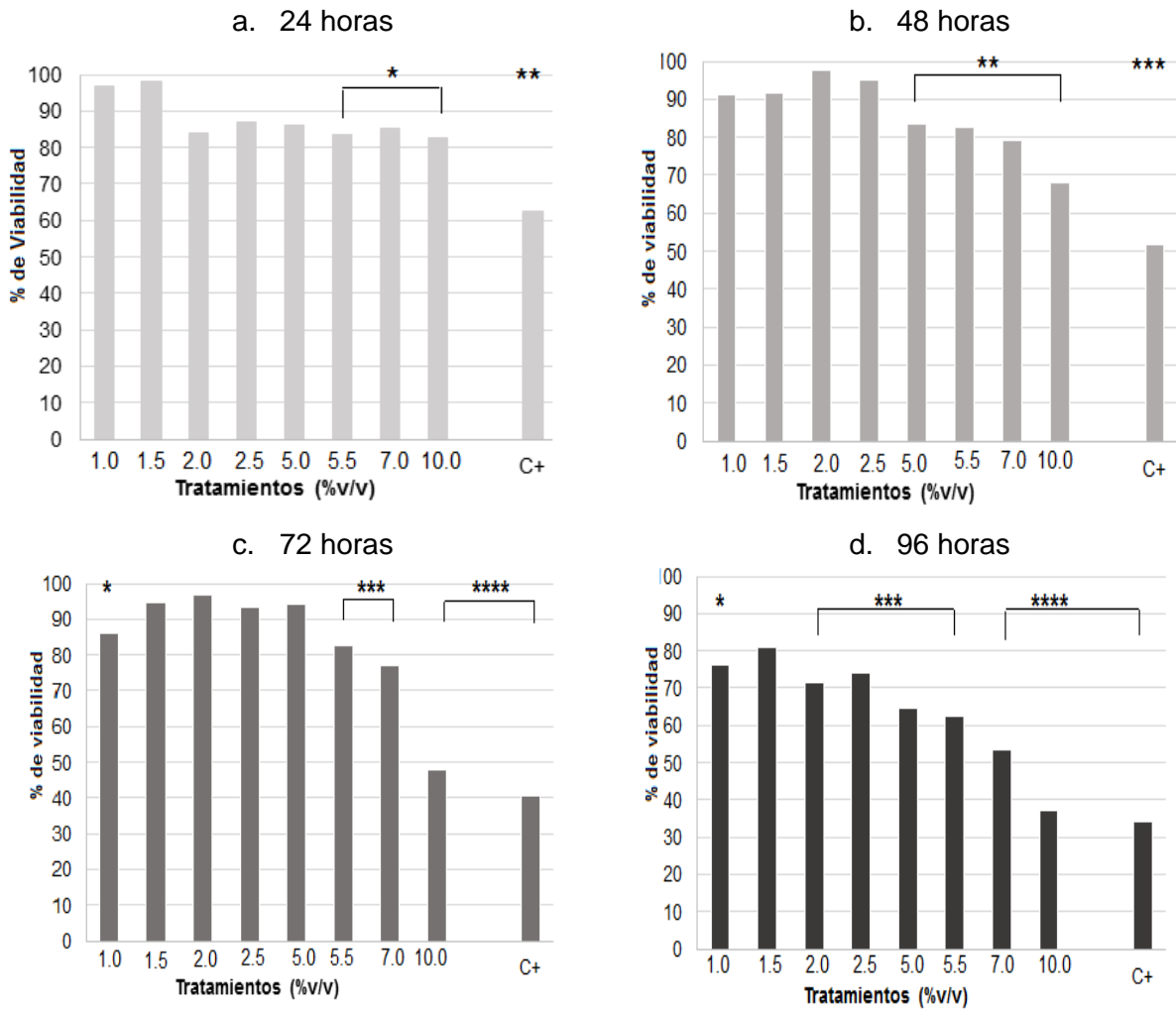


Figura 4-3. Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células SW480 evaluado mediante la prueba de MTT. Las diferencias que significativas fueron obtenidas por la prueba de Dunnet para comparación múltiple respecto al control negativo. En todos los casos $p < 0.001$ (Tabla A-12). C+: Células expuestas a H_2O_2 250 μ M durante 6 horas.

El efecto del extracto etanólico sobre las células SW620 mostró también un comportamiento Dosis-dependiente que resultó significativo para concentraciones superiores a 2.5% a partir de las 48 horas (Figura 4-4, Tabla A-4). Para estas células, la viabilidad disminuyó a las 24 horas en un 10.13%, 18.31%, 21.40%, 23.94% para los tratamientos de 5%, 5.5%, 7% y 10% respectivamente. A las 48 horas en un 26.55%, 36.25%, 32.42% y 45.53%; y a las 72 horas se obtuvo el mejor efecto ya que la viabilidad disminuyó en 39.56%, 52.27%, 51.59% y 61.71% para las concentraciones de tratamiento descritas anteriormente alcanzando su valor de DL_{50} , razón por la cual no se evaluó su efecto a las 96 horas.

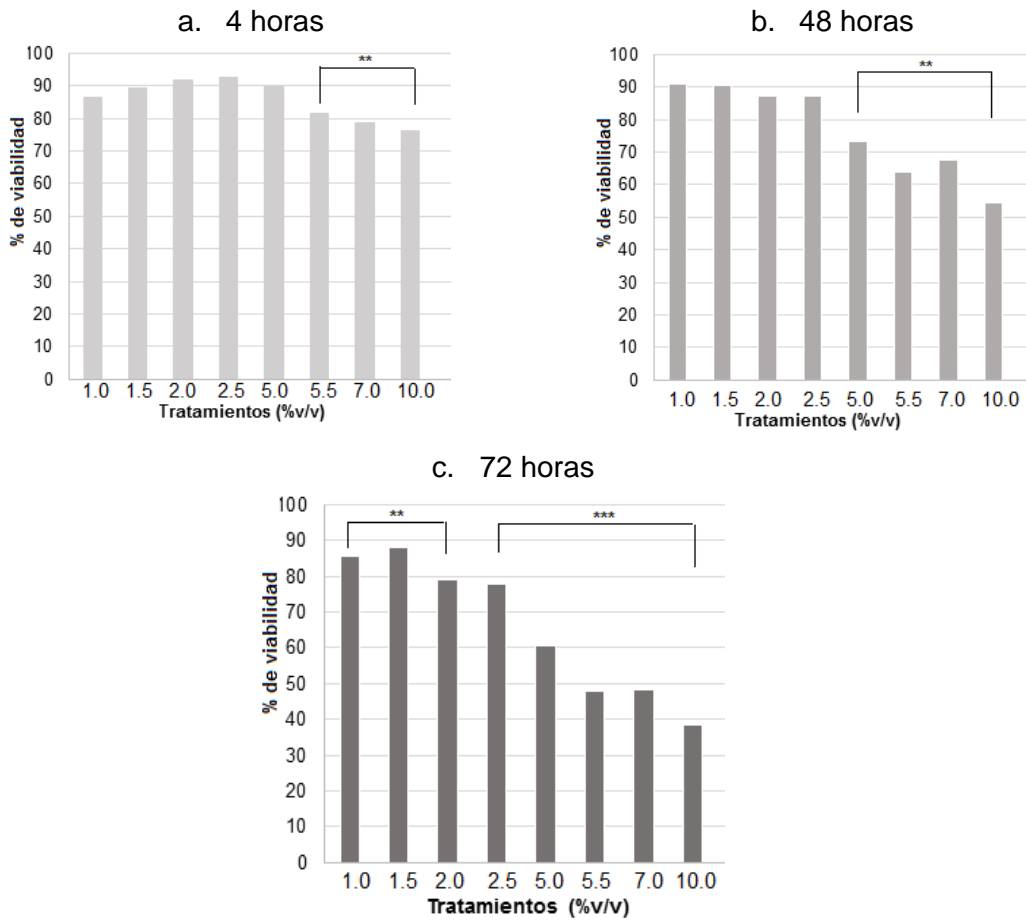


Figura 4-4. Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células SW620 evaluado mediante la prueba de MTT. Las diferencias que significativas fueron obtenidas por la prueba de Dunnet para comparación múltiple respecto al control negativo. En todos los casos $p < 0.00$. C+: Células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 6 horas.

El efecto del extracto sobre células Caco-2 resultó significativo a partir de las 24 horas (Anexos, Tabla A-5). La Viabilidad de estas células a las 24 horas se redujo en 8.30%, 19.09%, 35.87% y 40.46% para las proporciones de tratamientos de 5%, 5.5%, 7% y 10% respectivamente. A las 48 horas en 6.79%, 16.91%, 20.61%, y 22.01%; a las 72 horas en 22.34%, 18.56%, 20.18% y 32.41%; y a las 96 horas en 24.84%, 27,07%, 29.92% y de 40.47% para las concentraciones de tratamiento descritas anteriormente.

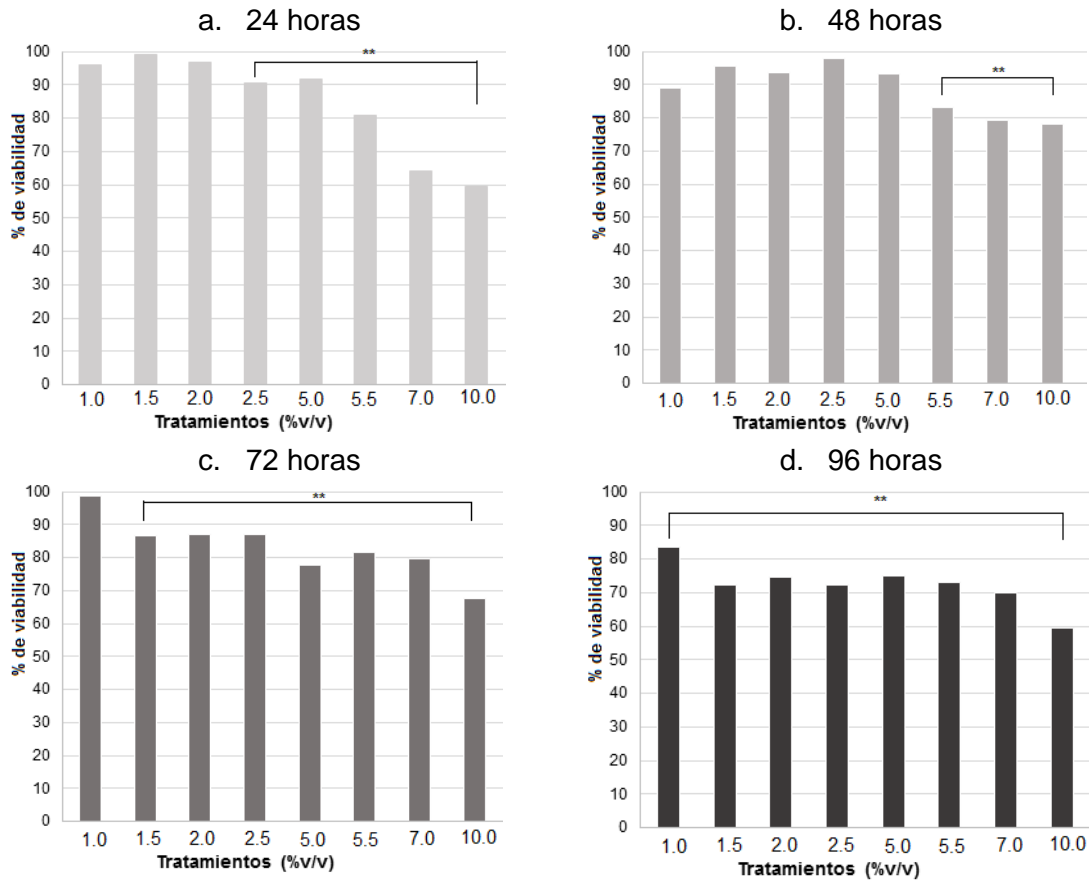


Figura 4-5. Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células Caco-2 evaluado mediante la prueba de MTT. Las diferencias que significativas fueron obtenidas por la prueba de Dunnet para comparación múltiple respecto al control negativo. En todos los casos $p < 0.001$. C+: Células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 6 horas.

El efecto del extracto etanólico de Hojas de *P. edulis* resultó significativo (*) a partir de las 24 horas (Tabla A-6) en células CHO-K1. Al estimar el Porcentaje de viabilidad celular se encontró que éste se redujo en 17.53%, 21.79%, 18.15% y 29.49% para las concentraciones de 5%, 5.5%, 7% y 10% respectivamente. A las 48 horas en 35.29%, 28.78%, 33.47% y 34.59%; a las 72 horas en 32.69%, 32.16%, 35.80% y de 37.83%; y a las 96 horas en 33.99%, 38.29%, 35.90% y 37.22% para las concentraciones descritas anteriormente.

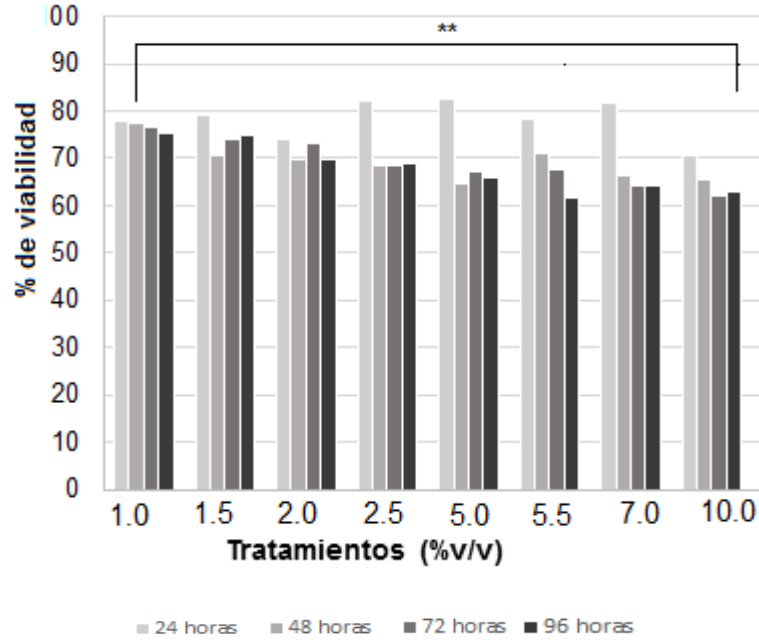


Figura 4-6. Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células CHO-K1 evaluado mediante la prueba de MTT. Las diferencias que significativas fueron obtenidas por la prueba de Dunnet para comparación múltiple respecto al control negativo. En todos los casos $p < 0.001$. C+: Células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 6 horas.

Los resultados de la prueba de viabilidad mediante MTT se resumen en la Tabla 4-2, en la que se estima la Dosis letal Media (DL_{50}) para cada tiempo y sistema celular evaluado. Como se observa, el mayor efecto del extracto se presentó en las células SW480 en las que se requirió una menor proporción de extracto para alcanzar la DL_{50} a las 25 horas, y en las células SW620 en mayores tiempos de exposición.

De forma global, los resultados de la prueba de MTT mostraron que el DMSO 0.2% empleado como control solvente presenta un efecto significativo sobre la viabilidad celular para tiempos de exposición mayores a 48 horas para las células SW620, CaCo-2 y CHO-K1 (Figura 4-4 a 4-6). Por lo tanto, debe ser considerado como un factor sobre la viabilidad celular en periodos de exposición más largos. En todos los casos existió una relación dosis-respuesta entre el tratamiento y el porcentaje de viabilidad celular, y además se evidenció que el efecto se aumenta con el tiempo.

Tabla 4-2: DL₅₀ estimada mediante regresión lineal del extracto etanólico de hojas de maracuyá.

| línea celular | tiempo (Horas) | Ecuación de regresión | Coefficiente de determinación (R ²) | DL ₅₀ (%v/v) | DL ₅₀ (µg/ml) |
|---------------|----------------|------------------------|---|-------------------------|--------------------------|
| SW480 | 96 | Y =(-4.4235)X + 84,111 | 0.9561 | 7.716 | 176.696 |
| | 72 | Y =(-4.3858)X + 102,92 | 0.7278 | 12.294 | 281.532 |
| | 48 | Y= (-2.9481)X + 98,775 | 0.8973 | 16.544 | 378.85 |
| | 24 | Y= (-5.3167)X + 88,96 | 0.8411 | 7.32 | 167.62 |
| SW620 | 96 | - | - | - | - |
| | 72 | Y=(-5.9327)X + 91.272 | 0.9245 | 6.9567 | 159.308 |
| | 48 | Y= (-4.3296)X + 95.596 | 0.9388 | 10.5312 | 241.187 |
| | 24 | Y= (-1.6643)X + 92.952 | 0.699 | 25.8078 | 590.998 |
| CaCo-2 | 96 | Y =(-2.136)X + 82.119 | 0.6286 | 15.036 | 344.324 |
| | 72 | Y =(-3.3222)X + 98.212 | 0.806 | 14.512 | 332.324 |
| | 48 | Y=(-2.3087)X + 99.089 | 0.5502 | 21.262 | 486.899 |
| | 24 | Y=(-5.6738)X + 110.37 | 0.8268 | 10.64 | 243.656 |
| CHO-K1 | 96 | Y=(-2.0256)X + 77.085 | 0.8858 | 13.731 | 314.439 |
| | 72 | Y=(-1.973)X + 78.058 | 0.9569 | 14.221 | 325.661 |
| | 48 | Y=(-1.2524)X + 74.918 | 0.5545 | NA | NA |
| | 24 | Y=(-0.3033)X + 79.616 | 0.0313 | NA | NA |

Y: Porcentaje de Viabilidad, X: proporción de tratamiento

NA: No sigue un ajuste lineal, (-) no evaluado.

valores obtenidos mediante MTT.

4.2.2 Efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por el método de exclusión de colorante azul de tripano:

La evaluación del efecto citotóxico por este método se realizó únicamente para el extracto etanólico de hojas de *P. edulis* por haber presentado un mayor efecto en la prueba Tamizaje por la metodología de MTT. Su efecto se evaluó en el modelo *in vitro* de cáncer de colon que incluyó las líneas SW480 y SW620, y la línea celular no maligna CHO-K1 para determinar el Índice de selectividad (SI).

En las figuras 4-7 a 4-10 se resumen los porcentajes promedio de viabilidad obtenido para cada concentración de extracto evaluada en tiempos de 24, 48, 72 y 96 horas. Los valores que resultaron tener diferencia significativa respecto al control negativo se subrayan con asterisco (*).

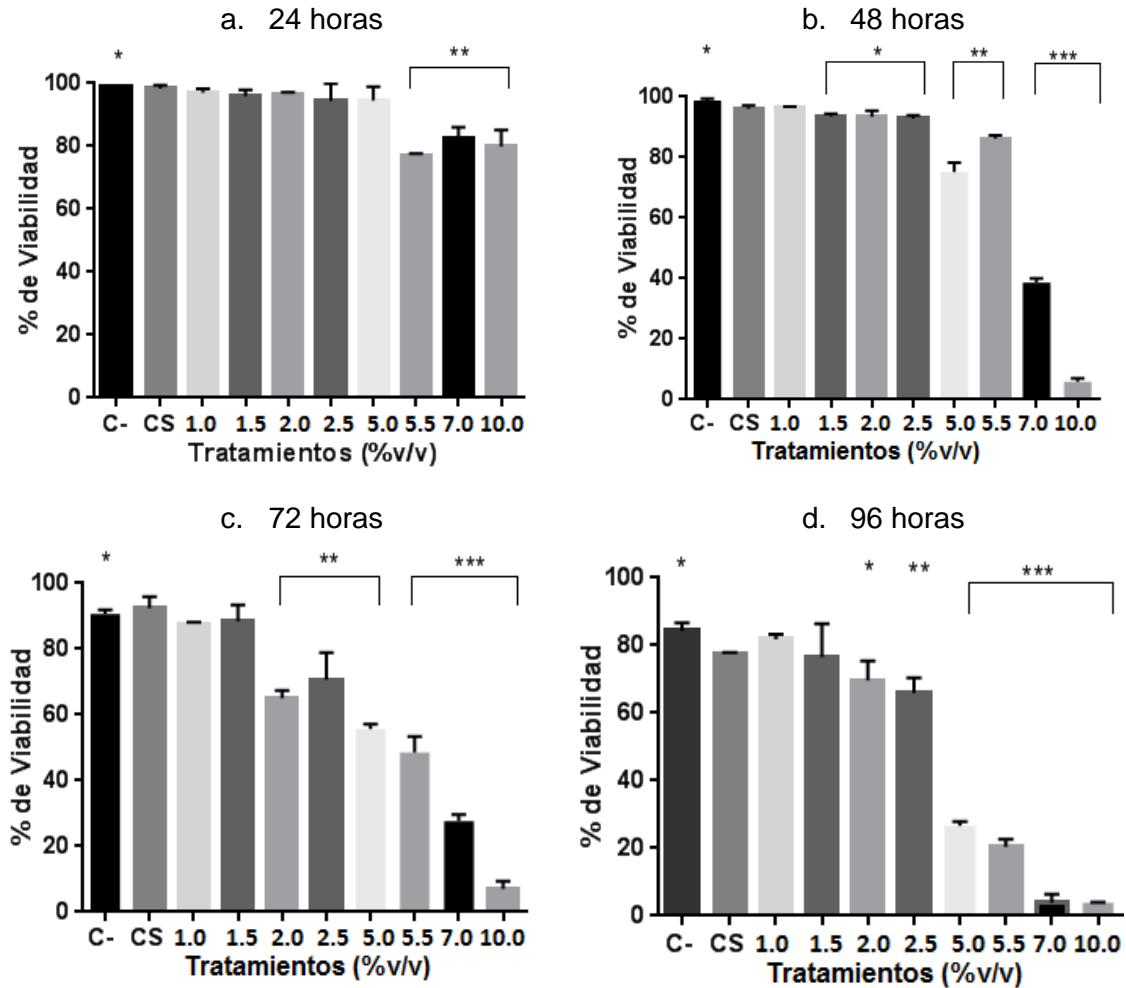


Figura 4-7. Efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre la viabilidad en células SW480. a) efecto a las 24 h, b) efecto a las 48 h, c) efecto a las 72 h, d) efecto a las 96 h. * Diferencias significativas ($p < 0.001$) por ANOVA de una vía y prueba de Dunnet para comparación múltiple respecto al control negativo (C-). C+: Células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 18 horas, CS: células tratadas con DMSO 0.2% durante el mismo tiempo de exposición al extracto.

Para esta línea celular se observó una disminución en el porcentaje de viabilidad que resultó significativo (Tabla A-14) para concentraciones de tratamiento superiores a 5% a partir de las 24 horas, y superiores a 1.5% a las 48 horas. En este tiempo de exposición se detectó una concentración umbral (Figuras 4-7b a 4-7d) para la cual la viabilidad disminuyó hasta en un 61.28% para la el tratamiento de 7% y en 94.16% para la de 10%. El efecto del extracto aumentó con el tiempo y se observó que concentraciones bajas como 2% (equivalente a 52.8 $\mu g/ml$) disminuyeran la viabilidad en valores de hasta 34.9% (Figura 4-7c) a las 72 horas.

La DL_{50} del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre células SW480 se estimó por regresión lineal para cada tiempo y se presentó como relación volumen-volumen de tratamiento y su equivalente en $\mu g/ml$.

Tabla 4-3: DL₅₀ estimada para el extracto etanólico de hojas de maracuyá mediante la prueba de exclusión de colorante azul de Tripano en células SW480.

| Tiempo (horas) | Ecuación de Regresión | Coefficiente de Determinación (R ²) | DL ₅₀ (% v/v) | DL ₅₀ (µg/ml) |
|----------------|------------------------|---|--------------------------|--------------------------|
| 96 | Y= (-10.026)X + 86.827 | 0.9011 | 3.6731 | 84.11 |
| 72 | Y= (-8.8124)X + 94.351 | 0.9537 | 5.0327 | 115.24 |
| 48 | Y= (-9.7845)X + 114.99 | 0.8645 | 6.6421 | 152.11 |
| 24 | Y= (-2.7785)X + 100.89 | 0.6510 | 18.3156 | 419.42 |

Y: Porcentaje de Viabilidad, X: proporción de tratamiento

El efecto sobre la viabilidad celular del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre células SW620 se presenta en la figura 4-8. Las diferencias en los porcentajes de viabilidad resultaron significativas a partir de las 24 horas de exposición (Tabla A-15). Para este tiempo, la viabilidad se redujo en valores de 28.71%, 32.89%, 36.68% y 36.43% para los tratamientos de 5, 5.5%, 7% y 10% respectivamente (Figura 4-8a). En 39.30%, 43.90%, 68.96%, 71.31% a las 48 horas (Figura 4-8b), en 55.53%, 68.82%, 73.51%, 94.08% a las 72 horas (Figura 4-8c), y a las 96 horas la viabilidad se redujo hasta en más del 50% cuando las concentraciones de tratamiento fueron mayores al 2%.

La DL₅₀ del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre células SW620 se estimó por regresión lineal para cada tiempo y se presentó como relación volumen-volumen de tratamiento y su equivalente en µg/ml.

Tabla 4-4: DL₅₀ estimada para el extracto etanólico de hojas de maracuyá mediante la prueba de exclusión de colorante azul de Tripano en células SW620.

| Tiempo (horas) | Ecuación de Regresión | Coefficiente de Determinación (R ²) | DL ₅₀ estimada (% v/v) | DL ₅₀ estimada (µg/ml) |
|----------------|-----------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 96 | Y=(-8.8142)X + 78.497 | 0.8654 | 3.2331 | 74.03 |
| 72 | Y=(-8.6809)X + 87.495 | 0.9619 | 4.3193 | 98.91 |
| 48 | Y=(-6.1866)X + 86.447 | 0.9143 | 5.8913 | 134.91 |
| 24 | Y=(-2.3056)X + 82.589 | 0.7933 | 14.135 | 323.69 |

Y: Porcentaje de Viabilidad, X: concentración de tratamiento

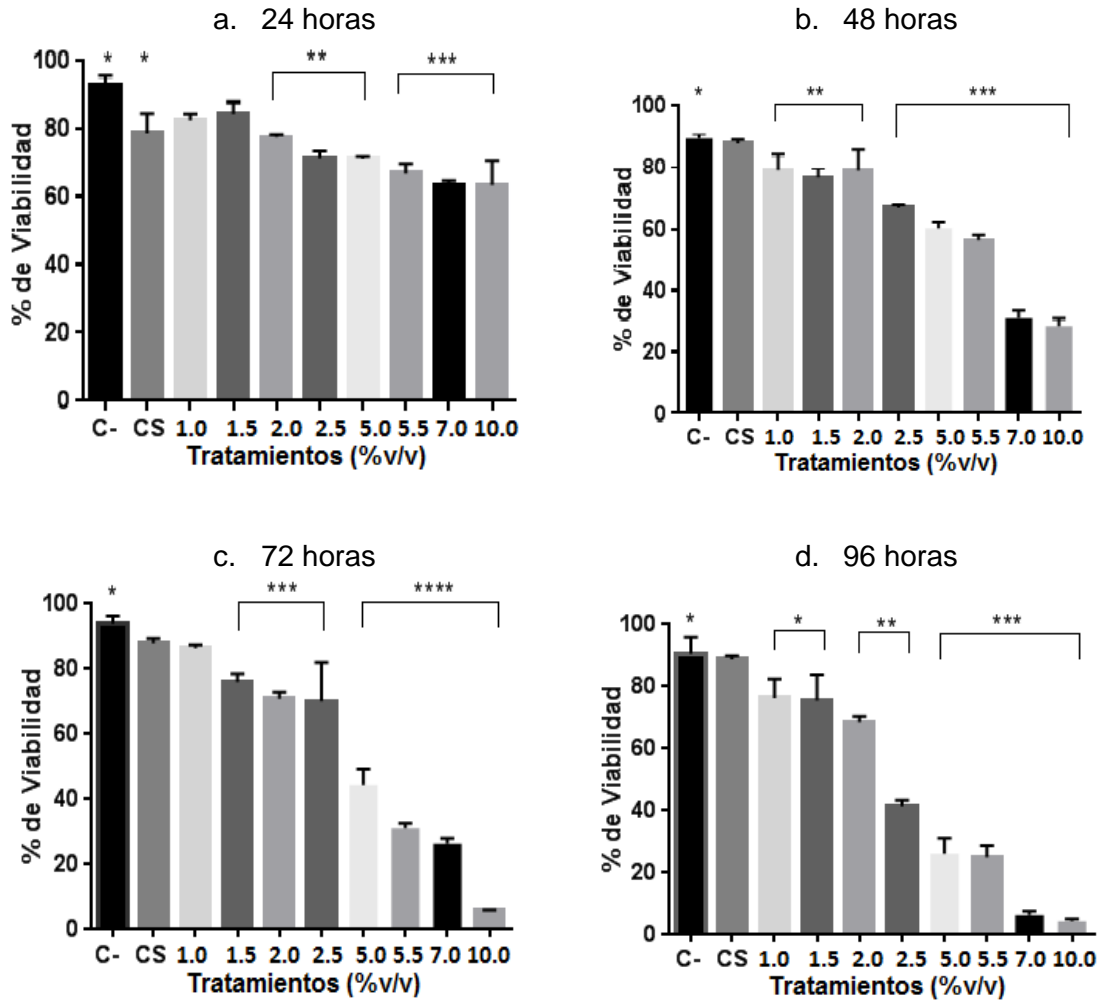


Figura 4-8. Efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre la viabilidad en células SW620. a) efecto a las 24 h, b) efecto a las 48 h, c) efecto a las 72 h, d) efecto a las 96 h. * Diferencias significativas ($p < 0.001$) por ANOVA de una vía y prueba de Dunnet para comparación múltiple respecto al control negativo (C-). C+: Células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 18 horas, CS: células tratadas con DMSO 0.2% durante el mismo tiempo de exposición al extracto.

Los resultados de viabilidad para células CHO-K1 tratadas con el extracto etanólico de Hojas de *P. edulis* mostraron diferencia significativa (*) entre los tratamientos para cada tiempo (Tabla A-16). La variación en los porcentajes de viabilidad se resume en la Figura 4-9. En esta, se observa que la viabilidad se redujo a las 24 horas en 12.92%, 12.88%, 29.80% y 45.21% para las concentraciones de 5, 5.5%, 7% y 10% respectivamente (Figura 4-9a), a las 48 horas en 18.27%, 10.10%, 32.14%, 78.26% (Figura 4-9b), y a las 72 horas en 15.63%, 17.78%, 36.59% y 71.93 para los mismos tratamientos.

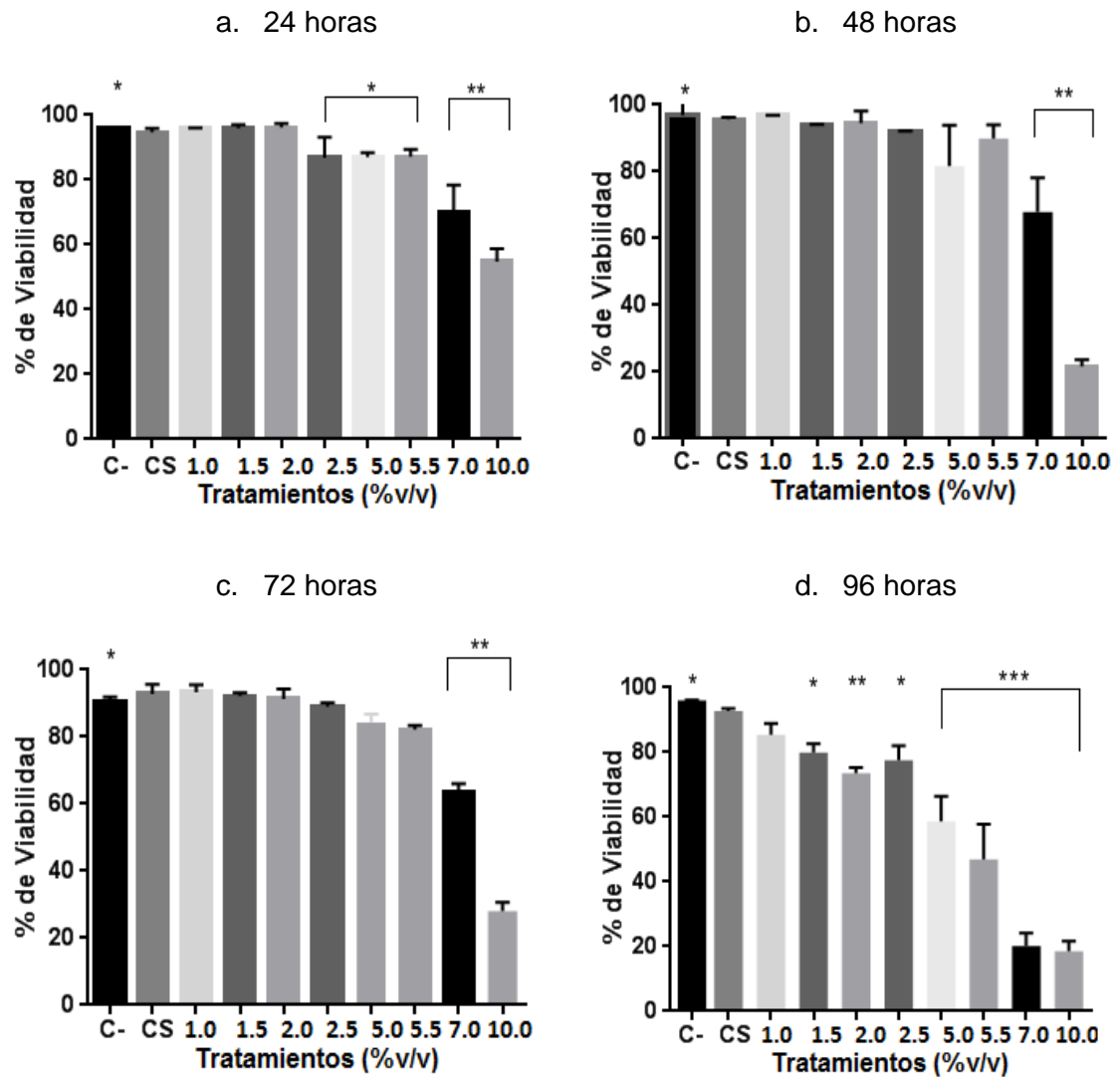


Figura 4-9. Efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* sobre la viabilidad en células CHO-K1. a) efecto a las 24 h, b) efecto a las 48 h, c) efecto a las 72 h, d) efecto a las 96 h. * Diferencias significativas ($p < 0.001$) por ANOVA de una vía y prueba de Dunnet para comparación múltiple respecto al control negativo (C-). C+: Células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 18 horas, CS: células tratadas con DMSO 0.2% durante el mismo tiempo de exposición al extracto.

El efecto del extracto sobre esta línea celular fue menor para cada concentración y tiempo evaluado en comparación con las células del modelo de cáncer de colon SW480 y SW620 después de 24 de tratamiento. Además el efecto sobre la viabilidad celular para la línea celular CHO-K1 tratada con el extracto acuoso siguió un ajuste lineal para cada tiempo.

Tabla 4-5: DL₅₀ estimada para el extracto etanólico de hojas de maracuyá mediante la prueba de exclusión de colorante azul de Tripano en células CHO-K1.

| Tiempo (horas) | Ecuación de Regresión | Coefficiente de Determinación (R ²) | DL ₅₀ estimada (% v/v) | DL ₅₀ estimada (µg/ml) |
|----------------|-----------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 96 | Y=(-8.1602)X + 92.769 | 0.9241 | 5.2412 | 120.02 |
| 72 | Y=(-6.6038)X + 106.47 | 0.8589 | 8.5512 | 195.82 |
| 48 | Y=(-7.266)X + 111.13 | 0.8142 | 8.4132 | 192.66 |
| 24 | Y=(-4.3999)X + 103.21 | 0.8891 | 12.093 | 276.93 |

Y: Porcentaje de Viabilidad, X: concentración de tratamiento

El efecto de la concentración del DMSO (0.2%) como control solvente (CS) no resultó significativo cuando se comparó respecto a los cultivos sin tratamientos (C-). Este hecho sugiere que el vehículo empleado como solvente de los tratamientos no presenta efecto citotóxico por permeabilización de la membrana y por lo tanto, los efectos en la viabilidad se asociaron con los compuestos presentes en el extracto etanólico de hojas de *P. edulis*.

Este ensayo de viabilidad por exclusión de colorante mostró un efecto diferencial en las 3 líneas celulares. Entre estas, las células SW620 presentaron mayor sensibilidad al extracto y las células CHO-K1 una menor sensibilidad de acuerdo a las DL₅₀ estimadas para cada tiempo (Tablas 4-3, 4-4, 4-5). Este efecto se comparó con las DL₅₀ estimadas mediante MTT y se determinó el Índice de selectividad (SI) para cada tiempo.

Tabla 4-6: Índice de selectividad del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en el modelo de cáncer de colon SW480-SW620 respecto a células no malignas CHO-K1.

| tiempo | DL50(µg/ml) CHO-K1 | DL50(µg/ml) SW480 | DL50(µg/ml) SW620 | SI SW480 | SI SW620 |
|--------|--------------------|-------------------|-------------------|----------|----------|
| 96 | 120.02 | 84.11 | 74.03 | 1.43 | 1.62 |
| 72 | 195.82 | 115.24 | 98.91 | 1.70 | 1.98 |
| 48 | 192.66 | 152.11 | 134.91 | 1.27 | 1.43 |
| 24 | 276.93 | 419.42 | 323.69 | 0.66 | 0.86 |

Tabla 4-7: Resumen de valores de DL₅₀ del extracto etanólico de maracuyá a 48 horas de tratamiento en las diferentes líneas celulares.

| línea celular | Metodología | |
|---------------|------------------------|--------|
| | exclusión de colorante | MTT |
| SW480 | 6.64% | 16.54% |
| SW620 | 5.89% | 10.53% |
| Caco-2 | No se realizó | 21.26% |
| CHO-K1 | 8.41% | 19.89% |

4.2.3 Efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de maracuyá evaluado mediante Sulforodamina B.

Esta prueba se realizó inicialmente con ambos extractos (Acuoso del fruto y etanólico de hojas de *P. edulis*) en las líneas celulares SW480 y SW620 como modelo *in vitro* de cáncer de colon. Debido a que el extracto etanólico presentó un mayor efecto inhibitorio se seleccionó para su posterior evaluación en las líneas celulares CaCo-2 y CHO-K1. Los resultados se presentan como porcentajes de inhibición para las concentraciones de extracto que tuvieron un efecto significativo (Figura 4-10 a 4-13)

El conjunto de datos obtenidos para la línea celular SW480 mostró que el efecto antiproliferativo del extracto depende de la dosis adicionada y del tiempo de exposición (debido a la diferencia entre la absorbancia de los tratamientos y la del control negativo que fue mayor en todos los caso). La Dosis-dependencia y Tiempo dependencia se probó mediante un Análisis de varianza de dos vías que mostró la interacción entre dichos factores. Se encontró diferencia significativa entre al menos dos de los tratamientos para un tiempo dado ($p=0.0164$), y en el efecto de cada tratamiento respecto al tiempo ($p<0.0001$) (Anexos, Tabla A-7). Dicha diferencia se encontró para proporciones superiores al 2% a las 96 y 144 horas de tratamiento respectivamente (Anexos, Tabla A-8).

Los resultados del efecto antiproliferativo del extracto acuoso sobre la línea celular SW620 se describen de forma análoga. Los porcentajes de inhibición para los que se encontró diferencia significativa se presentan en la Figura 4-11. El Análisis de varianza de dos vías (Tabla A-9) también mostró diferencia significativa entre al menos dos de los tratamientos para un tiempo dado ($p=0.0188$) y entre el efecto de cada tratamiento respecto al tiempo ($p<0.0001$) mostrando interacción entre estos dos factores: concentración de tratamiento y tiempo. Se identificó un efecto inhibitorio significativo a partir de las 48 horas para concentraciones iguales o mayores a 5.5%. Con la que se obtuvo una inhibición de 37.04% (Tabla A-10). El efecto inhibitorio aumentó significativamente a concentraciones mayores a 2% con el cual se alcanzó una inhibición de hasta 30% a las 144 horas de tratamiento.

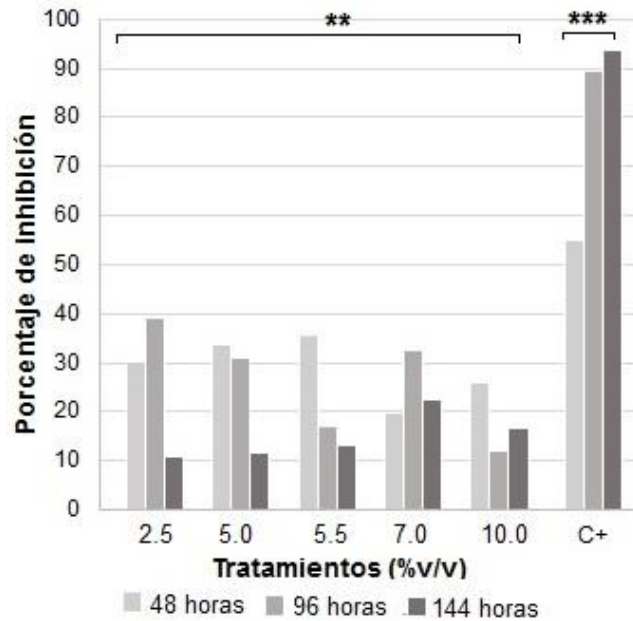


Figura 4-10. Efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de *P edulis* en células SW480. Porcentaje de inhibición obtenido mediante la técnica de Sulforodamina B. C+, Células tratadas con H₂O₂ 250 µM durante 18 horas. (*) Diferencias Significativa (p<0.05).

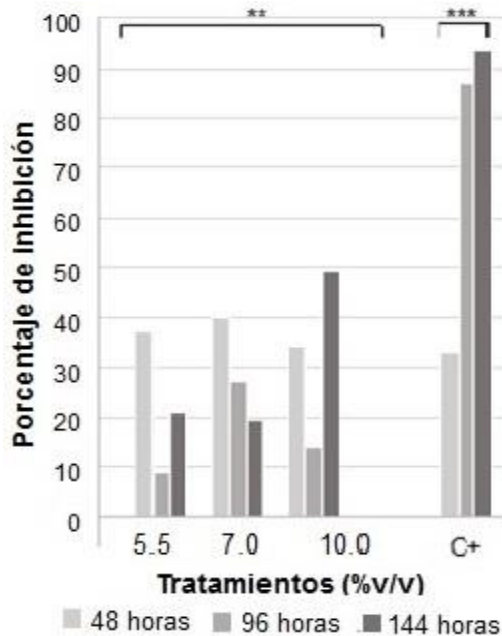


Figura 4-11. Efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de *P edulis* en células SW620. Porcentaje de inhibición obtenido mediante la técnica de Sulforodamina B. C+, Células tratadas con H₂O₂ 250 µM durante 18 horas. (*) Diferencias Significativa (p<0.05).

Se intentó establecer la Concentración inhibitoria Medida (CI_{50}) del extracto mediante regresión lineal. Sin embargo, para el conjunto de datos presentó valores de R^2 muy bajos y por lo tanto la CI_{50} no se determinó por este método.

4.2.4 Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por el método de SRB:

- **Efecto antiproliferativo en células SW480:**

Se encontró diferencia significativa entre al menos dos de los tratamientos para un mismo tiempo y en el efecto de cada tratamiento respecto al tiempo (Tabla A-11). La prueba de contraste mostró que dicha diferencia ocurre a concentraciones superiores a 5% a partir de las 48 horas de tratamiento (Figura 4-12b).

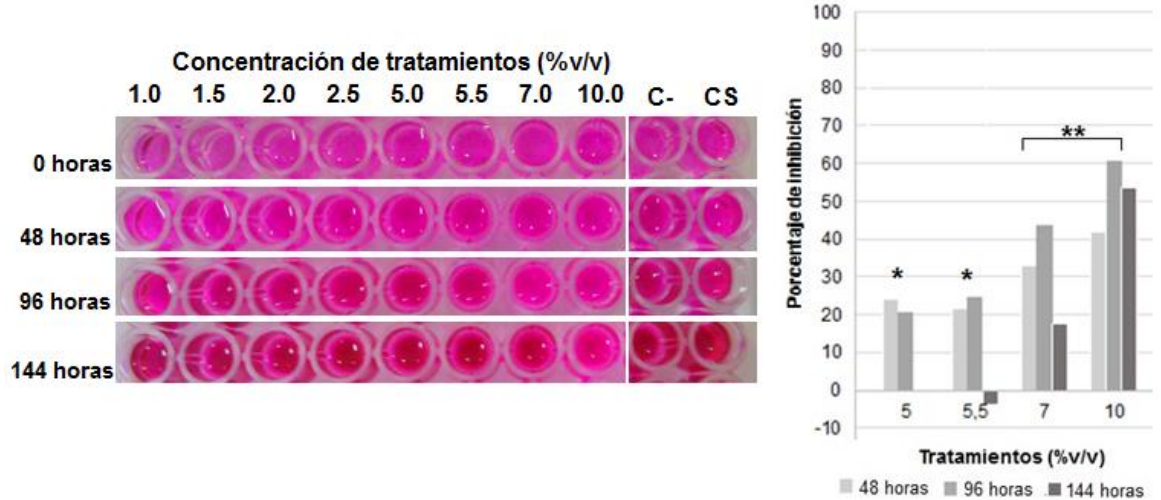


Figura 4-12. Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células SW480. Fotografías obtenidas de los cultivos tratados posterior a la solubilización del complejo SRB-Proteína (Izquierda), porcentaje de inhibición obtenido mediante la técnica de Sulfurodamina B (derecha). *diferencias Significativa ($p < 0.05$).

Se debe resaltar que el porcentaje de inhibición para proporción de 5% fue muy bajo (0.33%) y por tanto no se observa en la gráfica, y que el porcentaje de inhibición negativo para la concentración de 5.5% se debe a que la absorbancia promedio en estas condiciones superó la absorbancia promedio del control negativo. la CI_{50} del extracto sobre esta línea celular se encontró entre las concentraciones de 7% y 10% por Regresión lineal (Tabla 4-9). Se observó que a mayor concentración del extracto, se obtuvo un mayor efecto inhibitorio. Este hecho se probó por regresión lineal a partir de las 96 horas de tratamiento.

Tabla 4-8: CI_{50} del extracto etanólico del fruto de maracuyá determinado mediante SRB en células SW480.

| Tiempo (horas) | Ecuación de Regresión | Coefficiente de Determinación (R2) | CI_{50} estimada (% v/v) | CI_{50} estimada (μ g/ml) |
|----------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| 144 | $Y=(8.4526)X- 38.478$ | 0.8653 | 1.3631 | 31.214 |
| 96 | $Y=(7.8444)X- 16.356$ | 0.9805 | 8.4590 | 193.71 |
| 48 | $Y=(2.0948)X+ 17.458$ | 0.5149 | 15.5346 | 335.742 |
| 0 | NA | NA | NA | NA |

Y: Porcentaje de Inhibición, X: Proporción de tratamiento, NA: No aplica.

- Efecto antiproliferativo en células SW620:**

De acuerdo al Análisis de varianza se encontró un efecto significativo en comparación al control negativo a partir de las 48 para concentraciones superiores a 5% (Tabla A-12). En esta línea celular, las concentraciones superiores a 5% disminuyeron la absorbancia de forma lineal con relación dosis-dependiente y se alcanzó un efecto umbral con 7% a las 48 horas de tratamiento. En este caso, el porcentaje de inhibición alcanzó valores hasta de 80%.

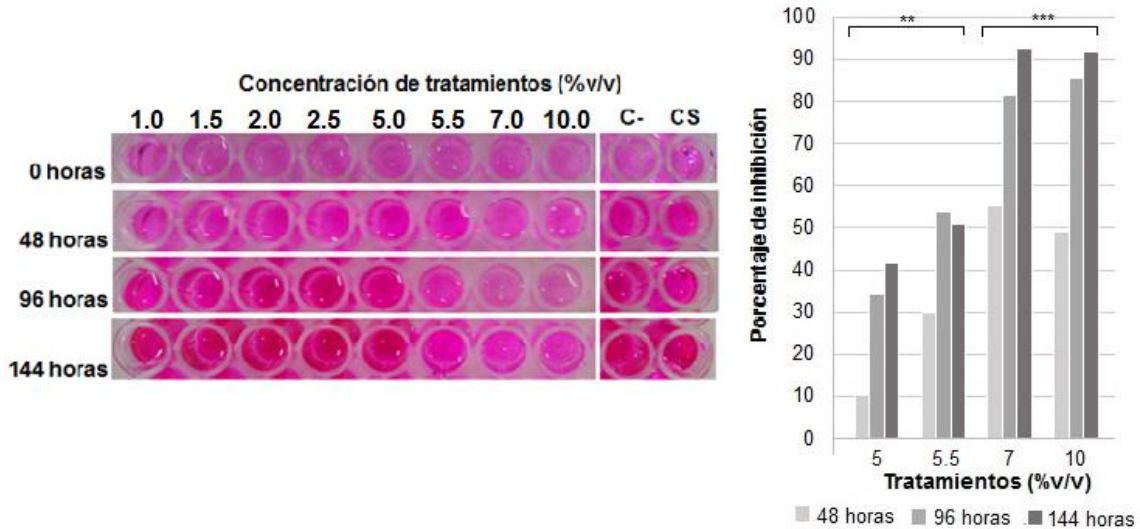


Figura 4-13. Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células SW620. Fotografías obtenidas de los cultivos tratados posterior a la solubilización del complejo SRB-Proteína (Izquierda), porcentaje de inhibición obtenido mediante la técnica de Sulforodamina B (derecha). *diferencias Significativa ($p < 0.05$).

- **Efecto antiproliferativo en células CHO-K1:**

En esta línea celular se obtuvo una disminución en los valores de absorbancia de los cultivos tratados respecto al control negativo a partir de las 96 horas (Tabla A-13). Este hecho se atribuyó al desprendimiento celular observado por microscopía.

El efecto inhibitorio de la proliferación solo resultó significativo respecto al control negativo a partir de las 48 horas. Sin embargo, el mayor efecto se alcanzó a las 96 horas, en el cual la inhibición máxima se alcanzó para concentraciones de 5% y 5.5% correspondiente a valores de 42.73% y de 48.91% respectivamente (Figura 4-14). En este caso, no se alcanzó la IC_{50} con los valores de tratamiento y tiempo evaluados y el efecto no siguió un ajuste lineal (tabla 4-10).

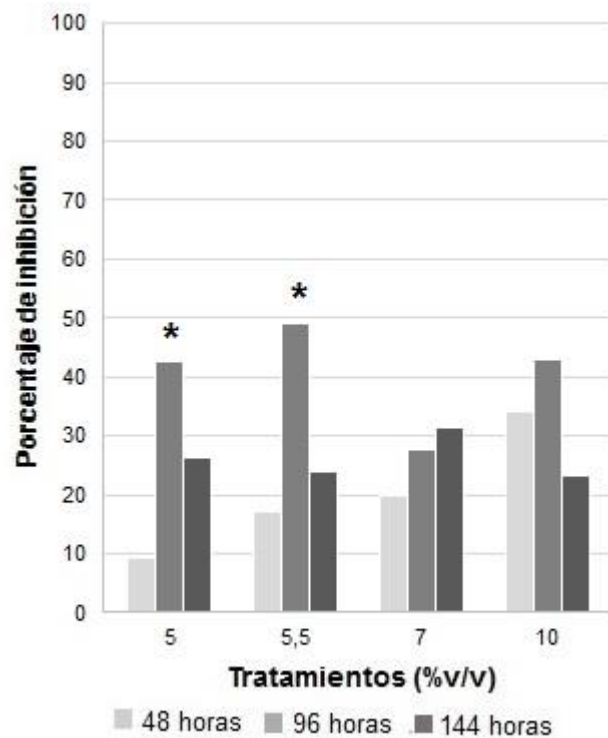


Figura 4-14. Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células CHO-K1. Porcentaje de inhibición obtenido mediante la técnica de Sulforodamina B.*diferencias Significativa ($p < 0.05$).

- **Efecto antiproliferativo en células Caco-2:**

La exposición de las células al extracto etanólico generó un efecto inhibitorio del crecimiento celular resultó significativo respecto al control negativo ($p < 0.001$) para todas las concentraciones a partir de las 48 horas de tratamiento.

El mayor porcentaje de inhibición se alcanzó con la concentración de 5% con el que se alcanzaron valores de 36.31%, 45.70% y de 42.65% a las 48, 96 y 144 horas de tratamiento respectivamente. El efecto de este extracto sobre esta línea celular no siguió un ajuste lineal y por tanto no se estimó la IC₅₀ por este método.

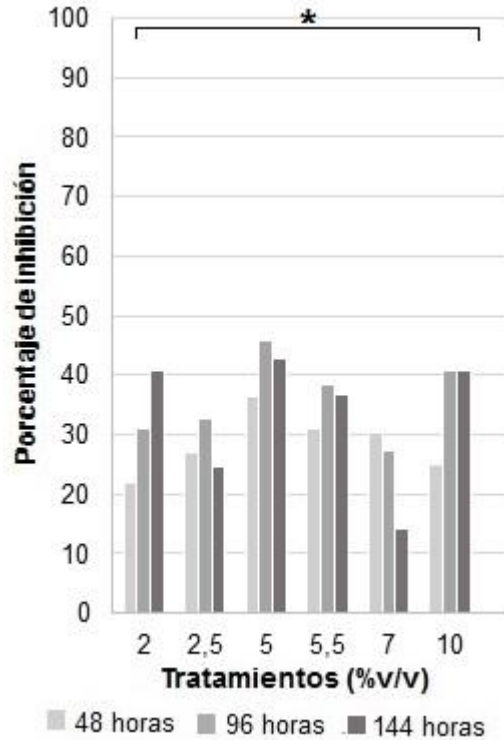


Figura 4-15. Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de maracuyá en células Caco-2. Porcentaje de inhibición obtenido mediante la técnica de Sulfurodamina B. *diferencias Significativa ($p < 0.05$).

Los resultados de las siguientes secciones están basados en los valores de DL₅₀ hallados por los métodos de Exclusión de colorante y MTT. Según esto, solo se empleó un rango concentración en el que se incluyó la menor DL₅₀ a 48 horas de exposición. Los tratamientos se limitaron a concentraciones de 5%, 5,5% y 7% del extracto etanólico por presentar un mejor efecto. Además, para los demás ensayos de Actividad Biológica (Eficiencia de clonación, ensayos de efecto inductor de apoptosis y sobre el ciclo celular, y de estrés oxidativo) se trataron únicamente las líneas celulares SW480 y Caco-2 como modelos de adenocarcinoma de Colon.

4.2.5 Efecto antiproliferativo del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por Eficiencia de clonación:

Los resultados de esta prueba se presentan como porcentajes de eficiencia de clonación absoluta (ECA) y de clonación relativa (ECR). En ambas líneas celulares se encontró una reducción significativa tanto de la ECA y de la ECR en los cultivos tratados.

En la línea Caco-2 se observó para los tratamientos de 5%, 5.5% y 7% una disminución en el porcentaje de ECA de 30%, 33.5%, 36.5% respectivamente, y una disminución de la ECR de 67.6%, 76.6%, 83.3% para cada una de las proporciones de extracto evaluadas (Tabla 4-10). Los resultados pueden visualizarse en las Figuras 4-16 y 4-17. Aunque el solvente redujo la eficiencia relativa en un valor de 14.5%, este porcentaje no resultó significativo respecto al control negativo, por lo tanto los efectos sobre la proliferación se atribuyeron a los compuestos en el extracto (Anexos, Tabla A-17 y A-18).

En la línea SW480, se encontró un efecto inhibitorio de los tratamientos de 5%, 5.5% y 7%. Los cuales redujeron la ECA en valores de 24.5%, 38.35%, 49.25%, y de ECR en 38.14%, 59.54%, 76.66% respectivamente. La reducción de la ECR para el solvente fue de 8.95% y no resultó significativo respecto al control negativo. Por tanto, los efectos sobre la eficiencia de clonación se atribuyeron a los compuestos presentes en el extracto (Anexo, Tabla A-19 y A-20)

Tabla 4-9: Eficiencia de clonación de células de adenocarcinoma de colon tratadas con el extracto etanólico de maracuyá durante 48 horas.

| Línea celular | | Tratamientos | | | | | |
|---------------|----------------|--------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | | C- | CS | C+ | 5% | 5.50% | 7% |
| Caco-2 | ECA | 44.75 | 38.25 | 12.25* | 14.5* | 10.5* | 7.5* |
| | ECR | 100 | 85.47 | 27.37* | 32.40* | 23.46* | 16.75* |
| | % de exclusión | 11.82 | 15.14 | 45.75* | 32.52* | 57.67* | 55.25* |
| SW480 | ECA | 64,25 | 58,5 | 8* | 39,75* | 26* | 15* |
| | ECR | 100 | 91,05 | 12,45* | 61,86* | 40,46* | 23,34* |
| | % de exclusión | 8,59 | 10,16 | 57,24* | 15,01* | 35,54* | 38,75* |

(*) Diferencia significativa ($p < 0.001$). C- (células sin tratamientos), C+ (células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 6 horas), CS (células expuestas a DMSO 0.2% durante 48 horas).

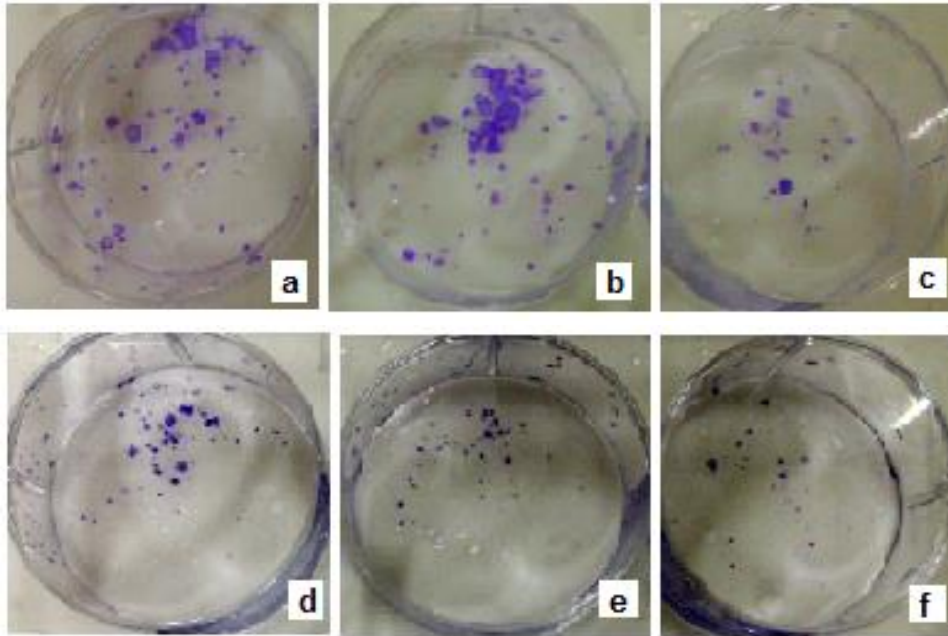


Figura 4-16: Cultivos de la línea celular Caco-2 tratados con el extracto etanólico de *P. edulis* durante 48 horas. **a.** Control negativo (células sin tratamiento), **b.** Control solvente (Células tratadas con DMSO 0.2%), **c.** Control positivo (Células tratadas con H₂O₂ (250 μM) durante 6 horas, **d.** Extracto etanólico al 5%(v/v), **e.** Extracto etanólico al 5.5%(v/v) **f.** Extracto etanólico al 7%(v/v).

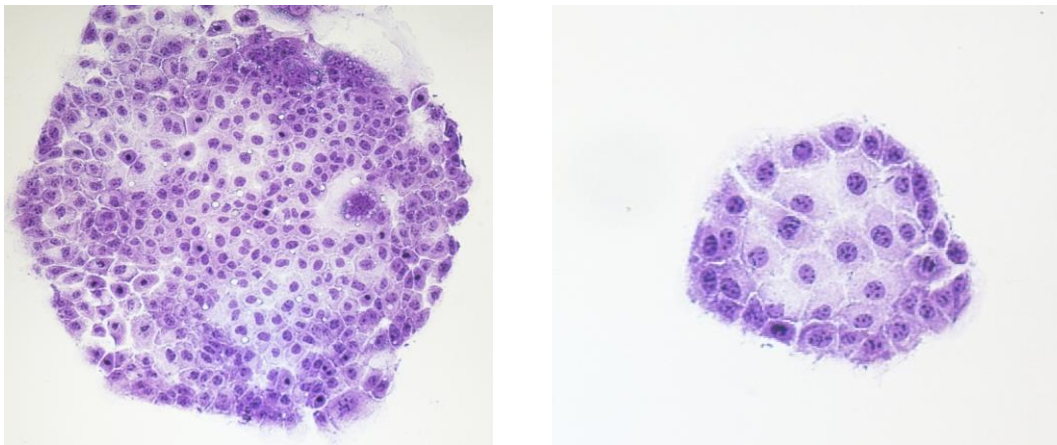


Figura 4-17: Colonias representativas de la línea celular Caco-2 teñidos con cristal violeta. Izquierda: morfología de colonia de células SW620 incluida (Objetivo de 10X), Derecha: Morfología típica de Colonias de células SW620 excluidas (Objetivo de 40X)

4.2.6 Efecto sobre el ciclo celular del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por citometría de flujo:

Los resultados de esta prueba se ilustran como histogramas de frecuencia en comparación a la distribución de cultivos no tratados y como porcentajes promedio de eventos encontrados para cada fase celular.

En ambas líneas celulares se observó alteraciones en el patrón de distribución. En general se observó un incremento las fase subG₁ (Indicativa de fragmentación o pérdida de ADN) y en subpoblación G₀/G₁, y una disminución en la subpoblación G₂/M. Estas variaciones fueron proporcionales a la concentración del extracto evaluado. A mayor concentración, mayor efecto sobre ambas líneas celulares.

En las células SW480 se observó un incremento de eventos hipoploides en 37%, 39.1% y de máximo 58.5% para las proporciones de tratamiento de 5%, 5.5% y 7% respetivamente, en comparación al control negativo para el que se obtuvo un valor promedio de 11.2% en subG₁. Además, el efecto del extracto sobre células SW480 generó una disminución en las proporciones de células en las demás fases (G₀/G₁, S y G₂/M).

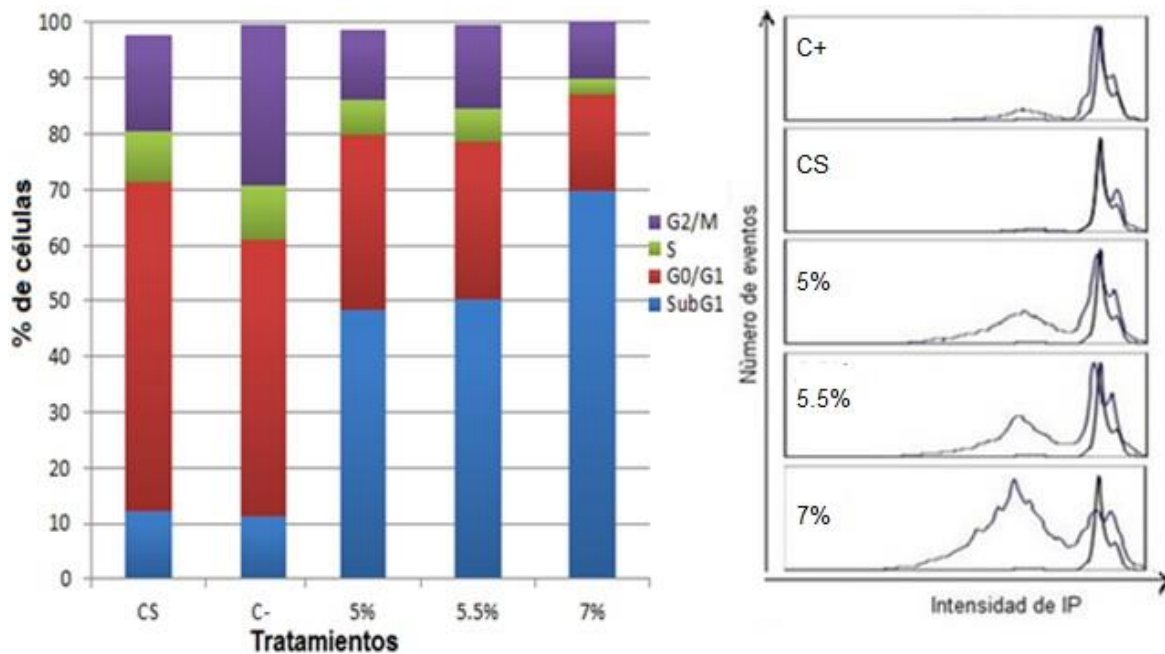


Figura 4-18. Efecto sobre el ciclo celular del extracto etanólico de Hojas de *P. edulis* en cultivos de células SW480 tratados con durante 48 horas. C- (células sin tratamiento), CS: (células expuestas a DMSO 0.2% durante 48 horas). C+ (células tratadas con H₂O₂ 250 μM durante 6 horas).

Los células Caco-2 tratadas con las mismas concentraciones de extracto etanólico de hojas de *P.edulis* mostraron una menor variación en la distribución del ciclo celular en comparación con las células SW480. Sin embargo también mostraron una acumulación de eventos en la subpoblación Hipoploide. Para esta subpoblación se obtuvieron incrementos de 5%, 10% y 13% para las proporciones de tratamiento de 5%, 5.5% y 7% respetivamente. Además, el efecto del extracto sobre células SW480 generó un aumento en la proporción celular en la fase S y disminución en la proporciones de células en G₂/M.

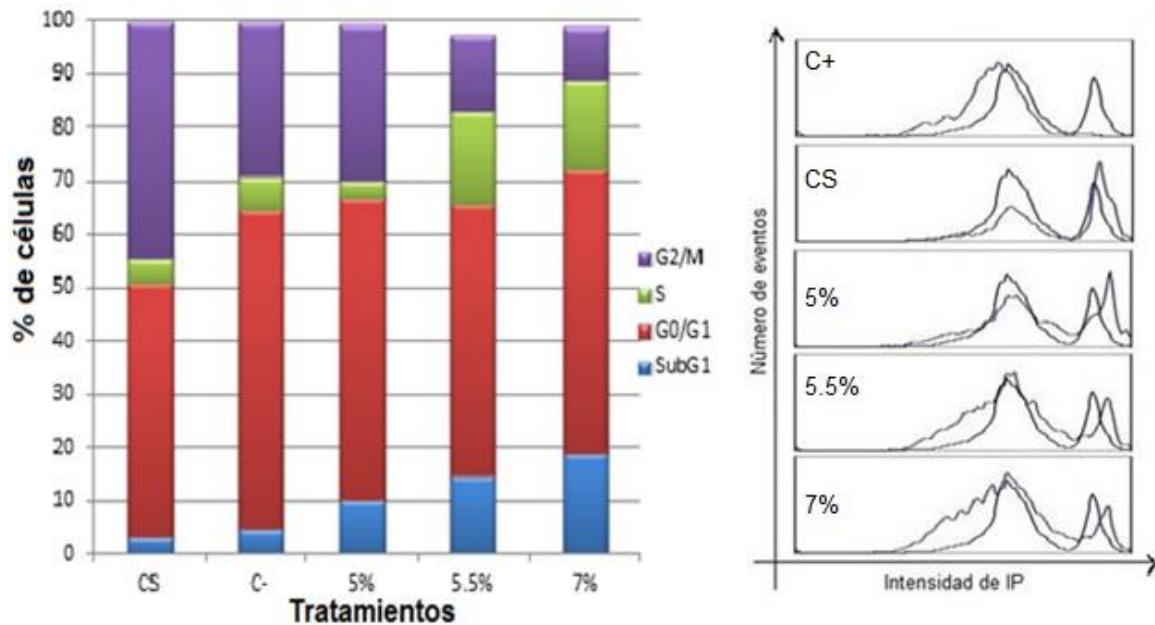


Figura 4-19. Efecto sobre el ciclo celular del extracto etanólico de Hojas de *P. edulis* en cultivos de células Caco-2 tratados con durante 48 horas. C- (células sin tratamiento), CS: (células expuestas a DMSO 0.2% durante 48 horas), C+ (células tratadas con H₂O₂ 250 μM durante 6 horas).

4.2.7 Efecto inductor de muerte celular del extracto etanólico de Hojas de maracuyá evaluado por citometría de flujo

Los resultados que se describen a continuación corresponden a ensayos de la capacidad inductora de necrosis y/o apoptosis del extracto en los sistemas celulares SW480 y Caco-2. Los resultados se presentan como gráficos de distribución de puntos para los diferentes marcajes con AnexinaV/IP, y como gráficos de porcentaje para cada evento de muerte celular.

El efecto del extracto sobre células SW480 se visualizó inicialmente de forma gráfica (Figura 4-20). Se identificó un desplazamiento hacia el cuadrante Q3 (positivo para IP) correspondiente a células necróticas en todos los tratamientos. Al comparar los valores promedio de cada evento, se encontró que el extracto generó una disminución en el

porcentaje de células viables y un incremento no significativo (respecto al control negativo) en las subpoblaciones apoptóticas tempranas y apoptóticas tardías (Tabla A-25 con $p=0.8228$, y tabla A-26 con $p=0.6038$). En contraste, la exposición al extracto resultó en un aumento significativo en las subpoblación de células necróticas (Tabla A-27, $p=0.018$). El control negativo presentó una proporción promedio de células necróticas de 9.66% y los tratamientos generaron aumentó hasta valores promedio de 13.6%, 14.6% y 30.2% (Figura 4-20). En este modelo se tuvo en cuenta la frecuencia basal de este tipo de muerte *in vitro* (el control negativo presenta una población necrótica claramente diferenciada)

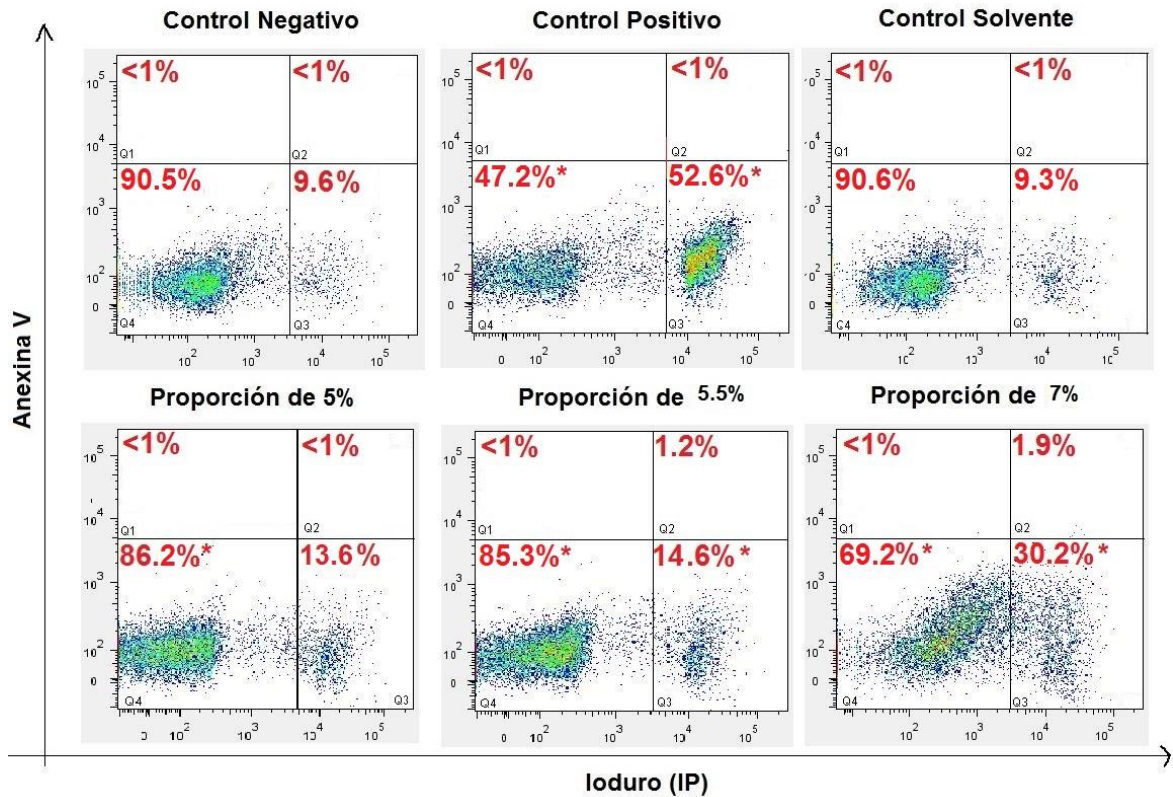


Figura 4-20. Efecto de muerte por apoptosis/necrosis del extracto etanólico de hojas de *P.edulis* en células SW480 tratadas durante 48 horas. Control negativo: células sin tratamiento, control Positivo: células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 6 horas, control solvente: células expuestas a DMSO 0.2% durante 48 horas. Q1: Annexina V (+), IP (-), Q2: Annexina V (+), IP (+), Q3: Annexina V (-), IP (+), Q4: Annexina V (-), IP (-). * Diferencia significativa ($p < 0.05$).

El efecto del extracto sobre células Caco-2 mostró un aumento en el porcentaje de la subpoblación en el cuadrante Q3 correspondiente a células necróticas en todos los tratamientos y un ligero desplazamiento hacia el cuadrante correspondiente a apoptosis tardía. La disminución en el porcentaje promedio de células viables y las variaciones en las subpoblaciones apoptóticas tempranas y tardías no resultaron significativas (Tabla A-21 con $p=0.579$ y tabla A-22 con $p=0.495$). En contraste, el aumento en el porcentaje de

células necróticas sí resulto significativo al compararse con esta misma subpoblación en del control negativo (Tabla A-23, $p=0.0003$); el cual presentó un porcentaje promedio de 3.8%. Se debe resaltar que para esta línea celular la exposición al solvente (DMSO 0.2%) durante 48 horas también generó muerte celular y la variación en su porcentaje promedio fue significativo al compararlo con el control negativo.

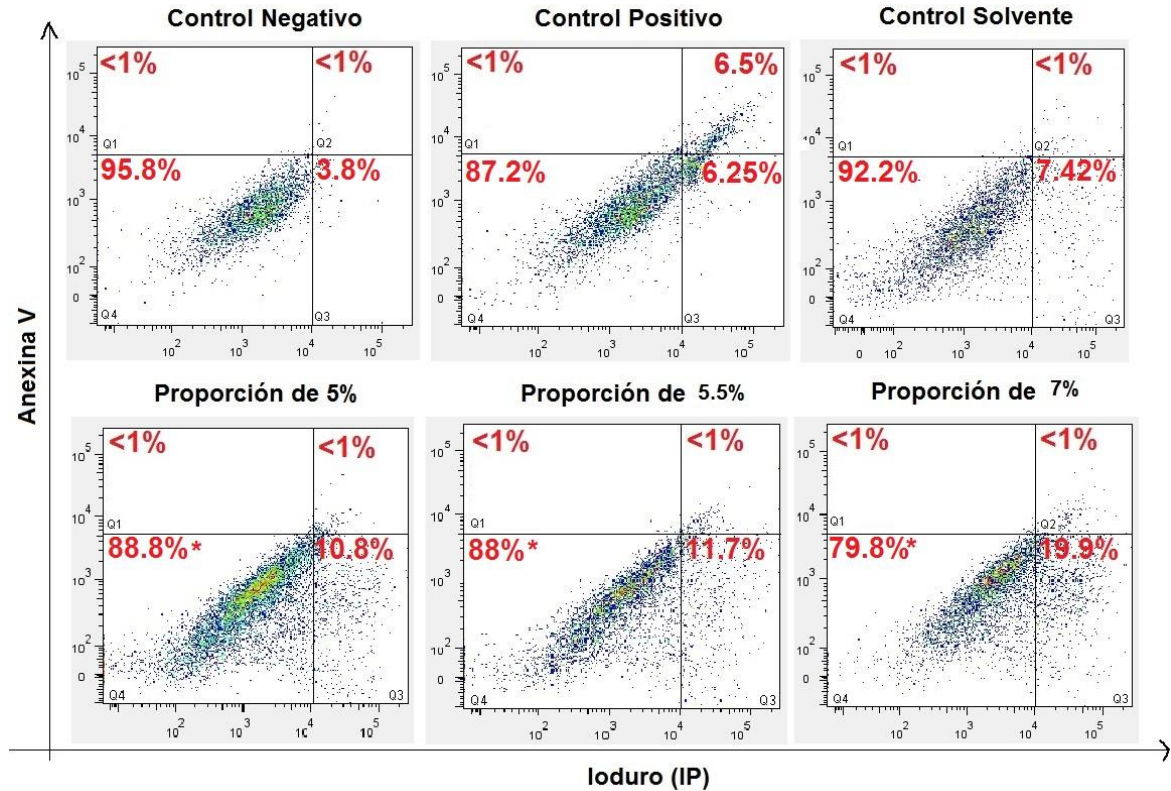


Figura 4-21. Efecto de muerte por apoptosis/necrosis del extracto etanólico de hojas de *P.edulis* en células Caco-2 tratadas durante 48 horas. Control negativo: células sin tratamiento, control Positivo: células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 6 horas, control solvente: células expuestas a DMSO 0.2% durante 48 horas. Q1: Anexina V (+), IP (-), Q2: Anexina V (+), IP (+), Q3: Anexina V (-), IP (+), Q4: Anexina V (-), IP (-). * Diferencia significativa ($p < 0.05$).

4.2.8 Efecto del extracto etanólico de hojas de maracuyá sobre la actividad de la caspasa 3:

En este ensayo se evaluó la luminiscencia (unidades relativas de Luminiscencia-RLU) producida por el clivaje del sustrato DEVD mediante la acción enzimática de las caspasas 3 y 7 (Figura 3-4). En ambas líneas celulares la respuesta al tratamiento mostró una relación Dosis-respuesta con ajuste lineal y un incremento que resultó significativo para todos los tratamientos cuando se compararon respecto al control negativo (Tabla 4-12, $p < 0.001$). El valor RLU del control negativo en células SW480 tuvo un valor promedio igual a 2034.1 y los tratamientos generaron un incremento promedio en los valores RLU

iguales a 33824.5, 35273.3 y 38281.8 para las concentraciones de 5%, 5.5% y 7% respectivamente. El efecto sobre la actividad de caspasa 3/7 resulto mayor en las células SW480 en comparación a las células Caco-2 (Figura 4-22), en las cuales el valor promedio de RLU del control negativo correspondió a 1766.1. En estas células se obtuvo valores RLU promedio para los tratamientos de 12358.68, 13283.38 y de 15130.23 para las concentraciones de 5%, 5.5% y 7% respectivamente.

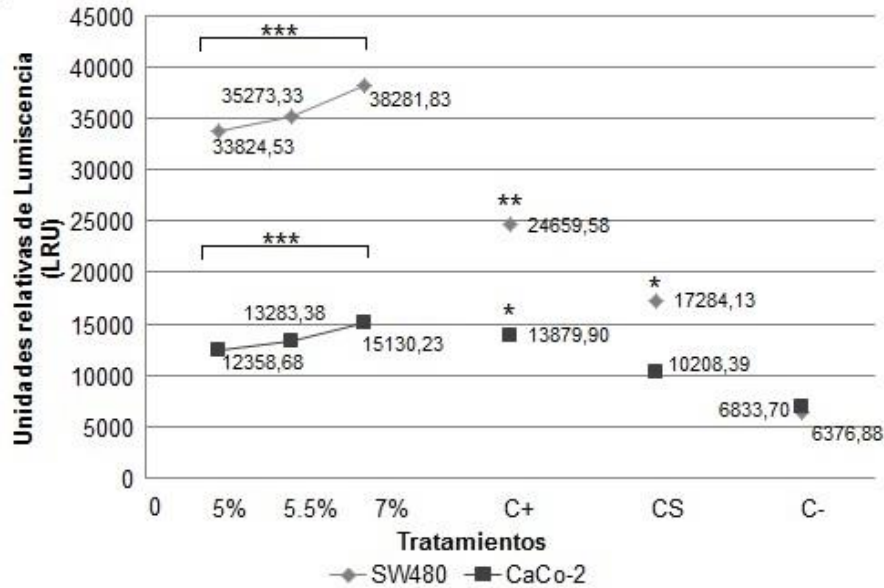


Figura 4-22: Efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en la actividad de las caspasa3 en células Caco-2 y SW480. CS (células tratadas con DMSO 0.2% durante 48 horas), C+ (células expuestas a H₂O₂ 250 µM durante 6 horas), C- (células sin tratamiento). * Diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 4-10: Coeficiente de determinación correspondiente a la actividad de Caspasa 3 en cultivos tratados con el extracto etanólico de hojas de maracuyá.

| línea celular | tiempo (Horas) | Ecuación de regresión | Coefficiente de determinación (R ²) |
|---------------|----------------|-----------------------|---|
| SW480 | 48 | Y=90025X + 29191 | 0.9929 |
| Caco-2 | 48 | Y=55915X + 9490.3 | 0.9944 |

Y: Luminiscencia promedio (RLU), X: Proporción de extracto etanólico de Hojas de *P. edulis*

4.2.9 Efecto en el contenido de glutatión oxidado en células tratadas con el extracto etanólico de Hojas de maracuyá

El estrés oxidativo se evaluó mediante el kit GSH/GSSG Glo® usando el equipo Glomax. Se encontró un incremento en los valores de luminiscencia y por tanto en el contenido de Glutatión oxidado (GSSG) en los cultivos tratados con el extracto. El efecto mostró un

efecto dosis-dependiente de relación lineal (Tabla 4-14) y un mayor efecto sobre células Caco-2 (Figura 4-23). Para estas células, el incremento en la proporción de GSSG resultó significativo (Tabla A-29, $p=0.0029$) en comparación a células no tratadas. Cuando se compararon los valores de luminiscencia para los tratamientos en ambas líneas, se encontró un incremento superior casi de 10 veces en células Caco-2 respecto a las células SW480 (Figura 4-24). Para estas células la variación en el contenido de glutatión oxidado solo resultó significativo únicamente para los tratamientos de 5.5% y de 7% (Tabla A-30, $p=0.0030$). Este hecho sugirió una mayor susceptibilidad de las células Caco-2.

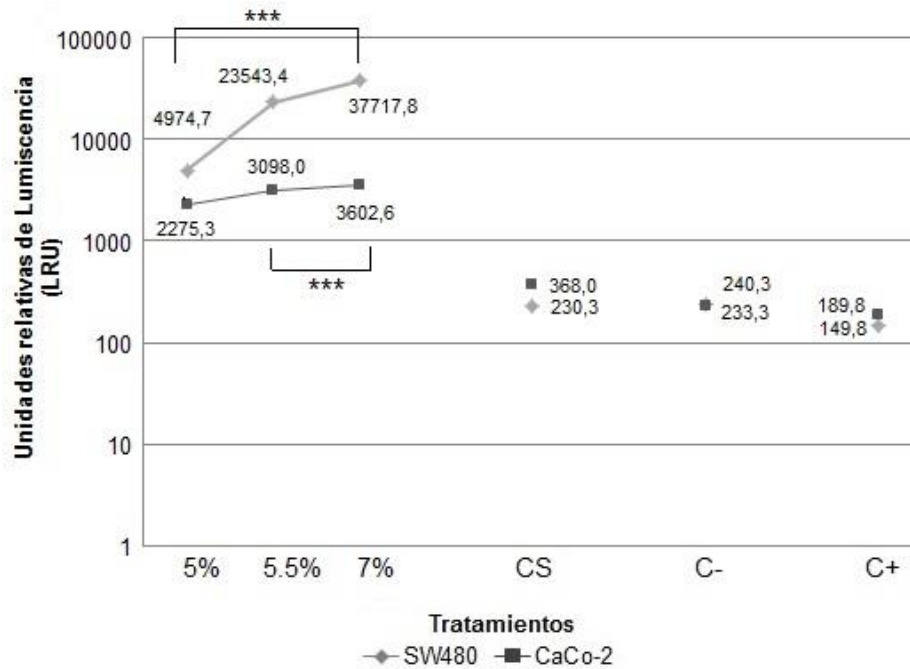


Figura 4-23: Efecto del extracto etanólico de *P. edulis* en el contenido de Glutatión oxidado en células SW480 y Caco-2. CS (células tratadas con DMSO 0.2% durante 48 horas), C+ (células expuestas a H_2O_2 250 μM durante 6 horas), C- (células sin tratamiento). * Diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 4-11: Coeficiente de determinación para luminiscencia relacionada con la proporción de Glutatión oxidado en cultivos tratados con el extracto etanólico de maracuyá.

| línea celular | tiempo (Horas) | Ecuación de regresión | Coefficiente de determinación (R^2) |
|---------------|----------------|-----------------------|---|
| SW480 | 48 | $Y=663.68X + 4319.3$ | 0.9812 |
| CaCo-2 | 48 | $Y=16372X + 54882$ | 0.9940 |

Y: Luminiscencia promedio (RLU), X: Proporción de extracto etanólico de Hojas de *P.edulis*.

5. Discusión

En el presente estudio se evaluó el extracto acuoso del fruto y el extracto etanólico de las hojas de *P. edulis f. flavicarpa*. Durante su desarrollo fue posible establecer un efecto negativo sobre la viabilidad celular de ambos extractos, y un efecto antiproliferativo, inductor de muerte celular y de estrés oxidativo del extracto etanólico. La actividad biológica de ambos extractos fue evaluada *in vitro* sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano Caco-2, SW480, su derivada metastásica SW620, y sobre la línea celular no tumoral CHO-K1.

El interés en la determinación de algunas propiedades anticancerígenas de los extractos de *P. edulis* se basó en la revisión de investigaciones previas, en las que se describen diferentes actividades biológicas para especies del género *Passiflora L.* Para *P. edulis* se han descrito diferentes actividades biológicas como efecto ansiolítico, antihipertensivo, antiasmático, entre otros (Miroddi, 2013), pero hay poca información disponible sobre su potencial anticancerígeno que podría estar mediado por un efecto citotóxico, genotóxico, y/o antiproliferativo. Algunos de estos efectos han sido determinados en especies del género *Passiflora L.* y que por su cercanía evolutiva con *P. edulis* sugieren investigar más acerca de las propiedades biológicas de esta especie. Por ejemplo, *P. foetida* presentó un efecto antitumoral *in vivo*, con letalidad celular superior al 50%, en carcinoma de Walker en ratones con dosis de 92mg/kg (Pessoa, 2006), *P. incarnata* mostró un efecto citotóxico *in vitro* del extracto etanólico de hojas en un modelo de leucemia linfoblástica aguda (Ożarowski, 2013), y un efecto antitumoral en carcinoma de Ehrlich con una DL₅₀ de 800 µg/ml (Sujana. 2012).

De acuerdo al objetivo inicial de esta investigación se determinó la presencia de algunos metabolitos de interés en ambos extractos evaluados. Se identificó la presencia de flavonoides, quinonas, alcaloides, deoxiazúcares, azúcares reductores, carotenoides y carbohidratos en ambos extractos, y la presencia de taninos únicamente en el extracto etanólico de hojas, y de esteroides y glicósidos cardiotónicos en el extracto acuoso del fruto (Tabla 4-1). Algunos autores han descrito metabolitos de estos mismos grupos de moléculas para en extractos *P. edulis*. Dhawan & Kumar, 2001 describieron la presencia de terpenos y carbohidratos tanto en el extracto acuoso y etanólico de las hojas, y de glicósidos como la “Passiflorina” y la “Passicapsina”, alcaloides, carotenoides, antocianinas, ácido ascórbico y lactonas en diferentes partes de esta planta (Dhawan et al, 2004), y Aguillón et al, 2013. Identificaron la presencia de taninos, flavonoides, quinonas, glicósidos, carotenoides y carbohidratos en el extracto acuoso y el extracto etanólico de hojas. Otros autores han reportado para este especie metabolitos de interés como Vitamina A, Vitamina B₆, Tiamina, Riboflavina y flavonoides (Zibadi & Watson, 2012), y C-glicosilflavonas como isoorientina y presencia de ácido γ -aminobutírico (GABA) (Zeraik, 2012).

La marcha fitoquímica preliminar descrita aquí difiere parcialmente en algunos aspectos a lo reportado por otros autores. Como se mencionó anteriormente, se determinó la presencia de alcaloides y taninos en el extracto etanólico de las hojas, lo que no se encontraba descrito para esta especie. Las diferencias encontradas respecto a las marchas fitoquímicas preliminares reportadas pueden deberse a diferentes factores. No solo a la metodología empleada, sino debido a que la presencia y cantidad determinada de un metabolito o la ausencia de un compuesto químico (asociado a metabolismo primario como fotosíntesis y respiración, o metabolismo secundario) es variable en cada caso y está determinado tanto por factores bióticos, como la fenología de la especie, estado de madurez, y por factores abióticos como la presión ambiental (Ruiz, 2008). Este hecho fue considerado como un punto importante en la caracterización de la actividad biológica y la búsqueda de compuestos promisorios de *P.edulis*, ya que las propiedades identificadas y descritas en esta investigación pueden resultar variables a las descritas por otros autores. Entre las causas, se encuentra que las características y propiedades de cada extracto puede ser mediada y potenciada por la compleja mezcla de metabolitos presentes en cada uno. De hecho, cada extracto en particular, podría ser más efectivo que la administración de algunos compuestos individualmente. Como se ha descrito, la mayoría de compuestos aislados de especies del género *Passiflora L.* actúan como “profármacos”, pues su actividad requiere de una activación metabólica o es dependiente de la interacción con otros compuestos (Miroddi et al, 2013).

Las pruebas biológicas realizadas en este estudio revelaron que el extracto acuoso del fruto y el extracto etanólico de hojas de *P. edulis* presentan actividad sobre la viabilidad celular y un efecto antiproliferativo. El ensayo de MTT permitió establecer que el extracto etanólico de hojas de esta especie presenta un mayor efecto sobre la viabilidad celular, en comparación con el extracto acuoso del fruto. A las 24 horas de tratamiento se evidenció que una mayor susceptibilidad en las células SW80 en comparación a las demás líneas celulares. Este hecho resulta relevante en la búsqueda de compuestos anticancerígenos que sean selectivos para etapas iniciales del proceso de carcinogénesis teniendo en cuenta el origen de las células SW480. En comparación, para tiempos de tratamiento entre 48 y 96 horas, se obtuvo un mayor efecto sobre la viabilidad en las células SW620, lo que sugiere que podría ser útil en las diferentes etapas de la enfermedad. El efecto citotóxico generado por el extracto etanólico mostró un efecto dosis- dependiente que permitió determinar valores de DL₅₀ a 24 horas de tratamiento iguales a 7.32% (167.62 µg/ml), 25.8% (590.98 µg/ml) para las líneas celulares SW480 y SW620 respectivamente, y de 10.64 (243.65 µg/ml) para la línea celular Caco-2. Aunque los valores de DL₅₀ obtenidos para el extracto etanólico mediante la prueba de MTT podrían considerarse no relevantes de acuerdo a los lineamientos propuestos por el NCI por alcanzar valores superiores a 100 µg/ml, se considera que la reducción de la viabilidad es importante por ser extractos y no compuestos puros. Además se consideró la prueba de MTT como una buena herramienta por estar asociada a procesos metabólicos vitales para la célula como la respiración celular (Stockert et al, 2012), y porque permitió establecer que el efecto no dependía únicamente de la dosis, sino que se agudiza con el tiempo de exposición y porque el análisis mostró que las diferencias en

viabilidad respecto a los controles negativos fueron significativos para tiempos de exposición superiores a 24 horas sobre las células SW480, SW620 y CHOK1.

El efecto sobre la viabilidad celular detectado por el método de azul de tripano fue evaluado solo para el extracto etanólico de las hojas por presentar un mejor efecto en la prueba de MTT. El efecto resultó significativo sobre las líneas SW480, SW620 y CHO-K1 a partir de las 24 horas con proporciones de tratamientos superiores a 5%, lo que sugiere un mecanismo de acción rápido y alteración en la permeabilidad de la membrana de estas células, evidenciando una actividad citotóxica relevante, pues la pérdida en la integridad de membrana constituye un primer paso en eventos de muerte celular por necrosis y en eventos tardíos de apoptosis (Angosto, 2003). En esta prueba se encontraron valores menores de DL_{50} 6.64% (152.11 $\mu\text{g/ml}$), 5.89% (134.91 $\mu\text{g/ml}$), y 8.45% (192.60 $\mu\text{g/ml}$) para las líneas celulares SW480, SW620, y CHO-K1 respectivamente, y fueron menores a los obtenidos por MTT. Además se estableció una concentración umbral entre 7% y 10% a partir de las 48 de exposición y una actividad selectiva para células de origen tumoral (Índice de selectividad, Tabla 4-6). Los resultados cuantitativos de esta prueba permitieron establecer una relación con cambios morfológicos detectados por microscopia de campo claro en los cultivos expuestos al extracto. En estos, se detectó pérdida de la adhesión celular normal y la formación de vesículas (Fotografías Anexas, Figuras A1 a A3).

La prueba de Sulforrodamina B mostró que el extracto etanólico de las hojas posee un mejor efecto inhibitorio de la proliferación celular en comparación al extracto acuoso del fruto. En el modelo de carcinogénesis SW480-SW620 se encontró un porcentaje de inhibición máximo para el extracto acuoso del fruto cercano al 40% a las 48 horas en las células SW480, y del 50% a las 144 horas en células SW620. Este hecho revela una menor susceptibilidad de las células derivadas metastásicas SW620 y sugiere que la mezcla de compuestos presentes en el extracto acuoso de hojas podría ser útil en fases iniciales del proceso de carcinogénesis. En contraste, el extracto etanólico generó un mayor efecto sobre las células SW620, seguida por las células SW480, Caco-2 y CHO-K1. Lo que sugiere, al igual que las pruebas de viabilidad, que el extracto etanólico de las hojas tiene un mejor efecto sobre la fase metastásica de la enfermedad. Los resultados del efecto inhibitorio de la proliferación celular fueron menores a los encontrados por otros autores como o el IC_{50} igual a 600 $\mu\text{g/ml}$ evaluado por azul de tripano en células de carcinoma de mama (carcinoma de EHRlich) en ratonas (Sujana et al, 2012), la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ en células de adenocarcinoma de colon HCT-8, o los valores encontrado Aguillion, et al 2012 por usando la misma metodología y el modelo SW480- SW620. En su trabajo se reportaron valores de IC_{50} para el extracto etanólico de hojas de *P. edulis f flavicarpa* de 524 $\mu\text{g/ml}$ y de 444 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto acuoso del fruto en células SW480. Además IC_{50} de 442 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto etanólico y de 415 $\mu\text{g/ml}$ en células SW620. De la prueba de efecto antiproliferación de estos extractos de debe resaltar que los valores máximos de inhibición se presentaron en diferentes tiempos de exposición. El extracto acuoso mostró porcentajes de inhibición máximos entre las 48 y las 96 horas, mientras que el extracto etanólico entre 96 y 144 horas, lo que podría estar relacionado con el mecanismo de captación y el proceso metabólico

asociado a la mezcla de compuestos presentes en cada extracto y con la susceptibilidad de las células a dichos compuestos. Además el efecto de los extractos puede estar ligado a la fase de crecimiento en la que se encuentra el cultivo celular pues en cada etapa se llevan a cabo procesos celulares y moleculares variables que implican retos y respuestas particulares para las células cuando son expuestas a agentes exógenos, más aún si estos presentan citotoxicidad y/o genotoxicidad. Como se ha descrito, los procesos *in vitro* implican diferentes fases que incluyen el establecimiento (o fase adaptativa), la fase de crecimiento exponencial, la fase quiescencia y una fase de muerte celular y un mismo compuesto o grupo de ellos podría desencadenar respuestas diferenciales en cada una de estas etapas (Freshney, 2005).

A partir de la consolidación y comparación de los datos obtenidos mediante MTT, exclusión de colorante azul de tripano y antiproliferación por Sulforodamina B, se estableció que el mejor extracto para continuar con el desarrollo de la investigación fue el extracto etanólico de hojas con un tiempo de exposición de 48 horas y proporciones de tratamiento de 5%, 5.5% y 7%. En las pruebas de Eficiencia de clonación, citometría y estado oxidativo se seleccionaron únicamente las celulares SW480 por presentar la mayor susceptibilidad a 24 horas, pero una susceptibilidad intermedia en un tiempo igual o superior a 48 horas de tratamiento, y las células Caco-2 por presentar el menor efecto. Además porque este diseño permitió probar el efecto del extracto etanólico de hojas sobre dos modelos *in vitro* derivados de un mismo tejido pero correspondientes a procesos neoplásicos con características citogenéticas y moleculares diferentes. El resultado de la prueba de eficiencia de clonación permitió determinar que la exposición a una concentración de 5% (132 µg/ml) durante 48 horas es suficiente para reducir la capacidad de proliferación clonal en las líneas celulares SW480 y Caco-2 hasta valores 61.86% de y 32.4% respectivamente, y hasta 32.40% y 16.75% con una proporción de tratamiento de 7%. Este ensayo fue complementario y concordante con la prueba de antiproliferación con Sulforodamina B en la que las células Caco-2 presentaron un menor efecto. Sin embargo, a diferencia esa prueba, la eficiencia de clonación permitió determinar que el extracto reduce la capacidad proliferativa y que dicho efecto se mantiene aun cuando las células han sido liberadas del tratamiento. Como se observó, dicha capacidad se redujo significativamente incluso hasta 7 días después de haber sido tratadas pero no es posible asegurar que el efecto sea conservado posterior a este periodo, pues es posible que las pocas células viables recuperen su potencial replicativo y puedan establecer colonias.

El ensayo de citometría para efecto del extracto etanólico sobre el ciclo celular mostró alteraciones en la distribución de eventos para cada una de las fases del ciclo celular con acumulación en la fase SubG₁ y G₂/M para las células Caco-2, y el aumento en SubG₁ y disminución en S y G₂/M en células SW480. Estos resultados podrían correlacionarse con los reportados por Neira, 2003 en otros modelos celulares. En su estudio, que el extracto acuoso del fruto de *P. edulis* presenta un efecto sobre el ciclo celular y que las mezclas de carotenoides y polifenoles presentes en el extracto etanólico presentan un mejor efecto con una respuesta dosis dependiente. Este extracto generó en tratamientos de 2% un incremento significativo en la subpoblación G₀/G₁ y un

descenso en la subpoblación en fase G₂/M en la línea celular MOLT-4, establecida a partir de una muestra de un paciente con leucemia linfoblástica Aguda (ATCC, 2015). Debido a que la acumulación SubG₁ puede estar relacionada con eventos de apoptosis que indican fragmentación específica y pre-lítica de ADN, o estar relacionada de forma menos probable con eventos de inestabilidad genética que produzcan subclones hipoploides (Langdon S, 2004), se sugiere realizar pruebas complementarias que permitan a tener una mejor comprensión del proceso de acumulación generado por la exposición al extracto etanólico de hojas de *P. edulis*. Para esto, es preciso realizar curvas de crecimiento mediante la prueba de función de acumulación o la prueba de Intercambio de cromátidas hermanas (ICH). Esta última prueba permitiría estimar el tiempo de generación en cada caso (Latt S.A, 1980; Willson, 2007) y descartar la correspondencia del pico SubG₁ con la presencia de subclones hipoploides derivados, pues cada célula mitótica podría ser analizada en los extendidos cromosómicos obtenidos y estimar el número modal en cada caso.

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo para el efector inductor de muerte celular del extracto etanólico de Hojas de *P. edulis*, mostraron que los tratamientos generan muerte celular por necrosis en células SW480 y Caco-2. Se encontró un aumento en valores de 13.6%, 14.6% y 30.2% para los tratamientos de 5%, 5.5% y 7% en células SW480 y en valores de 10.8%, 11.7% y 19.9% para estos mismos tratamientos en células Caco-2. En ambas líneas celulares se observó una respuesta dosis- dependiente y una menor susceptibilidad de las células Caco-2 en concordancia a las otras pruebas realizadas y puede estar relacionada con el grado de malignidad y el origen tumoral del que fue aislado. De otro lado, no se registraron incrementos significativos para los eventos de apoptosis temprana y tardía en ninguno de los sistemas evaluados, lo que descartaría que la acumulación detectada en SubG₁ corresponda a este tipo de eventos, y sugeriría que para este caso en particular, esta subpoblación podría estar representada por eventos relacionados con necrosis que presenta fragmentación post-lítica del DNA. El efecto inductor de muerte detectado por citometría de flujo se relaciona de forma directa con los resultados de la prueba de azul de tripano. Aunque los valores encontrados de eventos de viabilidad promedio son mayores usando citometría de flujo en comparación con la exclusión de colorante, se probó con esta última prueba que el efecto del extracto etanólico involucra daño en la membrana celular y que su consecuencia podría derivar finalmente en eventos celulares de necrosis. Las diferencias en la proporción de células viables puede deberse a la sensibilidad y especificidad de cada técnica y el número de eventos analizado (mínimo 1X10⁴ en citometría de flujo, y hasta 1X10³ recuentos en microscopia de campo claro en una aumento de 10X).

Para descartar el efecto inductor de muerte por apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* se evaluó la actividad de la Caspasa efectora 3. La cuantificación de la luminiscencia producida por la escisión de un sustrato específico para esta proteína, permitió determinar un aumento de su actividad que resultó significativo para las proporciones de extracto de 5%, 5.5% y 7% en comparación a los cultivos no tratados para las líneas celular Caco-2 y SW480. En particular, con esta prueba se detectó un mayor efecto sobre esta última línea celular (de forma similar a lo obtenido en las pruebas anteriores). Si bien los resultados de esta prueba no pueden compararse y correlacionarse de forma directa con los obtenidos por citometría de flujo (por los fundamentos de las técnicas); es posible inferir que la compleja mezcla del extracto etanólico no solo presenta capacidad inductora de muerte celular por necrosis, sino que desencadena procesos de apoptosis irreversibles bien sea mediante la vía intrínseca o

extrínseca y que conducen a la activación de la caspasa 3 (efectora). En su conjunto, los resultados de efecto inductor de muerte descritos aquí para el efecto pro- apoptótico, apoyan la hipótesis de otros autores que han evidenciado este mismo efecto en extractos polares, carotenoides y polifenoles aislados de *P.edulis* en otros modelos de carcinogénesis que incluyen las líneas celulares leucemoides MOLT-4, HL-60, CEM y K562 (Deneira, 2003).

La última prueba realizada y correspondiente al estado oxidativo, mostró que la exposición de las líneas celulares Caco-2 y SW480 al extracto etanólico de hojas de *P. edulis* durante 48 horas es suficiente para incrementar los valores de glutatión oxidado (GSSG). Estos resultados sugieren un incremento en el estrés celular por la desregulación en el sistema glutatión que involucra las enzimas Glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa y que podría generar acumulación de H_2O_2 y $NADP^+$. Este hecho puede desencadenar eventos celulares como la peroxidación lipídica produciendo daño en las membranas (concordante con la prueba de viabilidad por exclusión de colorante), o sobre algunas proteínas alterando transportadores iónicos y la capacidad para mantener gradientes normales o alterando vías de señalización por la liberación de calcio que activaría vías de muerte celular por apoptosis. Por otro lado, el microambiente con altas proporciones de ROS generado por estas mismas células como parte de su metabolismo, sumado al estado oxidativo con altas proporciones de GSSG generado por el extracto etanólico, podría aumentar la oxidación del ADN y producir fragmentación aleatoria del mismo. Un daño agudo sobre este y una baja capacidad y eficiencia reparativa podría tener como consecuencia un incremento en número de eventos de necrosis que fue finalmente identificado por citometría de flujo.

En el análisis de los resultados se debe considerar que se encontró un efecto diferencial entre los tipos celulares evaluados. En las pruebas en las que se incluyeron las células CHO-K1 y se calculó el índice de selectividad, se encontró un efecto diferencial entre células malignas y no malignas (valor superior a 1 en todos los casos). Este resultado es importante debido a que las células CHO-K1 se han constituido como un buen modelo para la búsqueda de compuestos anticancerígenos. Sin embargo se deben considerar la variación intrínseca ligada al origen de cada línea celular (especie y tipo de tejido). Este hecho, plantea la necesidad de evaluación de los extractos en el mayor número de tipos celulares posibles ya que la respuesta celular está mediada por la heterogeneidad en el origen de cada línea celular y está asociada a diferentes etapas de la enfermedad del cáncer colorectal, la inestabilidad genómica y la diversidad de fenotipos moleculares disponibles (Ahmed et al, 2013, Yeunga et al 2010). Para disminuir esta variabilidad se sugiere evaluar el mismo extracto y comparar la respuesta de otras líneas celulares provenientes de cáncer de colon humano como HT-29, HCT-6 entre otras.

Para finalizar, se debe resaltar que aunque el extracto acuoso del fruto de *P. edulis* mostró un menor efecto citotóxico (por MTT) y antiproliferativo (por SRB), mostró un mayor efecto sobre las células metastásicas SW620 en el modelo de carcinogénesis SW480-SW620, por lo que se sugiere continuar con las evaluaciones de este extracto ya

que podría contener compuestos promisorios para el tratamiento en la fase metastásica del adecarcinoma de colon humano.

6. Conclusión

Los modelos *in vitro* derivados de neoplasias humanas han contribuido durante décadas a la comprensión de diferentes mecanismos moleculares en procesos de transformación celular y, han potenciado la búsqueda de moléculas, mezclas de compuestos o el desarrollo de fármacos con potencial anticancerígeno. El sistema de evaluación *in vitro* empleado en esta investigación presentó ventajas únicas como: conflictos bioéticos de menor impacto, estandarización de técnicas de laboratorio para la evaluación de la actividad anticancerígena de extractos, facilidad para el control de los factores de evaluación y diseño experimental, entre otros.

En conjunto, el diseño experimental, las técnicas empleadas y los hallazgos de esta investigación permitieron establecer el potencial biológico de extractos de *P. edulis*. El extracto acuoso del fruto de esta especie presentó efecto citotóxico sobre el modelo de carcinogénesis de colon que incluye las células SW480 y SW620 y el extracto etanólico de las hojas presentó efecto citotóxico, antiproliferativo, efecto inductor de muerte por necrosis y apoptosis, y un estrés celular agudo sobre las líneas celulares SW480, SW620, Caco-2 y CHOK1 bajo las condiciones evaluadas. De esta manera, Los resultados de esta investigación contribuyen al reconocimiento de *P.edulis* como una especie potencial para la búsqueda de compuestos con actividad biológica y de uso biotecnológico, y establece punto de partida para el fraccionamiento y aislamiento de diferentes compuestos derivados de esta especie que pueden resultar promisorios para quimioprevención o como terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

ANEXOS

Figura A-1. Efecto biológico de las diferentes proporciones de extracto etanólico de Hojas de *P.edulis* en células SW480 expuestas durante 48 horas. (Fotografías de campo claro con objetivo de 10X).

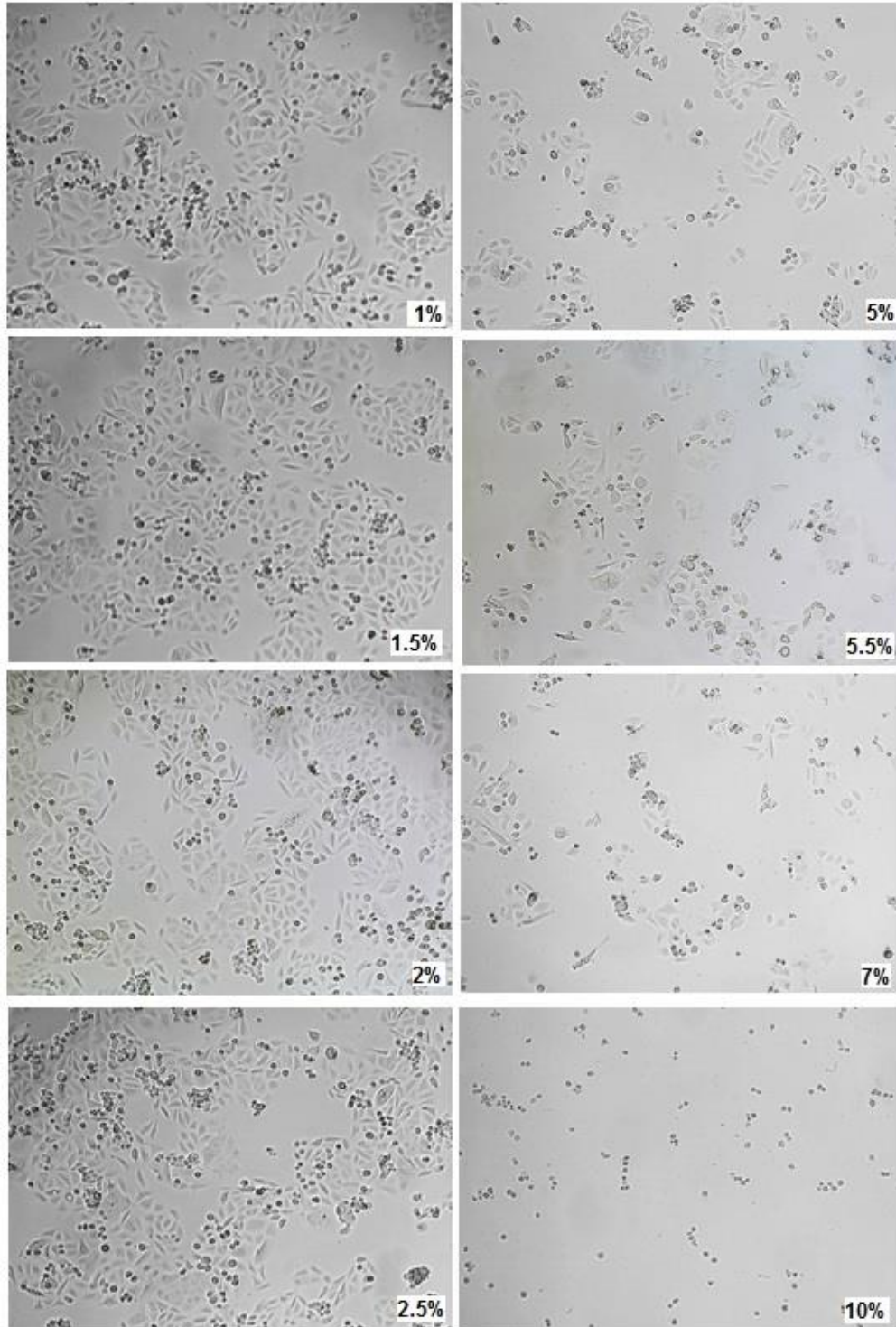


Figura A-2. Efecto biológico de las diferentes proporciones de extracto etanólico de Hojas de *P.edulis* en células SW620 expuestas durante 48 horas. (Fotografías de campo claro con objetivo de 10X).

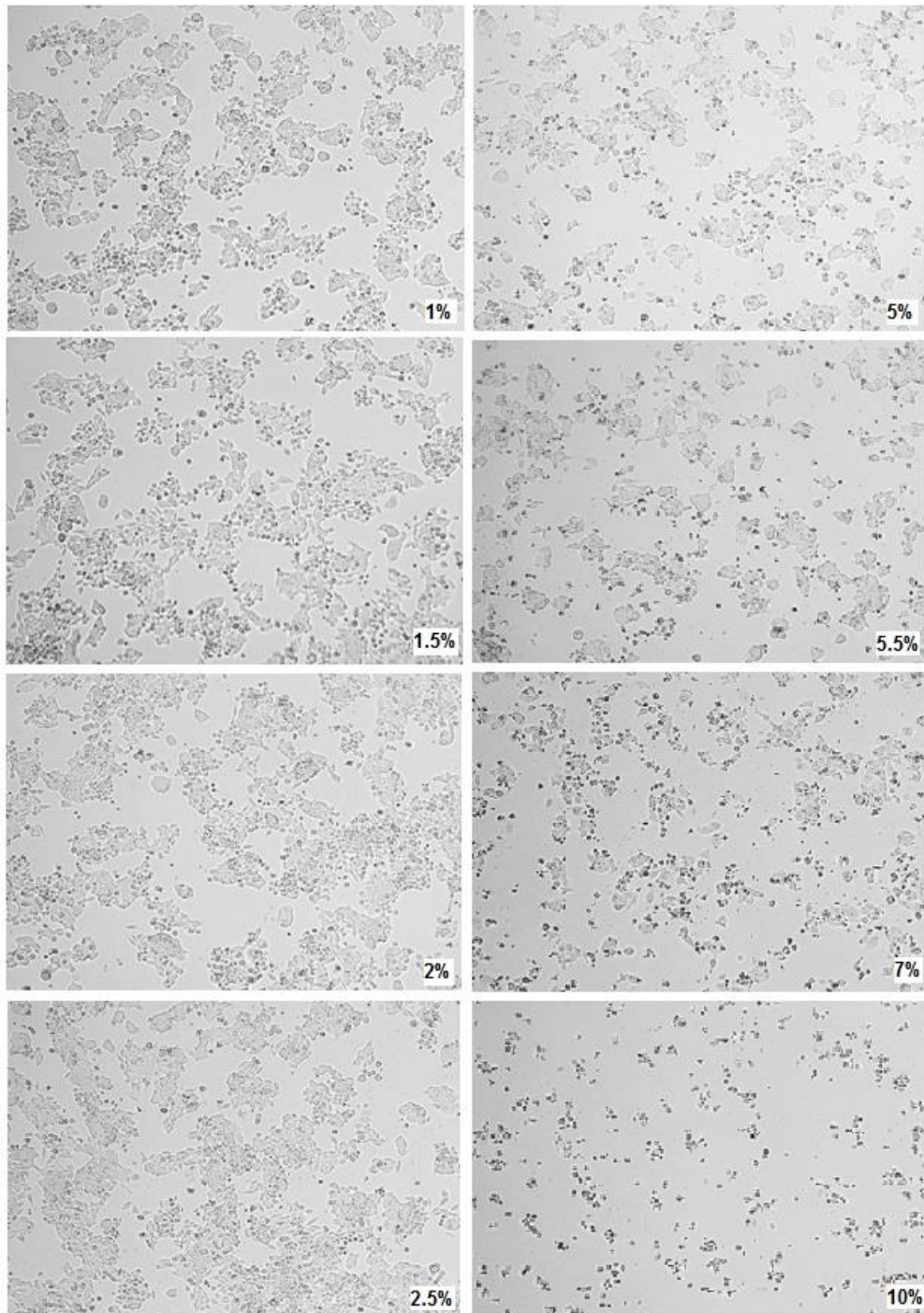
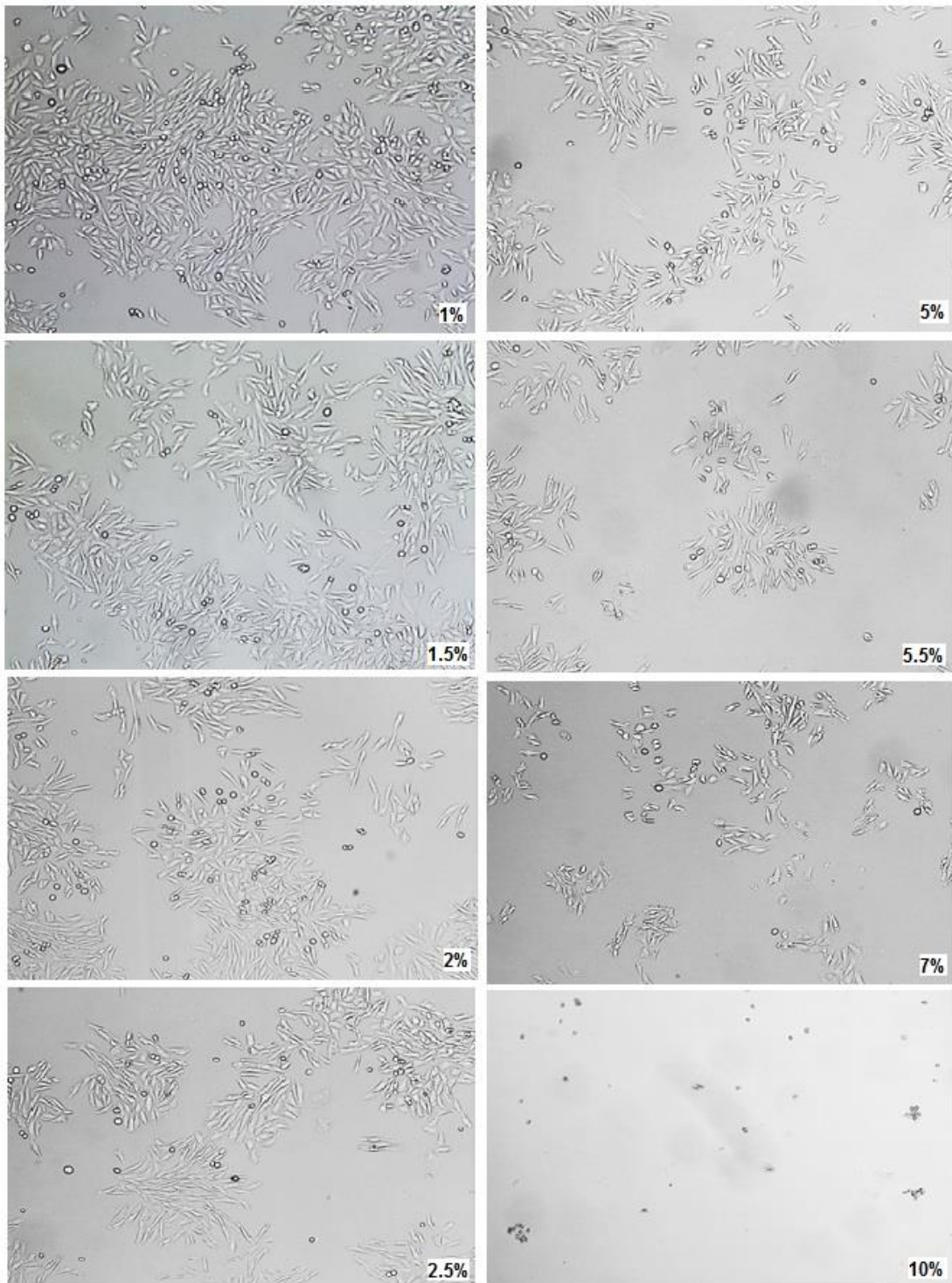


Figura A-3. Efecto biológico de las diferentes proporciones de extracto etanólico de Hojas de *P.edulis* en células CHO-K1 expuestas durante 48 horas. (Fotografías de campo claro con objetivo de 10X).



Aunque el análisis estadístico se realizó para los diferentes tiempos de exposición a los extractos, algunos de los resultados que se presentan a continuación están simplificados y corresponden a un tiempo de exposición de 48 horas (*). Esto con el fin de proveer la mayor información posible y de forma que pudiera relacionarse con los ensayos de citometría y estrés oxidativo en el que solo se evaluó este tiempo de exposición.

Tabla A-1(*): ANOVA y comparación múltiple de los valores de absorbancia obtenidos por MTT en cultivos de SW480 tratados con extracto acuoso del fruto de *P. edulis*.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|--------|----|---------|--------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,787 | 10 | 0,0787 | F (10, 66) = 46,56 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 0,1116 | 66 | 0,00169 | | |
| Total | 0,8986 | 76 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|---------------------|--------------|---------|
| c- vs. 1 | 0,04916 | -0,01223 to 0,1106 | No | ns |
| c- vs. 1,5 | -0,02801 | -0,08940 to 0,03338 | No | ns |
| c- vs. 2 | 0,0368 | -0,02459 to 0,09819 | No | ns |
| c- vs. 2,5 | 0,008807 | -0,05258 to 0,07020 | No | ns |
| c- vs. 5 | 0,03601 | -0,02538 to 0,09739 | No | ns |
| c- vs. 5,5 | 0,06541 | 0,004024 to 0,1268 | Yes | * |
| c- vs. 7 | 0,05644 | -0,004947 to 0,1178 | No | ns |
| c- vs. 10 | 0,1238 | 0,06241 to 0,1852 | Yes | **** |
| c- vs. CS | 0,01049 | -0,05090 to 0,07188 | No | ns |
| c- vs. C+ | 0,3617 | 0,3003 to 0,4231 | Yes | **** |

Tabla A-2(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480, evaluado por MTT.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|--------|----|-----------|--------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,1601 | 10 | 0,01601 | F (10, 54) = 17,36 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 0,0498 | 54 | 0,0009223 | | |
| Total | 0,2099 | 64 | | | |

| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | * | ns | ns | **** |
| C- vs. 1.5 | ns | ns | ns | **** |
| C- vs. 2 | ns | ** | ns | **** |
| C- vs. 2.5 | ns | * | ns | **** |
| C- vs. 5 | ns | ** | *** | **** |
| C- vs. 5.5 | * | ** | **** | **** |
| C- vs. 7 | ** | ** | **** | **** |
| C- vs. 10 | **** | *** | **** | **** |
| C- vs. C+ | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. CS | ns | ** | ** | **** |

Tabla A-3(*): ANOVA y comparación múltiple para los valores de absorbancia obtenidos en cultivos de SW620 tratados con extracto acuoso del fruto de *P. edulis*.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|--------|----|----------|-----------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,6063 | 10 | 0,06063 | F (10, 66) = 23,64 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 0,1693 | 66 | 0,002565 | | |
| Total | 0,7756 | 76 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|---------------------|--------------|---------|
| c- vs. 1 | 0,01039 | -0,06523 to 0,08601 | No | ns |
| c- vs. 1,5 | 0,00945 | -0,06617 to 0,08507 | No | ns |
| c- vs. 2 | 0,004934 | -0,08056 to 0,07069 | No | ns |
| c- vs. 2,5 | 0,05409 | -0,02153 to 0,1297 | No | ns |
| c- vs. 5 | 0,1137 | 0,03809 to 0,1893 | Yes | *** |
| c- vs. 5,5 | 0,1092 | 0,03361 to 0,1849 | Yes | ** |
| c- vs. 7 | 0,121 | 0,04541 to 0,1967 | Yes | *** |
| c- vs. 10 | 0,1285 | 0,05285 to 0,2041 | Yes | *** |
| c- vs. cs | 0,04052 | -0,03510 to 0,1161 | No | ns |
| c- vs. C+ | 0,3144 | 0,2388 to 0,3900 | Yes | **** |

Tabla A-4: ANOVA y Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW620, evaluado por MTT.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|--------|----|----------|-------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,5836 | 9 | 0,06485 | F (9, 60) = 21,63 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 0,1799 | 60 | 0,002998 | | |
| Total | 0,7635 | 69 | | | |

| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | ns | ns | **** | - |
| C- vs. 1.5 | ns | ns | *** | - |
| C- vs. 2 | ns | * | **** | - |
| C- vs. 2.5 | ns | * | **** | - |
| C- vs. 5 | ns | **** | **** | - |
| C- vs. 5.5 | ns | **** | **** | - |
| C- vs. 7 | ns | **** | **** | - |
| C- vs. 10 | ns | **** | **** | - |
| C- vs. C+ | * | ns | * | - |
| C- vs. CS | ns | ** | ** | - |

Tabla A-5: ANOVA y Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células Caco-2, evaluado por MTT.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|---------|----|-----------|--------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,06394 | 10 | 0,006394 | F (10, 66) = 36,44 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 0,01158 | 66 | 0,0001754 | | |
| Total | 0,07551 | 76 | | | |

| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | ns | **** | ns | **** |
| C- vs. 1.5 | ns | ns | **** | **** |
| C- vs. 2 | ns | ** | **** | **** |
| C- vs. 2.5 | ns | ns | **** | **** |
| C- vs. 5 | ns | ** | **** | **** |
| C- vs. 5.5 | ** | **** | **** | **** |
| C- vs. 7 | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. 10 | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. C+ | **** | *** | **** | **** |
| C- vs. CS | ns | **** | **** | *** |

Tabla A-6(*): ANOVA y Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células CHO-K1, evaluado por MTT.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|---------|----|----------|--------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 1,248 | 10 | 0,1248 | F (10, 66) = 83,56 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 0,09857 | 66 | 0,001494 | | |
| Total | 1,347 | 76 | | | |

| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. 1.5 | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. 2 | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. 2.5 | *** | **** | **** | **** |
| C- vs. 5 | *** | **** | **** | **** |
| C- vs. 5.5 | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. 7 | *** | **** | **** | **** |
| C- vs. 10 | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. C+ | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. CS | ns | ns | * | **** |

Tabla A-7: ANOVA de dos vías para efecto antiproliferativo obtenido por SRB en células SW480 del extracto acuoso del fruto de *P. edulis*.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|---------------|-------|----|--------|--------------------|---------------|
| Row Factor | 58,6 | 3 | 19,53 | F (3, 30) = 84,15 | P < 0,0001 |
| Column Factor | 6,327 | 10 | 0,6327 | F (10, 30) = 2,726 | P = 0,0164 |
| Residual | 6,964 | 30 | 0,2321 | | |

Tabla A-8: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de *P. edulis* en células SW480.

| | 0 horas | 48 horas | 96 horas | 144 horas |
|-------------------------------------|---------|----------|----------|-----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | ns | ns | * | ns |
| C- vs. 1,5 | ns | ns | ** | ns |
| C- vs. 2 | * | **** | * | ns |
| C- vs. 2,5 | ns | ns | * | ns |
| C- vs. 5 | ns | **** | ns | ns |
| C- vs. 5,5 | ns | **** | ns | ns |
| C- vs. 7 | ns | **** | ns | *** |
| C- vs. 10 | ns | **** | ns | * |
| C- vs. c+ | ns | **** | **** | **** |
| C- vs. CS | ns | ** | ** | ns |

Tabla A-9: ANOVA de dos vías para efecto antiproliferativo obtenido por SRB del extracto acuoso del fruto de *P. edulis* en células SW620.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|---------------|-------|----|--------|--------------------|---------------|
| Row Factor | 32,78 | 3 | 10,93 | F (3, 30) = 74,71 | P < 0,0001 |
| Column Factor | 3,884 | 10 | 0,3884 | F (10, 30) = 2,656 | P = 0,0188 |
| Residual | 4,387 | 30 | 0,1462 | | |

Tabla A-10: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de *P. edulis* en células SW620.

| | 0 horas | 48 horas | 96 horas | 144 horas |
|--|---------|----------|----------|-----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | ** | ns | ns | ns |
| C- vs. 1,5 | ** | ns | ns | **** |
| C- vs. 2 | **** | **** | ns | **** |
| C- vs. 2,5 | ns | ns | ns | *** |
| C- vs. 5 | * | **** | ns | *** |
| C- vs. 5,5 | ns | **** | ns | **** |
| C- vs. 7 | ns | **** | **** | **** |
| C- vs. 10 | *** | **** | ns | **** |
| C- vs. c+ | ns | **** | **** | **** |
| C- vs. CS | ns | ** | ns | * |

Tabla A-11: ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo a 96 horas para el efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de fruto de *P. edulis* en células SW480, evaluado por SRB.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|---------|----|----------|--------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,01733 | 10 | 0,001733 | F (10, 66) = 1,350 | P = 0,2235 |
| Residual (within columns) | 0,08475 | 66 | 0,001284 | | |
| Total | 0,1021 | 76 | | | |

| | 0 horas | 48 horas | 96 horas | 144 horas |
|--|---------|----------|----------|-----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | ns | **** | ns | ns |
| C- vs. 1.5 | ns | **** | ns | Ns |
| C- vs. 2 | ns | **** | ns | Ns |
| C- vs. 2.5 | ns | **** | ns | Ns |
| C- vs. 5 | ns | *** | ns | Ns |
| C- vs. 5.5 | ns | *** | ns | Ns |
| C- vs. 7 | ns | **** | **** | Ns |
| C- vs. 10 | ns | **** | **** | **** |
| C- vs. C+ | ns | **** | ** | ** |
| C- vs. CS | ns | ns | ns | Ns |

Tabla A-12(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de fruto de *P. edulis* en células SW620, evaluado por SRB.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|---------|----|----------|--------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,2164 | 10 | 0,02164 | F (10, 66) = 18,31 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 0,07803 | 66 | 0,001182 | | |
| Total | 0,2945 | 76 | | | |

| | 0 horas | 48 horas | 96 horas | 144 horas |
|-------------------------------------|---------|----------|----------|-----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | ns | *** | ** | **** |
| C- vs. 1.5 | ns | * | ns | **** |
| C- vs. 2 | ns | ns | ns | *** |
| C- vs. 2.5 | ns | ns | ns | **** |
| C- vs. 5 | ns | * | ** | ns |
| C- vs. 5.5 | ns | **** | *** | **** |
| C- vs. 7 | ns | **** | **** | **** |
| C- vs. 10 | ns | **** | **** | **** |
| C- vs. C+ | ns | - | - | - |
| C- vs. CS | ns | * | ns | ns |

(-) No calculado

Tabla A-13(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto antiproliferativo del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células CHO-K1, evaluado por SRB..

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|--------|----|---------|--------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,4856 | 10 | 0,04856 | F (10, 66) = 4,278 | P = 0,0001 |
| Residual (within columns) | 0,7493 | 66 | 0,01135 | | |
| Total | 1,235 | 76 | | | |

| | 0 horas | 48 horas | 96 horas | 144 horas |
|--------------------------------------|---------|----------|----------|-----------|
| Dunnnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. 1 | ** | ns | ns | ns |
| C- vs. 1.5 | * | ns | ns | ns |
| C- vs. 2 | ns | ** | ns | ns |
| C- vs. 2.5 | ns | ** | ns | ns |
| C- vs. 5 | ns | ns | ns | ns |
| C- vs. 5.5 | ** | ns | ns | ns |
| C- vs. 7 | * | ns | ns | ns |
| C- vs. 10 | ns | *** | ns | *** |
| C- vs. C+ | ns | **** | ** | *** |
| C- vs. CS | ns | ns | ns | ns |

Tabla A-14: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480, evaluado por Azul de tripano.

| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Dunnnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. C+ | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. CS | ns | ns | ns | ns |
| C- vs. 1 | ns | ns | ns | ns |
| C- vs. 1,5 | ns | * | ns | ns |
| C- vs. 2 | ns | * | *** | * |
| C- vs. 2,5 | ns | * | ** | ** |
| C- vs. 5 | ns | **** | **** | **** |
| C- vs. 5,5 | *** | **** | **** | **** |
| C- vs. 7 | ** | **** | **** | **** |
| C- vs. 10 | *** | **** | **** | **** |

Tabla A-15: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW620, evaluado por Azul de tripano

| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. C+ | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. CS | * | ns | ns | ns |
| C- vs. 1 | ns | * | ns | * |
| C- vs. 1,5 | ns | * | ** | * |
| C- vs. 2 | ** | * | ** | ** |
| C- vs. 2,5 | *** | *** | *** | **** |
| C- vs. 5 | *** | **** | **** | **** |
| C- vs. 5,5 | *** | **** | **** | **** |
| C- vs. 7 | **** | **** | **** | **** |
| C- vs. 10 | **** | **** | **** | **** |

Tabla A-16: Comparación múltiple respecto al control negativo para el efecto citotóxico del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células CHO-K1, evaluado por Azul de tripano.

| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Dunnett's multiple comparisons test | Summary | Summary | Summary | Summary |
| C- vs. C+ | *** | **** | **** | **** |
| C- vs. CS | ns | ns | ns | ns |
| C- vs. 1 | ns | ns | ns | ns |
| C- vs. 1,5 | ns | ns | ns | * |
| C- vs. 2 | ns | ns | ns | ** |
| C- vs. 2,5 | ns | ns | ns | * |
| C- vs. 5 | ns | ns | ns | **** |
| C- vs. 5,5 | ns | ns | ns | **** |
| C- vs. 7 | *** | ** | *** | **** |
| C- vs. 10 | **** | **** | **** | **** |

Tabla A-17(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto antiproliferativo (% de clonación absoluta) del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células Caco-2, evaluado por eficiencia de clonación.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|-------|----|-------|------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 2545 | 5 | 509 | F (5, 6) = 52,31 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 58,38 | 6 | 9,729 | | |
| Total | 2603 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| C- vs. 5% | 30,25 | 19,68 to 40,82 | Yes | *** |
| C- vs. 5,5% | 34,25 | 23,68 to 44,82 | Yes | *** |
| C- vs. 7% | 37,25 | 26,68 to 47,82 | Yes | *** |
| C- vs. C+ | 32,5 | 21,93 to 43,07 | Yes | *** |
| C- vs. CS | 6,5 | -4,069 to 17,07 | No | ns |

Tabla A-18(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto antiproliferativo (% de clonación relativa) del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células Caco-2, evaluado por eficiencia de clonación.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|-------|----|-------|-----------------|------------|
| Treatment (between columns) | 12709 | 5 | 2542 | F (5, 6) = 1410 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 10,81 | 6 | 1,802 | | |
| Total | 12720 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| C- vs. 5% | 67,46 | 62,91 to 72,01 | Yes | **** |
| C- vs. 5,5% | 76,56 | 72,01 to 81,11 | Yes | **** |
| C- vs. 7% | 83,22 | 78,67 to 87,77 | Yes | **** |
| C- vs. C+ | 72,76 | 68,21 to 77,31 | Yes | **** |

Tabla A-19(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto antiproliferativo (% de clonación absoluta) del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480, evaluado por eficiencia de clonación.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|-------|----|-------|------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 5280 | 5 | 1056 | F (5, 6) = 33,39 | P = 0,0003 |
| Residual (within columns) | 189,8 | 6 | 31,63 | | |
| Total | 5470 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| C- vs. 5% | 24,5 | 5,444 to 43,56 | Yes | * |
| C- vs. 5,5% | 38,25 | 19,19 to 57,31 | Yes | ** |
| C- vs. 7% | 49,25 | 30,19 to 68,31 | Yes | *** |
| C- vs. C+ | 56,25 | 37,19 to 75,31 | Yes | *** |
| C- vs. CS | 5,75 | -13,31 to 24,81 | No | ns |

Tabla A-20(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto antiproliferativo (% de clonación relativa) del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480, evaluado por eficiencia de clonación.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|--------------------------------|-------|----|-------|------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 12653 | 5 | 2531 | F (5, 6) = 74,46 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 203,9 | 6 | 33,99 | | |
| Total | 12857 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| C- vs. 5% | 38,08 | 18,33 to 57,84 | Yes | ** |
| C- vs. 5,5% | 59,62 | 39,87 to 79,38 | Yes | *** |
| C- vs. 7% | 76,3 | 56,55 to 96,06 | Yes | **** |
| C- vs. C+ | 87,28 | 67,52 to 107,0 | Yes | **** |
| C- vs. CS | 9,322 | -10,43 to 29,08 | No | ns |

Tabla A-21(*): ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células Caco-2 (Eventos de apoptosis temprana)

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|--------|----|---------|-------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,2586 | 5 | 0,05173 | F (5, 6) = 0,8159 | P = 0,5792 |
| Residual (within columns) | 0,3804 | 6 | 0,0634 | | |
| Total | 0,6391 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-------------------|--------------|---------|
| c- vs. cs | -0,012 | -0,8652 to 0,8412 | No | ns |
| c- vs. c+ | 0,357 | -0,4962 to 1,210 | No | ns |
| c- vs. 5% | 0,3165 | -0,5367 to 1,170 | No | ns |
| c- vs. 5,50% | 0,274 | -0,5792 to 1,127 | No | ns |
| c- vs. 7% | 0,1445 | -0,7087 to 0,9977 | No | ns |

Tabla A-22(*): ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células Caco-2 (Eventos de apoptosis tardía).

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|--------|----|-------|-------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 285149 | 5 | 57030 | F (5, 6) = 0,9874 | P = 0,4951 |
| Residual (within columns) | 346540 | 6 | 57757 | | |
| Total | 631689 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| c- vs. cs | 416,5 | -397,9 to 1231 | No | ns |
| c- vs. c+ | 404,6 | -409,7 to 1219 | No | ns |
| c- vs. 5% | 415,9 | -398,5 to 1230 | No | ns |
| c- vs. 5,50% | 415,5 | -398,9 to 1230 | No | ns |
| c- vs. 7% | 414,9 | -399,4 to 1229 | No | ns |

Tabla A-23(*): ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células Caco-2 (Eventos de necrosis).

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|-------|----|-------|------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 2933 | 5 | 586,5 | F (5, 6) = 31,48 | P = 0,0003 |
| Residual (within columns) | 111,8 | 6 | 18,63 | | |
| Total | 3045 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|------------------|--------------|---------|
| c- vs. cs | 3,345 | -11,28 to 17,97 | No | ns |
| c- vs. c+ | -39,7 | -54,32 to -25,07 | Yes | *** |
| c- vs. 5% | 4,97 | -9,657 to 19,60 | No | ns |
| c- vs. 5,50% | 2,405 | -12,22 to 17,03 | No | ns |
| c- vs. 7% | -1,29 | -15,92 to 13,34 | No | ** |

Tabla A-24 (*): ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células Caco-2 (Eventos negativos para los marcajes).

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|-------|----|-------|------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 4428 | 5 | 885,7 | F (5, 6) = 52,47 | P < 0,0001 |
| Residual (within columns) | 101,3 | 6 | 16,88 | | |
| Total | 4530 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| c- vs. cs | -3 | -16,92 to 10,92 | No | ns |
| c- vs. c+ | 50,75 | 36,83 to 64,67 | Yes | **** |
| c- vs. 5% | -0,1 | -14,02 to 13,82 | No | ns |
| c- vs. 5,50% | -2,15 | -16,07 to 11,77 | No | ns |
| c- vs. 7% | 2,25 | -11,67 to 16,17 | No | ns |

Tabla A-25(*): ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480 (Eventos de apoptosis temprana).

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|----------|----|----------|-------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,001044 | 5 | 0,000209 | F (5, 6) = 0,4160 | P = 0,8228 |
| Residual (within columns) | 0,003011 | 6 | 0,000502 | | |
| Total | 0,004054 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|---------------------|--------------|---------|
| c- vs. cs | 0,005 | -0,07090 to 0,08090 | No | ns |
| c- vs. c+ | 0,0145 | -0,06140 to 0,09040 | No | ns |
| c- vs. 5% | -0,015 | -0,09090 to 0,06090 | No | ns |
| c- vs. 5,50% | 0,01 | -0,06590 to 0,08590 | No | ns |
| c- vs. 7% | 0,005 | -0,07090 to 0,08090 | No | ns |

Tabla A-26(*): ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480 (Eventos de apoptosis tardía).

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|---------|----|----------|-------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 0,01727 | 5 | 0,003453 | F (5, 6) = 0,7703 | P = 0,6038 |
| Residual (within columns) | 0,0269 | 6 | 0,004483 | | |
| Total | 0,04417 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-------------------|--------------|---------|
| c- vs. cs | 0,015 | -0,2119 to 0,2419 | No | ns |
| c- vs. c+ | 0,03 | -0,1969 to 0,2569 | No | ns |
| c- vs. 5% | -0,08 | -0,3069 to 0,1469 | No | ns |
| c- vs. 5,50% | 0,03 | -0,1969 to 0,2569 | No | ns |
| c- vs. 7% | 0,015 | -0,2119 to 0,2419 | No | ns |

Tabla A-27(*): ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480 (Eventos de Necrosis).

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|-------|----|-------|------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 1984 | 5 | 396,7 | F (5, 6) = 16,82 | P = 0,0018 |
| Residual (within columns) | 141,5 | 6 | 23,59 | | |
| Total | 2125 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|------------------|--------------|---------|
| c- vs. cs | -1,43 | -17,89 to 15,03 | No | ns |
| c- vs. c+ | -37,57 | -54,02 to -21,11 | Yes | *** |
| c- vs. 5% | -4,225 | -20,68 to 12,23 | No | ns |
| c- vs. 5,50% | -5,06 | -21,52 to 11,40 | No | ns |
| c- vs. 7% | -8,365 | -24,82 to 8,093 | No | ** |

Tabla A-28(*): ANOVA y comparación múltiple para el efecto inductor de apoptosis del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480 (Eventos negativos para los marcajes).

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|-------|----|-------|------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 1981 | 5 | 396,2 | F (5, 6) = 16,85 | P = 0,0018 |
| Residual (within columns) | 141,1 | 6 | 23,51 | | |
| Total | 2122 | 11 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| c- vs. cs | 1,45 | -14,98 to 17,88 | No | ns |
| c- vs. c+ | 37,55 | 21,12 to 53,98 | Yes | *** |
| c- vs. 5% | 4,25 | -12,18 to 20,68 | No | ns |
| c- vs. 5,50% | 5,05 | -11,38 to 21,48 | No | ns |
| c- vs. 7% | 8,35 | -8,081 to 24,78 | No | ** |

Tabla A-29(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células Caco-2, evaluado por GSH/GSSG GLO®.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|------------|----|-----------|-------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 4998000000 | 5 | 999500000 | F (5, 18) = 5,537 | P = 0,0029 |
| Residual (within columns) | 3249000000 | 18 | 180500000 | | |
| Total | 8247000000 | 23 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| c- vs. 7% | -37454 | -63690 to -1121 | Yes | ** |
| c- vs. 5.5% | -23280 | -49516 to 2956 | Yes | ** |
| c- vs. 5% | -4711 | -30947 to 21525 | Yes | ** |
| c- vs. cs | 33,25 | -26203 to 26269 | No | ns |
| c- vs. c+ | -205,5 | -26441 to 26030 | No | ns |

Tabla A-30(*): ANOVA y comparación múltiple respecto al control negativo del efecto del extracto etanólico de hojas de *P. edulis* en células SW480, evaluado por GSH/GSSG GLO®.

| ANOVA table | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P value |
|-----------------------------|----------|----|---------|-------------------|------------|
| Treatment (between columns) | 48320000 | 5 | 9664000 | F (5, 18) = 5,528 | P = 0,0030 |
| Residual (within columns) | 31470000 | 18 | 1748000 | | |
| Total | 79790000 | 23 | | | |

| Dunnett's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95% CI of diff, | Significant? | Summary |
|-------------------------------------|------------|-----------------|--------------|---------|
| c- vs. 7% | -3413 | -5995 to -831,0 | Yes | ** |
| c- vs. 5.5% | -2908 | -5490 to -326,4 | Yes | * |
| c- vs. 5% | -2086 | -4667 to 496,4 | No | ns |
| c- vs. cs | -178,3 | -2760 to 2404 | No | ns |
| c- vs. c+ | -43,5 | -2625 to 2538 | No | ns |

Referencias

- AGUILLÓN J, MALDONADO ME., LOANGO N, ARANGO SS., LANDÁZURI P. Antioxidant and Antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice *Passiflora edulis*. *Perspectivas en nutrición humana*. 2013; 15(1): 13-25.
- AHMED D, EIDE P.W, I.A EILERTSEN I.A, DANIELSEN S.A, EKNÆSM M, HEKTOEN M, LIND G.E, LOTHE R.A Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013.
- ALBERT L. La sistemática y evolución de las Passifloras. Memorias del primer Simposio Internacional de Passifloras, Palmira, Colombia; 1993. p. 51-54.
- ANDERSON ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*.1985; 113:548–555.
- ANGOSTO CM. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. FarM*. 2003, 69: 1-29.
- ANUARIO ESTADÍSTICO 2006. República de Colombia. Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Cancerología. Vol. 4, Noviembre de 2007.
- ARENCIBIA DF., ROSARIO LA., CURVECO DL. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *RETEL (Revista de toxicología en línea)*. 2009; 19(1): 40-51.
- ASADUJJAMAN, MISHUK A.U, HOSSAIN A, KUMAR A. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: biological and pharmacological activities. *The Scientific World Journal*. 2014,10p.
- BAKER DD, CHU M, OZA U, RAIGARHIA V. The Value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat. Prod Rep*.2007;24(6):1225-44.
- BILBAO MR. Análisis fitoquímico preliminar: Universidad del Quindío. Armenia-Colombia.1997.
- BINGHAM SA. Diet and colorectal cancer prevention. *Biochem Soc Trans*; 2008; 28: 12-16.
- BOEIRA JM., FENNERC R., BETTI AH., PROVENSÍ G., LACERDA LA., BARBOSA PR, GONZALEZ F.HD, CORREA A., DRIEMEIER D., DALL'ALBA MP., PEDROSO AP., GOSMANN G, DA SILVA J.,RATES S., Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 128:526–532
- BOUSSEROUEL S., LAMY V., GOSSÉ F., LOBSTEIN A., MARESCAUX J., RAUL F. Early modulation of gene expression used as biomarker for chemoprevention in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Pathol Int*. 2011; 61:80-87.

- BOUSSEROUEL S, KAUNTZ H, GOSSÉ F, BOUHADJAR M, SOLER L, MARESCAUX J, RAUL F. Identification of gene expression profiles correlated to tumor progression in a preclinical model of colon carcinogenesis.. *Int J Oncol.* 2010; 36: 1485-90.
- BOYD MR. the NCI *in vitro* anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation 1985-1995, *Teicher Humana Press Inc.*, Totowa, N edn. B. Teicher (ed.), 1997.23-42.
- BUGALLO V., CARDONE S., PANNUNZIO M.J., FACCIUTO G., Breeding Advances in *Passiflora* spp. (Passion Flower) Native to Argentina. *Floriculture and Ornamental Biotechnology.* 2011; 5(1): 23-34.
- CALAPAI G., NAVARRA M., MINCIULLO P.L., GANGEMI S. *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *J. Ethnopharmacol.* 2013;150(3):791-804.
- CALVERT P.M., FRUCHT H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2002;137: 603-12.
- CHASSAGNE D, CROUZET J. A cyanogenic glycoside from *Passiflora edulis* fruit. *Phytochemistry.* 1998; 49(3):757-759.
- DARZYNKIEWICZ S, BRUNO S, DEL BINO G, GORCZYCA W, HOTZ M.A., LASSOTA P, TRAGANOS F. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry .* 1992; 13:795-808.
- DENG J, ZHOU Y, BAI M, LI H, LI L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* and *P. flavicarpa*. *Journal of Etnopharmacology.* 2010; 128(1):1480-153.
- DHAWAN K; KUMAR S; SHARMA A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnate* and *P. edulis*. *Fitoterapia.*2001; 72(6):698-702.
- DHAWAN K, DHAWAN S, SHARMA A. *Passiflora*: as review update. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94:1-23.
- DENZOIN L.A., SORACI A.L., TAPIA M.O. La Homeostasis del glutati3n. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2013; 47(3)
- DOMÍNGUEZ, X.A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Centro Regional de Ayuda Técnica. AID. México. 1978.
- DU J, TANG XL.Natural products against cancer: a comprehensive bibliometric study of the research projects, publications, patents and drugs. *J Cancer Res.* 2014,10(1):27-37.
- ENGELAND MV, NIELAND L, FRANS CS, SCHUTTE B, REUTELINGSPERGER C. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry.* 1998; 1:1–9.
- ESCOBAR LM., ALFONSO PA., ARISTIZABAL FA. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas tumorales. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2009; 9(2):49-56.

ESCOBAR LK. New Species and Varieties of *Passiflora* (Passifloraceae) from The Andes of South America *Systematic Botany*. 1986; 11(1):88-97.

FARHANA A.R, MAHMUDA H, LAIZUMAN N. Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Activity of *Passiflora Edulis* Sims. *European Journal of Scientific Research*. 2009; 31(4), 592-598

FRANKEN NA., RODERMOND HM., STAP J, HAVEMAN J, BREE CB. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*. 2006; 1:2315:2319.

FRESHNEY, I.R. Culture of Animal cells: A Manual of Basic Technique, Fifth edition. Edn John Wiley & Sons, Inc, 2005.

GAGOS S, HOPWOOD VL., ILIOPOULOS D, KOSTAKIS A, KARAYANNAKOS P, YATZIDES H, SKALKEAS GD., PATHAK S. Chromosomal markers associated with metastasis in two colon cancer cell lines established from the same patient. *Anticancer Research*. 1995;15(2):369-378

GLOBOCAN 2015, IARC. Consulta en línea disponible en <http://www-dep.iarc.fr/>.

GRAGG GM., NEWMAN DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal Ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):72-79.

GRIFFITH, OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med*. 1999; 27:922–935.

HARVEY AL. Drug Discovery Today. *Natural products in drug discovery*. 2008;13(19-20):894–901.

HERNÁNDEZ A., BERNAL R. Lista de Especies de Passifloraceae de Colombia. *Biota Colombiana*. 2000; (3): 320-335.

HINGORANI R, DENG J, ELIA J, MCINTYRE C, MITTAR D. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™. *System BD-Biosciences Application Note*. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA, COLOMBIA INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. 2010,108 p.

INGALE, A., HIVRALE, A. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. And their bioactive compounds. *Afr.J.PlantSci*. 2010;(4):417–426.

KAO F.T., PUCKETT T.T. Genetics of somatic mammalian cells, vii. induction and isolation of nutritional mutants in chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968; 60(4):1275-1281.

LANDGDON S. Cancer Cell Culture. Methods and protocols. *Humana Press*. 2004. 88:171-181.

- LATT S.A, SCHRECK R.R. Sister chromatid exchange analysis. *Am J Hum Genet.* 1980; 32(3): 297–313.
- LEIBOVLTZ A, STLNSON JC., MCCOMBS WB., MCCOY CE., MAZUR KC., MABRY ND. Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Research.* 1976; 36: 4562-4569.
- MARECK U, HERRMANN K, GALENSA R, WRAY V. The 6-C-chinovoside and 6- C-fucoside of luteolin from *Passiflora edulis*. *Phytochemistry.*1991; 30(10): 3486-3487.
- MARTÍN F., NAKASONE H. The edible species of *Passiflora*. *Economical Botany.* 1970;24: 333-343.
- MARK S. BUTLER. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of natural products*, 2004; 67(12):2141-2153.
- MIRODDI M., CALAPAI G., NAVARRA M., MINCIULLO L., GANGEMI S. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinica ltrials *Journal Of Ethnopharmacology.* 2013; (150)791–804.
- MIRODDI, M., MANNUCCI, C., MANCARI, F., NAVARRA, M., CALAPAI, G. Research and development for botanical products in medicinals and food supplements market. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013:649-720.
- MONDAL S, BANDYOPADHYAY S, GHOSH MK, MUKHOPADHYAY S, ROY S, MANDAL C. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012, 12(1):49-75.
- MOSS R.W. Antioxidants against cancer. 2000. New York: Equinox Press Inc.,
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* 1983;65: 55–63.
- MOO-PUC R, ROBLEDO D, FREILE-PELEGRÍN. In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Marinas.*2009; 35(4):345–358.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Developmental Therapeutics program. Disponible en <http://www.cancer.gov/>.
- NAKAMURA A, SEDELNIKOVA O.A, REDON C, PILCH DR, SINOGEVA NI, SHROFF R, LICHTEN M, BONNER W.M. Techniques for gamma-H2AX detection. *Methods Enzymol.* 2004.409:236-50.
- NILES AL., MORAVEC RA., HESSELBERTH PE., SCURRIA MA., DAILY WJ., RISS TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* 2007; 366:197–206.
- NOLAN, RP., LEE, K. Dynamic model for CHO Cell engineering. *Journal of Biotechnology.* 2012; 158: 24-33.

NÚÑEZ R, GALAN E, MORENO C, ROMERO A, SANTAMARÍA JI. Poliposis adenomatosa familiar: síndrome de Gardner. *Cir Pediatr* 2006; 19: 111-114.

O'BRIEN MA, DAILY WJ., HESSELBERTH PE., MORAVEC RA., SCURRIA MA., KLAUBERT DH, BULLEIT RF., WOOD KV. Homogeneous, bioluminescent protease assays: caspase-3 as a model. *J Biomol Screen.*2005;10(2):137-148.

OCAMPO J, COPPENS J , ECKENBRUGGE E, RESTREPO M, JARVIS A, SALAZAR M, CAETANO C. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana.*2007; 8(1), 1:45.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC. Disponible en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

OŻAROWSKI M, PASZEL-JAWORSKA A. Evaluation of cytotoxic activity of leaf and callus culture of *Passiflora* sp. extracts in human acute lymphoblastic leukemia cell lines and antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*. Symposium "Perspectives and challenges in medicine".2013,Programme and abstracts, pp. 133-134.

PAN M.H, HO C.T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem Soc Rev.* 2008; 37: 2558-74.

PERRY N, ALBERSTON G, BLUNT J, COLE A, MUNRO M. 4.4-Hydroxy-2-cyclopentenone an antipseudomonas and cytotoxic component from *Passiflora-tetrandra*. *Planta Medica.* 1991; 57(2):129-31.

PESSOA C., VERAS COSTA-LOTUFO L., LEYVA A., AMARAL DE MORAES MA., ODORICO DE MORAES M Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. *Lead Molecules from Natural Products*. M.T.H. Khan and A. Ather (eds.). 2006; 197-212.

PIZZETTI J, MONTANHER AB., ZUCOLOTTO SM., SCENKEL EP., FRODE TS. Evaluation of the antinflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chemistry.* 2007; 104(3):1097-1105

PURICELLI L, DELL'AICA I, SARTOR L, GARBISA S, CANIATO R. preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease mmp-2 and mmp-9 by *passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. *Fitoterapia.* 2003;74(3):302-4.

PUNK TT, STEFFEN J. Life cycle analysis of mammalian cells. A method for localizing metabolic events within the life cycle, and its application to the action of colcemide and sublethal doses of x-irradiation. *Biophysical Journal.* 1963; 3: 379- 397.

RAFEHI H, ORLOWSKI C, GEORGIADIS GT., VERVERIS K., EL-OSTA A, KARAGIANNIS TC. Clonogenic Assay: Adherent Cells. *Vis Exp.* 2011; (49): 2573.

RAHMAN A, CHOUDHARY M.I., THOMSEN W.J. Bioassay Techniques for Drug Development. In: Manual of Bioassay Techniques for Natural Products Research, Harwood Academic Publishers, Netherlands, 2001; 34–35.

RAO A.L., SANKAR G.G. Caco-2 cells: an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*. 2009; 1(2):260.

RAMAIYA S.D, BUJANG J.S,ZAKARIA M.H. Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Passiflora Species. *Lead Molecules from Natural Products* M.T.H. Khan and A. Ather (eds.). 2006. 197p

RENEHAN A.G., O'DWYER S.T., HABOUBI N.J., POTTEN C.S. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis*.2002;4: 76-89.

REDDY L, ODHAV, BHOOLA K:D.Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003, 99(1):1–13.

RISS T.L., MORAVEC R.A, NILES A.L., BENINK H.A., WORZELLA T.J., MINOR L. Cell Viability Assay. *Assay Guidance Manual*. 2013; 3(6).

ROJAS J, RONCEROS S, PALOMINO R, SALAS M, AZAÑERO R, CRUZ H; ROJAS A, ASMATJ, TAM J. Efecto coadyuvante del extracto liofilizado de *Passiflora edulis* (maracuyá) en la reducción de la presión arterial en pacientes tratados con enalapril. *An Fac med*. 2009; 70:103 - 108.

RODRIGUEZ-FRAGOSO,L.,REYES-ESPARZA,J.,BURCHIEL,S.W.,HERRERA-RUIZ,D.,TORRES,E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol.Appl.Pharmacol*.2008; 227:125–135.

RUHUL AMIN A.R.M., KUCUK O, KHURI F.R, SHIN D.M. Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 2712-2725.

RUIZ CA. Estudio de los Metabolitos secundarios de lippia organoides H.B.K, en tres estados fenológicos. Tesis de Grado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia. 2008.

SANABRIA A. Análisis fitoquímico preeliminar. Bogotá: Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.1983.

SANABRIA A; MARTÍNEZ J, DÍAZ J. Cáncer de colon: análisis del costo de enfermedad para los estadios iii y iv en Cansercoop ips Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2009; 38 (2), 193-214.

SUJANA N, RAMANATHAN S, VIMALA V, SUNDARAM M, PEMIAH B. Antitumour potential of *Passiflora incarnate* against ehrlich ascites carcinoma. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012, (4): 2.

SIES H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med*. 1999; 27:916–921.

SILVA SC., FREITAS AL., BARROS FC., LINS K, ALVES AP., ALENCAR NM., DE FIGUEIREDO IS., PESSOA C, DE MORAES MO., COSTA-LOTUFO LV., FEITOSA JP., MACIEL JS., DE PAULA RC. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. *Carbohydrates Polymers*. 2012; 87:139-145.

SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, MCMAHON J, VISTICA D. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990; 82:1107-1112.

STOCKERT JC., BLAZQUEZ- CASTRO A., CAÑETE M., HOROBIN RW., VILLANUEVA A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan products is in lipids droplets. *Acta Histochemica*. (2012)doi:10.106/j.achis.2012.01.006.

SUJANA N, RAMANATHAN S, VIMALA V , SUNDARAM M, PEMIAIAH B. Antitumour potential of *passiflora incarnata*.I against ehrlich ascites carcinoma. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012;4(2).

SURH YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev*.2003; 3:768-780.

TAFUR R., PERFETTI P., RUIZ D., MORALES J. Plan frutícola Nacional. 2006; 43 p.

TERZIC J, GRIVENNIKOV S, KARIN E, KARIN M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*.2010;138: 2101-2114.

TENESA A, DUNLOP M.G. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2009;10: 353–358.

TRAN SL., PUHAR A, NGO-CAMUS M, RAMA RAO N. Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin Lysis of *Bacillus cereus*. *PLoS One*. 2011; 6(9): e22876.

WILSON D.M, THOMPSON L.H. /Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. *Mutation Research*. 2007; 616(1-2):11–23

WU L, CHEN X, HUANG L, TIAN J, KE F, XU J, CHEN Y, ZHENG M. A Novobiocin Derivative, XN4, Inhibits the Proliferation of Chronic Myeloid Leukemia Cells by Inducing Oxidative DNA Damage. *PLOS ONE*. 2015.

XU X, NAGARAJAN H, LEWIS N.E., PAN S, CAI Z, LIU X, CHEN W, XIE M, WANG W, HAMMOND S, ANDERSEN M.R., NEFF N, PASSARELLI B, KOH W, FAN H.C., WANG J, GUI Y, LEE K.H., BETENBAUGH M.J., QUAKE S.R., PALSSON B.O., WANG J. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature Biotechnology*. 2011; 29(8): 51-57.

YEUNGA T.M , GANDHIA S.C, WILDINGA J.L , MUSCHELB R, BODMERA W.F Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *PNAS*. 2010;107(8).

YEUM KJ., RUSSELL R, ALDINI G. Antioxidant activity and oxidative stress: an overview. Biomarkers for antioxidant defense and oxidative damage: principles and practical application. Iowa: Blacwell Publishing.2010, 1-19pp.

YOSHIKAWA K, KATSUTA S, MIZUMORI J, ARIHARA S. Four cycloartane triterpenoids and six related saponins from *Passiflora edulis*. *Journal of Natural Products*. 2000; 63(9):1229-1234.

ZERAIK L.M, YARIWAKWE J.H. Passion fruit rinds (*passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. *Quim. Nova*. 2012; 35(3): 541-545.

ZIBADI S; WATSON R,R. Passion Fruit (*Passiflora edulis*). *Evidence- Based Integrative Medicine*. 2012; 1(3): 183-187.