

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE RESAZURINA Y MTT  
EMPLEADOS EN LA EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SOBRE TRES LÍNEAS  
CELULARES TUMORALES**

LINAMARÍA ESCOBAR MÁRMOL

TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar el título de

Bióloga

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTA DE CIENCIAS  
CARRERA DE BIOLOGÍA  
2007

## NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

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

**ESTUDIO COMPARTIVO DE LOS MÉTODOS DE RESAZURINA Y MTT  
EMPLEADOS EN LA EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SOBRE TRES LÍNEAS  
CELULARES TUMORALES**

LINAMARÍA ESCOBAR MÁRMOL

APROBADO

---

Fabio Aristizábal G Ph.D.  
Director

---

Alba Noemí Téllez M.Sc.  
Codirectora

---

Susana Fiorentino Ph.D.  
Jurado

---

Jairo Tovar Ph.D.  
Jurado

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE RESAZURINA Y MTT  
EMPLEADOS EN LA EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SOBRE TRES LÍNEAS  
CELULARES TUMORALES**

LINAMARÍA ESCOBAR MÁRMOL

APROBADO

---

Angela Umaña Muñoz MPhil  
Decana Académica

---

Andrea Forero BSc.  
Directora Carrera de Biología

## **DEDICATORIA**

Mis padres por ser mi soporte y mejor ejemplo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo contó con la colaboración de personas e instituciones a quienes quiero hacer explícito mis más sinceros agradecimientos.

Al Dr. Fabio Aristizábal, Profesor del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá por permitirme pertenecer a su grupo de investigación y brindarme su apoyo y colaboración como director en la realización de este trabajo.

A Claudia Cordero, Investigadora del grupo de Farmacogenética del Cáncer de la Universidad Nacional por su colaboración y ayuda incondicional.

A Johanna Morantes, Investigadora del grupo de Farmacogenética del Cáncer de la Universidad Nacional por su orientación en el manejo de cultivos celulares.

A los Doctores Luís Fernando Cuca y Augusto Rivera, profesores del Departamento de Química de la Universidad Nacional por proporcionar los compuestos sintéticos y los extractos etanólicos totales respectivamente.

Alba Lucía Valenzuela Correa, Investigadora del grupo de Productos Naturales Biactivos de plantas medicinales Colombianas, del Departamento de Farmacia por su colaboración y la ayuda en el manejo de los equipos.

Mis padres por ser mi soporte y mejor ejemplo.

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	10
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA .....	17
2.1. Cultivos celulares.....	17
2.2. Requerimientos básicos de cultivos celulares .....	18
2.3. Líneas celulares empleadas .....	19
2.3.1. HEp-2 .....	19
2.3.2. HT-29.....	20
2.3.3. HeLa.....	20
2.4. Citotoxicidad in vitro.....	21
2.5. Métodos para la evaluación de citotoxicidad in vitro.....	22
2.5.1. Reducción de MTT.....	23
2.5.2. Tinción con Resazurina.....	24
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	25
3.1. Formulación .....	25
3.2. Justificación .....	25
4. OBJETIVOS .....	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos específicos.....	27
5. HIPÓTESIS .....	27

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1. Diseño .....	28
6.1.1. Factor de diseño .....	28
6.1.2. Variable de respuesta.....	28
6.1.3. Unidad de respuesta.....	28
6.1.4. Unidad de muestreo.....	28
6.2. Población de estudio y material biológico .....	28
6.3. Variables de estudio .....	29
6.3.1. Variable independiente .....	29
6.3.2. Variable dependiente .....	29
6.4. Materiales y Métodos.....	29
6.4.1. Manejo general de cultivos celulares .....	30
6.4.1.1. Tripsinización.....	30
6.4.1.2. Conteo y comprobación de viabilidad.....	30
6.4.1.3. Criopreservación.....	31
6.4.2. Establecimiento de los parámetros para la aplicación del método de resazurina.....	31
6.4.3. Selección de los parámetros para los métodos de tinción celular .....	32
6.4.3.1. Aplicación de parámetros de resazurina .....	32
6.4.3.2. Aplicación de parámetros de MTT.....	33
6.4.4. Comparación entre los dos métodos de tinción celular .....	34
6.4.4.1. Tinción de resazurina.....	35
6.4.4.2. Reducción de MTT.....	35
6.4.5. Evaluación de la citotoxicidad de extractos etanólicos vegetales.....	36
6.4.6. Expresión de resultados.....	36
6.5. Recolección de la información .....	37
6.6. Análisis de información .....	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
7.1 Selección de parámetros para la aplicación del método de tinción con resazurina.....	39

7.2. Comparación entre los dos métodos de tinción celular .....	48
7.2.1. Doxorubicina HCl.....	51
7.3. Evaluación de la citotoxicidad de extractos etanólicos de origen vegetal.....	57
7.4. Evaluación de la recuperación celular.....	60
8. CONCLUSIONES .....	63
9. RECOMENDACIONES.....	64
10. REFERENCIAS .....	65
11. ANEXOS.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células HEp-2 en cultivo .....	20
Figura 2. Células HT-29 en cultivo.....	20
Figura 3. Células HeLa en cultivo.....	21
Figura 4. Conversión de MTT a cristales púrpuras de formazán.....	23
Figura 5. Conversión de resazurina a resofurina .....	24
Figura 6. Efecto de la concentración y tiempo de incubación de resazurina sobre la intensidad de fluorescencia medida en Unidades Relativas de fluorescencia URF para HEp-2 .....	40
Figura 7. Efecto de la concentración y tiempo de incubación de resazurina sobre la intensidad de fluorescencia medida en Unidades Relativas de fluorescencia URF para HT-29.....	41
Figura 8. Efecto de la concentración y tiempo de incubación de resazurina sobre la intensidad de fluorescencia medida en Unidades Relativas de fluorescencia URF para HeLa.....	41
Figura 9A. Seguimiento en el tiempo de la reducción de resazurina a resofurina en HEp-2.....	47
Figura 9B. Seguimiento en el tiempo de la reducción de resazurina a resofurina en HT-29.....	47
Figura 9C. Seguimiento en el tiempo de la reducción de resazurina a resofurina en HeLa.....	47
Figura 10A. Efecto citotóxico de Doxorubicina HCl empleando el método de resazurina y el método de reducción de MTT para HEp-2 .....	51

Figura 10B. Efecto citotóxico de Doxorubicina HCl empleando el método de resazurina y el método de reducción de MTT para HT-29...	51
Figura 10C. Efecto citotóxico de Doxorubicina HCl empleando el método de resazurina y el método de reducción de MTT para HeLa. ....	52
Figura 11A. Segundo ensayo del efecto citotóxico de Doxorubicina HCl empleando el método de resazurina y el método de reducción de MTT para HEp-2. ....	53
Figura 11B. Segundo ensayo del efecto citotóxico de Doxorubicina HCl empleando el método de resazurina y el método de reducción de MTT para HT-29. ....	53
Figura 11C. Segundo ensayo del efecto citotóxico de Doxorubicina HCl empleando el método de resazurina y el método de reducción de MTT para HeLa. ....	54
Figura 12A. Correlación entre MTT y resazurina para HEp-2.....	55
Figura 12B. Correlación entre MTT y resazurina para HT-29.....	55
Figura 12C. Correlación entre MTT y resazurina para HeLa.....	55
Figura 13. Efecto citotóxico de <i>X. discreta</i> y <i>P. hispidum</i> . ....	59
Figura 14A. Porcentajes de supervivencia después de un tiempo de recuperación para el extracto de <i>P. hispidum</i> ... ..	61
Figura 14B. Porcentajes de supervivencia después de un tiempo de recuperación para el extracto <i>X. discreta</i> . ....	61
Figura 15. Porcentajes de supervivencia después de un tiempo de recuperación de 24 horas para Doxorubicina HCl en HEp-2. ....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores obtenidos de la prueba estadística de Levene evaluando dos factores en cada línea celular.....	42
Tabla 2. Valores obtenidos de la prueba estadística de Shapiro-Wilk evaluando cada nivel de los factores valorados para cada línea celular....	42
Tabla 3. Resultados obtenidos de un análisis de varianza univariante con dos factores y su efecto combinado en tres líneas celulares.....	43
Tabla 4. Resultados obtenidos de la comparación de concentración y diferentes tiempos de incubación de resazurina valorando todas las posibles interacciones y su nivel de significancia. ....	44
Tabla 5. Resultados obtenidos de la comparación tiempo y diferentes concentraciones de resazurina valorando todas de todas las posibles interacciones y su nivel de significancia. ....	45
Tabla 6. Promedio de porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar tres compuestos sintéticos y doxorubicina HCl empleando dos métodos de tinción celular. ....	49
Tabla 7. Promedio de porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar tres compuestos sintéticos y doxorubicina HCl empleando dos métodos de tinción celular dos semanas después. ....	50
Tabla 8. Datos obtenidos de la prueba de Correlación de Pearson en cada línea celular. ....	54
Tabla 11. Promedio de porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar trece extractos etanólicos y doxorubicina HCl....	57

**ANEXOS**

Anexo 1. Tablas de resultados... ..70  
Anexo 2. Protocolo para el empleo del método de resazurina. ....88

## RESUMEN

En este trabajo se realizó una comparación del método de resazurina como indicador de medida indirecta de supervivencia celular con el método que se tiene disponible para la evaluación de actividad citotóxica: MTT, con el fin de evaluar la posibilidad de reemplazar su uso en los ensayos de citotoxicidad que realiza el grupo de Farmacogenética del Cáncer, y la capacidad de recuperación de las células después de someterlas a un tratamiento con xenobióticos. Los dos métodos (resazurina y MTT) arrojaron respuestas comparables bajo las condiciones evaluadas.

La comparación se efectuó a través de la valoración de citotoxicidad sobre tres líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos: HEp-2, HT-29 y HeLa evaluando tres compuestos sintéticos durante un periodo de tratamiento de 48 horas.

De igual manera, se evaluó la sensibilidad a Doxorubicina HCl, un agente antineoplásico en las tres líneas celulares empleadas. Los resultados obtenidos por los dos métodos revelaron un comportamiento semejante en las líneas celulares evaluadas.

Para comprobar las condiciones establecidas para el uso del método de tinción de resazurina, se valoraron trece extractos vegetales con actividad antiparasitaria sobre *Leishmania*. Se encontró que los extractos etanólicos totales de *Xilopia discreta* y *Piper hispidum* poseen actividad citotóxica sobre las líneas celulares empleadas. Hasta donde conocemos, es el primer reporte de actividad citotóxica para estas especies sobre líneas celulares tumorales.

## ABSTRACT

Implementation of the use of the resazurin assay was carried out as an indicator of indirect measurement of cellular survival comparing the available method to assess cytotoxic activity: MTT with the purpose of replacing the MTT method by Resazurin. This enables the possibility of evaluate cellular recovery after putting under them xenobiótic treatment. The results showed that there were not differences in response, derived form to the used method to evaluate viability and cellular survival post treatment.

The activity was assessed through cytotoxicity evaluation on three human solid tumour derived cell lines: HEp-2, HT-29 y HeLa evaluating three synthetic compounds for a 48 h period.

In the same way, doxorubicin HCl, an antineoplastic agent was evaluated on three cell lines. The results obtained in both methods (resazurin and MTT) reveals a similar model on the three cell lines.

In order to verify resazurin methodology was applicable on crude natural products cytotoxicity, thirteen non pure vegetal extracts with antiparasitic activity against Leishmania were tested on this cell lines. Potential antiproliferative activity on the used cell lines was found for *Xilopia discreta* and *Piper hispidum* finding that the experimental model is useful to assess vegetal origin substances. To our knowledge this is the first report of cytotoxic activity found in these species.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas tumorales, son comúnmente empleados diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de forma indirecta el número de células viables, luego de someterlas a tratamiento con diferentes concentraciones de un xenobiótico. La mayoría de éstos suelen ser de punto final mediante sistemas de tinción destructivos, lo cual impide seguir el comportamiento post tratamiento de las células.

Los métodos de reducción como el MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), XTT (2,2-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido) y resazurina requieren de células vivas o al menos de un funcionamiento mitocondrial para convertir el colorante precursor en un producto medible. El MTT y XTT, por otra parte, son reducidos tempranamente en procesos de la cadena respiratoria, fundamentalmente por la respiración y su flujo de electrones, así estos indicadores de viabilidad celular resultan intrínsecamente tóxicos, causando la muerte celular. En el caso de resazurina, este compuesto es reducido por respiración mitocondrial a su forma reducida resofurina que es fluorescente, por lo que se propone como un método más sensible que otros comúnmente empleados en ensayos de citotoxicidad como MTT y XTT; además de tener una baja toxicidad que permite prolongar el monitoreo de los cultivos celulares durante un tiempo de recuperación posterior al tratamiento.

El objetivo principal de este estudio, es comparar dos métodos de tinción celular (MTT y resazurina) como indicadores de citotoxicidad específica en diferentes líneas celulares. La implementación del uso de resazurina como herramienta de medida indirecta de supervivencia celular permitirá al Grupo de Farmacogenética de Cáncer de la Universidad Nacional de Colombia evaluar la capacidad de recuperación de las células después de someterlas a un tratamiento con xenobióticos.

## 2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Cultivos celulares

Los cultivos celulares son conjuntos de procedimientos técnicos, que tienen como objetivo principal mantener vivas las células animales fuera del organismo de donde provienen, por un tiempo que incluso puede superar el de la vida del animal de origen (Ezpeleta, 1998). El término es aplicado sin distinción para referirse a cultivo de tejidos, cultivo de células primarias y a líneas celulares establecidas (Freshney 2000).

Inicialmente, el cultivo celular fue diseñado como un método para evaluar el comportamiento típico de las células animales, sin la influencia de los cambios sistemáticos que se pueden presentar en el animal durante la homeóstasis normal o bajo las presiones de estrés que involucra un ensayo experimental (Freshney, 2000). Actualmente, este método otorga una serie de ventajas, de las cuales sobresalen la caracterización y homogeneidad de la muestra, ya que facilitan el aislamiento de las células sin transformar sus características fenotípicas obteniendo resultados uniformes (Putnam *et al*, 2002); igualmente permite el manejo de las condiciones fisicoquímicas del ambiente (pH, temperatura, humedad), microambiente (interacción célula-célula) y fisiológicas como son los elementos dispuestos en el medio de cultivo y otros nutrientes; es económica, ya que minimiza costos debido a que se requiere menor cantidad de materiales comparado con la cría y mantenimiento de animales experimentales (Putnam *et al*, 2002; Freshney 2000; Morgan y Darling 1995) y finalmente disminuye el uso de animales con fines experimentales acorde con el principio de las tres R's propuesto por Russell & Burch en Balls y colaboradores (1995) como un sistema para estimular el uso de metodologías alternativas que cumplan con los objetivos de Reducir, Refinar y Reemplazar el uso de animales de experimentación.

Es por ello, que los cultivos de células y tejidos han encontrado gran aplicabilidad en investigaciones encaminadas al análisis de actividad celular como ciclo celular, apoptosis, etc., adhesión celular, flujo intracelular expresado en señales de

transducción, inmunología e ingeniería de tejidos e incluso investigaciones del cáncer y virus entre otros (McDonald 1998).

## **2.2. Requerimientos básicos de cultivos celulares**

Los requerimientos generales de cultivo para líneas celulares son: un medio nutritivo, condiciones controladas de pH, temperatura y humedad y adición de antibióticos.

El medio de cultivo celular es seleccionado de acuerdo a los requerimientos específicos de cada línea celular; pero debe ser líquido, conteniendo alguna fuente de carbono (glucosa y glutamina generalmente), aminoácidos esenciales, iones y oligoelementos entre otros. Los factores de crecimiento son aportados por el suero fetal bovino (FBS) con el que generalmente es suplementado el medio. Igualmente los medios de cultivo contienen rojo de fenol como indicador de pH, que tiene como función permitir el monitoreo de esta variable (Freshney 2000). El medio mínimo esencial de Eagle (MEM) y el medio MEM Dulbecco han sido empleados satisfactoriamente en las tres líneas celulares a emplear (HeLa, HEp-2, HT-29) (Fricker *et al*, 1996; Keepers *et al*, 1991).

Las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de las células son un pH promedio 7,4; temperatura de 37° C, atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad relativa 100% que se logra cultivándolas en incubadora con suministro de CO<sub>2</sub>.

Así mismo, los cultivos pueden ser contaminados por bacterias, hongos, levaduras o micoplasma; para minimizar la posibilidad de contaminación es necesaria la aplicación de técnicas asépticas que implica el trabajo en cabina de flujo vertical, así como el empleo de material estéril y la adición de antibióticos como penicilina, gentamicina o estreptomycinina al medio de cultivo (Lieberman *et al*, 2001; Morgan & Darling 1995).

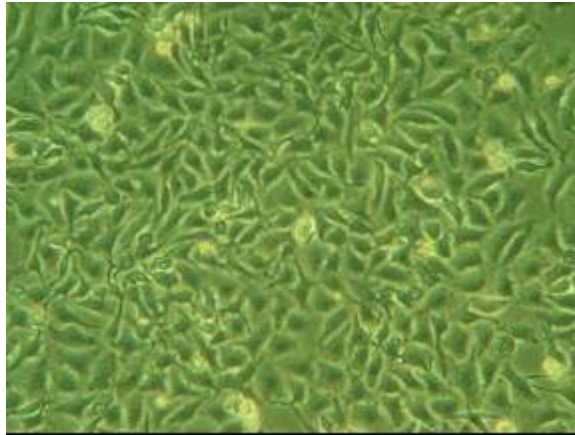
### **2.3. Líneas celulares empleadas**

El Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos para su programa de tamizaje preliminar de actividad anticáncer cuenta con un panel de más de 100 líneas celulares derivadas de tumores humanos, conformado por líneas de crecimiento en suspensión, y líneas adherentes, organizadas en grupos que representan leucemias, melanomas, cáncer de riñón, ovario, colon, pulmón y sistema nervioso central, con el fin de implementar nuevas investigaciones orientadas al descubrimiento de nuevas drogas promisorias con potencial actividad citotóxica y/o inhibitoria contra una amplia gama de tipos tumorales (NCI, 1998).

En este trabajo se emplearon tres líneas celulares derivadas de tumores sólidos provenientes de humanos, incluidas en el panel de líneas celulares que el Grupo de Farmacogenética del Cáncer emplea como modelo *in vitro* para realizar valoraciones de citotoxicidad (Cordero y Aristizábal, 2002; León y colaboradores, 2006; Morantes 2006), HEP-2, HT-29 y HeLa respectivamente; cuyas características se definen a continuación.

#### **2.3.1. HEP-2**

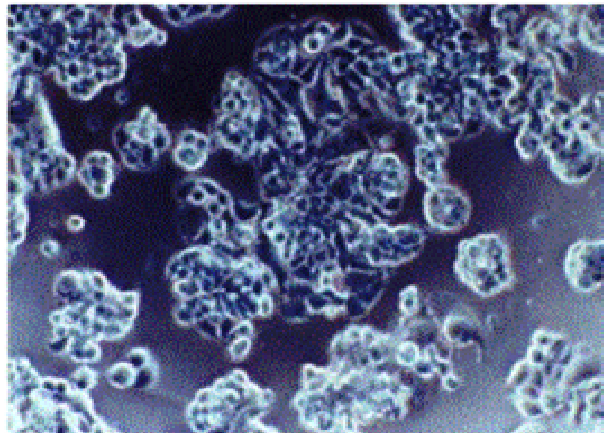
Línea celular establecida por A. Moore, L. Sabachewsky & H. Toolan (1952). Inicialmente se consideró como línea derivada de un carcinoma epidermoide de laringe. Sin embargo, por análisis de isoenzimas se determinó que esta línea pudo establecerse por contaminación con células de la línea HeLa; condición que se confirmó con la aparición de marcadores cromosomales de HeLa en el patrón de bandas G. HEP-2 muestra ser una línea resistente, pues logra conservar su viabilidad incluso por cambios en el ambiente, la temperatura o las condiciones nutricionales, es de crecimiento adherente y capaz de producir queratina (ATCC 2006).



**Figura No 1.** Células HEp-2 en cultivo (contraste de fase 20x)

### **2.3.2. HT-29**

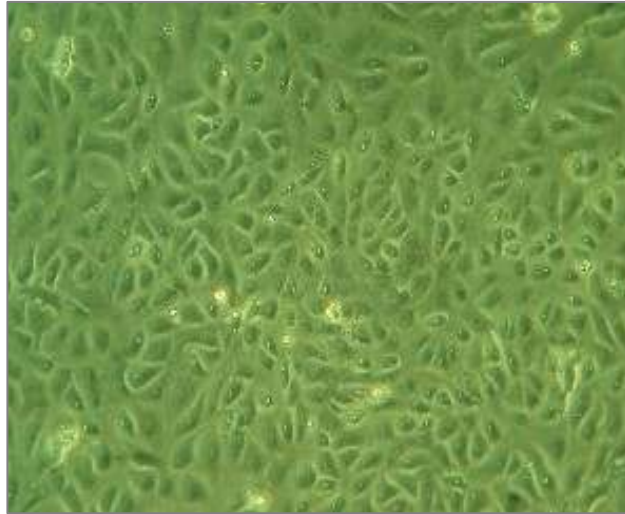
Línea celular caracterizada por J. Fogh, a partir de un adenocarcinoma colorectal. Sus células son de crecimiento adherente y de forma epitelial; en su estructura se diferencian microvellocidades, mitocondrias vacuolizadas con gránulos oscuros, retículo endoplasmático, pocos lisosomas primarios y muchos secundarios. Secreta el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la fracción secretoria de IgA. Es sensible a la infección con el virus HIV (ATCC 2006).



**Figura No 2.** Células HT-29 en cultivo (contraste de fase 20x)

### 2.3.3. HeLa

Línea celular de crecimiento adherente y de forma epitelial, derivada de un adenocarcinoma de cervix de origen humano; es capaz de producir queratina. Esta línea ha sido reportada por contener secuencias del virus papilloma 18 (HPV18) y niveles normales de pRB (retinoblastoma) (ATCC 2006).



**Figura No 3.** Células HeLa en cultivo (contraste de fase 20x)

### 2.4. Citotoxicidad *in vitro*

La toxicidad de un compuesto es una característica impredecible ya que puede actuar de diferente manera en especies o incluso en órganos específicos (Ponsoda *et al* 1995), es por ello que la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de un compuesto en varios tipos celulares puede ser de gran ayuda para determinar toxicidad potencial sobre individuos íntegros (toxicidad *in vivo*), ya sea para el empleo en fármacos y aditivos para alimentos donde debe demostrarse que no son tóxicos; o bien para ser usados como compuestos antiproliferativos cuya citotoxicidad en este caso es de valiosa importancia para su acción (Freshney 2000).

Los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia. Los ensayos de viabilidad se emplean para determinar el

porcentaje de células que inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas; mediante estos ensayos se puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento en términos de concentraciones letales para el 50% de la población ( $CL_{50}$ ) (Freshney 2000).

Por otro lado, los ensayos de supervivencia evalúan la capacidad de proliferación, después de un tratamiento. Estos involucran necesariamente un tiempo de recuperación post tratamiento para observar si el daño causado por el agente fue letal o no. Estos ensayos permiten evaluar el efecto citotóxico de un tratamiento en términos de concentraciones inhibitorias de crecimiento para el 50% de la población ( $IC_{50}$ ) (Freshney 2000; Fricker *et al*, 1996).

Por ello, en este trabajo se asumirá la concentración letal 50 ( $LC_{50}$ ) como la concentración de la sustancia de tratamiento que causa la muerte al 50 % de las células en cultivo, evaluadas inmediatamente después del tratamiento; y la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ), como la concentración de la sustancia de tratamiento que inhibe la proliferación del 50 % de las células tratadas posterior al tratamiento (Freshney 2000).

## **2.5. Métodos para la evaluación de citotoxicidad *in vitro***

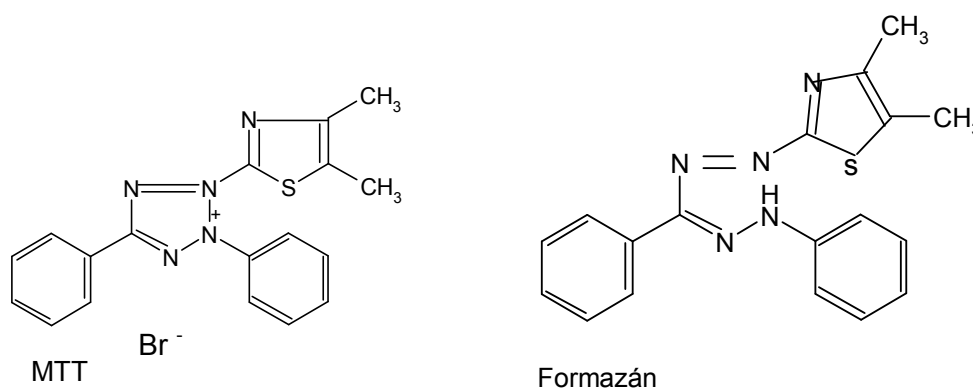
La prueba *in vitro* ideal para evaluar proliferación celular y citotoxicidad tiene como características ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la viabilidad celular y que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar (Anoopkumar-Dukie *et al* 2005); más aun, si el método es aplicable a técnicas de barrido o tamizaje de alta eficiencia (HTS) y las células pueden ser usadas para más experimentos; los investigadores habrán adquirido la herramienta perfecta (O'Brien *et al* 2000).

Diferentes métodos han figurado históricamente en los ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Primero, los colorantes químicos tales como cristal violeta y sulforodamina B, los cuales colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado.

Segundo, los detectores de liberación de componentes constitutivos celulares, midiendo actividades enzimáticas tales como lactato deshidrogenasa y finalmente aquellos que miden la función metabólica de las células usando sales de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro; MTS (3-[4,5,dimetiltiazol-2-yl]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4- sulfofenil]-2H-tetrazolio y XTT (23-bis-(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido)) los cuales por actividad mitocondrial al ser reducidos a formazán producen una intensa coloración (Slater 2001).

### 2.5.1. Reducción de MTT

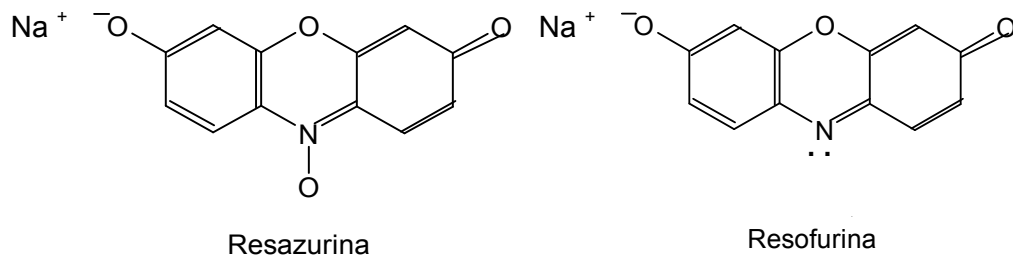
El ensayo de MTT está basado en la reducción metabólica de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) amarillo pálido, soluble en agua (Figura 1). Este colorante es reducido tempranamente, en células viables, por componentes de la cadena respiratoria a cristales de formazán (azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenadas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual resulta ser intrínsecamente tóxico para las células (Putnam *et al* 2002; Bernas & Dobrucki 2002). Fue desarrollado por Mosmann (1983) como método colorimétrico, cuantitativo, de microtitulación para la determinación de la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas, siendo preciso y rápido (Bellamy 1992).



**Figura No 4.** Conversión de MTT a cristales púrpuras de formazán por reducción

## 2.5.2. Tinción con Resazurina

La resazurina (azul no fluorescente) es reducida a resofurina (rosado altamente fluorescente) por oxidoreductasas que se encuentran en la mitocondria de células viables. La resofurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células humanas, animales, bacterias e incluso hongos (Rolón *et al* 2005; Zhang *et al* 2004; Palomino *et al* 2002; González & Tarloff 2001; Rasmussen 1999; Rasmussen & Nicolaisen 1999).



**Figura No 5.** Conversión de resazurina a resofurina por acción metabólica de células viables generando un producto fluorescente. La fluorescencia es directamente proporcional al número de células viables.

Este colorante es poco tóxico para las células, diferente a lo que ocurre en otras técnicas (MTT, Sulforodamina, XTT), lo cual permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además este método es muy sensible y altamente reproducible (Hamid *et al* 2004; Lieberman *et al* 2001).

Es posible obtener una medida de absorbancia a una longitud de onda de 570nm y/o fluorescencia en 530nm<sub>ex</sub> y 590nm<sub>em</sub>, ya que este colorante tiene propiedades tanto cromóforas como fluoróforas (Anoopkumar-Dukie *et al* 2005).

### 3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

#### 3.1. Formulación

En los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, son comúnmente empleados diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar el número de células viables. La mayoría de estos son destructivos lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático. Es por ello que es necesario implementar métodos no tóxicos para las células que permitan seguir su comportamiento post-tratamiento.

#### 3.2. Justificación

Los métodos tradicionales indicadores de viabilidad celular resultan intrínsecamente tóxicos, debido a la producción, al interior de la célula, de colorantes en forma de cristales no solubles en medio acuoso, lo cual limita continuar evaluando la conducta de las células después de ser expuestas a un xenobiótico antiproliferativo (McMillian et al. 2002).

Por el contrario, la versatilidad de la resazurina como método fluorométrico y colorimétrico para identificar viabilidad celular provee ciertas ventajas en comparación con otros métodos tradicionales. Primero su fácil manejo (Hamid, 2004), dado que el indicador es añadido directamente a las células en cultivo al terminar el periodo de incubación y no requiere de la manipulación de otros agentes. Segundo, la resazurina muestra muy baja toxicidad para las células y para el investigador (O'Brien et al. 2000). Tercero, el método no requiere de ningún tipo especial de manejo o la disposición de otros sistemas sofisticados de protección ya que es prácticamente inocuo y no es radioactiva. Cuarto, debido a su naturaleza homogénea, la resazurina puede ser adaptada a ensayos *in vitro* en gran escala. Quinto, investigaciones han destacado la gran sensibilidad del método de resazurina comparable con métodos como incorporación de timidina y ensayos de reducción de tetrazolio con el fin de medir proliferación y citotoxicidad celular (Nakayama et al. 1997). Por esto, el empleo de la resazurina puede ser un método promisorio y

eficiente para estudiar las condiciones de reacción en futuras aplicaciones relevantes como lo son el tamizaje de compuestos con potencial actividad anticáncer.

Es por esta razón que la implementación de un nuevo método de tinción celular poco tóxico, sensible y específico es crucial para valorar detalladamente no solo el efecto citotóxico de productos con potencial actividad anticáncer sobre células tumorales, sino el comportamiento de las células luego de someterlas a un tratamiento traumático permitiendo complementar los modelos que se tienen disponibles para la evaluación de actividad citotóxica mediante la determinación de la capacidad proliferativa de las células después de un tratamiento citotóxico como el presentado por extractos de las especies vegetales *Acnitus arborescens*, *Anarcadium giganteum* y *Piper aducum* evaluados previamente por el grupo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Comparar el método de resazurina con el método de reducción del MTT como sistemas de medida indirecta de masa celular en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales.

### 4.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones óptimas para la aplicación del método de resazurina como medida indirecta de masa celular en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales.
- Comparar las respuestas obtenidas *in vitro* por los métodos de reducción de resazurina y MTT al medir la citotoxicidad de tres compuestos sintéticos y un antineoplásico reconocido.
- Evaluar la capacidad de recuperación de las células tumorales posterior al tratamiento con diferentes extractos vegetales.

## 5. HIPÓTESIS

Ho: Las respuestas obtenidas a partir de dos ensayos de valoración de citotoxicidad no difieren según el sistema de tinción celular empleado (resazurina o MTT) para evaluar la viabilidad y supervivencia celular post-tratamiento.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Diseño**

#### **6.1.1. Factor de diseño**

Estudio de conformidad para evaluar la correlación de los resultados obtenidos a partir de los dos métodos de conteo celular indirecto (MTT y resazurina) para la detección del efecto citotóxico de extractos, fracciones o compuestos puros de cualquier origen sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos, en la búsqueda de agentes antineoplásicos potenciales.

#### **6.1.2. Variable de respuesta**

- Porcentajes de supervivencia obtenidos en los ensayos de citotoxicidad.

#### **6.1.3. Unidad de respuesta**

- Absorbancia promedio (a una longitud de onda de 570 nm) de pozos de tratamiento, blancos de tratamiento, control de crecimiento y blanco.
- Fluorescencia promedio (a una longitud de onda de 535nm<sub>em</sub> y 595nm<sub>ex</sub>) de pozos de tratamiento, blancos de tratamiento, control de crecimiento y blanco.

#### **6.1.4. Unidad de muestreo**

- Cada uno de los 96 pozos de las placas de microtitulación.

### **6.2. Población de estudio y Material biológico**

La población de estudio estuvo constituida por líneas celulares adherentes derivadas de tumores humanos sólidos (HEp-2, HT-29 y HeLa), las cuales fueron proporcionadas por el Instituto de Cancerología de Colombia al grupo de Farmacogenética del Cáncer de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

En el siguiente trabajo se emplearon tres líneas celulares derivadas de tumores sólidos provenientes de humanos. Se dispuso de viales con alícuotas celulares en concentración aproximadamente de  $5 \times 10^6$  células / mL, de tres líneas celulares derivadas de tumores humanos de diferentes orígenes, HeLa (adenocarcinoma de cérvix), Hep-2 (carcinoma de laringe) y HT-29 (Adenocarcinoma colorectal), con un número de pases máximo 30 suministradas por el laboratorio de Ensayos Farmacológicos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá.

### **6.3. Variables de estudio**

#### **6.3.1. Variable independiente**

- Concentraciones de Compuestos sintéticos (10, 1 y 0,1) expresadas en  $\mu\text{M}$ .
- Concentraciones de Extractos vegetales (5, 1 y 0,5) expresadas en  $\mu\text{g/mL}$ .
- Concentraciones de Doxorrubicina HCl (10, 1 y 0,1) expresadas en  $\mu\text{M}$ .

#### **6.3.2. Variable dependiente**

- Porcentajes de supervivencia celular estimados por valores de absorbancia medidos a una longitud de onda de 570 nm en espectrofotómetro.
- Porcentajes de supervivencia celular estimados por valores de fluorescencia medidos a una longitud de onda de de  $535\text{nm}_{\text{em}}$  y  $595\text{nm}_{\text{ex}}$  en espectrofluorómetro.

### **6.4. Materiales y Métodos**

#### **6.4.1. Manejo general de cultivos celulares** (Freshney, 2000; Ezpeleta, 1998)

Las tres líneas fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial (MEM) suplementado al 5% de suero fetal bovino (FBS) y 50 µg/mL de gentamicina, en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> estériles e incubados en condiciones estándar (5% CO<sub>2</sub> en el aire, 37 C y 100% de humedad relativa) (Cordero y Aristizábal 2002).

Para el mantenimiento de los cultivos se realizó un cambio de medio cada dos días lavando las células con solución de buffer de fosfatos (PBS) de 149,2 mM y pH= 7,3 hasta que la confluencia de las células fuera de un 90%.

##### **6.4.1.1. Tripsinización**

En el momento de transferir las células de los frascos de cultivo a las placas de microtitulación, para lograr el desprendimiento de las células y facilitar la suspensión celular que se emplea en el conteo celular; se empleó una solución de tripsina al 0,025% v/v-EDTA 0,03% v/v (Ácido etilendiamino tetracético) que se dejó actuar en las células durante 5 minutos en incubadora a 37<sup>0</sup>C. El volumen de solución a emplear fue de 5 a 10 ml, dependiendo del área superficial del frasco de cultivo. Esta solución actúa como quelante de iones de Ca<sup>+2</sup>; principal ion involucrado en el mecanismo de unión celular y como agente proteolítico (tripsina) de las proteínas de la matriz extracelular.

##### **6.4.1.2. Conteo y comprobación de viabilidad**

Tomando una alícuota de 5µL de la suspensión obtenida en el método de tripsinización; se llevó a cabo una tinción con azul de Trypan al 4% y se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer al microscopio. Así fue posible diferenciar las células viables de las que no lo eran, ya que este tinte solo permea la membrana de las células muertas y se cuentan las células viables que permanecen translúcidas.

#### **6.4.1.3. Criopreservación**

Con el fin de mantener reservas de células viables, se tomó la suspensión celular obtenida a partir de la tripsinización de cultivos de crecimiento, se concentró por centrifugación y se resuspendió en una mezcla que contenía 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 40% de suero fetal bovino (FBS) y 50% de MEM a una concentración mínima de  $5 \times 10^6$  células / mL. Este vial se llevó al congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  y pasadas 24 horas se transfirió al contenedor de nitrógeno líquido a  $-180^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.4.2. Establecimiento de los parámetros para la aplicación del método de resazurina.**

Para la aplicación del ensayo de tinción basado en resazurina se consideraron los siguientes parámetros:

- Concentración de resazurina

En literatura consultada se encuentran descritos diferentes protocolos, todos basados en los establecidos por Pagé (1993), O'Brien y colaboradores (2000) y Magnani & Bettini (2000), donde la resazurina se adicionó a los pozos en una concentración final de 10% v/v a partir de una solución inicial de  $44 \mu\text{M}$ . Estudios realizados por Martin y colaboradores (2003) reportaron utilizar 20% v/v de la misma concentración inicial. Por esta razón se evaluarán paralelamente tres porcentajes volumen a volumen (10%, 15% y 20%) de la misma concentración inicial con el fin de determinar a que porcentaje de volumen se encuentra la mejor linealidad entre el número de células y la intensidad de fluorescencia generada.

- Tiempo de Incubación y densidades celulares

En algunos protocolos descritos, las placas fueron incubadas con la solución de resazurina por 4h a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  en el aire y 100% de humedad. Sin embargo,

Nakayama y colaboradores (1997), reportaron tiempos de incubación que van desde 1 hora hasta 6 horas para algunas líneas celulares tumorales de tipo adherente. Por ello, se evaluaron diferentes tiempos de incubación (1, 4 y 6 horas) para establecer el periodo mínimo requerido para una óptima incorporación de la resazurina por las células. De igual forma, con el fin de realizar un seguimiento detallado de la reducción de resazurina a resofurina y posteriormente a dihidroresofurina, se evaluaron diferentes tiempos de incubación (1, 4, 6, 24, 48, y 72 horas).

Las densidades celulares a inocular fueron las implementadas para el método de MTT en el estudio de Cordero y Aristizábal (2002). Para HEp-2: 7500 células/pozo; para HT-29: 15000 células/pozo y para HeLa: 10000 células/pozo, en un volumen de 100  $\mu$ L por pozo.

- Método de lectura

Dada la versatilidad del método para ser leído en absorbancia o fluorescencia, en este trabajo se tomó la medida de fluorescencia empleando las longitudes de onda de 535nm<sub>ex</sub> y 595nm<sub>em</sub> en un lector TECAN GENios (Anoopkumar-Dukie *et al.* 2005). Así mismo, se emplearon placas de microtitulación de 96 pozos transparentes, de fondo plano donde se realizó la lectura en 100  $\mu$ L de medio sin suplementar.

### **6.4.3. Selección de los parámetros para los métodos de tinción celular**

#### **6.4.3.1. Aplicación de parámetros de resazurina**

Para establecer el efecto de la intensidad de fluorescencia evaluando diferentes concentraciones del colorante incorporado y tiempos de incubación para las tres líneas celulares, se inocularon en placas de cultivo de fondo plano, de 96 pozos transparentes con 100  $\mu$ L de medio suplementado al 5% SFB y 50 $\mu$ g de gentamicina, las siguientes densidades celulares: para HEp-2: 7500 células/pozo; para HT-29: 15000 células/pozo y para HeLa: 10000 células/pozo. Cada dilución

celular se inoculó por triplicado. Para garantizar la adherencia de las células a la placa de cultivo; se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en el aire durante 24 h. Después de cumplido el tiempo de incubación, se lavaron con 100 µL de solución PBS con el fin de impedir cualquier interferencia de las proteínas provenientes del suero en la disolución final. La resazurina se preparó a una concentración de 44 µM evaluando tres diferentes diluciones (10%, 15% y 20% v/v) con medio sin suplementar en un volumen final por pozo de 100µL (Magnani & Bettini 2000).

Finalmente las placas de cultivo se incubaron en condiciones estándar y fueron leídas después de 1, 4 y 6 horas de incubación con la resazurina (Nakayama *et al.* 1997). Igualmente para evaluar la reducción de resazurina a resofurina y seguidamente a dihidroresofurina, así como la estabilidad relativa, contra el tiempo de fluorescencia y concentración de colorante, se realizaron valoraciones en periodos de incubación de 1, 4, 6, 24, 48 y 72 horas.

#### **6.4.3.2. Aplicación de parámetros de MTT**

Para el caso de reducción con MTT, los rangos de linealidad de la relación absorbancia y número celular para las líneas celulares empleadas fueron previamente evaluados en el estudio de Cordero y Aristizábal (2002); en éste, se establecieron las densidades celulares a inocular para un tratamiento de tiempo de duración de 48 horas.

Aunque se encontraron descritos diferentes protocolos, todos basados en el establecido por Mossman en 1983; se emplearon las condiciones utilizadas por el grupo de Farmacogenética del Cáncer en las valoraciones de citotoxicidad (Cordero y Aristizábal, 2002). Se preparó una solución de MTT diluida en PBS (1mg/mL) y se adicionó 0,25mg/mL por pozo a medio de cultivo sin suplementar, según trabajos realizados por Scudiero *et al* (1988) y Ezpeleta (1988) y utilizando las mismas líneas celulares de Cordero y Aristizábal (2002). Las placas se incubaron con la solución MTT por 4 horas a 37°C; periodo descrito como el mínimo tiempo requerido para la máxima formación de cristales de formazán (Freshney 2000; Fricker *et al* 1996). Las

densidades celulares inoculadas por pozo, fueron las implementadas para este método por Cordero y Aristizábal (2002). Para HEp-2: 7500 células/pozo; para HT-29: 15000 células/pozo y para HeLa: 10000 células/pozo.

Las placas fueron leídas en el lector de placas BIORAD 550 a una longitud de onda de 570nm y con un filtro de referencia de 690nm; con un volumen final por pozo de 100  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfoxido).

#### **6.4.4. Comparación entre los dos métodos de tinción celular**

Una vez conocida la concentración óptima y su tiempo de incubación para la tinción con resazurina y teniendo establecidos los parámetros de MTT, se trataron paralelamente placas semejantes, que fueron sometidas a tinción con resazurina o con MTT.

Para ello, se inocularon por triplicado las densidades celulares establecidas para cada línea celular en 100  $\mu$ L de MEM suplementado que fueron incubadas 24 horas para permitir la adhesión celular. Para valorar el efecto citotóxico de tres compuestos sintéticos: Urotropina, TATD (Simkins & Wright, 1955) TATu (Rivera *et al*, 2004) y un agente antineoplásico reconocido: doxorubicina HCl (doxo), se prepararon tres diluciones seriadas en relación de 1:10 de cada uno de los tratamientos en medio MEM suplementado con 5% de FBS, obteniendo las siguientes concentraciones finales: 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M (León *et al* 2006); cada pozo fue tratado con 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones tanto de los compuestos o de doxo, dejando un grupo de pozos no tratado como control de crecimiento y un grupo de pozos sin células de blanco de tratamiento. Después del tratamiento de 48 horas paralelamente se determinó la población celular viable mediante los ensayos con MTT y resazurina.

Un estudio realizado por Bugelski y colaboradores (2000) reportó que para un tamizaje preliminar, 10  $\mu$ M es un valor de referencia para compuestos puros con

potencial actividad anticáncer y por eso se empleó como máxima concentración a evaluar.

Los resultados comparados fueron los porcentajes de supervivencia de los cuales se infirió que tanto variaron las respuestas en función del método de tinción celular.

#### **6.4.4.1. Tinción de resazurina**

Para cuantificar el efecto citotóxico de los tratamientos se empleó la prueba fluorométrica de resazurina. Transcurridas las 48 horas de inoculado el tratamiento sobre las células se extrajo el medio de cultivo con tratamiento y se lavaron los pozos con PBS, posteriormente, se adicionaron 100µL por pozo de medio MEM sin suplementar con la dilución de resazurina previamente seleccionada a un tiempo de incubación anteriormente establecido. Cumplido el tiempo de incubación las placas fueron leídas en el espectrofluorómetro TECAN.

#### **6.4.4.2. Reducción de MTT**

Para cuantificar el efecto antiproliferativo de los tratamientos, se empleó el método de reducción de MTT. Cumplidas las horas de tratamiento, las microplacas de cultivo se lavaron con PBS ya que las proteínas provenientes del suero pueden interferir en la dilución final del formazán (Denizot, 1986). Posteriormente se añadieron 100µL de MTT en concentración 0,25mg/mL en medio sin suplementar; las placas fueron incubadas por 4 horas en condiciones estándar. Luego del tiempo de incubación se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 100µl de DMSO con el fin de disolver el formazán, producto del metabolismo de MTT. Las placas de cultivo se agitaron por 5 minutos y la absorbancia a 570nm fue leída con un filtro de referencia de 690nm para reducir el background, en un lector de placas BIORAD 550. Los valores resultantes fueron tomados como medida indirecta de masa celular viable.

#### **6.4.5. Evaluación de la citotoxicidad de extractos etanólicos vegetales**

Para cuantificar el efecto citotóxico de trece extractos de origen vegetal con demostrada actividad antiparasitaria *in vitro* sobre Leishmania, se empleó la prueba fluorométrica de resazurina anteriormente establecida en las líneas celulares.

La evaluación se realizó con un periodo de tratamiento de 48 horas, empleando tres concentraciones de tratamiento: 5, 1 y 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .; aunque, según lo sugieren otros grupos, el valor de referencia para extractos es de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Mans, *et al*, 2000), para estos extractos se empleo esta concentración máxima debido a que se tenían reportes previos de actividad leishmanicida a concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  y además debido a que se dispuso de poca cantidad de muestra.

Se empleó el método de igual forma que en el diseño utilizado en el tratamiento doxorubicina y compuestos sintéticos. Finalmente, gracias a que el método basado en la reducción de resazurina es poco tóxico, después de la lectura se lavaron las microplacas con PBS y se adicionó por pozo 100 $\mu\text{L}$  de medio MEM suplementado llevándolas a incubar por 24 horas para evaluar la capacidad proliferativa de las células después del tratamiento traumático. Después de esta incubación nuevamente se midió la población celular empleando este mismo método.

#### **6.4.6. Expresión de resultados**

La variable de respuesta para cada ensayo fue expresada en porcentaje de supervivencia obtenido en los ensayos de citotoxicidad.

Después de la lectura de cada una de las placas del método de resazurina, el valor de la fluorescencia obtenido para cada pozo de ensayo ( $F_{\text{tto}}$ ), se restó de la fluorescencia obtenida en el blanco de tratamiento ( $F_{\text{bt}}$ ) y se dividió posteriormente por la diferencia de la fluorescencia de control ( $F_{\text{c}}$ ) y la fluorescencia obtenida de las células de control de crecimiento ( $F_{\text{bc}}$ ), dando como cálculo el porcentaje de supervivencia o viabilidad de las células.

$$\% \text{ de supervivencia} = [(F \text{ tto} - F \text{ bt}) / (F \text{ c} - F \text{ bc})] \times 100$$

Así mismo el porcentaje de supervivencia obtenido con el método de reducción de MTT se obtuvo de la siguiente manera:

$$\% \text{ de supervivencia} = [(A \text{ tto} - A \text{ bt}) / (A \text{ c} - A \text{ bc})] \times 100$$

Donde:

A tto: Absorbancia promedio de pozos de tratamiento (Medio+células+tratamiento).

A bt: Absorbancia promedio de blancos de tratamiento (Medio+tratamiento sin células).

A c: Absorbancia promedio control de crecimiento (Medio+células sin tratamiento).

A bc: Absorbancia promedio blanco (Medio sin tratamiento sin células).

Para evaluar la recuperación celular después de un tratamiento traumático; luego de la lectura de cada una de las placas empleando el método de resazurina, el valor de la fluorescencia obtenido para cada pozo de tratamiento (F<sub>tto</sub>), se restó de la fluorescencia obtenida en el blanco de tratamiento (F<sub>bt</sub>) y se dividió por la diferencia de la fluorescencia control obtenida a las en el periodo de tratamiento de 48 horas (F<sub>c 48h</sub>), con el fin de evitar tomar las fluorescencias obtenidas de controles confluentes después de 72 horas de inoculadas las células; y la fluorescencia obtenida de las células de control de crecimiento (F<sub>bc</sub>), dando como cálculo el porcentaje de supervivencia o viabilidad de las células.

$$\% \text{ de supervivencia} = [(F \text{ tto} - F \text{ bt}) / (F \text{ c} (48\text{h}) - F \text{ bc})] \times 100$$

## 6.5. Recolección de la información

Para ello se requerirá de una búsqueda exhaustiva de bibliografía asociada al tema; así mismo se llevarán a cabo las actividades de laboratorio siguiendo los procedimientos operativos estandarizados para el manejo de cultivos celulares y valoración de citotoxicidad *in vitro* propuesto por Cordero y Aristizábal (2002) y Cordero y colaboradores (2004).

## **6.6. Análisis de información**

Ya que los datos obtenidos provinieron de métodos que generaron una medida indirecta de la población; para establecer el tiempo de incubación y la concentración inicial mínima requerida de resazurina se aplicó una prueba de análisis de varianza ANOVA univariante y posteriormente una prueba post hoc que permite determinar de forma más específica las diferencias cuando hay diferentes niveles en las variables. De igual forma, para establecer las diferencias de respuesta para los dos métodos de viabilidad celular y así indicar si los métodos proveen resultados comparables se aplicó una prueba t de muestras independientes y correlación de Pearson, empleando el programa estadístico SPSS (Statistical Product for Service Solutions) versión 13.0 para Windows. Los resultados del establecimiento de parámetros de resazurina y la actividad citotóxica de los tratamientos sobre el panel de líneas se analizaron empleando un análisis de varianza (ANOVA) para establecer la influencia de los factores de tratamiento y línea celular.

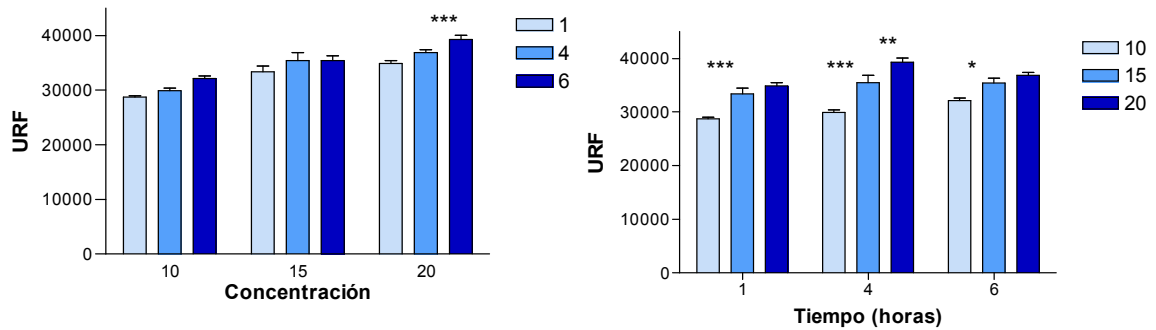
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Selección de parámetros para la aplicación del método de tinción con resazurina.

Con el fin de establecer el tiempo de incubación y la concentración inicial mínima requerida de resazurina para realizar la lectura de viabilidad celular en las tres líneas celulares evaluadas, se realizaron tratamientos paralelos de placas semejantes con las concentraciones de 10%, 15% y 20% volumen/volumen evaluadas a diferentes tiempos.

Los resultados obtenidos mostraron que para las tres líneas celulares HEP-2, HT-29 y HeLa, la intensidad de fluorescencia, medida en unidades relativas de fluorescencia, aumentó a medida que se incrementaron el tiempo de incubación y la concentración de resazurina (Figura 6, 7, 8). Los valores de intensidad de fluorescencia en todos los tratamientos fluctuaron entre 18000 y 45000 URF aproximadamente.

Para HEP-2, la diferencia de intensidad de fluorescencia medida como URF mostró un incremento pausado al aumentar la concentración de colorante, la diferencia más notoria se presentó al comparar la intensidad de fluorescencia entre la primera concentración y la última donde se presentó un incremento de 4000 URF (Figura 6 A). La intensidad de fluorescencia aumentó significativamente con relación al tiempo de medición, sin embargo, las diferencias fueron mínimas al comparar las concentraciones de 15 y 20% medidas a una y seis horas de inoculado en colorante (Figura 6 B).

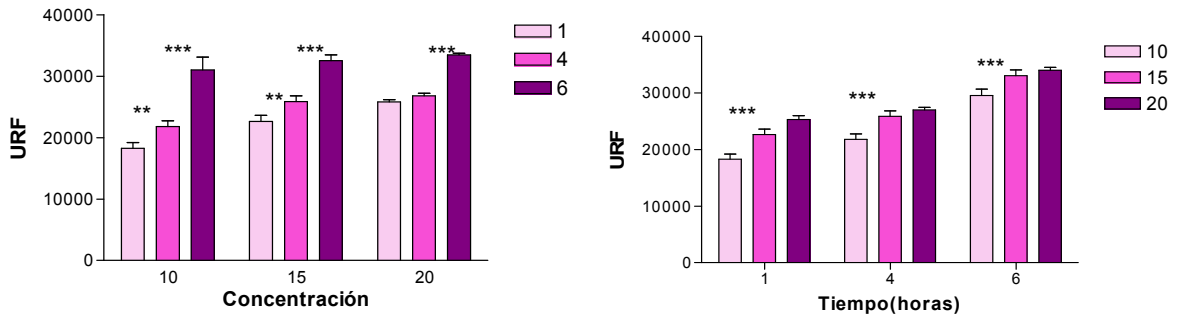


**A.**

**B.**

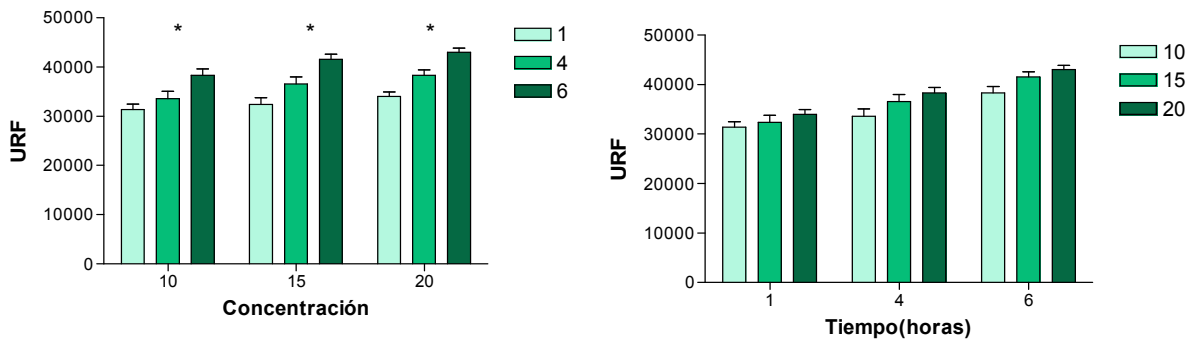
**Figura No 6.** Efecto de la concentración y tiempo de incubación de resazurina sobre la intensidad de fluorescencia medida en URF (unidades relativas de fluorescencia) para HEp-2,  $\alpha=0.05$  y  $\pm 1$  desviación típica. \* =  $P > 0.05$ ; \*\* =  $P > 0.01$ ; \*\*\* =  $P > 0.001$ .

La intensidad de fluorescencia para la línea HT-29 se mantuvo en un intervalo entre 18000 y 35000 URF (Figura 7 A y B). El mayor cambio de URF se observó a la última concentración evaluada, aumentando 5000 URF aproximadamente con respecto a la cuarta hora de incubado el colorante y 8000 URF con respecto a la primera hora de medición; contrario a lo observado empleando concentraciones de 10 y 15% de resazurina en la primera hora y cuarta donde las diferencias fueron mínimas; aproximadamente 2500 URF (Figura 7 A). Respecto al tiempo de incubación, se observó el incremento paulatino de la intensidad de fluorescencia para cada concentración de resazurina inoculada (Figura 7 B) Esto muestra que con esta línea celular, para obtener los mismos valores de intensidad de fluorescencia, es necesario establecer un tiempo de incubación mayor que en las otras líneas empleadas.



**Figura No 7.** Efecto de la concentración y tiempo de incubación de resazurina sobre la intensidad de fluorescencia medida en URF (unidades relativas de fluorescencia) para HT-29,  $\alpha=0.05$  y  $\pm 1$  desviación típica \* =  $P>0.05$ ; \*\* =  $P>0.01$ ; \*\*\* =  $P>0.001$ .

HeLa mostró tener cambios no muy significativos de la intensidad de fluorescencia valorando ambos factores independientemente (Figura 8 A y B), siendo esto muy similar a lo observado en la línea celular HEP-2, determinado así como línea patrón a HT-29, para establecer el tiempo de incubación y la concentración inicial mínima requerida de resazurina, por ser en que la respuesta de intensidad de fluorescencia se observó más afectada por las variables evaluadas.



**Figura No 8.** Efecto de la concentración y tiempo de incubación de resazurina sobre la intensidad de fluorescencia medida en URF (unidades relativas de fluorescencia) para HeLa,  $\alpha=0.05$  y  $\pm 1$  desviación típica \* =  $P>0.05$ ; \*\* =  $P>0.01$ ; \*\*\* =  $P>0.001$ .

De igual manera, para contrastar estadísticamente la hipótesis nula de los efectos del tiempo de incubación y la concentración de resazurina simultáneamente sobre la intensidad de fluorescencia, única variable dependiente; se realizó un análisis de varianza univariante con varios factores. Para su aplicación previamente se verificó el supuesto de homogeneidad de varianzas empleando la prueba de Levene mostrando que para ambos factores evaluados las varianzas son iguales,  $P > 0.005$  (Tabla1); así mismo, para comprobar el supuesto de normalidad se manejó la prueba de Shapiro Wilk el cual reveló que los datos se ajustaron a una distribución normal,  $p > 0.005$  confirmando el cumplimiento del supuesto (Tabla 2). Estas pruebas estadísticas fueron realizadas para el conjunto de datos de cada línea celular.

**Tabla No 1.** Valores obtenidos de la prueba estadística de Levene evaluando dos factores en cada línea celular.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas					
	Factores	Estadístico de Levene	gl1	gl2	P
HEp 2	Tiempo	0,174	2	51	0,841
	Concentración	0,634	2	51	0,535
HT-29	Tiempo	1,142	2	51	0,327
	Concentración	1,475	2	51	0,238
HeLa	Tiempo	0,720	2	51	0,492
	Concentración	0,387	2	51	0,681

**Tabla No 2.** Valores obtenidos de la prueba estadística de Shapiro-Wilk valorando cada nivel de los factores evaluados para cada línea celular.

Prueba de Normalidad								
Línea Celular	Hora	Estadístico	gl	P	Concentración	Estadístico	gl	P
HEp-2	1	0,948	18	0,390	10	0,949	18	0,404
	4	0,966	18	0,727	15	0,910	18	0,086
	6	0,916	18	0,110	20	0,956	18	0,526
HT-29	1	0,915	18	0,103	10	0,918	18	0,117
	4	0,950	18	0,421	15	0,962	18	0,638
	6	0,963	18	0,654	20	0,819	18	0,053
HeLa	1	0,936	18	0,244	10	0,967	18	0,746
	4	0,933	18	0,221	15	0,966	18	0,725
	6	0,938	18	0,267	20	0,949	18	0,410

Los resultados obtenidos del ANOVA univariante mostraron que la interacción entre las variables concentración de resazurina y el tiempo de incubación no tuvo efecto sobre la intensidad de fluorescencia en cada línea celular; sin embargo, cada uno de los factores por separado ejerce un efecto en esta variable dependiente (Tabla 3).

Los valores de F calculados fueron superiores al valor de F tabulado para los grados de libertad correspondientes en el caso de las variables independientes;  $F_{2,45} = 3,23$ ; mientras que para el efecto combinado entre el tiempo de incubación y la concentración del colorante, el valor de F calculado es inferior al valor de F tabulado  $F_{4,45} = 2,61$ .

**Tabla No 3.** Resultados obtenidos de un análisis de varianza univariante con dos factores y su efecto combinado en tres líneas celulares.  $\alpha = 0,05$

	gl	HEp-2		HT-29		HeLa	
		F	P	F	P	F	P
Tiempo	2	10,07	3,70E-05	106,2	1,01E-15	36,1	4,43E-10
Concentración	2	56,18	5,80E-13	32	9,23E-07	8,38	0,001
Tiempo * Concentración	4	2,36	0,45	0,62	0,15	0,33	0,85
Modelo corregido	8	17,74	1,30E-11	26,15	1,68E-14	11,24	1,35E-08
Residual	45						

Como los resultados de la prueba estadística ANOVA sugirieron algún efecto de las variables concentración y tiempo sobre la intensidad de fluorescencia, se realizó una prueba de comparación múltiple: Bonferroni. Esta prueba permite determinar de forma más específica, cuando hay más de dos niveles de factor, entre que niveles hay diferencia y entre cuales no, controlando el error ya que se divide la significación entre el número de comparaciones. Para realizar la prueba se asumió una igualdad de varianzas y se trabajó con un nivel de significación de 0,05. (Tabla 4).

Los resultados de la comparación por la prueba de Bonferroni realizada para la variable de tiempo de incubación coincidieron con los resultados obtenidos anteriormente de la interpretación de las gráficas.

**Tabla No 4.** Resultados obtenidos de la comparación de concentración y diferentes tiempos de incubación valorando todas las posibles interacciones y su nivel de significancia utilizando la prueba post hoc Bonferroni. NS= no significancia; \* = >0.05; \*\* = P>0.01; \*\*\* = P>0.001.

Concentración	HEp-2			HT-29			HeLa		
	Tiempo								
	1 vs 4	1 vs 6	4 vs 6	1 vs 4	1 vs 6	4 vs 6	1 vs 4	1 vs 6	4 vs 6
10	ns	*	ns	*	***	***	ns	***	*
15	ns	ns	ns	ns	***	***	ns	***	*
20	ns	***	ns	ns	***	***	*	***	*

Para la línea celular HEp-2 se observó que no existe diferencia en el tiempo de incubación del colorantes, ya sea a la hora a las cuatro o las sexta hora, solo se observó una diferencia de intensidad de fluorescencia al tomar una concentración de resazurina al 20% y evaluar los niveles de una hora y seis horas. En HT-29, al contrastar la primera hora y la cuarta hora no se encontraron diferencias notables, sin embargo, el cambio de intensidad de fluorescencia para esta línea celular estuvo entre la cuarta y sexta hora; Así mismo, al contrastar la primera hora de incubación con la cuarta no se encontraron notables diferencias en HeLa y poco notables al comparar la cuarta hora con la sexta; las mayores diferencias se observaron en las líneas HT-29 y HeLa al discrepar específicamente la primera hora y la sexta; los niveles de significancia fueron menores de 0.0001.

Finalmente, el aumento del tiempo mejoró considerablemente la intensidad de fluorescencia en las líneas HT-29 y HeLa obteniendo así que la línea para la cual más diferencias se observaron con los parámetros evaluados fue HT-29 seguida de HeLa y con pocas diferencias en HEp-2.

Con respecto al efecto de concentración de resazurina incorporada (Tabla 5), se encontró que para la línea HEP-2, al incrementar la concentración de 10% a 15% hubo un aumento en la intensidad de fluorescencia, sin embargo, al aumentar la concentración de resazurina a 20% el aumento no fue considerablemente significativo, lo que muestra que esta línea celular puede ser manejada a concentraciones de resazurina 10% y/o 15% en cualquier tiempo.

Para la línea HT-29, el comportamiento de la intensidad de fluorescencia al evaluar diferentes concentraciones de resazurina fue similar al de Hep-2, solo que la diferencia entre los tratamientos de 10% y 15% fueron menos significantes.

En HeLa, las diferencias observadas fueron incluso menos significativas que las reflejadas en las líneas celulares anteriores, lo que indica que a cualquier concentración, de las tres evaluadas, es adecuada para un ensayo de rutina.

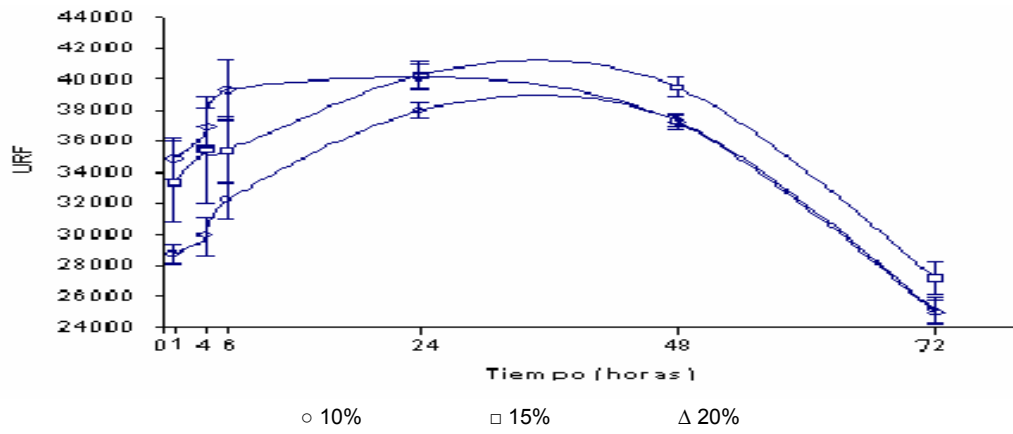
La mayor diferencia encontrada se presentó al comparar las concentraciones 10 y 20% de resazurina en todas las horas de incubación en las líneas HEP-2 y HT-29. La línea HeLa no presentó ningún cambio.

**Tabla No 5.** Resultados obtenidos de la comparación tiempo y diferentes concentraciones de resazurina valorando todas de todas las posibles interacciones y su nivel de significancia utilizando la prueba post hoc Bonferroni. NS= no significancia; \* =  $P > 0.05$ ; \*\* =  $P > 0.01$ ; \*\*\* =  $P > 0.001$ .

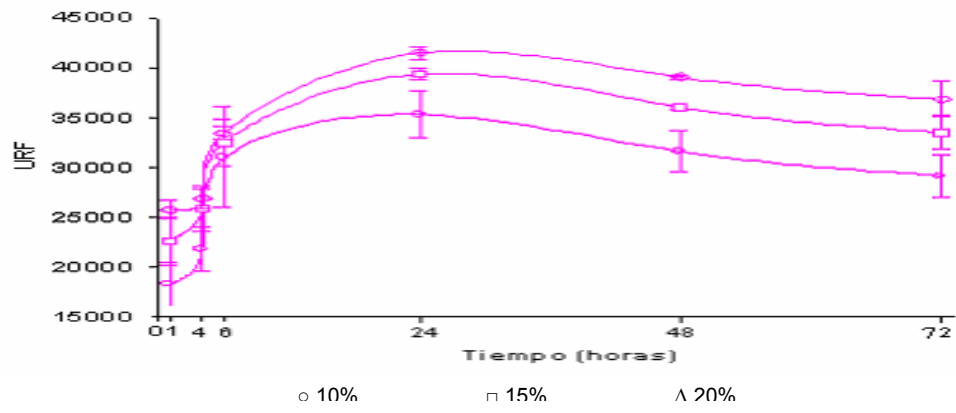
Tiempo	HEP-2			HT-29			HeLa		
	Concentración								
	10 vs 15	10 vs 20	15 vs 20	10 vs 15	10 vs 20	15 vs 20	10 vs 15	10 vs 20	15 vs 20
1	***	***	ns	**	***	ns	ns	ns	ns
4	***	***	**	**	***	ns	ns	*	ns
6	*	***	ns	*	**	ns	ns	*	ns

Así, con base en los resultados descriptivos y estadísticos obtenidos en este experimento, se seleccionaron como condiciones mínimas requeridas para la medición de viabilidad celular en las tres líneas celulares evaluadas: una dilución al 10% v/v de una solución de resazurina al 44 uM inoculados por pozo, ya que para todas las líneas valoradas, esta concentración presentó una buena respuesta; y un tiempo de incubación de cuatro horas en condiciones de 37° C, CO<sub>2</sub> en el aire y 100% de humedad. El periodo óptimo de incubación puede variar de una línea celular a otra (Nakayama *et al*, 1997) como lo observado en las comparaciones por Bonferroni sobre la línea celular HT-29, que sugieren un tiempo de incubación de 6 horas como óptimo; sin embargo, las otras dos líneas celulares mostraron una buena intensidad de fluorescencia a las 4 horas de incubación. Sin embargo, por practicidad se escogió este tiempo como el justo para un análisis de rutina en los ensayos de citotoxicidad, dado que las intensidades de fluorescencia, para las líneas celulares empleadas, son suficientemente amplias como para poder detectar cambios significativos cuando las poblaciones celulares cambien fuertemente frente a la exposición a moléculas o extractos en estudio, ajustándose en las tres líneas valoradas y lo descrito previamente por Pagé y colaboradores (1993).

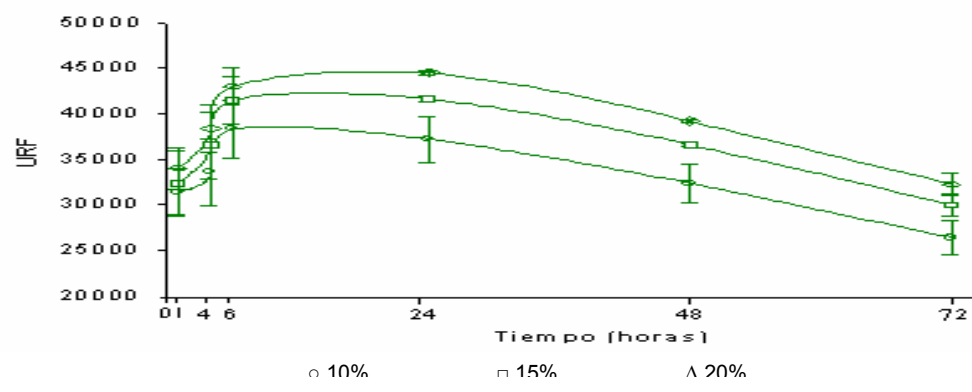
Por otro lado, con el propósito de evaluar la reducción de resazurina a resofurina y seguidamente a dihidroresofurina, para cada línea celular, se realizó una valoración de la estabilidad de la fluorescencia del colorante a las mismas concentraciones establecidas y a diferentes periodos de incubación que oscilaron entre 1 y 72 horas (Figura 9 A-C).



A.



B.



C.

**Figura No 9.** Seguimiento en el tiempo de la reducción de resazurina a resofurina durante un periodo total de incubación de 72 horas a diferentes concentraciones de resazurina. N=6,  $\alpha=0.05$  y  $\pm 1$  desviación típica. A: HEP-2 B: HT-29 y C: HeLa

Durante las primeras seis horas de incubación se observó un aumento con tendencia exponencial en la intensidad de fluorescencia para todas las líneas, lo cual indica la transformación de resazurina a resofurina fluorescente por las células al metabolizar el colorante. A las 24 horas de inoculada la resazurina, la fluorescencia alcanzó su máximo punto en las líneas HeLa y HT-29. Luego de este tiempo de incubación se observó un decrecimiento paulatino en el tiempo disminuyendo 4000 URF en HT-29, e incluso decreciendo hasta intensidades inferiores a las observadas en las primeras horas de incubación como fue el caso de HeLa y HEp-2. Este descenso en la intensidad de fluorescencia puede ser explicado por la transformación de resofurina a dihidroresofurina no fluorescente e incolora después de 24 horas de incubación descrito por O'Brien y colaboradores (2000).

Esto considerando que existen trabajos en los que se ha incubado con la resazurina por periodos de hasta 24 horas, para mejorar la sensibilidad, como el realizado por Nociari y colaboradores (1998) empleando líneas celulares tumorales eritroleucemias y murina mastocitomas P815, se muestra que la citotoxicidad mediada por resazurina es detectable luego de 6 horas de incubación, siendo el tiempo mínimo requerido para que las células que han sobrevivido a un tratamiento metabolicen la resazurina; sin embargo, determinaron que el tiempo óptimo de incubación de la resazurina fue de 24 horas ya que a ese periodo de tiempo es posible detectar con una mejor sensibilidad un efecto tóxico en las células y así minimizar el error.

## **7.2. Comparación entre los dos métodos de tinción celular**

Actualmente existen diferentes métodos de punto final para medir de manera indirecta poblaciones celulares. En este trabajo se comparó el método de resazurina con el método ampliamente empleado en ensayos de citotoxicidad, la reducción de MTT, sobre tres líneas celulares.

Se evaluó el efecto citotóxico de tres compuestos sintéticos y un agente antineoplásico sobre las tres líneas celulares de trabajo, con el fin de comparar las respuestas obtenidas por los dos métodos de tinción celular empleando las condiciones seleccionadas en este trabajo para la aplicación del método de reducción de resazurina y las usadas para el método de reducción de MTT por el grupo de Farmacogenética del Cáncer.

A partir de los valores de fluorescencia obtenidos se calcularon los porcentajes de supervivencia celular después de un periodo de tratamiento de 48 horas, mostrando que para ninguna línea celular evaluada los compuestos causaron disminución notoria en la supervivencia celular. Este mismo resultado se observó al evaluar por los dos métodos. Al evaluar doxorubicina HCl empleada como control positivo de este ensayo, se encontró que las tres líneas en estudio fueron sensibles a la acción de este fármaco en el rango de concentración evaluado (Tabla 6).

**Tabla No 6.** Promedio de porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar tres compuestos sintéticos y doxorubicina HCl empleando dos métodos de tinción celular. N=3.

Sustancia	Concentración (µM)	Resazurina			MTT		
		HEp-2	HT-29	HeLa	HEp-2	HT-29	HeLa
TATu	10	88	86	88	94	97	90
	1	89	92	89	97	100	94
	0,10	90	93	90	97	101	95
Urotropina	10	98	98	99	91	99	102
	1	98	100	99	93	101	103
	0,10	98	103	99	95	103	103
TATD	10	97	84	97	87	100	96
	1	97	92	101	89	101	96
	0,10	99	94	102	92	110	97
Doxorrubicina HCl	10	14	67	60	10	42	45
	1	28	95	75	24	79	58
	0,10	72	97	88	59	83	80

Después del periodo de tratamiento, en algunos pozos se presentó un efecto citotóxico muy bajo y en otros se midieron porcentaje de supervivencias superiores al 100%. Esto puede ser explicado porque al inocular las placas puede existir una

mínima diferencia de la cantidad de células dispuestas en cada pozo, y después de 48 horas de incubación de las células proliferan y se magnifican estas diferencias. Es por esto que se pueden observar intensidades de fluorescencia mayores en los pozos tratados que en los pozos control de crecimiento. Como estas diferencias fueron menores al 10% no se consideró como un efecto proliferativo significativo.

Una repetición realizada dos semanas después, ratificó los valores de supervivencia obtenidos tanto en la valoración de los compuestos sintéticos evaluados por métodos de tinción celular diferente como la sensibilidad de las líneas al agente antineoplásico, con un periodo de tratamiento de 48 horas; estableciendo la reproducibilidad de los resultados (Tabla 7).

**Tabla No 7.** Promedio de porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar tres compuestos sintéticos y doxorubicina HCl empleando dos métodos de tinción celular dos semanas después. N=3.

Sustancia	Concentración (µM)	Resazurina			MTT		
		Hep-2	HT-29	HeLa	Hep-2	HT-29	HeLa
TATu	10	89	103	90	94	94	87
	1	92	103	91	90	97	92
	0,10	92	109	91	91	100	93
Urotropina	10	94	102	101	80	94	95
	1	97	104	100	88	96	97
	0,10	99	104	100	95	101	100
TATD	10	98	97	99	87	93	99
	1	98	99	101	87	95	101
	0,10	100	99	102	94	101	102
Doxorrubicina HCL	10	28	64	65	19	44	41
	1	47	86	72	32	63	68
	0,10	67	94	84	62	91	80

Tomando los valores de supervivencia obtenidos se realizó un análisis de varianza de un vía con el fin de comparar posibles diferencias en los resultados entre las concentraciones empleadas en los tratamientos por cada línea celular. Los datos derivados empleando el método de resazurina y MTT mostraron que no existen cambios al aumentar la concentración de los compuestos valorados en ninguna de

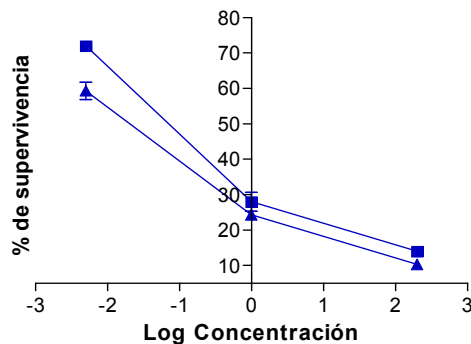
las líneas celulares empleadas ( $\alpha=0.05$ ;  $P>0,05$ ); así que la acción de los tratamientos a sus diferentes concentraciones fue semejante.

Por otro lado, el tratamiento con Doxorubicina HCl a distintas concentraciones mostró una reducción de la supervivencia al aumentar la concentración en las tres líneas celulares empleando ambos métodos ( $\alpha=0.05$ ;  $P<0,05$ ) así que para una posterior comparación de las respuestas de supervivencia derivadas de los métodos, se compararon los valores de supervivencia obtenidos para cada concentración, por cada uno de los métodos de tinción.

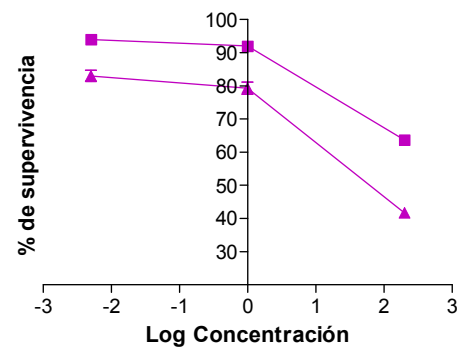
### 7.2.2. Doxorubicina HCl

Con el fin de comparar las respuestas obtenidas en ambos métodos, se evaluaron los resultados de porcentaje de supervivencia provenientes de cada concentración independientemente en las tres líneas.

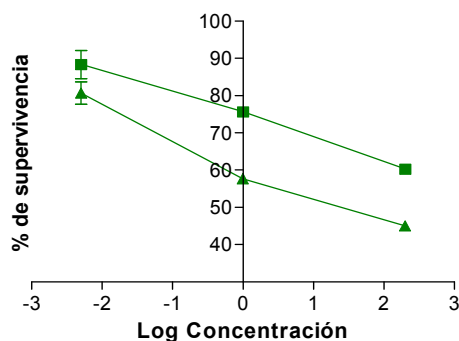
Los resultados expresados en gráficas como curvas de logaritmo de la concentración – porcentaje de supervivencia para cada línea celular, mostraron que las tres líneas en estudio fueron sensibles a la acción de doxorubicina en el rango de concentración evaluado con un tratamiento de 48 horas empleando ambos métodos de tinción (Figura 10 A-C).



A.



B.



C.

**Figura No 10.** Efecto citotóxico de Doxorubicina HCl empleando el método de resazurina (□) y el método de reducción de MTT (Δ) sobre cada línea celular. A: HEP-2, B: HT-29 y C: HeLa.  $\alpha=0,05$  y  $\pm 1$  desviación típica.

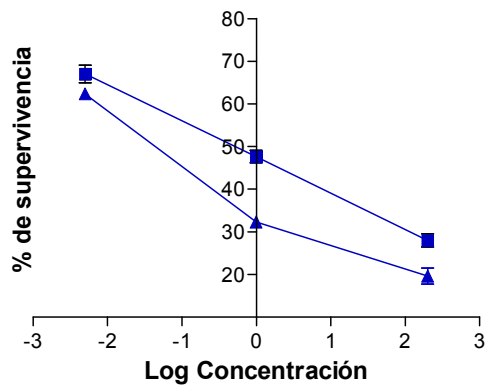
Al valorar la citotoxicidad de doxorubicina sobre HEP-2 empleando los métodos MTT y resazurina respectivamente se obtuvo una viabilidad entre el 10% y 20% a la mayor concentración (10 $\mu$ M); 25-30% a una concentración de 1 $\mu$ M y 60%-70% de supervivencia evaluando una concentración de 0,1  $\mu$ M. Este descenso gradual mostró que la línea HEP-2 es más sensible a este fármaco usado en tratamientos para cáncer que las otras dos líneas empleadas, lo que ya se había establecido en un trabajo previo del grupo (León *et al*, 2006).

Para la línea HT-29, por los dos métodos de tinción, con las dos concentraciones menores, no se observó diferencia importante entre los porcentajes de células que sobreviven al tratamiento, solo a la máxima concentración se observó una reducción importante de este porcentaje, sin embargo, en el caso de resazurina esta reducción fue hasta el 67% de viabilidad, y para MTT fue de 42%. Esto hace que por el método de MTT sea posible hacer un cálculo aproximado de la CL<sub>50</sub>, porque se tiene un valor inferior al 50%, mientras que con resazurina no es posible.

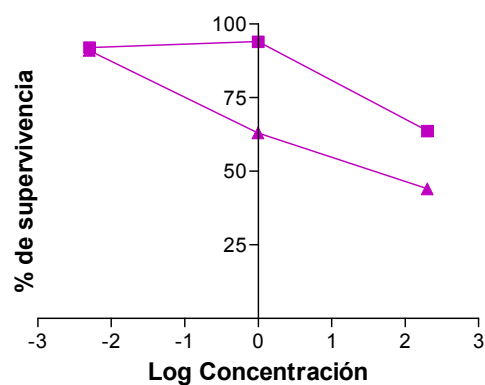
Para las tres líneas celulares se observó el mismo comportamiento al leer por MTT o por resazurina, pero con esta última en todos los casos se obtuvieron porcentajes de viabilidad superiores. Solo a la mayor concentración de Doxorubicina empleando el método de MTT se observó una disminución del 50% de la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos en el segundo ensayo, al valorar la citotoxicidad de doxorubicina HCl, fueron similares a los anteriormente descritos. La tendencia de las dos curvas con relación al ensayo anterior en cada gráfica es la misma, pero los valores son diferentes.

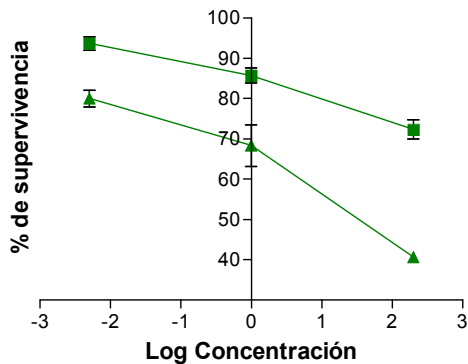
Los resultados expresados en gráficas como curvas de logaritmo de la concentración – porcentaje de supervivencia para cada línea celular, mostraron igualmente que las tres líneas en estudio fueron sensibles a la acción de doxorubicina en el rango de concentración evaluado con un tratamiento de 48 horas empleando ambos métodos de tinción (Figura 11 A-C), lo cual muestra la repetibilidad de los resultados.



**A.**



**B.**



C.

**Figura No 11.** Repetición del efecto citotóxico de Doxorubicina HCl empleando el método de resazurina (□) y el método de reducción de MTT (Δ) en las tres líneas celulares. A: HEP-2, B: HT-29 y C: HeLa.  $\alpha=0,05$  y  $\pm 1$  desviación típica.

Seguidamente, para comprobar la hipótesis de igualdad de porcentajes de supervivencia obtenida en los dos métodos, se aplicó la prueba de correlación de Pearson que indica el grado de correlación que existen entre las variables, además de la fuerza con que las variables están asociadas y si esta relación es o no significativa. El intervalo de valores que puede tener este coeficiente de correlación es entre 1 y -1, siendo -1 asociación perfecta negativa, 1 asociación perfecta positiva o 0 no asociación.

Los valores de correlación de Pearson calculados para cada línea celular mostraron que para las tres líneas celulares, los coeficientes de correlación de Pearson dieron cercanos a 1. Esto indica que los resultados obtenidos por los dos métodos están asociados en forma positiva, es decir, cuando aumenta el porcentaje de supervivencia en un método, aumenta en porcentaje de supervivencia del otro (Tabla 8).

**Tabla No 8.** Datos obtenidos de la prueba de Correlación de Pearson en cada línea celular.

	Correlación de Pearson	N	P (2colas)
HEp-2	0,970	18	0,000
HT-29	0,840	18	0,001
HeLa	0,860	18	0,000



con MTT una mayor citotoxicidad a la misma concentración de fármaco evaluada por resazurina, se concluye igualmente que en el trabajo de Hamid que las respuestas de supervivencia derivadas de ambos métodos aunque guardan la misma asociación no son comparables al emplear este fármaco; quizá por diferentes mecanismos de acción del fármaco sobre enzimas responsables de la transformación de resazurina y del MTT malinterpretando los resultados. En este estudio, los efectos observados por este fármaco fueron desprendimiento celular y un extensivo daño celular.

Por consiguiente se deduce de estos resultados que existe un potencial riesgo de sesgar los resultados al usar un solo método de tinción celular de punto final cuando se realizan valoraciones de citotoxicidad, lo cual ha sido anteriormente descrito por Hoslt & Oredsson (2004).

Por otra parte, la reducción de resazurina ha reportado ser variable dependiendo de la línea valorada. Un estudio desarrollado por O'Brien y colaboradores (2000) identificó como esto ocurre; evaluando  $\text{CuSO}_4$  a diferentes concentraciones en tres líneas celulares diferentes (hepatocitos de ratón, HeLa y HepG2) encontró que el método de resazurina detectó una citotoxicidad más rápidamente en las primeras líneas; sin embargo, usando la línea celular HeLa, el resultado fue contrario. Esto puede indicar una sensibilidad diferente de esta línea a la presentada por las otras evaluadas. Por ello, Nakayama y colaboradores (1997) exponen la importancia de valorar individualmente las líneas celulares, ya que cada una posee propiedades metabólicas únicas que deben ser caracterizadas para determinar parámetros experimentales tales como tiempo de incubación, densidad celular y concentración de compuesto a evaluar para la óptima conversión de formas oxidadas a reducidas de los métodos a evaluar como es el caso de la reducción de tetrazolio a formazán en el método de MTT, y la reducción de resazurina a un producto fluorescente como la resofurina.

### 7.3. Evaluación de la citotoxicidad de extractos etanólicos de origen vegetal.

Complementariamente, para comprobar que las condiciones establecidas para el uso del método de tinción de resazurina eran aplicables en la valoración de productos de origen vegetal no puros, se evaluó la actividad citotóxica de trece extractos etanólicos de origen vegetal con propiedades antiparasitarias *in vitro* sobre Leishmania, actualmente en estudio por el grupo de Inmunotoxicología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.

Las concentraciones evaluadas para los extractos fueron inferiores a las usadas por grupos Latinoamericanos para valoración de extractos provenientes de plantas medicinales originarias de Suramérica, que sugieren evaluar una máxima concentración de 50µg/mL (Mans *et al*, 2000). Esto debido a la poca disponibilidad de muestra y al conocimiento previo de su actividad Leishmaniocida en monocitos de ratón que algunos extractos mostraron ser efectivos en concentraciones iguales o menores a 10µg/mL (Delgado, datos sin publicar)

Para la línea celular HEp-2 solo dos extractos mostraron inducción de muerte celular a la mayor concentración evaluada; el primero proveniente de hojas de *Xylopia discreta* (L. f.) Sprague & Hutch y el segundo de hojas de *Piper hispidum* H. B. K. Los resultados mostraron que ninguno de los extractos evaluados reveló actividad citotóxica en las líneas HT-29 y HeLa a ninguna de las concentraciones evaluadas, obteniendo porcentajes de supervivencia que oscilaron entre 80-100% e incluso superiores. (Tabla 9).

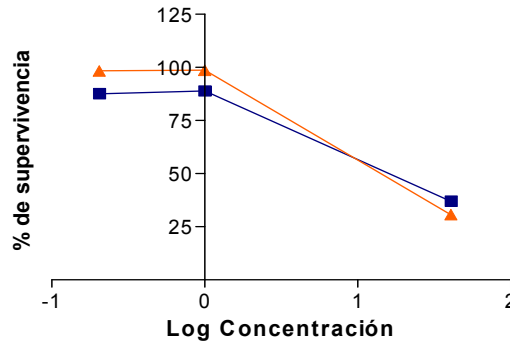
**Tabla No 9.** Promedio de porcentajes de supervivencia obtenidos al evaluar trece extractos etanólicos y doxorubicina HCl. N=3

Extracto	Concentración (µg/mL)	HEp-2	HT-29	HeLa
<i>Brosimum rubescens</i> (hojas)	5	78	98	92
	1	87	105	90
	0,5	88	111	90

<i>Oxandra langipetala</i> (hojas)	5	97	92	99
	1	97	97	96
	0,5	99	107	97
<i>Raputia hepthaphyla</i> (corteza)	5	98	99	101
	1	100	109	98
	0,5	112	114	113
<i>Xilopia discreta</i> (semillas)	5	87	104	87
	1	88	114	90
	0,5	88	119	89
<i>Pipier hispidum</i> Hojas)	5	31	99	75
	1	99	102	96
	0,5	98	103	97
<i>Raputia hepthaphyla</i> (hojas)	5	99	106	100
	1	101	113	99
	0,5	112	117	112
<i>Brosimun rubencens</i> (corteza)	5	65	98	84
	1	91	102	91
	0,5	90	106	89
<i>Oxandra venezolana</i> (hojas)	5	100	93	97
	1	100	99	97
	0,5	101	112	98
<i>Anona jahni</i> (hojas)	5	98	112	94
	1	100	119	100
	0,5	113	121	118
<i>Pilocapus alvaradoi</i> (hojas)	5	89	87	90
	1	89	94	91
	0,5	88	102	90
<i>Zhanthoxylum guinduense</i> (hojas)	5	100	102	101
	1	99	103	100
	0,5	101	115	101
<i>Anona jahni</i> (madera)	5	98	109	100
	1	99	115	100
	0,5	110	115	112
<i>Xilopia discreta</i> (hojas)	5	37	82	83
	1	89	83	91
	0,5	88	88	90
Doxorrubicina HCl	10	28	53	62
	1	49	93	80
	0,1	75	96	91

Las curvas Log de concentración – porcentaje de supervivencia, correspondientes a los extractos de *X. discreta* y *P. hispidum*, mostraron actividad citotóxica, observándose una disminución del porcentaje de células viables entre 60-70% respectivamente. Los resultados reflejan un decrecimiento drástico a la mayor

concentración evaluada y ningún cambio a las concentraciones menores (Figura 13).



**Figura No 13.** Efecto citotóxico de *X. discreta* (□) y *P. hispidum* (◇) sobre la línea celular HEP-2 en un periodo de tratamiento de 48 horas con un  $\alpha=0.05$  y  $\pm 1$  desviación típica.

Los resultados mostraron que la  $CL_{50}$  aproximado para estos extractos se ubicó entre 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , porque a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no se observó efecto y a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  redujo la supervivencia celular a menos del 50%.

En un estudio desarrollado por Alécio y colaboradores (1998) por medio del fraccionamiento del extracto de *P. hispidum*, se encontró una nueva pirrolidina amida con actividad antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* a una mínima cantidad de 10 $\mu\text{g}$ . Según Mans y colaboradores (2000), una planta que tiene la capacidad de producir un fungicida, resulta un buen candidato para se evaluada como potencial citotóxico en ensayos antiproliferativos.

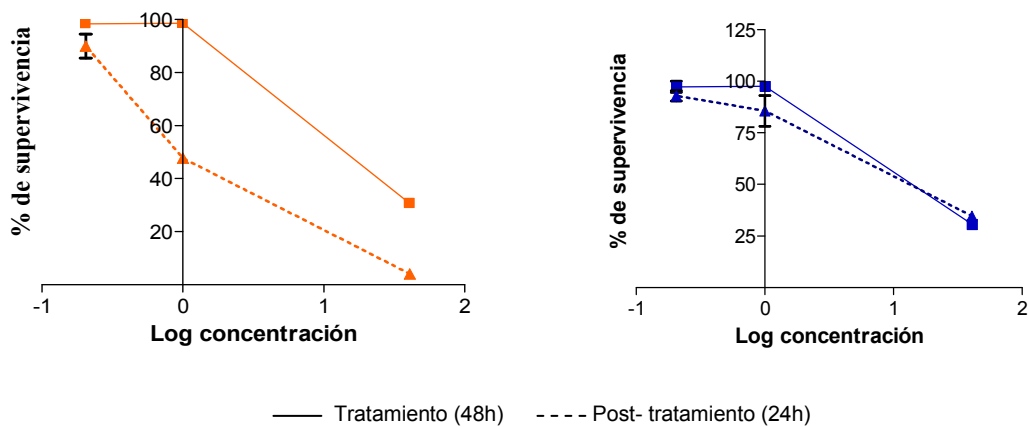
Por otra parte, los resultados de citotoxicidad obtenidos para doxorrubicina HCl, son del mismo orden de los obtenidos en la comparación de métodos. En el rango de concentración evaluado no hubo una disminución de la supervivencia mayor al 50% en las líneas HT-29 y HeLa; mientras que en HEP-2 se observó actividad presentando una disminución del porcentaje de supervivencia proporcional al aumento de la concentración (Tabla 9).

#### 7.4. Evaluación de la recuperación celular.

Con el fin de valorar la recuperación celular después de un tratamiento traumático, se evaluó la capacidad de recuperación de las células HEp-2 luego de ser expuestas por 48 horas a dos extractos vegetales que mostraron ser potencialmente citotóxicos, con un tiempo de recuperación de 24 horas posterior al tratamiento. Los resultados para el extracto de *P. hispidum*, después de un tiempo de recuperación, reflejaron una disminución de supervivencia celular de 10% en la menor concentración; 55% de detrimento a 1µg/mL y 35% a la mayor concentración. Todo esto con relación los porcentajes de supervivencia calculados después de un periodo de tratamiento de 48 horas con este fármaco (Figura 14 A).

En cuanto a los porcentajes de supervivencia obtenidos después de un periodo de recuperación en *X. discreta* no se observó recuperación ni muerte celular con relación a lo observado en el tratamiento de 48 horas (Figura 14 B).

Con el fin de comparar los resultados obtenidos después de un tratamiento 48 horas con doxorrubicina y los resultados obtenidos después de un tiempo de 24 horas de recuperación celular, se realizó un ANOVA de una vía, encontrando que el extracto derivado de *X. discreta* después de un tiempo de recuperación no mostró ningún tipo de disminución significativa o aumento alguno de masa celular manteniéndose constante ( $F_{1,12} = 0,120$ ;  $P=0,734$ ), mientras que el extracto derivado de *P. hispidum* mostró una disminución de células después de 24 horas de recuperación. ( $F_{1,12} = 209,7$ ;  $P<0.0001$ ).

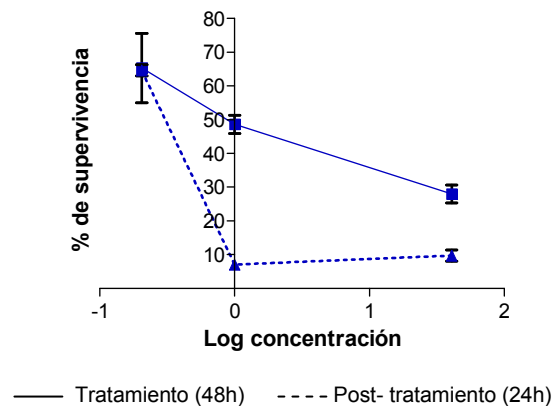


**A.**

**B.**

**Figura No 14.** Porcentajes de supervivencia después de un tiempo de recuperación de 24 horas para dos extractos sobre HEp-2. A: *P. hispidum* B: *X. discreta*.  $\alpha=0.05$  y  $\pm 1$  desviación típica.

En cuanto a los resultados obtenidos del tratamiento de doxorubicina HCl luego de un tiempo de recuperación, se observó en la línea HEp-2 una disminución de poco marcada de células a la mayor concentración, seguido de una baja de más de 45% de células en la concentración media y una disminución 18% de células en la menor concentración, todo estos con relación a al total de células viables después del periodo de tratamiento de 48 horas, mostrando que no se observó recuperación celular lo que evidencia el poder citotóxico de este medicamento. (Figura 15).



**Figura No 15.** Porcentajes de supervivencia después de un tiempo de recuperación de 24 horas para Doxorubicina HCl en HEP-2.  $\alpha=0.05$  y  $\pm 1$  desviación típica

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el método experimental empleado bajo las condiciones establecidas, permite evaluar la citotoxicidad de extractos vegetales sobre líneas tumorales de origen humano, actividad que según en la literatura, puede ser empleada en tamizajes preliminares de sustancias promisorias con potencial citotóxico (Hamid *et al*, 2004; O'Brien *et al*, 2000).

No obstante, las evaluaciones realizadas mostraron la sensibilidad de la línea HEP-2 frente a doxorubicina HCl empleando este método de tinción celular, se considera necesario evaluar el empleo de otros fármacos antineoplásicos sobre las líneas evaluadas, con el fin de establecer el patrón de sensibilidad de cada una empleando este método y poder definir si la actividad citotóxica evidenciada representa una actividad diferencial sobre la clase de cáncer que representa.

## 8. CONCLUSIONES

Se encontró que las respuestas de porcentaje de supervivencia obtenidas a partir de dos métodos de valoración de citotoxicidad fueron semejantes al evaluar diferentes compuestos sintéticos.

Se observó en este estudio que los extractos provenientes de hojas de *Xylopiá discreta* y *Piper hispidum* son sustancias promisorias, mostrando una actividad citotóxica en la línea celular HEp-2 a muy baja concentración.

El método de tinción de Resazurina empleado bajo las condiciones establecidas permitió realizar un seguimiento de recuperación de las células después de ser sometidas a un tratamiento citotóxico.

## 9. RECOMENDACIONES

Valorar la citotoxicidad de compuestos y fracciones derivados de los extractos totales provenientes de hojas de *Xilopia discreta* y *Piper hispidum* para establecer en cual de ellas reside la actividad observada.

Evaluar la capacidad de recuperación de las células empleando el método de reducción de resazurina en sustancias con actividad citotóxica previamente establecida con el fin de realizar un seguimiento más detallado para cada una de las líneas.

## 10. REFERENCIAS

Alécio, A; Bolzani, V; Marx, M; Kato, M & Furlan, M. 1998. Antifungal Amide form leaves of *Piper hispidum*. Journal of Natural Products 61: 637-639.

American Type Culture Collection (ATCC). 2006. Cell lines and Hybridomas. <<http://www.atcc.org/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>>. Fecha de consulta: Julio 24 de 2006.

Anoopkumar-Duke, S., Carey, JB., Conere, T et al. 2005. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. The British Journal of Radiology. 78: 945-947.

Balls, M; Goldberg, A; Fentem, J; Broadhead, C; Burch, R; Festing, M & Fraizer, J. 1995. The three R's: The way forward. The report and recommendation of ECVAM workshop 11. ATLA 23:838.

Bellamy, W. 1992. Prediction of response to drugs therapy of cancer: a review of in vitro assay. Drugs 44 (5): 690.

Bernas, T & Dobrucki, J. 2002. Mitochondrial a non mitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1 and Nao mitochondrial fluorescent probes. Cytometry 47:236-242.

Bugelski, P; Uzma, A; Molton, S; Topeg, I; Lord, P & Morgen, G. 2000. A strategy for primay high throughput cytotoxicity screening in pharmaceutical toxicology. Pharmaceutical Research 17(10): 1265-1272.

Cordero, C y Aristizábal, F. 2002. Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales sobre líneas derivadas de tumores humanos, empleando dos métodos colorimétricos. Revista Colombiana de Biotecnología 4: 100-106.

Cordero, P; Gomez, S; León, C; Morantes, S & Aristizábal, F. 2004. Cytotoxic activity of five compounds isolated from Colombian plants. *Fitoterapia* 75: 225.

Cragg, G & Newman, D. 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation* 17:2. 153-163.

Denizot, F & Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological Methods* 89: 271.

Ezpeleta O. 1998. Curso teórico práctico sobre cultivo celular y ensayos de citotoxicidad. Universidad de Navarra. Facultad de Farmacia.

Freshney I. 2000. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4<sup>th</sup> Edition. John Wiley and Sons Inc. 589 p.

Fricker, S & Buckley, R. 1996. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an *in vitro* screen for antitumour agents. *Anticancer Research* 16: 3755.

Gonzalez, R & Tarloff, J. 2001. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro* 15: 257-259.

Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R & Bullock, P. 2004. Comparison of Alamar Blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro* 18: 703-710.

Hanahan, D & Weinberg, R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-68.

Holst, M & Oredsson, S. 2005. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. *Toxicology in Vitro* 19: 379-387.

Keepers, Y; Pizao, P; Peter, G; Ark-Otte, J; Winograd, B & Pinedo, H. 1991. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MMT) Assays for *in vitro* Chemosensitivity testing. *European Journal of cancer* 27 (7): 897.

León, C; Gómez, S; Morantes, S; Cordero, C y Aristizábal, F. 2006. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomédica* 26:161-168.

Lieberman, M., Patterson, G & Moore, R. 2001. In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assays parameters on growth inhibitory activity. *Cancer letter* 173: 21-29.

Magnani, E & Bettini, E. 2000. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. *Brain Research protocols* 5: 266-272.

Mans, Dennis; Rocha, A & Swartsmann, G. 2000. Anti-Cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist* (5): 185-198.

Martin, A; Camacho, M; Portaels, F & Palomino, J. 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Micobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-Line Drugs: Rapid, Simple and Inexpensive Method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (11):3616-3619.

McDonald, C. 1998. In "Basic cell Culture: A practical approach". Edited by J.M Davis. IRL Press by Oxford University Press.

McMillian, M., Li, L., Parker, J., Patel, L., Zhong, Z., Gunnet, J., Powers J & Johnson, M. 2002. An improved resazurina-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biology and Toxicology* 18: 157-173.

Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J & Boyd, M. 1991 Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen using a diverse panel of cultured human tumour cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83:757-766.

Morantes, S; Páez, A; Cordero, C; Rincón, J & Aristizábal, F. 2006. Actividad citotóxica y análisis fotoquímico de fracciones aisladas del extracto etanólico total de *Acnitus arborescens*. Acta Farm. Bonaerense 25(4): 491-496.

Morgan, J., Darling D.C. 1995. Cultivo de células animales. Editorial Acribia S.A.

Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods 65: 55-63.

Nakayama, G., Caton, M., Nova, M & Parandoosh, Z. 1997. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in Vitro. Journal of Immunological Methods (204): 205-208.

National Cancer Institute (NCI). 1998. Report of the National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program Review Group Report. <[http://deainfo.nci.nih.gov/advisory/BSA/bsa\\_program/bscdevtherprgmin.html](http://deainfo.nci.nih.gov/advisory/BSA/bsa_program/bscdevtherprgmin.html)>.

Fecha de consulta: Noviembre 15 de 2006.

Nociari, M; Shalev, A; Benias, P & Russo, C. 1998. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. Journal of Immunological Methods. 213: 157-167.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T & Pognan F. 2000. Eur. J. Biochem. 267, 5421-5426.

Pagé B., Pagé M., Noel, N., 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. International Journal of Oncology. 3, 4743.

Palomino, J; Martin, A; Camacho, M; Guerra, H; Swings, J & Portaels F. 2002. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Micobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46 (8): 2720-2722.

Ponsoda, X., Jover R., Núñez C., Royo M., Castell J. V. and Gómez-Lechón M. J. 1995. Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes

and in cell lines: Correlation between *in vitro* data and human lethal concentration. *Toxicology in Vitro* 9(6): 959 – 966.

Putnam, k; Bombick, D & Doolittle, D.(2002). Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro* 16:599-607.

Rasmussen, E & Nicolaisen, G. 1999. Stability of resazurin in buffers and mammal cell culture media. *In vitro and Molecular toxicology* 12 (4): 195-202.

Rasmussen, E. 1999. Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In vitro and Molecular toxicology* 12 (1): 47-58.

Rivera, A; Nuñez, M; Morales, M & Nathan-Joseph, Pedro. 2004. Preparation of cage amine 1,3,6,8-tetraazatricyclo[4.3.1.1<sup>3,8</sup>] undecane. Short Communication. *Tetrahedron Letters* 45 (41): 7563-7565.

Rolón, M; Vega, C; Escario, J & Gómez, A. 2005. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitological research* 10: 57-61.

Scudiero, D; Shoemaker, R; Paull, K; Monks, A; Tierney, S; Nofziger, T; Currens, M; Seniff, D & Boyd, M. 1998. Evaluation of a soluble Tetrazolium/Formazan Assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumour cell lines. *Cancer Research* 48: 4827.

Simikins, R & Wright, G. 1955. Nitrolysis of 1,3,6,8-Diendomethylene-1,3,6,8-tetracyclodecane. *Journal of American Chemistry Society* 77: 3157-3159.

Slater, K. 2001. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Analytical Biotechnology* 12: 70-74.

Zhang, H., Du, G & Zhang, J. 2004. Assay of mitochondrial functions by resazurin *In Vitro*. *Acta Farmacológica Sinica* 25 (3): 385-389.

## 11. ANEXOS

### Anexo No 1. Tablas de resultados

Determinación del rango de linealidad concentración de resazurina – tiempo de incubación. Periodo de tratamiento de 6 horas.

Ensayo I Periodo de incubación 6 horas									
Concentración de resazurina (v/v)	HEp-2			HT-29			HeLa		
	1h	4h	6h	1h	4h	6h	1h	4h	6h
10%	29733	31608	33870	19683	22805	30646	34020	39215	43326
	28745	30112	32274	21988	25669	34239	34543	33126	39561
	27901	28746	31312	17710	21249	29424	30919	33570	38531
	29047	30669	32917	16867	20238	27013	30133	36096	38874
	28829	29937	32007	17697	21706	29332	31331	29568	34724
	28141	28255	30632	15694	19270	26407	27506	30091	34960
15%	34247	35406	36190	21507	25335	31931	27561	40622	44626
	31592	32237	33876	25856	29148	36933	36133	34292	40222
	31148	33066	33534	21241	24095	31436	31770	35558	40655
	38142	42110	39367	22309	25686	32453	31918	41267	44895
	33393	35223	35494	25236	27920	35356	36733	32058	38695
	31822	34727	34158	19574	23084	30035	30227	35476	40157
20%	36737	40435	38499	26793	27580	34569	31760	40852	45392
	32867	35806	34737	26213	27955	35191	36697	35717	41155
	34402	40011	36780	25369	26725	33738	32509	39551	43250
	34791	38437	36755	23482	26041	32684	34554	40433	45384
	36089	40977	37826	26720	28228	35417	36650	34452	40379
	34393	40149	36779	23285	25328	32238	32013	39084	42660

Determinación del rango de linealidad concentración de resazurina – tiempo de incubación. Periodo de tratamiento 72 horas.

Concentración de resazurina % de v/v	HEp-2						HT-29						HeLa					
	1h	4h	6h	24h	48h	72h	1h	4h	6h	24h	48h	72h	1h	4h	6h	24h	48h	72h
	<b>10%</b>	17768	22869	29984	38598	37869	26303	27344	31972	35023	37024	32975	31318	28565	30145	32945	39742	34392
	16304	23161	27805	37911	37235	24912	27260	32063	35560	37883	33592	31885	28379	30573	33205	39819	34640	27438
	15939	22230	27122	38036	37362	24402	27929	30537	34997	37610	33728	28659	28020	29589	34156	38862	33722	26421
	16465	24198	28581	38295	37244	25877	30842	31622	35355	32922	29381	28411	28532	28546	32235	35016	30537	26319
	16942	22199	28850	38023	37319	25042	29923	30505	34303	33215	29911	28758	28794	29923	32452	35272	30729	24684
	16094	21772	27677	36960	36776	24233	29571	30440	34177	33432	29997	25915	28613	30794	33432	34602	30176	24186
<b>15%</b>	18231	24490	30419	40848	40413	28551	36577	43921	39227	38830	35902	34767	28754	32034	34210	41846	36755	31485
	18382	24550	30391	39520	39297	27291	35835	43202	40574	40440	36318	34687	29590	31251	34434	41940	36801	29671
	17540	23647	29139	39004	38564	25628	37490	43094	40884	39669	36350	31484	30674	32281	33752	41859	36792	29420
	18699	24453	30383	41495	39530	27508	36160	43848	39910	38938	35783	35010	30188	32994	33705	41628	36620	31366
	18624	24457	30586	40673	39844	27826	38565	44112	41633	39508	35781	33852	29828	31338	34618	41388	36267	29079
	18157	23313	29347	40158	39285	26390	39565	43575	41155	39172	36167	31250	28520	32075	34929	41359	36366	28969
<b>20%</b>	18190	24756	29779	39422	37373	25796	42598	44874	45571	41231	38911	38466	31410	33951	37850	44887	39403	34132
	18549	25024	30457	40776	36501	25368	39965	42748	45280	41894	39257	37723	31703	33160	37821	44743	39320	32145
	18755	25398	30719	40359	37251	24091	41287	46406	44544	41822	39175	34916	31690	34676	37256	44325	39078	30998
	18689	25822	31493	39665	36823	25098	39452	45975	46035	40502	38763	38512	30730	34630	36663	44569	39276	33342
	18867	25604	31775	40655	37822	25553	41198	45564	44867	42233	39266	37233	30868	34658	37207	44268	38927	31898
	19322	26261	32533	40034	37684	23903	42787	47241	44895	41428	38968	34569	30367	34774	36688	44258	39187	31076

Evaluación de citotoxicidad del compuesto AR110. Periodo de tratamiento 48 horas.

<b>Ensayo I Compuesto Sintético AR110 - Métodos de tinción celular</b>								
<b>Método de tinción</b>	<b>Pozos de Blanco</b>				<b>Pozos de tratamiento</b>			
	<b>B Control</b>	<b>10µM</b>	<b>1µM</b>	<b>0,1µM</b>	<b>Control C</b>	<b>10µM</b>	<b>1µM</b>	<b>0,1µM</b>
<b>Línea Celular HT-29</b>								
<b>MTT</b>	0,010	0,010	0,011	0,010	2,057	2,031	2,044	1,933
					1,989	2,075	1,984	1,998
					2,243	2,275	2,275	2,158
<b>Resazurina</b>	1417	1299	1312	1334	33785	29167	30715	31399
					35142	28426	31891	31040
					33961	31243	32530	33044
<b>Línea Celular HEp-2</b>								
<b>MTT</b>	0,010	0,012	0,010	0,013	0,895	0,801	0,899	0,882
					0,819	0,761	0,845	0,950
					0,824	0,839	0,887	0,862
<b>Resazurina</b>	1304	1187	1215	1205	44552	40777	41243	41137
					46346	41025	41751	39944
					46859	40915	41514	40531
<b>Línea Celular HeLa</b>								
<b>MTT</b>	0,007	0,007	0,008	0,009	1,422	1,094	1,322	1,428
					1,488	1,326	1,250	1,350
					1,430	1,501	1,515	1,330
<b>Resazurina</b>	1373	1229	1222	1252	47919	42737	42948	42734
					46946	40624	41599	40052
					46730	42626	43000	42358

Evaluación de citotoxicidad del compuesto AR100. Periodo de tratamiento 48 horas

Ensayo I Compuesto Sintético AR100 - Métodos de tinción celular								
Método de tinción	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
	B Control	10µM	1µM	0,1µM	Control C	10µM	1µM	0,1µM
<b>Línea Celular HT-29</b>								
<b>MTT</b>	0,010	0,010	0,012	0,011	2,037	2,085	2,036	2,121
					2,096	2,034	1,999	2,101
					2,145	2,212	2,176	2,250
<b>Resazurina</b>	1301	1304	1316	1281	32404	33889	33235	32239
					34173	34615	32718	32175
					33306	33931	33815	33380
<b>Línea Celular HEp-2</b>								
<b>MTT</b>	0,012	0,012	0,013	0,014	1,009	1,010	1,010	0,912
					1,184	1,086	1,036	1,050
					1,052	0,999	0,991	1,002
<b>Resazurina</b>	1191	1196	1211	1196	41926	40794	41229	40590
					41821	41996	40776	40483
					40792	39504	40540	40495
<b>Línea Celular HeLa</b>								
<b>MTT</b>	0,010	0,008	0,011	0,010	1,621	1,619	1,660	1,642
					1,617	1,574	1,578	1,542
					1,486	1,658	1,628	1,641
<b>Resazurina</b>	1228	1231	1220	1238	43290	42749	42518	42825
					41720	40620	41958	41376
					42777	42853	42230	42940

Evaluación de citotoxicidad del compuesto AR120. Periodo de tratamiento 48 horas.

<b>Ensayo I Compuesto Sintético AR120 - Métodos de tinción celular</b>									
<b>Método de tinción</b>									
	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento				
	B Control	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	Control C	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	
<b>Línea Celular HT-29</b>									
<b>MTT</b>	0,012	0,013	0,013	0,013	2,197	2,160	2,105	2,419	
					2,013	2,161	2,116	2,209	
					2,175	2,156	2,196	2,367	
<b>Resazurina</b>	1302	1280	1294	1473	32796	30287	28434	29776	
					32333	30982	26312	31079	
					33606	32060	28675	30867	
<b>Línea Celular HEp-2</b>									
<b>MTT</b>	0,016	0,013	0,015	0,016	0,941	0,781	0,860	0,833	
					0,953	0,884	0,880	0,865	
					0,947	0,822	0,868	0,834	
<b>Resazurina</b>	1198	1183	1202	1330	40525	38348	39537	45525	
					38962	39272	38594	45562	
					40897	39165	39155	45671	
<b>Línea Celular HeLa</b>									
<b>MTT</b>	0,011	0,012	0,011	0,014	1,611	1,534	1,545	1,532	
					1,481	1,441	1,402	1,453	
					1,681	1,598	1,623	1,632	
<b>Resazurina</b>	1243	1194	1199	1341	41703	42319	40562	46429	
					41130	42331	40117	46732	
					42936	42019	41033	46256	

Comprobación de la citotoxicidad de doxorubicina HCl. Periodo de tratamiento 48 horas.

<b>Ensayo I Doxorubicina HCl - Métodos de tinción celular.</b>								
<b>Método de tinción</b>	<b>Pozos de Blanco</b>				<b>Pozos de tratamiento</b>			
	<b>B Control</b>	<b>10µM</b>	<b>1µM</b>	<b>0,1µM</b>	<b>Control C</b>	<b>10µM</b>	<b>1µM</b>	<b>0,1µM</b>
<b>Línea Celular HT-29</b>								
<b>MTT</b>	0,011	0,010	0,012	0,012	1,917	0,829	1,506	1,572
					1,966	0,816	1,534	1,690
					2,010	0,838	1,623	1,625
<b>Resazurina</b>	1332	1328	1346	1317	40220	28550	41800	40379
					39667	28801	41906	40579
					40605	30640	42254	40141
<b>Línea Celular HEp-2</b>								
<b>MTT</b>	0,011	0,011	0,011	0,013	0,992	0,130	0,234	0,640
					1,039	0,121	0,271	0,587
					0,960	0,089	0,253	0,563
<b>Resazurina</b>	1365	1334	1335	1349	42903	14857	27078	32796
					42946	14223	24593	33312
					43319	16024	21257	34084
<b>Línea Celular HeLa</b>								
<b>MTT</b>	0,010	0,011	0,012	0,011	1,738	0,738	0,997	1,273
					1,661	0,766	1,014	1,400
					1,704	0,798	0,956	1,441
<b>Resazurina</b>	995	975	971	960	38730	22087	27882	35160
					36302	23458	28240	30526
					35983	22528	28271	32565

Evaluación de citotoxicidad del compuesto AR110. Periodo de tratamiento 48 horas.

<b>Ensayo II Compuesto Sintético AR110 - Métodos de tinción celular.</b>								
<b>Método de tinción</b>	<b>Pozos de Blanco</b>				<b>Pozos de tratamiento</b>			
	B Control	10µM	1µM	0,1µM	Control C	10µM	1µM	0,1µM
<b>Línea Celular HT-29</b>								
<b>MTT</b>	0,022	0,020	0,019	0,021	2,242	1,989	2,045	1,965
					2,100	1,926	2,024	2,144
					1,998	2,045	2,103	2,195
<b>Resazurina</b>	1612	1466	1480	1474	11997	12299	11257	10779
					11298	14591	11271	12032
					11070	12016	12832	11368
<b>Línea Celular HEp-2</b>								
<b>MTT</b>	0,018	0,031	0,021	0,025	1,594	1,519	1,400	1,435
					1,607	1,513	1,463	1,47
					1,613	1,54	1,518	1,508
<b>Resazurina</b>	1481	1343	1298	1324	43456	38996	39922	40657
					45975	40553	42467	42304
					41923	37208	38072	38014
<b>Línea Celular HeLa</b>								
<b>MTT</b>	0,014	0,016	0,017	0,023	1,771	1,759	1,600	1,661
					1,825	1,570	1,660	1,697
					1,845	1,422	1,768	1,718
<b>Resazurina</b>	1250	1120	1116	1135	36396	32877	33400	33704
					37499	33198	33451	33028
					33538	30405	30588	31061

Evaluación de citotoxicidad del compuesto AR100. Periodo de tratamiento 48 horas.

<b>Ensayo II Compuesto Sintético AR100 - Métodos de tinción celular.</b>								
<b>Método de tinción</b>	<b>Pozos de Blanco</b>				<b>Pozos de tratamiento</b>			
	B Control	10µM	1µM	0,1µM	Control C	10µM	1µM	0,1µM
<b>Línea Celular HT-29</b>								
<b>MTT</b>	0,016	0,016	0,014	0,015	2,052	1,776	1,888	1,965
					1,844	1,957	1,967	2,03
					2,084	1,913	1,862	2,018
<b>Resazurina</b>	1446	1443	1442	1423	16301	16384	17291	16904
					14341	14317	14370	13829
					12312	13008	12892	13601
<b>Línea Celular HEp-2</b>								
<b>MTT</b>	0,019	0,031	0,020	0,030	1,328	1,300	1,197	0,981
					1,424	1,311	1,207	1,171
					1,387	1,352	1,265	1,196
<b>Resazurina</b>	1347	1260	1331	1325	41841	41618	43061	43252
					42668	41636	41704	42355
					39295	39808	40426	40176
<b>Línea Celular HeLa</b>								
<b>MTT</b>	0,016	0,018	0,015	0,02	1,613	1,639	1,597	1,551
					1,697	1,681	1,598	1,585
					1,667	1,665	1,638	1,609
<b>Resazurina</b>	1142	1108	1124	1152	33864	34713	34781	34120
					33543	33368	32313	32794
					31184	31483	31282	31563

Evaluación de citotoxicidad del compuesto AR120. Periodo de tratamiento 48 horas.

<b>Ensayo II Compuesto Sintético AR120 - Métodos de tinción celular</b>								
<b>Método de tinción</b>	<b>Pozos de Blanco</b>				<b>Pozos de tratamiento</b>			
	<b>B Control</b>	<b>10µM</b>	<b>1µM</b>	<b>0,1µM</b>	<b>Control C</b>	<b>10µM</b>	<b>1µM</b>	<b>0,1µM</b>
<b>Línea Celular HT-29</b>								
<b>MTT</b>	0,016	0,022	0,02	0,02	1,779	1,490	1,629	1,725
					1,695	1,690	1,653	1,761
					1,753	1,698	1,699	1,805
<b>Resazurina</b>	1432	1413	1401	1568	20448	18084	20419	18627
					13396	16943	16622	18405
					13139	14972	15756	16819
<b>Línea Celular HEp-2</b>								
<b>MTT</b>	0,026	0,03	0,028	0,033	1,019	0,816	0,838	0,884
					1,029	0,848	0,802	0,774
					1,086	0,987	0,842	0,818
<b>Resazurina</b>	1351	1353	1388	1546	42961	43673	42403	48053
					40681	41247	39201	43459
					40464	40576	40060	43786
<b>Línea Celular HeLa</b>								
<b>MTT</b>	0,012	0,038	0,014	0,017	1,509	1,495	1,577	1,507
					1,533	1,636	1,530	1,585
					1,581	1,629	1,592	1,541
<b>Resazurina</b>	1109	1094	1078	1221	34630	35255	34923	39369
					30971	31872	30818	35122
					31392	30829	30772	35342



Evaluación de la citotoxicidad de 13 extractos etanólicos con actividad antiparasitaria sobre Leishmania en la línea celular HEp-2. Ensayo I

Extracto etanólico	Línea Celular Hep-2							
	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
	B Control	5µM	1µM	0,5µM	Control C	5µM	1µM	0,5µM
1	1373	1216	1232	1214	46432	37233	41378	41143
					47473	36055	40577	41845
					47240	37759	41127	41733
19	1230	1210	1217	1209	40272	39869	40460	40339
					41538	39373	39672	40663
					40856	39483	38992	40072
7	1196	1183	1168	1312	40113	38848	39852	44432
					39867	39189	40200	44844
					40319	39553	40491	44974
11	1267	1158	1158	1150	46851	40987	41037	41000
					46715	39950	40627	41078
					45466	40774	40864	40941
15	1162	1134	1140	1137	40729	14328	39891	40171
					41028	13212	40269	40179
					41446	12777	41293	40620
9	1141	1132	1141	1234	40124	39639	40321	44859
					39236	38807	40156	44462
					40132	39433	39993	43657
3	1569	1377	1321	1316	46323	30482	42356	42327
					47283	30154	42582	41717
					47296	31461	42662	42169
17	1280	1276	1272	1283	42112	41931	42347	42793
					42707	42317	41939	43111
					42464	42977	42581	42888
13	1309	1318	1347	1533	43106	41871	42765	48180
					41948	41917	42519	48408
					43019	41836	43174	48452
21	1372	1255	1252	1262	40805	36906	36904	36677
					41623	36362	37160	36307
					41477	37153	36719	36544
5	1251	1245	1257	1266	36449	37073	36488	36826
					36650	36618	35749	36823
					36173	35775	35824	36718
10	1272	1236	1248	1354	36913	35579	36483	38722
					36080	35953	35798	39996
					36292	35469	36268	40904
12	1357	1232	1224	1302	41413	16250	37110	36517
					41798	16552	36945	35982
					41221	15700	36921	36680

Evaluación de la citotoxicidad de 13 extractos etanólicos con actividad antiparasitaria sobre Leishmania en la línea celular HT-29. Ensayo I

Extracto etanólico	Línea Celular HT-29							
	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
	B Control	5µM	1µM	0,5µM	Control C	5µM	1µM	0,5µM
1	1785	1609	1647	1615	42408	42759	45786	47638
					44210	41428	45013	47816
					43523	42628	44886	48185
19	1627	1607	1601	1614	43386	39754	42783	45479
					42778	39558	41032	46112
					43071	39591	41746	45905
7	1638	1647	1603	1842	41705	40855	44501	46135
					40083	40354	44428	46448
					41088	40795	44164	46676
11	1633	1510	1493	1498	26324	26286	27059	29831
					26174	25673	29860	30991
					25227	28404	30393	30047
15	1480	1504	1455	1489	45110	45799	47285	47528
					45864	44540	46714	46682
					45652	44794	45937	46400
9	1500	1484	1469	1636	39101	38825	41995	41357
					36311	39645	42816	44711
					37591	41206	42382	45720
3	1647	1538	1532	1536	34892	34841	35994	36707
					35887	36281	36197	37449
					36063	33373	36500	36112
17	1520	1504	1527	1532	36264	34949	36529	41224
					36897	33172	35240	40749
					34043	32387	34564	37583
13	1520	1519	1495	1653	36891	37750	40189	39915
					32409	38198	39877	41309
					32826	37638	40855	41608
21	1583	1396	1401	1414	35047	32135	34150	36096
					36880	30083	33971	36789
					36708	31841	34197	37707
5	1370	1384	1370	1348	33856	33462	34457	37242
					30795	31893	32370	37163
					31284	32158	31614	35633
10	1401	1415	1375	1581	32718	35713	37629	37575
					31619	35064	36782	36313
					33390	35416	37847	37914
12	1612	1401	1403	1442	37831	30688	30763	32313
					37632	31449	31526	32728
					35212	29054	29893	31903

Evaluación de la citotoxicidad de 13 extractos etanólicos con actividad antiparasitaria sobre Leishmania en la línea celular HeLa. Ensayo I

Extracto etanólico	Línea Celular HeLa							
	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
	B Control	5µM	1µM	0,5µM	Control C	5µM	1µM	0,5µM
1	1346	1226	1233	1248	45045	41302	40322	41019
					45675	41319	41347	40336
					45606	42182	41204	41154
19	1239	1216	1216	1205	40509	40378	39468	39249
					40978	40821	39485	39847
					41085	40509	39260	39537
7	1209	1181	1190	1315	39443	39921	38454	43549
					38973	39941	38753	44827
					39849	39878	38680	44478
11	1310	1199	1167	1181	45480	39681	40581	40183
					45672	39109	40516	39648
					44359	39572	40543	40373
15	1171	1146	1144	1136	40543	31091	38939	39561
					41001	31709	39241	39037
					40505	29477	39383	40081
9	1146	1144	1133	1224	39286	39206	39088	44331
					38883	39123	38399	44110
					39487	39198	38871	43190
3	1383	1250	1257	1250	47971	40819	44098	43528
					48904	41247	44599	42880
					48992	40805	43607	43178
17	1257	1248	1262	1266	43355	42470	43069	43020
					43687	42686	41774	43150
					43574	41154	41768	42439
13	1276	1254	1271	1447	43883	41810	43439	50982
					43156	41394	43948	50919
					44363	41052	43892	51984
21	1605	1435	1435	1438	47195	42761	42813	42909
					47718	42603	43224	42475
					47782	43350	43083	43007
5	1393	1377	1381	1365	42742	43369	43105	42721
					43244	43746	42844	43756
					43009	43550	43118	43425
10	1402	1356	1387	1571	43131	41829	42132	46569
					41728	43176	41914	48160
					42792	42959	43099	47423
12	1625	1477	1456	1463	47819	39350	43488	43595
					47493	38790	43242	42213
					46922	40138	43201	42840

Comprobación de la citotoxicidad de doxorubicina HCl. Periodo de tratamiento 48 horas.

Ensayo I Doxorubicina HCl							
Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
B Control	10µM	1µM	0,1µM	Control C	10µM	1µM	0,1µM
<b>Línea Celular HEp-2</b>							
1236	1239	1229	1231	35466	9261	19860	26735
				35843	11377	17729	26951
				36692	12482	16967	28429
<b>Línea Celular HT-29</b>							
1359	1357	1347	1331	41865	23825	39674	39373
				41870	21395	40012	40224
				41392	22897	37321	40881
<b>Línea Celular HeLa</b>							
1429	1418	1428	1433	42144	27971	33988	39199
				42773	27167	33989	38438
				43306	25524	35433	39061

Datos obtenidos después de un tiempo de recuperación de 24 horas para doxorubicina HCl y los extractos *X. discreta* y *P. hispidum* después de un tratamiento traumático.

Ensayo I Recuperación celular de HEp-2								
Pozos de Blanco					Pozos de tratamiento			
Doxorubicina HCl	B Control	10µM	1µM	0,1µM	Control C	10µM	1µM	0,1µM
	1442	1326	1303	1331	30336	3122	2377	15700
					31811	3473	2609	13227
					32553	3474	2872	16715
<i>Xilopia discreta</i>	B Control	5µM	1µM	0,5µM	Control C	5µM	1µM	0,5µM
	1357	1232	1224	1302	41413	16250	37110	36517
					41798	16552	36945	35982
					41221	15700	36921	36680
<i>Piper hispidum</i>	1162	1134	1140	1137	40729	14328	39891	40171
					41028	13212	40269	40179
					41446	12777	41293	40620

Evaluación de la citotoxicidad de 13 extractos etanólicos con actividad antiparasitaria sobre Leishmania en la línea celular HEP-2. Ensayo II.

Extracto etanólico	Línea Celular HEP-2							
	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
	B Control	5µM	1µM	0,5µM	Control C	5µM	1µM	0,5µM
1	1423	1251	1262	1266	41936	26907	37368	37520
					41381	25394	38316	38217
					37710	26169	35119	35079
19	1242	1234	1251	1237	37977	32835	36612	38154
					37975	33071	35958	37009
					35610	29739	34873	34690
7	1265	1242	1243	1416	38845	35394	38916	44765
					36456	33855	36921	42274
					36375	33344	37698	41788
11	1136	1114	1139	1143	33228	27135	32872	33563
					30454	25226	32209	33106
					33044	25738	30192	30939
15	1280	1149	1137	1139	38779	20896	33495	32830
					36597	19510	31422	31438
					34043	19428	30561	32949
9	1145	1137	1117	1282	31801	24184	31024	34857
					29809	25306	30104	35025
					30111	22355	29452	31844
3	1480	1313	1267	1261	43704	29324	40358	40526
					45200	29050	40804	40315
					45302	30650	41468	40753
17	1220	1226	1218	1240	40324	41155	41071	41133
					41459	41899	40558	41645
					41120	41690	41236	41269
13	1258	1256	1287	1457	41545	40262	40930	46002
					40712	40595	40740	46118
					41689	40252	41020	45927
21	1408	1255	1265	1266	40262	33243	35215	36819
					41121	30749	35290	32233
					37420	28397	33547	34227
5	1255	1242	1253	1246	35028	36481	36722	37039
					33622	35148	36809	37590
					31633	32335	33752	34697
10	1256	1235	1253	1397	37521	33452	37742	43087
					36203	34174	37277	43457
					36439	32426	37458	43245
12	1390	1248	1247	1272	36728	16028	33533	34952
					38153	14590	34778	33465
					36317	14466	32838	33567

Evaluación de la citotoxicidad de 13 extractos etanólicos con actividad antiparasitaria sobre Leishmania en la línea celular HT-29. Ensayo II.

Extracto etanólico	Línea Celular HT-29							
	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
	B Control	5µM	1µM	0,5µM	Control C	5µM	1µM	0,5µM
1	1738	1582	1610	1610	43448	42234	45018	48341
					40801	41490	44603	47046
					41920	42686	44326	48127
19	1622	1614	1607	1619	43256	39948	40220	45845
					41708	39051	40199	43892
					42588	41452	44153	45055
7	1633	1625	1817	1602	39638	40953	45802	46584
					41335	40391	43936	44293
					41296	40957	42923	45273
11	1622	1499	1497	1470	25458	26698	28206	29781
					24347	26343	28059	29821
					24626	26117	26435	28189
15	1492	1465	1461	1482	45965	44183	45673	46390
					45158	45676	46441	47335
					46147	45927	47447	47810
9	1507	1493	1470	1637	39338	40733	42359	44483
					38362	37664	41645	43590
					37342	37567	41726	40451
3	1659	1560	1494	1545	37079	33766	35732	37754
					37729	35821	36252	37532
					36156	36634	36812	36386
17	1537	1541	1555	1520	33851	33048	35566	39236
					33913	32741	36523	37900
					33477	32062	34783	39441
13	1568	1502	1559	1654	33192	38301	40032	41339
					36522	37820	39149	42304
					35374	37917	40165	40248
21	1718	1566	1594	1586	47035	41615	44682	47000
					48595	42403	45823	43961
					49615	42017	45854	46876
5	1579	1563	1697	1556	44830	42248	43748	45740
					45927	43107	44589	45671
					45275	44322	45114	44569
10	1580	1582	1553	1780	43630	39783	46930	49980
					44823	41886	46750	51649
					45975	41941	48012	51033
12	1797	1700	1666	1639	49805	43508	45257	46238
					49072	42097	44030	46069
					46374	43042	43924	47669

Evaluación de la citotoxicidad de 13 extractos etanólicos con actividad antiparasitaria sobre Leishmania en la línea celular HeLa. Ensayo II.

Extracto etanólico	Línea Celular HeLa							
	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
	B Control	5µM	1µM	0,5µM	Control C	5µM	1µM	0,5µM
1	1449	1285	1289	1305	47941	42869	43194	44656
					48321	42346	43274	45894
					48474	43277	43273	45794
19	1292	1276	1289	1293	43403	41630	42303	42863
					43000	41948	42096	43373
					42909	41070	41241	43073
7	1301	1290	1312	1488	42574	41062	42372	47968
					42101	40435	41842	48259
					42858	41090	41028	48360
11	1418	1287	1303	1311	48745	42861	43734	42581
					48320	41801	43771	42456
					48034	42264	44052	44214
15	1283	1285	1309	1297	41615	39289	39932	43177
					41705	39068	40582	43507
					42667	40589	41528	42505
9	1323	1295	1301	1459	41563	38915	41270	44449
					41930	39393	40425	44308
					42268	38983	40706	42559
3	1421	1313	1317	1331	49181	41611	44191	43770
					48726	41859	44271	42643
					48104	41476	44426	43561
17	1311	1304	1305	1319	43655	41686	41585	42292
					43474	40824	42183	42510
					43399	42587	43275	43396
13	1339	1301	1338	1453	44035	41168	43575	51103
					43130	41330	43514	51355
					44128	41533	43927	49949
21	1502	1348	1347	1361	47861	41968	41389	41580
					48922	41778	41799	40950
					49002	42603	41791	41697
5	1345	1314	1337	1341	41471	39289	40386	41047
					41770	38973	39246	40446
					41970	37841	39234	40481
10	1349	1316	1330	1474	41693	39379	41080	44597
					41259	39451	41186	44276
					41868	38677	41337	44271
12	1471	1320	1325	1319	48330	39214	42592	42337
					48520	39154	42620	41622
					47343	39681	42476	42356

Comprobación de la citotoxicidad de doxorrubicina HCl. Periodo de tratamiento 48 horas. Ensayo II.

Ensayo II Doxorrubicina HCl							
B Control	Pozos de Blanco			Control C	Pozos de tratamiento		
	10µM	1µM	0,1µM		10µM	1µM	0,1µM
<b>Línea Celular HEp-2</b>							
1188	1091	1106	1121	35620	9494	13793	28178
				37687	10084	15156	24718
				34989	9739	14278	26430
<b>Línea Celular HT-29</b>							
1116	1108	1134	1124	31840	18915	28705	30978
				31222	20431	29490	29490
				28315	18265	29555	30311
<b>Línea Celular HeLa</b>							
1336	1308	1314	1298	41336	27310	30407	37937
				41531	26048	32303	38526
				41852	27527	34384	39956

Datos obtenidos después de un tiempo de recuperación de 24 horas para doxorrubicina HCl y los extractos *X. discreta* y *P. hispidum* después de un tratamiento traumático. Ensayo II.

Ensayo II Recuperación celular de HEp-2								
Doxorrubicina HCl	Pozos de Blanco				Pozos de tratamiento			
	B Control	10µM	1µM	0,1µM	Control C	10µM	1µM	0,1µM
	1103	1117	1113	1125	19127	3573	2404	13255
					17566	2625	2397	14312
					20420	2636	2397	13212
<i>Xilopia discreta</i>	B Control	5µM	1µM	0,5µM	Control C	5µM	1µM	0,5µM
	1194	1111	1104	1140	19943	8077	16861	20023
					23596	8917	22117	21719
<i>Piper hispidum</i>					22863	8153	18327	20237
	1066	1072	1073	1063	8511	1392	4622	8012
					8206	1393	4764	7976
				8469	1371	4352	7009	

## **Anexo 2.** Protocolo para el empleo del método de resazurina

### **ENSAYO DE REDUCCIÓN DE RESAZURINA**

**OBJETIVO:** Determinar de forma indirecta, en número de células viables presentes en un pozo, midiendo la cantidad de resofurina producida por la reducción metabólica de la resazurina.

#### **EQUIPOS**

Sistema de aspiración al vacío

Cabina de flujo laminar vertical de Bioseguridad clase II LABCONCO

Incubadora JOUAN IG150 a 37°C con atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

Micropipeta multicanal

Pipeta repetidora

#### **MATERIALES**

Solución de resazurina a una concentración inicial de 44M.

Solución buffer de fosfatos pH: 7,3 y Molaridad :149.2 mM/L/

Medio de cultivo suplementado (MEM con 5% de FBS y 50µg de gentamicina)

Medio de cultivo no suplementado

Jeringas con aguja 21g.

1. Inocular las células en las placas siguiendo el POE No 7, e incubar por 24 horas a 37°C y en condiciones estándares.
2. Pasadas las 24 horas retirar las placas de la incubadora y aspirar el medio presente en los pozos empleando una jeringa con aguja 21 g conectada al sistema de vacío.
3. Disponer en cada pozo 100 µL de buffer fosfatado precalentado a 37°C: Dejar en contacto con las células por 30 segundos.
4. Aspirar el buffer y adicionar 100 µL de la solución de prueba (extracto, compuesto, fracción etc.,)
5. Incubar la placa a 37°C por 48 horas.

6. Preparar la solución de trabajo de resazurina a una concentración de 44 M en PBS
7. Aspirar con jeringa conectada al sistema de vacío el medio de cultivo, lavar cada pozo con 100  $\mu$ L de solución de buffer de fosfato y extraerlo.
8. Disponer en cada pozo 10% de resazurina volumen/volumen con medio sin suplementar usando una multicanal, llevar a la incubadora e incubar por 4 horas a 37°C con atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> en aire

DE AQUÍ EN ADELANTE TRABAJAR FUERA DE LA CABINA DE FLUJO LAMINAR

9. Leer los valores de fluorescencia en el lector de placas TECAN GENios medidos a una longitud de onda de de 535nm<sub>em</sub> y 595nm<sub>ex</sub>.