

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Evaluación de la acción antiproliferativa del extracto  
acuoso de *Physalis peruviana* L. (Aguaymanto) en  
cultivos celulares de linfocitos humanos y leucemia  
mieloide crónica (K562)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de  
Bióloga Genetista Biotecnóloga

**AUTOR**

Dalia Violeta Churampi Mancilla

**ASESOR**

Margarita Rosa Eugenia Velásquez Reinoso

Lima - Perú

2016

## DEDICATORIA

*A Violeta la flor más amada de mis jardines terrenales, a Alejandro el más grande y valeroso hidalgo de mi vida, a mi honorable y combatiente hermano Raúl, a mi dignísima hermana Dapne, a mis heroicos abuelos Edilberto y Segundo y a Armando el heraldo máspreciado de mi corazón, gracias por ayudarme en esta gran carrera y apoyarme en cada paso y caída.*

## AGRADECIMIENTOS

Todo lo que soy y aspiro ser es gracias a mis Padres, hermanos, Armando y amigos gracias por ayudar a edificar todo lo que soy con sus buenos cimientos. Tengo muchísimas personas a las que querría mencionar, es difícil tener que resumir en algunos párrafos mis agradecimientos para con todos así que estoy segura que me faltarán palabras para poder expresar tanta consideración hacia mí.

Gracias a mi segunda familia Churampi-Heredia, a mis padrinos y tíos Amadeo y Elvia, a mis queridas primas hermanas de sangre y amor Valeria y Adriana. Gracias a mis primas Ivanna y Vanessa, a mis tíos Blanca, Meche, Elinda, Vilma, Pablo y Juan. A mis otras primas Isabel, María y mis queridos primos, sobrinos y sobrinas. A mis amados abuelos Edilberto, Segundo, Aurora y Julia, que supieron inculcar los mejores valores en mis padres.

Gracias compañeros por su incondicional amistad y apoyo en el colegio Virgen María, gracias Diana, Fiorella, Yasmin, Victor, Karla, Israel y prof. Ángel. Gracias también a mis antiguas amigas Julia y Pamela. Un agradecimiento especial a usted sra. Marta y sr. Carlos por hacerme sentir bienvenida en su hogar, gracias a la promoción DUC IN ALTUM.

Todo lo que pude aprender en esta preciosa carrera universitaria es gracias a mis queridos profesores que me inculcaron desde el inicio la importancia del saber, gracias al laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM por abrirme sus puertas, gracias profesora Margarita Velásquez por haberme dado la mano y arriesgarse en este reto que fue mi tesis, por hacerme sentir una raíz más de este precioso lugar, por esa sonrisa que me recuerda a la de mi madre que me abriga cada día, gracias Dr. Jaime Descailleaux por haber puesto su ladrillo en esta construcción tan grande, gracias por haber confiado en una idea diferente y riesgosa, por tener fe en mí y hacer que sienta que el laboratorio es mi segundo hogar.

Muchas gracias por apoyarme prof. Alberto López gracias por todo, prof. Mari Siles, gracias por impulsarme para nunca rendirme y creer en mis conocimientos, gracias al laboratorio de **Genética General** de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM. Gracias Yvett, José y Diego que me apoyaron con su sincera amistad.

Muchas gracias al laboratorio de Citogenética de la Facultad de Ciencias Biológicas-UMMSM, gracias prof. Olga Bracamonte, Dr. Misael Guevara, gracias Jorge, Yomara, Enzo y Gabriela. Muchas gracias al laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM, gracias prof. Susana Gutiérrez y prof. Fernando Merino, gracias Manuel por la comprensión y paciencia. Muchas gracias profesores Rubén Valdiviezo y Rosa Orondo por su apoyo incondicional y a la Facultad de Medicina Humana-UNMSM por acompañarme en este reto que fue mi tesis. Gracias al laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, gracias Dra. Libertad Alzamora, prof. Erasmo Colona, Emely, Kelly y Luis por el apoyo. Gracias por el tremendo apoyo Dr. Abraham Vaisberg encargado del Laboratorio de Biología Celular y Virología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Un agradecimiento especial a usted Dra. Mariela Flores por apoyarme más de lo que cualquier persona me ha apoyado. Gracias Dra. Lily Vásquez Ponce por el apoyo que me dio al inicio de mis investigaciones.

Gracias a mis queridos amigos que hicieron de mi estancia pre universitaria la mejor de las experiencias, por su apoyo, comprensión, ánimos, y sobre todo por su sincera amistad, gracias Renzo, Eva, **Yajahaira, Henry, Erik, Nagif, Lisete, Indira, Wendy y Lenin** el lazo que formamos nunca se romperá. También muchísimas gracias a Karina, Saulo, Pedrito, Angelo, Estefanía y mis demás compañeros de la base G y B 09 (Rossalind Elsie Franklin). Gracias **Renzo** por ser mi hermano y siempre mi mejor amigo. Gracias sra. Sandra por tratarme como una hija y ayudarme cuando tanto la necesitaba. Gracias amiga **Zuccetti** por darme un hombro en donde apoyarme. Gracias **Eva** por apoyarme académicamente y por obsequiarme tu amistad desde que pisé la universidad.

Gracias **ARMANDO** por ser la mano que me sostiene, por velar por mis sueños y ser mis ojos en la oscuridad. Gracias **PAPÁ Alejandro y MAMÁ Violeta** por ser el motor de mi vida, de todo lo que soy y lo que quiero ser, gracias por empaparme con tanta amor y felicidad. Gracias **RAÚL** por ser pieza fundamental en toda mi carrera profesional, por apoyarme incondicionalmente hasta que alcancé la victoria. Gracias a **DIOS y al AGUAYMANTO**, que me han dado la posibilidad de cumplir más metas de las que me había trazado.

*Todos tus intentos son un éxito, algunas veces ganas y otras simplemente aprendes.  
Nada es en vano. Ismael Cala.*

## ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ATCC	American Type Culture Collection (Colección americana de tipos de cultivos).
CDDP	Cis-diaminodicloroplatino (Cisplatino).
DMSO	Dimetilsulfóxido.
D.O.	Densidad óptica.
ECACC	European Collection of Cell Cultures (Colección europea de cultivos celulares).
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y medicamentos).
IC50	The mean inhibitory concentration (Concentración inhibitoria media).
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico).
NaCl	Cloruro de Sodio.
nm	Nanómetro.
PB-MAX	Peripheral Blood Karyotyping Medium (Medio de sangre periférica para cariotipificación).
PBS	Phosphate buffered saline (Tampón o buffer fosfato salino).
rpm	Revoluciones por minuto.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Instituto Parque Memorial Roswell).
SBF	Suero Bovino fetal.
SI	Índice de selectividad.
°C	Grados Celsius.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
ABREVIATURAS .....	VI
INDICE GENERAL.....	VII
ÍNDICES DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS .....	XII
RESUMEN .....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	5
II.1. Las plantas, fuentes de nuevas sustancias.....	5
II.2. Farmacognosia .....	5
II.3. Investigación de compuestos anticancerígenos de origen vegetal .....	7
II.4. Biología de la especie <i>Physalis peruviana</i> L. “aguaymanto”.....	8
II.4.1. Clasificación taxonómica.....	8
II.4.2. Características Botánicas.....	8
II.5. Uso de <i>Physalis peruviana</i> L. en la medicina popular .....	10
II.6. Composición fisicoquímica y nutricional de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	11
II.7. Cultivo celular .....	15
II.8. Banco de líneas celulares y colecciones de cultivos celulares .....	15
II.8.1. Línea K562 .....	19
II.9. Impacto del cáncer: principales causas de mortalidad .....	19
II.10. Técnicas o ensayos para evaluar citotoxicidad .....	21
II.11. Ensayos de antiproliferación mediante cultivo celular <i>in vitro</i> : Prueba de inhibición del crecimiento celular de células normales y tumorales.....	23

II.11. 1. Método colorimétrico del MTT .....	25
II.11. 2. Ensayo azul de tripano .....	26
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
IV.1. Materiales.....	28
IV.1.1. Modelo biológico humano .....	28
IV.1.2. Modelo biológico vegetal .....	28
IV.1.3. Identificación taxonómica.....	29
IV.1.4. Materiales de laboratorio.....	29
IV.1.5. Equipos y Aparatos .....	29
IV.1.6. Otros.....	30
IV.2. Metodología.....	30
IV.2.1. Preparación del extracto acuoso de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	30
IV.2.2. Preparación de las diluciones del cisplatino .....	31
IV.2.3. Obtención de linfocitos de sangre periférica.....	32
IV.2.4. Exposición de los linfocitos a los extractos acuosos del aguaymanto .....	35
IV.2.5. Transporte de la línea celular purificada al laboratorio .....	36
IV.2.6. Cultivo, mantenimiento y criopreservación de las líneas celulares .....	37
IV.2.7. Conteo celular con azul de tripano para estimar la Viabilidad celular de los linfocitos humanos y la línea K562 .....	41
IV.2.8. Ensayo colorimétrico MTT para los linfocitos humanos y la línea K562 .....	42
IV.2.9. Análisis estadístico.....	44
V. RESULTADOS.....	45
V.1. Evaluación preliminar del cultivo de linfocitos .....	45
V.1.1. Mediante conteo celular con azul de tripano.....	45
V.2. Evaluación de la viabilidad celular en linfocitos humanos.....	45
V.2.1. Mediante conteo celular con azul de tripano .....	45
V.2.2. Mediante el ensayo MTT.....	49
V.2.3. Concentración Inhibitoria Media (IC50) .....	52

V.3. Evaluación de la viabilidad celular en la línea celular K562 .....	53
V.3.1. Mediante conteo celular con azul de tripano .....	53
V.3.2. Mediante el ensayo MTT .....	57
V.3.3. Concentración Inhibitoria Media (IC50) .....	59
V.4. Índice de selectividad. ....	60
VI. DISCUSIÓN .....	61
VI.1. Viabilidad celular de linfocitos sometidos a extracto acuoso de <i>Physalis</i> <i>peruviana</i> L. evaluada mediante conteo celular y ensayo MTT.....	61
VI.2. Efectos en la viabilidad celular de linfocitos sometidos a extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino .....	63
VI.3. Viabilidad celular de la línea K562 sometida al extracto acuoso de <i>Physalis</i> <i>peruviana</i> L. evaluada mediante conteo celular y ensayo MTT.....	64
VI.4. Efectos en la viabilidad celular de la línea K562 sometida a extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino .....	65
VI.5. Concentración Inhibitoria Media (IC50) e Índice de Selectividad (IS).....	67
VII. CONCLUSIONES .....	70
VIII. RECOMENDACIONES .....	71
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
X. ANEXOS .....	87
X.1. Glosario.....	87
X.2. Contador automático .....	87
X.3. Consentimiento informado.....	89
X.4. Identificación taxonómica .....	91

## ÍNDICES DE FIGURAS

	Pags.
Figura 1. La Farmacognosia .....	6
Figura 2. Fruto de <i>Physalis peruviana</i> L.....	9
Figura 3. Estado natural de <i>Physalis peruviana</i> L. en la zona de colecta .....	10
Figura 4. Esquema representativo del estudio de agentes antiproliferativos .....	23
Figura 5. Reacción de la sal de tetrazolio MTT con la succinato– deshidrogenasa y la formación de sales de formazán .....	26
Figura 6. Zona de muestreo de los frutos frescos de <i>Physalis peruviana</i> L. en Carhuaz-Ancash.....	28
Figura 7. Trituración del fruto y filtración de la masa acuosa obtenida del fruto....	31
Figura 8. Desecación de la masa acuosa .....	31
Figura 9. Metodología del aislamiento de linfocitos de sangre total. Parte 1 .....	33
Figura 10. Metodología del aislamiento de linfocitos de sangre total. Parte 2 .....	34
Figura 11. Linfocitos aislados y en incubación.....	35
Figura 12. Exposición del cultivo celular linfocitario a los diferentes tratamientos .....	35
Figura 13. Flujograma de la metodología utilizada en los linfocitos humanos .....	36
Figura 14. Incubación y monitoreo de la línea celular K562.....	37
Figura 15. Exposición del cultivo celular K562 a los diferentes tratamientos .....	38
Figura 16. Cultivo y establecimiento de la línea K562.....	38
Figura 17. Criopreservación de la línea K562 .....	39
Figura 18. Replicación y subcultivo de la línea K562 para su mantenimiento.....	40
Figura 19. Flujograma de la metodología utilizada con la línea K562 .....	40
Figura 20. Cámara de Neubauer.....	41
Figura 21. Ensayo MTT.....	43
Figura 22. Linfocitos en cámara de Neubauer .....	45
Figura 23. Viabilidad celular de linfocitos sometidos a los tratamientos.....	48
Figura 24. Curva de crecimiento del promedio de los linfocitos sometidos a los tratamientos .....	49

Figura 25. Viabilidad celular de linfocitos sometidos a los tratamientos en el ensayo MTT .....	51
Figura 26. Curva de crecimiento del promedio de los linfocitos sometidos a los tratamientos en el ensayo MTT .....	52
Figura 27. Concentración Inhibitoria Media en linfocitos.....	53
Figura 28. Viabilidad celular de la línea K562 sometida a los tratamientos .....	55
Figura 29. Curva de crecimiento del promedio de la línea K562 sometida a los tratamientos .....	56
Figura 30. Células de la línea K562 viables .....	56
Figura 31. Viabilidad celular de la línea K562 sometida a los tratamientos en el ensayo MTT .....	58
Figura 32. Curva de crecimiento del promedio de la línea K562 sometida a los tratamientos en el ensayo MTT .....	59
Figura 33. Concentración inhibitoria media en la línea K562 .....	60
Figura 34. Contador automático SCEPTER.....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pags.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	8
Tabla 2. Composición nutricional del fruto de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	11
Tabla 3. Composición fisicoquímica de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	12
Tabla 4. Reportes de la composición fisicoquímica de <i>Physalis peruviana</i> L. por cada 100 g del fruto según varios autores .....	14
Tabla 5. Líneas celulares más frecuentemente utilizadas en evaluaciones de antiproliferación.....	18
Tabla 6. Concentraciones del extracto acuoso de <i>Physalis peruviana</i> L. y cisplatino .....	32
Tabla 7. Número y concentración de linfocitos obtenidos de 4ml de sangre de los 10 donantes.....	46
Tabla 8. Conteo celular de linfocitos en la cámara de Neubauer (número de linfocitos x 10 <sup>6</sup> ).....	47
Tabla 9. Densidad óptica de linfocitos humanos en el ensayo MTT .....	50
Tabla 10. Conteo celular en los diferentes tratamientos de la Línea K562 (número de células x 10 <sup>6</sup> ) .....	54
Tabla 11. Densidad óptica de la Línea K562 en el ensayo MTT .....	57

## RESUMEN

*Physalis peruviana* L. "Aguaymanto" es una especie peruana usada tradicionalmente en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades por sus presuntas propiedades quimioprolácticas, quimioterapéuticas, antibióticas, antipiréticas, antivirales y antimicóticas. Es así que se postula como una valiosa fuente natural para la obtención de nuevos agentes farmacológicos. En el presente estudio se evaluó el efecto antiproliferativo del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. en linfocitos humanos y en la línea celular K562 (leucemia mieloide crónica), para lo cual se colectaron frutos frescos de la provincia de Carhuaz (Ancash) que fueron procesados para obtener un extracto sólido puro para adicionarlo a un cultivo celular *in vitro* linfocitario aislado de 10 individuos sanos y de la línea celular K562. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones adecuadas y se les añadió cuatro dosis del extracto acuoso (50, 100, 200 y 400 µg/ml), de cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml) y como control negativo el medio de cultivo. Se determinó la viabilidad celular mediante el conteo celular con el colorante azul de tripano en la cámara de Neubauer y con el ensayo colorimétrico MTT en el lector de ELISA. Los resultados mostraron que las concentraciones de aguaymanto con mayor efecto antiproliferativo fueron 200 y 400 µg/ml, que alcanzaron porcentajes de inhibición mayores de 50 % tanto para los linfocitos y la línea celular K562. Paralelamente, el cisplatino mostró claramente mayor efecto antiproliferativo en los linfocitos en comparación con el aguaymanto, mientras que el aguaymanto mostró mayor efecto antiproliferativo en la línea K562, lo que podría sugerir que el fruto es menos dañino en linfocitos que el cisplatino. El análisis estadístico se realizó con el software STATA a un nivel del 5% (Kruskall-Wallis,  $p < 0.05$ ), encontrándose diferencias significativas en la viabilidad celular de los linfocitos y de K562 con extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino. Con el aguaymanto, la viabilidad celular fue mayor en linfocitos que en K562; y con el cisplatino, la viabilidad celular fue mayor en K562 que en linfocitos. La concentración inhibitoria media del aguaymanto fue de 235.73 µg/ml para linfocitos y para la línea celular K562 fue de 146.25 µg/ml, lo que dio un índice de selectividad mayor a 1 (Microsoft Excel 2010). Esto indica que el aguaymanto tiene mayor efecto antiproliferativo sobre las células cancerígenas de leucemia que sobre las células no malignas (linfocitos). Los resultados son satisfactorios y sugieren continuar estudios sobre las diversas bondades medicinales del aguaymanto como fuente potencial de compuestos bioactivos con aplicación terapéutica.

**Palabras clave:** *Physalis peruviana* L., antiproliferativo, linfocitos humanos, leucemia mieloide crónica, conteo celular, ensayo colorimétrico MTT.

## ABSTRACT

*Physalis peruviana* L. "Aguaymanto" is a peruvian species traditionally used in the treatment of cancer and other diseases for their alleged properties chemoprophylaxis, chemotherapy, antibiotic, antipyretic, antiviral and antifungal. Thus it is postulated as a valuable natural source for obtaining new pharmacological agents. In the present study was evaluated the antiproliferative effect of aqueous extract of *Physalis peruviana* L. in human lymphocytes and in cell line K562 (chronic myelogenous leukemia), for which fresh fruits of the province of Carhuaz (Ancash) were collected to obtain a pure solid extract to add it to a cell culture in vitro of lymphocytes isolated from 10 healthy individuals and the cell line K562. Cultures were maintained in suitable conditions and added with four doses of the aqueous extract (50, 100, 200 and 400 µg / ml), cisplatin (0.3, 0.6, 1.25 and 2.5 µg / ml) and negative control with medium culture. Cell viability was determined by cell counting with trypan blue dye Neubauer chamber and the MTT colorimetric assay in ELISA reader. The results showed that concentrations greater antiproliferative effect of aguaymanto were with 200 and 400 µg / ml, which reached percentages of inhibition over 50% for both lymphocytes and cell line K562. At the same time, cisplatin showed clearly higher antiproliferative effect on lymphocytes than aguaymanto, while aguaymanto showed greater antiproliferative effect in the K562 line, which may suggest that the fruit is less harmful than cisplatin in lymphocytes. Statistical analysis was performed using STATA software at a level of 5% (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ), in cell viability were significant the differences of lymphocytes and K562 with aqueous extract of aguaymanto and cisplatin. With aguaymanto, cell viability was higher in lymphocytes than K562 cells; and with cisplatin, cell viability was higher in K562 cells than lymphocytes. The mean inhibitory concentration was 235.73 aguaymanto µg / ml for lymphocytes and in cell line K562 was 146.25 µg / ml, which gave a selectivity index higher than 1 (Microsoft Excel 2010). This indicates that the aguaymanto has greater antiproliferative effect on cancer cells of leukemia than nonmalignant cells (lymphocytes). The results are satisfactory and suggests to continue studying on the various medicinal benefits of aguaymanto as a potential source of bioactive compounds with therapeutic application.

**Keywords:** *Physalis peruviana* L., antiproliferative, human lymphocytes, chronic myeloid leukemia, cell count, MTT colorimetric assay.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre apareció en la tierra ha procurado mantener su bienestar y protegerse de cualquier amenaza mediante recursos naturales; la naturaleza fue muy generosa al otorgarle gran parte de la protección contra diversas afecciones, estas propiedades generalmente estuvieron asociadas de forma errónea con temas mágico-religiosos; el uso terapéutico de los productos de origen natural es una de las necesidades primordiales desde inicios de la historia de la humanidad (Cortez *et al.*, 2004). Por ejemplo las plantas han sido siempre utilizadas popularmente de manera intuitiva y empírica con fines medicinales, debido a que poseen estructuras que producen aparentemente un efecto fisiológico (Farnsworth *et al.*, 1985 citado por Bermudez *et al.*, 2005).

El auge de los productos fitoterapéuticos como parte de la medicina alternativa, es en respuesta a factores como el alto costo de los medicamentos y de la asistencia médica, razón por la cual se hace necesario crear líneas de investigación que conduzcan a establecer pruebas que permitan asegurar el uso correcto de medicamentos que llevan como principio activo extractos vegetales, con el menor riesgo posible. Es por eso que las técnicas *in vitro* son un modelo biológico reproducible y verificable, altamente usado en respuesta al uso de plantas medicinales que sustituyen una cantidad ingente e innecesaria del uso de animales, los cuales engloban ensayos en cultivos celulares, tisulares, fracciones subcelulares, órganos perfundidos, reconstituidos o en cortes, cultivo primario, reagregados celulares, co-cultivos sistemas con células cancerígenas (leucemia, cáncer de colon, hepatocarcinoma, etc) y células no transformadas (fibroblastos o linfocitos humanos) (Meneau, 2014). En ellos utilizan células genéticamente modificadas, células transgénicas y muestras de procedencia humana. Estos métodos permiten que se controlen eficientemente las condiciones de ensayo, con lo que se alcanza un alto nivel de estandarización; además, son rápidos, económicos y requieren pequeñas cantidades del material de estudio (Meneau, 2014). Sin embargo, aun cuando estos métodos presentan numerosas ventajas no debe dejar de considerarse que son muy restrictivos, ya que evalúan solo un aspecto concreto de la toxicidad y no al organismo como un todo, sin embargo permiten probar distintos productos vegetales y evaluar sus riesgos antes de utilizar modelos animales y mucho antes de utilizar modelos humanos (Meneau, 2014).

Asimismo, también aportan un control al uso indiscriminado de especies vegetales en el tratamiento de muchas enfermedades. La medicina tradicional peruana es y ha sido muy utilizada desde la época incaica, a su vez posee una gran diversidad de plantas nativas con propiedades que en su mayoría no han sido estudiadas científicamente. Un ejemplo es la planta *Physalis peruviana* L. nativa de la región de los Andes, que trasciende la historia de los períodos pre-incas e incas a lo largo del Sur de América, siendo el centro de origen, de acuerdo con Legge (1974), los Andes del Perú.

*Physalis peruviana* L., pertenece a la familia Solanácea, que fue descrita por primera vez por Linnaeus en 1753 (Quispe-Mauricio *et al.*, 2009); y es conocida comúnmente a nivel nacional como capulí y aguaymanto. En Sudamérica el aguaymanto también se le llama uchuva, uva del monte, amor en bolsa, uvilla, tomatillo, etc. (Maguiña, 2005; Angulo, 2005; Caicedo y Andrés, 2010; Fischer *et al.*, 2014). El aguaymanto es usado empíricamente para tratar el cáncer y otras enfermedades, como hepatitis, asma, malaria y dermatitis (Perry, 1980; Zavala *et al.*, 2006) por sus presuntas propiedades antibacterianas, antimicóticas, antipiréticas y quimioterapéuticas. El interés principal en el aguaymanto radica en su aparente potencial anticancerígeno, ya que el cáncer es en la actualidad uno de los problemas de salud más preocupantes de la humanidad, y aunque se ha avanzado considerablemente en el conocimiento, tratamiento y la prevención de la patología, quedan aún muchas lagunas terapéuticas por descubrir (Amiel D. y Amiel J., 2013). Para enfrentar y controlar esta enfermedad, el tratamiento consiste en quimioterapia, radioterapia, cirugía o una combinación de ellas, lamentablemente estas opciones pueden ser muy agresivas y tóxicas causando en el paciente una serie de efectos secundarios a nivel físico y psicológico (Díaz, 2013; Uscanga, 2014).

La citotoxicidad de agentes antineoplásicos sintéticos, muy usados actualmente a nivel nacional e internacionalmente, es un problema constante en la terapia contra el cáncer, su limitación se encuentra en que los fármacos son tóxicos tanto para células cancerígenas como no cancerígenas, lo que provoca efectos adversos en diferentes tipos de tejidos u órganos (Gottesman y Pastan, 1993; Smith *et al.*, 1998; Isnard–Bagnis *et al.*, 2005). Dentro de los efectos secundarios a nivel físico se reportan náuseas y vómitos, alopecia, cansancio, anemia, infección, problemas de coagulación, mucositis, diarrea, estreñimiento, hemorroides, efectos sexuales como disfunción eréctil y otros (Díaz, 2013). La problemática del alcance de las terapias contra cáncer y sus efectos adversos son una triste realidad que enfrentan todos los pacientes en el

mundo, la quimioterapia por ejemplo ha sido socavada por el hecho de que los fármacos usados actualmente son relativamente tóxicos o, hasta cierto punto, ineficaces por un incremento de la resistencia a los medicamentos (Díaz, 2013). Los mecanismos moleculares de la resistencia a la droga pueden implicar una variedad de factores tales como mutación de los genes blancos y la disminución de las concentraciones de los fármacos en las células debido a la toxicidad renal (Gottesman y Pastan, 1993; Ling *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1998; Isnard–Bagnis *et al.*, 2005). En este contexto, se ve urgente la necesidad de descubrir nuevos agentes terapéuticos contra este conjunto de enfermedades que afectan a tanta población (Cortés-Funes, 2006); los recursos naturales (algas, plantas, hongos, etc) siempre han jugado un papel importante en la obtención de fármacos, por ejemplo las plantas son una fuente importante de sustancias anticancerosas (Hartwell, 1971, Vega-Ávila *et al.*, 2006).

Actualmente, a nivel mundial la Administración de alimentos y medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, cuenta con muchos fármacos anticancerígenos de los cuales aproximadamente el 62-67 % son de origen natural (semisintéticos o naturales) (Newman *et al.*, 2003; Vega-Ávila *et al.*, 2006). Así, las plantas medicinales se han convertido en importantes fuentes de agentes quimioterapéuticos como la vinblastina y el paclitaxel obtenidos a partir de derivados de las especies *Catharanthus roseus* y *Taxus brevifolia* (Cragg y Newman, 1999; Zavala *et al.*, 2006). Además, los compuestos de origen natural presentan una gran diversidad de estructuras químicas, a diferencia de las pocas y pequeñas moléculas sintéticas, que con frecuencia proveen de actividades biológicas altamente específicas (Gonzales y Valerio, 2006).

Se ha realizado un enorme número de estudios para determinar la citotoxicidad y actividad antitumoral de diversas especies vegetales, un estudio meta-analítico ha realizado la búsqueda bibliográfica en la base de datos NAPRALERT, y halló 31, 500 trabajos que reportan resultados positivos frente a células tumorales (Gonzales y Valerio, 2006). Los extractos de plantas medicinales poseen más de un mecanismos de acción (Areiza-Mazo *et al.*, 2013), como en *Physalis peruviana* L. que se han aislado componentes químicos que han mostrado tener actividad antioxidante y previenen el daño peroxidativo hepático (Wang *et al.*, 1999; Watson y Oliveira, 1999).

Los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de las hojas y frutos de especies del género *Physalis* (como *Physalis peruviana* L. y *Physalis angulata* L.) han demostrado tener actividad antiproliferativa *in vivo* contra numerosos tipos de células cancerosas, incluyendo; leucemia, cáncer de pulmón, de colon, de cuello uterino, hepatoma,

melanomas y también de células no cancerosas incluyendo líneas de fibroblastos de ratón y células de riñón de mono (Chiang, 1992a, b; Ismail y Alam, 2001, Areiza-Mazo *et al.*, 2013). Los compuestos bioactivos mayoritarios del extracto de *Physalis peruviana* L. son las **physalinas** (A, B, D y F) y los **glicósidos** que han demostrado tener actividad anticancerígena en diversas líneas malignas (Chiang, 1992a; Ismail y Alam, 2001).

La necesidad de búsqueda de nuevos fármacos naturales alternativos anticancerígenos y el desconocimiento científico de muchas propiedades de *Physalis peruviana* L. invita a indagar sobre los beneficios medicinales que presentaría esta planta. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto acuoso del fruto de aguaymanto en base a su actividad antiproliferativa sobre un modelo *in vitro* de linfocitos humanos de sangre periférica proveniente de individuos sanos y con el fin de fortalecer el modelo, se amplió el tipo de linaje celular con células de leucemia mieloide crónica (línea K562) para el análisis del efecto antiproliferativo. Además, se caracterizó la sensibilidad de la línea K562 utilizando un agente antineoplásico de uso clínico muy conocido, el cisplatino (Quispe-Mauricio *et al.*, 2009).

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. Las plantas, fuentes de nuevas sustancias

Desde los orígenes de la humanidad las plantas han sido utilizadas para fines alimenticios y curativos, ya que el ser humano recurría a la naturaleza en busca de alimentos y salud, mediante ensayos de acierto y error ganó experiencia y aprendió a distinguir los productos curativos de los tóxicos y de los alimenticios; estos conocimientos se transmitieron de generación en generación, sin los recursos naturales, el hombre no hubiera sobrevivido a las afecciones (Hernández y Gally, 1981). Son muchas las plantas medicinales usadas desde la antigüedad que hoy tienen vigencia absoluta, la botánica medicinal siempre ha constituido el principal arsenal terapéutico de muchos pueblos y civilizaciones, y se tiene referencia que ya en el año 3 700 A. C., en los documentos médicos chinos, se decía en sus tratados de medicina que existía para cada enfermedad una planta que sería su remedio natural (Ulin, 2006; Corrales *et al.*, 2014). Gradualmente el hombre ha roto muchos de los lazos que lo unen a la naturaleza, actualmente la medicina se vale de drogas sintéticas para aliviar todas las enfermedades y la mayoría de estas drogas son benéficas, pero también son utilizadas sin ningún cuidado, provocando muchas veces efectos secundarios nocivos (Hernández y Gally, 1981). Por fortuna en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza, y por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no solo para incluirlas en nuestra alimentación sino también de forma curativa (Hernández y Gally, 1981).

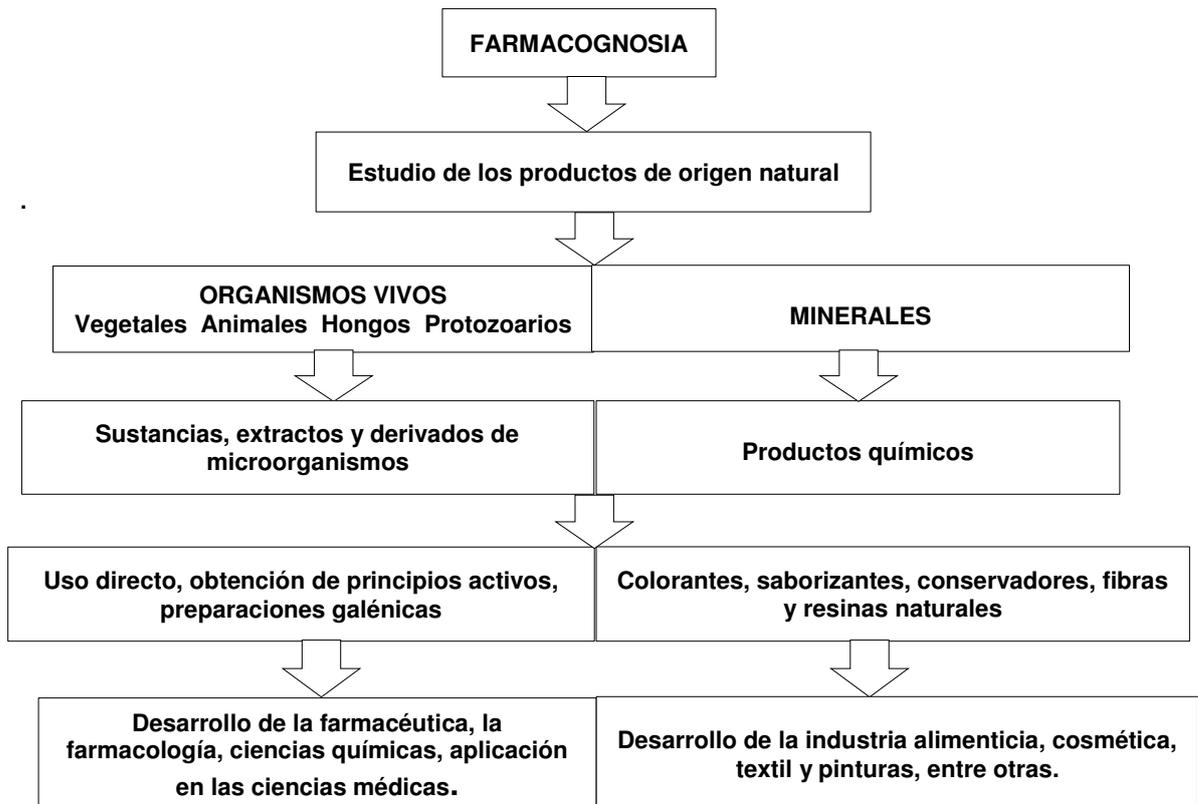
### II.2. Farmacognosia

La Farmacognosia es la más antigua de las ciencias médicas, el término fue utilizado por primera vez por el alemán Aenotheus Seydler en 1815 en su tesis doctoral (*Analecta Pharmacognostica*). Etimológicamente deriva de las voces griegas *Pharmakon*, que significa medicamento y *Gignosco* que se refiere al hecho de adquirir el conocimiento de algo, por lo tanto, la Farmacognosia es la ciencia farmacéutica que se ocupa del estudio de las sustancias medicamentosas naturales ya sean de origen vegetal, microbiano (hongos, bacterias) o animal (Osorio, 2009). También se le puede definir como la ciencia encargada del estudio de fuentes naturales de materia prima de interés farmacéutico, estudiando sustancias con propiedades terapéuticas y tóxicas, excipientes u otras sustancias de interés farmacéutico, aunque su uso sea básicamente tecnológico y no terapéutico (por ejemplo, el algodón y el almidón)

(Cortez *et al.*, 2004; Osorio, 2009) (**Figura 1**). En términos más generales, trata sobre los aspectos botánicos, químicos, biológicos y económicos de los fármacos, destinados a la preparación de medicamentos, razón por la que muchos autores la designan como “Materia Médica” o “Materia Farmacéutica”.

Durante la última mitad del siglo 20, la farmacognosia estaba dedicada a ser una materia de descripción botánica con componentes en química y biología, sin embargo en los últimos años, la enseñanza de la farmacognosia tomo un nuevo interés y relevancia debido al crecimiento explosivo del uso de fitoterapéuticos en la práctica farmacéutica moderna (Verpoorte, 2000).

En un gran esfuerzo para actualizar el alcance de los campos de la farmacognosia de una manera consistente con las actividades científicas del siglo 21, el término ha sido recientemente definido como una ciencia molecular que explora las relaciones de estructura-actividad que ocurren naturalmente con una droga potencial (Verpoorte, 2000).



**Figura 1. La Farmacognosia.** Esquema representativo del desarrollo de la ciencia (Cortez *et al.*, 2004).

Ahora y como resultado de los modernos procedimientos de aislamiento y de experimentación farmacológica, nuevas drogas vegetales encuentran su camino hacia la medicina en estado de sustancias purificadas, a diferencia de las antiguas preparaciones, estas mezclas están limitadas, por lo general, a unas pocas firmas comerciales que manipulan todas las materias primas; por ejemplo pocos farmacéuticos tienen ocasión de utilizar diversas especies vegetales reconocidas como *Catharanthus roseus*, en cambio están más familiarizados con el manejo de sustancias que contienen los alcaloides aislados de esa planta como vinblastina y vincristina (Osorio, 2009).

### **II.3. Investigación de compuestos anticancerígenos de origen vegetal**

Desde hace 3,500 años el hombre ha empleado las plantas para el tratamiento de tumores (cáncer) (Hartwell, 1971) y son más de 3,000 especies de plantas las que se han reportado para el tratamiento de este conjunto de enfermedades (Graham *et al.*, 2000; WHO, 2015). Los compuestos de origen natural derivados de plantas presentan una gran diversidad de estructuras químicas, comparado con las pequeñas moléculas sintéticas (compuestos artificiales) y con frecuencia proveen de actividades biológicas altamente específicas (Amiel D. y Amiel J., 2013).

Es así que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos de América (EUA) durante el periodo del 1981-2002 aproximadamente el 67 % de éstos son de origen natural (semisintéticos o naturales) (Newman *et al.*, 2003; Vega-Ávila *et al.*, 2006); análisis realizado por la FDA.

Así, las plantas medicinales se han convertido en importantes fuentes de agentes quimioterapéuticos como la vinblastina y el paclitaxel obtenidos a partir de derivados de las especies *Catharanthus roseus* y *Taxus brevifolia* (Laza *et al.*, 2003). Estos medicamentos se han clasificado como: productos de origen natural, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural (Cragg y Newman, 1997). Se consideran como productos naturales a los producidos por bacterias (bleomicina), y a los materiales obtenidos de organismos marinos o de plantas (Newman *et al.*, 2000).

El periodo de investigación científica al respecto es mucho más reciente ya que es en 1958, cuando se aisló la vinblastina, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI) inició diversas investigaciones acerca de las plantas con actividad anticancerosa, lo que condujo al aislamiento y conocimiento del mecanismo

de acción de sustancias como las podofitoxinas, taxanos y camptotecinas, posteriormente se han aislado de plantas compuestas que se encuentran en fase clínica como es el caso de la combretastatina A-4 (Vega-Ávila *et al.*, 2006).

Debido a la gran cantidad y variedad de derivados químicos de origen vegetal con actividad anticancerígena que poseen menores efectos adversos que los fármacos comúnmente utilizados, es factible continuar las investigaciones en plantas medicinales con el objetivo de aislar sus componentes y elaborar nuevos fármacos.

## II.4. Biología de la especie *Physalis peruviana* L. “aguaymanto”

### II.4.1. Clasificación taxonómica

*Physalis peruviana* L. “aguaymanto” es una planta originaria de los Andes Sudamericanos incluso según Legge (1974) el centro de origen de la planta son los Andes del Perú. Esta planta cuenta con más de ochenta variedades en estado silvestre y pertenece a la familia de las Solanáceas y al género *Physalis* (Tabla 1).

En Sudamérica existen algunas variaciones en la nominación del fruto, por ejemplo en el Perú es conocida como aguaymanto, uva de monte, capulí o tomate silvestre (Angulo, 2005; Fischer *et al.*, 2014) o tomatillo (Aristizábal, 2013). En Colombia se le conoce como uchuva, en Chile como amor en bolsa o capulí, en Ecuador, como uchuva o uvilla (Caicedo y Andrés, 2010) y en Brasil como mapati, cucura, imbauba mansa, puruma o *Physalis* (Fischer *et al.*, 2014). En sur África como “Grosella del cabo” y en el Reino Unido (UK) como “Cape gooseberry” (Bailey, 1977).

**Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Physalis peruviana* L.**

Determinado por el Museo de Historia Natural (Anexo X.4) y por United States Department of Agriculture (USDA) (2000).

<b>REINO</b>	Plantae
<b>SUBREINO</b>	Tracheobionta
<b>DIVISIÓN</b>	Magnoliophyta
<b>CLASE</b>	Magnoliopsida
<b>SUBCLASE</b>	Asteridae
<b>ORDEN</b>	Solanales
<b>FAMILIA</b>	Solanaceae
<b>GÉNERO</b>	<i>Physalis</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>Physalis peruviana</i> L.
<b>NOMBRES COMUNES</b>	Aguaymanto, uchuva, uvilla, tomatillo, capulí.

## II.4.2. Características Botánicas

A este género pertenecen variedades cuya principal característica es albergar el fruto dentro de un capacho también conocido como cáliz, que le permite una vida útil cercana a un mes, además de protegerlo de insectos, pájaros, patógenos y las condiciones climáticas externas, sin éste, el fruto duraría de 4 a 5 días al ambiente (Cedeño y Montenegro, 2004).

La planta es de tipo arbustiva con una raíz fibrosa que se ha encontrado a más de 60 cm de profundidad en el suelo, posee un tallo algo quebradizo de color verde, con vellosidades de textura muy suave al tacto. Las hojas son enteras, similares a un corazón pubescente y de disposición alterna, sus flores son hermafroditas de cinco sépalos, con una corola amarilla y de forma tubular.

El fruto es una baya carnosa en forma de globo (**Figura 2**), con un diámetro que oscila entre 1,25 y 2,5 cm y con un peso entre 4 y 10 g. Su pulpa presenta un sabor ácido azucarado (semiácido) y contiene de 100 a 300 semillas pequeñas de forma lenticular. Es de color naranja-amarillo con una piel lisa y brillante (Flórez *et al.*, 2000; Calvo, 2009; Valdenegro *et al.*, 2012). Una planta de *Physalis* (**Figura 3**) puede producir cerca de 300 frutos (Aparcana y Villarreal, 2014).



**Figura 2. Fruto de *Physalis peruviana* L.** Dibujo del fruto de aguaymanto protegido por los cálices.  
Fuente: (Aristizábal, 2013).

*Physalis peruviana* L. es originaria del Perú, y es la especie más conocida del género *Physalis*; se encuentra ampliamente distribuida por las regiones tropicales y templadas de todos los continentes, pero se puede decir que está concentrada especialmente en Australia, América Central y América del Sur. También es reportada como nativa en

Chile, donde los frutos son comestibles y ocasionalmente comercializados, pero aún no es un cultivo importante (Madriñan, 2010). Fue introducida por los españoles en Sudáfrica hace más de 200 años como especie antiescorbuto y distribuida a Kenia, California, Gran Bretaña, Australia, Zimbabwe, Nueva Zelanda, Hawaii y la India; esta fruta logró una amplia acogida en Nueva Zelanda, China, la India y en Malasia es comúnmente cultivada pero a menor escala, en Inglaterra fue por primera vez reportada en 1774, donde ha sido cultivada a lo largo de los caminos y en jardines de las casas (Madriñan, 2010).



**Figura 3. Estado natural de *Physalis peruviana* L. en la zona de colecta.** Foto: Dalia Churampi.

### **II.5. Uso de *Physalis peruviana* L. en la medicina popular**

La medicina tradicional peruana posee numerosas plantas con propiedades que en su mayoría no han sido estudiadas científicamente, una de estas es *Physalis peruviana*, que es usada empíricamente para tratar el cáncer y otras enfermedades (Perry, 1980; Chiang, 1992a; Zavala *et al.*, 2006). Se ha empleado como agente anticancerígeno, antipirético e inmunomodulador, asimismo para el tratamiento de enfermedades como la malaria, asma, hepatitis, dermatitis, diabetes y el reumatismo; antioxidante, antihepatotóxico, antihepatoma, hipoglicemiante o tratamiento para la diabetes, purificador de sangre, tonificador del nervio óptico (Chiang, 1992a; Wang *et al.*, 1999; Watson y Oliveira, 1999; Wu *et al.*, 2004, Arun y Asha, 2007; Rodríguez y Rodríguez, 2007; Aristizábal, 2013 y Aparcana y Villarreal, 2014). Los extractos de las hojas también han mostrado importantes actividades antibióticas y antiinflamatorias (Ahmad *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2006).

Además de lo ya mencionado, se postula como nutraceutico, por su alto contenido de provitamina A, también es rica en vitamina C, D y E, posee algunas vitaminas del

complejo vitamínico B y además contiene proteínas (0.3 %) y fósforo (55 %) (Soares *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Zavala *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2008, Campos *et al.*, 2011). Asimismo posee una determinada cantidad de polifenoles que actúan reduciendo la formación de radicales libres, y le otorgan al aguaymanto una propiedad antioxidante, que brindan valor agregado benéfico para la salud (Castro *et al.*, 2008; Hassanien, 2011).

## II.6. Composición fisicoquímica y nutricional de *Physalis peruviana* L.

De la gran diversidad de plantas sometidas a investigación (250.000-500.000 especies) solo un pequeño porcentaje ha sido sometido a investigaciones fitoquímicas y es aún menor el conocimiento acerca de sus propiedades farmacológicas (Hamburger y Hostettmann, 1991; Rates, 2001; Quispe-Mauricio *et al.*, 2009). El aguaymanto, es la especie más conocida del género *Physalis*, no solo por su fruto azucarado con alto contenido de vitaminas A y C, además de hierro y fósforo sino también por sus diversos componentes nutritivos (Fischer *et al.*, 2000) (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Composición nutricional del fruto de *Physalis peruviana* L.:**  
Principales componentes nutricionales del fruto de aguaymanto (Erkaya *et al.*, 2012; Aristizábal, 2013).

Parámetro nutricional	Rango
Humedad	79.8 - 85.5 %
Proteína	0.3 - 1.5 g
Grasa	0.15 - 0.5 g
Carbohidratos	11 - 19.6 g
Fibra	0.4 - 4.9 g
Cenizas	0.7 - 1 g
Carotenos	16 mg
Tiamina	0.1 - 0.18 mg
Riboflavina	0.03 - 0.18 mg
Niacina	0.8 - 1.7 mg
Vitamina C	20 - 43 mg
Potasio	210 - 467 mg
Magnesio	7 - 19 mg
Calcio	2 - 28 mg
Fósforo	27 - 55.3 mg
Hierro	0.3 - 1.2 mg
Zinc	0.28 - 0.40 mg

Es así que, las propiedades y bondades medicinales se derivan de la composición nutricional del fruto, además de la composición nutricional es muy necesario describir cada componente fisicoquímico de *Physalis peruviana* L. (**Tabla 3**), diversas investigaciones coinciden en valores aproximados para parámetros físico-químicos importantes como son: densidad (1,038 – 11,031) que es la relación de la masa con el volumen de líquidos que contiene el fruto, sólidos solubles presentes en el jugo son expresados como °Brix que mayormente nos indican el nivel de sacarosa que hay en la pulpa (12,5 y 14,3) y acidez expresada como porcentaje de ácido cítrico (2 y 2,4) (Puente et al., 2011).

**Tabla 3. Composición fisicoquímica de *Physalis peruviana* L.:**

Reportes de varias investigaciones que coinciden en los componentes fisicoquímicos (Puente et al., 2011).

Parámetro fisicoquímico	Mendoza et al., 2012.	Marín, 2010.	Márquez et al., 2009.	Restrepo, 2008.
Acidez (%)	2	2,05	2,4	2,1
°Brix	13	14,3	12,5	13,8
Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	11,031	1,038	-	-
pH	3,72	3,39	3,56	3,39

En los frutos maduros el pH y los °Brix decrecen lo que lleva a un aumento de la acidez de un 2,0 a 2,1 % (Restrepo, 2008; Márquez et al., 2009; Marín et al., 2010; Puente et al., 2011; Mendoza et al., 2012). El aguaymanto es un fruto cuyo atributo peculiar es el sabor agridulce, que contiene valores destacables de nutrientes como vitamina A, fibra, proteína, potasio, fósforo, hierro y zinc (Restrepo, 2008).

Sus principales propiedades medicinales se deben a sus componentes fisicoquímicos descritos detalladamente en la **Tabla 4** por cada 100 g de producto (Puente et al., 2011). Del fruto se obtienen crudos vegetales que se utilizan como medicinas, y que son llamados fitomedicamentos ya que su principio activo es un extracto vegetal, elaborado de acuerdo a formas farmacéuticas tradicionales posee propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas, con más de un mecanismo de acción (Zavala et al., 2006, Areiza-Mazo et al., 2013) y con gran actividad biológica totalmente demostrada, es decir, estandarizada, normalizada, estabilizada y con una acción farmacológica definida, conocida y cuantificada (Osorio, 2009). El aguaymanto es un producto valioso, debido a la presencia de compuestos biológicamente activos como fitosteroles, polifenoles, vitaminas, fenoles, withanólidos y physalinas (Chiang, 1992a; Fang, 2011; Aristizábal, 2013; Demir et al., 2014).

Además se han aislado diversos componentes químicos como el 28-hidroxiwitanólido, witanólidos, physalinas, phygrina, kaempferol y glicósidos (Elliger *et al.*, 1992; Dinan *et al.*, 1997; Yu-Hsuan, 2009). Algunas propiedades medicinales se han asociado con las **lactonas** como el 28-hidroxiwitanólido, witanólidos, physalinas, phygrina; y a su vez los witanólidos exhiben un gran espectro de propiedades biológicas y farmacológicas; repelente de insectos, hepatoprotector, inmunomodulador, antiinflamatorio, antitumoral y antiproliferativo (Zavala *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2010; Ramadan, 2011).

Los **flavonoides** como el kempferol y glucósidos de quercetina son otros componentes que han mostrado actividad antioxidante y preventiva al daño peroxidativo en microsomas hepáticos y hepatocitos (Wang, *et al.*, 1999; Watson y Oliveira, 1999, Wu *et al.*, 2005). Igualmente, se ha reportado que varios de estos compuestos tienen capacidad antioxidante como los polifenoles, que son capaces de neutralizar la acción oxidante de radicales libres (Mier, 2011) como la vitamina  $\beta$ -caroteno que es un importante agente anti-radical libre, que se ha demostrado que cuando se tiene una dieta rica en caroteno, existe menos disposición a enfermedades cardiovasculares y cáncer (Auroma, 1999).

Aparte de los componentes químicos ya mencionados el fruto de aguaymanto presenta como mayores componentes bioactivos a las physalinas A, B, D, F y los glicósidos. Las **physalinas** han mostrado tener actividad anticancerígena en líneas celulares HA-22T (carcinoma hepatocelular), HeLa (adenocarcinoma de cérvix), APM1840 (Leucemia linfocítica aguda T), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), KG-1 (leucemia mieloide aguda), CTV1 (leucemia monolítica aguda) y KB-16 (cáncer nasofaríngeo) (Chiang, 1992a). Al mismo tiempo se ha demostrado que las physalinas B y F tienen una potente actividad inmunosupresora al inhibir la proliferación de linfocitos y la producción de interleuquinas (Puente *et al.*, 2011); y se ha evidenciado que inhiben tanto la producción de citoquinas como la activación de macrófagos (Soares *et al.*, 2003 y 2006) para una mejor defensa ante cualquier infección o enfermedad.

**Los glicósidos** igualmente han demostrado tener un actividad anticancerígena en diversas líneas de leucemias, hepatomas, cáncer de cérvix y nasofaríngeos (Chiang, 1992a; Ismail y Alam, 2001). Diferentes autores reportaron que otros de los constituyentes químicos encontrados en el fruto de *Physalis peruviana* L.; son los witaesteroides, glucósidos, alcaloides y flavonoides, los cuales suelen aislarse de los extractos obtenidos con disolventes más polares, como metanol y etanol (Bernal y

Correa, 1998; Aparcana y Villarreal, 2014). Es así que se propone al aguaymanto como un fruto farmacológicamente valioso tal y como se muestra en la **Tabla 4**. Finalmente se señala que estos componentes de los extractos de *Physalis peruviana* L. muestran efectos antiproliferativos sobre diversos tipos de cáncer por medio de la inducción de apoptosis (Wu *et al.*, 2004).

**Tabla 4. Reportes de la composición fisicoquímica de *Physalis peruviana* L. por cada 100 g del fruto según varios autores (Puente *et al.*, 2011).**

<b>Autores</b>	<b>Año</b>	<b>Composición nutricional</b>
<b>Fang <i>et al.</i></b>	<b>2011</b>	Perulactones E-H, 28 hidroxiwitanólido E
		Witaperuvina 1-K, Witaperuvina L-N
		Witanólido S, Witanólido C, Fiperunolido B
<b>Calderón <i>et al.</i></b>	<b>2011</b>	Fiperunolido B
		4 $\beta$ -hidroxiwitanólido E
		Witánolidos: Fiperunolido A, Fiperunolido B
<b>Lan <i>et al.</i></b>	<b>2009</b>	Fiperunolido C, Fiperunolido D, Peruvianoxido
		4 $\beta$ -hidroxiwitanólido E, Visconolido
		Witanólido E, Witanólido S, Witanólido C,
		Witafisanólido, Witaperuvina D
<b>Repo de Carrasco y Zelada</b>	<b>2008</b>	Calorías, Agua, Proteína, Grasa, Carbohidratos,
		Fibra, Cenizas, Hierro, Zinc, Fósforo, Calcio, Potasio
<b>Musinguzi <i>et al.</i></b>	<b>2007</b>	Agua, Proteína, Grasa, Fibra, Hierro, Fósforo, Calcio, Potasio,
		Sodio, Magnesio, Betacaroteno (Vit. A), Ácido Ascórbico (Vit. C)
<b>Wu <i>et al.</i></b>	<b>2004</b>	Phisalina A, Phisalina B, Phisalina D, Phisalina F
		Fitoesteroles, Fitoquinona (Vit. K1), Vitamina E,
<b>Ramadán <i>et al.</i></b>	<b>2003</b>	$\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -tocoferol, $\gamma$ -tocoferol, $\delta$ -tocoferol
<b>Osorio y Roldán</b>	<b>2003</b>	Betacaroteno (vit. A), Tiamina (vit. B1), Riboflavina (vit. B2),
		Niacina (vit. B3), Ácido Ascórbico (vit. C).
<b>Corporación Colombia Internacional (CCI)</b>	<b>2001</b>	Calorías, Agua, Proteína, Grasa, Carbohidratos.
<b>Fischer <i>et al.</i></b>	<b>2000</b>	Fibra, Cenizas, Betacaroteno (vit. A), Tiamina (vit. B1),
		Riboflavina (vit. B2), Niacina (vit. B3), Ácido Ascórbico (vit. C).
<b>Corporación Colombia Internacional (CCI)</b>	<b>1994</b>	Betacaroteno (vit. A), Tiamina (vit. B1), Riboflavina (vit. B2),
		Niacina (vit. B3), Ácido Ascórbico (vit. C).
<b>National Research Council (NRC)</b>	<b>1989</b>	Calorías, Agua, Proteína, Grasa, Carbohidratos, Fibra, Cenizas,
		Hierro, Fósforo, Calcio, Potasio, Sodio, Betacaroteno (vit. A), Tiamina (vit. B1), Riboflavina (vit. B2), Niacina (vit. B3), Ácido Ascórbico (vit. C).

## **II.7. Cultivo celular**

El cultivo celular abarca al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (Martinez, 2007). Tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio, tras la incorporación de modificaciones que dieron lugar a medios más sofisticados, se hizo posible el cultivo de células tumorales procedentes de muestras de tejidos malignos tanto del hombre como animales (Castro, 2006). En un principio el objetivo principal era el estudio de las propias células, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuándo dejan de crecer, este tipo de estudios todavía tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular y el control del crecimiento de células tumorales (Morgan y Darling, 1995).

Existen 3 formas principales de iniciar un cultivo celular: Cultivo de órganos, cultivos primarios y células disgregadas, el cultivo primario es lo primero de una serie de procesos selectivos que finalmente darán origen a una línea celular (Martinez, 2007).

El cultivo celular tiene como principal objetivo mantener vivas, fuera de su organismo de origen, a células de diferentes linajes de origen animal, vegetal, bacteriano, etc. El objetivo secundario es estudiar su comportamiento sin el control normal ejercido por el organismo vivo, para observarlas bajo un ambiente experimental controlable (Freshney, 2000). Es la mejor manera de establecer nuevas líneas celulares en cultivo para estudiar la morfología celular y para comparar el efecto de diferentes agentes, o diferentes concentraciones de un agente sobre el crecimiento y metabolismo de las células (Castro, 2006).

## **II.8. Banco de líneas celulares y colecciones de cultivos celulares**

La búsqueda de nuevas moléculas con una potencial actividad anticancerígena a partir de productos naturales es hoy en día un campo vigente (Cordell, 2000; Mans *et. al.*, 2000; León *et. al.*, 2006). En este proceso, la valoración de la citotoxicidad *in vitro* sigue siendo una herramienta válida y útil en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios, que los grupos de investigación básica utilizan ampliamente alrededor del mundo (Andrighetti-Fröhner *et. al.*, 2003; Morales *et. al.*, 2005; Zhang, 2005; León *et. al.*, 2006). Para dar solidez a las valoraciones es necesario disponer de un panel de líneas celulares que represente diversos tipos de tumores, y conocer su sensibilidad a agentes con acción citotóxica demostrada o aparente. Para la selección de productos con potencial actividad anticancerígena, se cuentan con bancos y

colecciones de cultivos celulares. A nivel mundial existen 2 bancos de líneas celulares más importantes: American Type Culture Collection (ATCC, 2015) ubicado en Norteamérica y el European Collection of Cell Cultures (ECACC, 2015). En Norteamérica, además del ATCC también se encuentra, aunque menos conocido el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI, 2015).

A nivel sudamericano en Argentina existen la Asociación del Banco Argentino de Células (ABAC, 2015), Asociación Argentina de Bancos de Tejidos (para trasplantes) y el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC, 2015); en Colombia, el Instituto Nacional de Cancerología y la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC, 2015). Sin embargo, desde 1947, ATCC es la institución con mayor y más variada colección mundial de células, desde líneas celulares primarias, continuas, transformadas (cancerígenas), no cancerígenas, bacterianas, animales, etc (ATCC, 2015).

En 1989, el NCI estableció el tamizaje de líneas celulares, y, actualmente, emplea un panel de 60 líneas que representan nueve tipos de tumores humanos (cerebro, colon, pulmón, ovario, riñón, melanoma, leucemia, mama y próstata) (Cordero y Aristizábal, 2002b; Takimoto, 2003; León *et. al.*, 2006). Desde 1999, realiza y recomienda a otros laboratorios iniciar el tamizaje con un reducido panel de líneas celulares altamente sensibles y sólo evaluar con el panel amplio, los productos que muestren actividad a ese primer nivel (Mans *et. al.*, 2000; Takimoto, 2003; León *et. al.*, 2006).

Con los sucesivos pasajes o subcultivos celulares, un cultivo primario forma una Línea Celular, este término implica la presencia de varios linajes celulares de fenotipos similares o distintos, así, al seleccionar uno de los linajes celulares sea por clonado, por separación celular física o por cualquier otra técnica de selección, se pueden evidenciar ciertas propiedades específicas que han sido identificadas en la masa de células del cultivo, finalmente esta línea celular se transforma en lo que se conoce como cepa celular (“cell strain”) (Morgan y Darling, 1995).

Las líneas celulares son células de origen animal o humano que se han adaptado a vivir en cultivo, poseen capacidad de proliferación comúnmente limitada, ya sean adherentes o en suspensión, suelen clasificarse en primarias, inmortales o transformadas (Martínez-Carpio y Navarro, 2003). Las células primarias son aquellas recientemente aisladas a partir de tejidos u órganos y suelen tener una duración limitada de cultivo; las células transformadas presentan la propiedad de crecer en

forma ilimitada en cultivo (es decir, no mueren), las células transformadas están integradas por células que derivan de tumores o que han sido manipuladas de algún modo (Morgan y Darling, 1995).

Entre las ventajas de las líneas celulares se encuentran que suelen ser más sencillas de manejar que las células primarias, crecen continuamente y poder obtener un gran número de células, además de existir información relativamente abundante sobre ellas (Morgan y Darling, 1995).

Las líneas celulares normalmente tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 80 generaciones, superado ese límite, las células entran en senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar, supuestamente por el acortamiento de los telómeros, y mueren; sin embargo, algunas células (como las de roedores, mono y células tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente; estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación (Freshney, 2000).

Las líneas celulares transformadas o cancerígenas se caracterizan porque son inmortales (crecen indefinidamente); su crecimiento es aberrante (se pierde la inhibición por contacto, la limitación de la densidad celular durante la proliferación y la dependencia del anclaje); son malignas (invaden tejidos y dan lugar al crecimiento de tumores), son genéticamente inestables y presentan aberraciones cromosómicas; a su vez también existen células no transformadas o no cancerígenas (fibroblastos de ratón, células de riñón de mono, etc) (Martínez-Carpio y Navarro, 2003).

Existe otra clasificación que depende de la forma en que crecen sobre la superficie: **Adherentes** (células en monocapa) que se fijan al material plástico de un frasco o placa y por lo tanto tienen que desprenderse de esa superficie antes de utilizarlas y **no Adherentes** (células en suspensión) que normalmente no se fijan a la superficie del recipiente de cultivo sino que crecen fluidas y se encuentran suspendidas en la solución del cultivo (Morgan y Darling, 1995).

En la **Tabla 5** se muestra las principales líneas celulares utilizadas en todo el mundo, de diferentes tipos de linajes (cancerígenos y no transformados) y celulares (fluidos y adherentes).

**Tabla 5. Líneas celulares más frecuentemente utilizadas en evaluaciones de antiproliferación (Morgan y Darling, 1995)**

Tipo celular	Líneas celulares
Epiteliales	A-253, CHO, HeLa, MDCK, PtK1
Tejido conjuntivo	3T3, BHK, COSD, L, MRC-5, Vero, WI-38
Tejido muscular	L6
Tejido nervioso	NB41A3
Sangre y tejidos linfoides	K562, Namalwa, MPC-11, U937
Células madre embrionarias	E14.1, H1, H9, R1

La demostración de que las células y los tumores sólidos humanos pueden dar origen a líneas celulares continuas, fomentó su empleo en investigación sobre cáncer e impulsó su implementación como método complementario de “screening” o tamizaje previo a los ensayos *in vivo*, como referencia tenemos al **Grupo de Desarrollo de Fármacos del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos** y sus continuas investigaciones (Cordero y Aristizábal, 2002 b). La propagación de líneas celulares requiere que el número de células aumente continuamente, las condiciones de cultivo han sido seleccionadas para favorecer al máximo la proliferación celular; estas condiciones son: baja densidad celular, baja concentración de calcio y la presencia de factores de crecimiento. Dentro de los requerimientos generales de un cultivo de líneas celulares se cuentan: el medio de cultivo, condiciones de pH, temperatura y ambiente controlado (Freshney, 2000). El medio de cultivo básicamente debe ser líquido, que contenga una fuente de carbono, aminoácidos esenciales, oligoelementos, contar con un sistema regulador de pH, iones y factores de crecimiento aportados por el suero fetal bovino (SBF) con el que generalmente se suplementa el medio; adicionalmente, los medios de cultivo celular contienen rojo de fenol como indicador de pH para permitir un constante monitoreo de esta variable (Freshney, 2000). Después de preparar el medio básico deben ser añadidos otros insumos, como por ejemplo antibiótico para disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos (Alvarado y Mendoza, 2002).

Con las líneas celulares se han realizado evaluaciones de una serie de agentes antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción, generando perfiles de sensibilidad frente a los cuales se puede comparar con otras nuevas sustancias en estudio, lo que permite plantear hipótesis sobre su mecanismo de acción y sus blancos moleculares (Sausville y Johnson, 2000, León *et. al.*, 2006).

A lo largo de los años, ese modelo experimental ha mostrado buena correlación entre el patrón de actividad de un compuesto, el panel de células y su mecanismo de acción, generando información útil en el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos (Takimoto, 2003 y Yamori, 2003 citados por León *et. al.*, 2006).

### **II.8.1. Línea K562**

Los estudios de los distintos tipos de leucemias se han visto obstaculizados por la falta de modelos animales similares a los humanos, y por la supervivencia restringida de células leucémicas *in vitro* frescas. Las líneas celulares se han creado con el propósito de sobrepasar estas limitantes y estudiar con mayor accesibilidad a los cánceres. Estas líneas han sido muy útiles en el estudio de la expresión génica y la modulación de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas.

Las líneas leucémicas probablemente surgieron como un cultivo del tipo primario por la transformación del virus Epstein-Barr de linfocitos no neoplásicos que se presentan en el inóculo de cultivo inicial, la creación de varias líneas de leucemia mieloide humana ha sido reciente, cuando se empezaron a utilizar maquinarias con aislamiento para una completa esterilidad (Koeffler y Golde, 1980). Estas líneas proporcionan sistemas modelo para estudiar el control de la diferenciación en la leucemia humana, en 1981, Lozzio y Lozzio informaron el desarrollo de la línea K562 del líquido pleural de un paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica (megacariocitos), después de 24 días en cultivo líquido, las células comenzaron una proliferación activa. Desde entonces luego de más de 40 años este linaje celular cancerígeno se sigue utilizando enormemente en diversas investigaciones, al ser una línea no adherente, constante, homogénea y del tipo inmortal facilita su manipulación y mantenimiento.

### **II.9. Impacto del cáncer: principales causas de mortalidad**

El cáncer desde hace varios años se ha convertido en una de las causales de mortalidad más preocupantes de la humanidad, la organización mundial de la salud (OMS) estima que en el 2012 ocurrieron 8.2 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (Ferlay *et. al.*, 2010). En el Perú, el registro de cáncer de Lima Metropolitana de mayor relevancia, fue el realizado por el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), con el cual se evidenció que hubo 65 680 casos entre 1990 a 1997, siendo los más frecuentes los cánceres de estómago, mama, cuello uterino, pulmón, próstata e hígado (Registro hospitalario de cáncer 1990-97, INEN) (Solidoro, 2006; Tejada, 2011). De acuerdo a Globocan (2008) mencionado por Ferlay *et al.* (2010), a nivel mundial ocurren 350,434 casos de leucemias en todo el mundo con una

tasa de incidencia estandarizada de 5 por cada 100,000 habitantes; el 55.8 % de los casos ocurren en varones y se resalta que el 59.9 % de los casos registrados se producen en los países en desarrollo (210 mil casos aproximadamente) (Ferlay *et al.*, 2010).

En cuanto a mortalidad, se cuenta con un estimado de 257 mil muertes en el año 2008 a nivel mundial, convirtiendo a la leucemia en la séptima causa de muerte por cáncer en ambos sexos (Jemal *et al.*, 2010). La expectativa de vida de nuestras poblaciones está creciendo debido a un mejor control de las enfermedades infecciosas, parasitarias y perinatales y con ello, crece la proporción de gente de edades más avanzadas, en quienes la incidencia de cáncer es más alta (Zaharia, 2013).

En las investigaciones del cáncer, los ensayos *in vitro* son fundamentalmente de dos tipos: ensayos moleculares altamente específicos (dirigidos a una diana u objetivo sub celular único) y ensayos celulares realizados en células derivadas de un tejido o línea celular; además, pueden ser divididos en ensayos citotóxicos y otros tipos de ensayos que incluyen exámenes morfológicos.

Rutinariamente, para enfrentar y controlar esta patología el tratamiento comprende el uso de la quimioterapia, radioterapia, cirugía o una combinación de ellas, lamentablemente estas opciones pueden ser muy agresivas y tóxicas causando en el paciente una serie de efectos secundarios a nivel físico y psicológico (Pui *et al.*, 1990). La quimioterapia ha sido y es cuestionada por la alta citotoxicidad de agentes antineoplásicos sintéticos sobre células no transformadas, este es un gran problema en la terapia anticancerígena, ya que provoca efectos adversos en diferentes tipos de tejidos u órganos como los riñones e hígado (Gottesman y Pastan, 1993; Smith *et al.*, 1998; Isnard–Bagnis *et al.*, 2005). Dentro de los efectos secundarios a nivel físico se han reportado; náuseas y vómitos, pérdida de pelo o alopecia, cansancio y anemia, infección, problemas de coagulación, mucositis, diarrea, estreñimiento, hemorroides, efectos sexuales y otros (Díaz, 2013).

Por lo antes expuesto el descubrimiento de nuevos agentes con actividad anticancerígena se ha convertido en una de las metas de la investigación científica moderna; la molécula ideal para este fin debe eliminar o incapacitar una variedad importante de subpoblaciones celulares de un tumor sin afectar, en lo posible, al tejido normal. Sin embargo, dentro de la búsqueda de una molécula que actúe como agente

antitumoral, es indispensable mencionar, que siempre existirá cierta toxicidad del principio activo frente a células normales y cancerígenas (Huang y Oliff, 2001).

Los reportes, según la literatura son satisfactorio se invitan a continuar estudios sobre las diferentes propiedades antitumorales de *Physalis peruviana* L. “Aguaymanto”, a fin de aislar sus principales componentes (phisalinas, witanolidos, fenoles, etc.) y evaluarlos en otras líneas tumorales así como en células no cancerígenas. Las investigaciones sugieren que el aguaymanto puede ser una fuente potencial de compuestos bioactivos con aplicación quimiopreventiva y quimioprotectora en cáncer humano (Zavala *et al.*, 2006; Areiza-Mazo *et al.*, 2013,).

## **II.10. Técnicas o ensayos para evaluar citotoxicidad**

Los recursos biológicos existentes en la biodiversidad natural vegetal son considerados como una fuente potencial de productos con actividad farmacológica, por largo tiempo han sido el objeto de estudio de varios grupos de investigación, que han abordado de forma amplia los primeros pasos del proceso de investigación y desarrollo de nuevos principios activos extraídos de plantas, incluyendo la selección de especies con base en información etnomédica (Bermudez *et al.*, 2005; Bucay, 2009). La eterna búsqueda de plantas anticancerígenas y sus principios activos se inicia, frecuentemente con la disminución del universo de probables plantas citotóxicas del tipo antiproliferativas, aprovechando los aportes de la medicina folclórica y tradicional, y de conocimientos etnobotánicos que suelen ser acertados y alentadores (Bucay, 2009). La citotoxicidad hace referencia, claro está, a los efectos nocivos que se producen en una célula cuando está en contacto con un agente tóxico, el cual provoca alteraciones de acuerdo a las concentraciones a la que se encuentre (Arencibia *et al.*, 2003).

Un potente agente citotóxico actúa generalmente por medio de la inhibición del ciclo celular paralizando la antiproliferación; o por la inducción significativa de la apoptosis y la regula mediante eventos de despolarización de la membrana mitocondrial (Patel *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2012). Es así que el análisis químico preliminar para identificar el tipo de compuesto vegetal presente y la evaluación de su posible actividad biológica generalmente es a través de bioensayos de toxicidad en pequeños organismos como la *Artemia salina*, *Daphnia magna* y otros modelos experimentales (Sanabria *et al.*, 1997).

Los compuestos bioactivos de las plantas así seleccionadas se extraen con solventes orgánicos o agua, particularmente se usan los extractos alcohólicos o hidroalcohólicos por ser sencillos y de fácil manejo, y además con la finalidad de cubrir un amplio espectro polar y apolar se puede utilizar el n-Hexano. Sin embargo, en ocasiones, por la naturaleza fisicoquímica de las moléculas bioactivas se requieren otros solventes. El extracto crudo obtenido, para su utilización posterior, se resuspende o disuelve en agua o de preferencia en dimetilsulfóxido (DMSO) (Escalona, 2011).

Para seguir avanzando se hace necesario establecer sistemas de evaluación preliminar de actividad enfocada a patologías específicas, en especial aquellas de alto impacto social y económico (Pinzon *et al.*, 1997, Cordero y Aristizábal, 2002a), aumentando así la participación del país en el proceso y en los beneficios derivados de su biodiversidad, impulsando el fortalecimiento de la capacidad técnica y científica, y promoviendo la conservación y utilización sostenible de los recursos biológicos (Soejarto y Farnsworth, 1989, Cordero y Aristizábal, 2002a).

Para responder a esta necesidad se ha centrado el interés en las metodologías alternativas *in vitro*, modelos que pueden generar resultados con validez internacional, relativamente económicos, rápidos y sencillos, además de que contribuyen a la reducción del empleo de animales de laboratorio y abren la posibilidad de realizar estudios a nivel molecular (Johnson, 1990; Cordero y Aristizábal, 2002a).

Existen diversas metodologías para evaluar citotoxicidad de extractos vegetales en cultivos celulares *in vitro* (Moo-Puc *et al.*, 2009) y para este tamizaje preliminar de agentes con actividad antiproliferativo se emplean grupos de líneas celulares derivadas de tumores humanos que son expuestas a la sustancia en estudio por un periodo determinado, al cabo del cual se evalúa la capacidad citotóxica de los agentes estudiados, si la sustancia resulta citotóxica se puede interpretar que tiene una potencial actividad antiproliferativo *in vivo* (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991; Lieberman *et al.*, 2001; Cordero y Aristizábal, 2002b).

La valoración preliminar *in vitro* del potencial de los extractos vegetales, se evalúa en cultivos *in vitro* de diversos linajes de células mediante diferentes metodologías descritas en la literatura para medir la viabilidad celular.

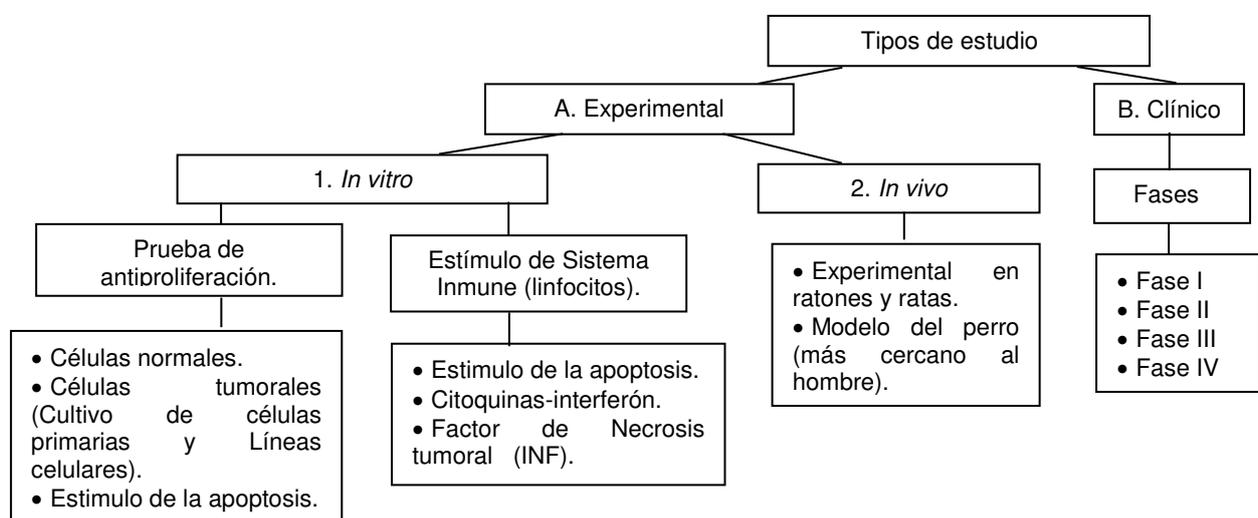
Entre las técnicas más populares pero que presentan importantes ventajas dependiendo del tipo de estudio que se proponga, se encuentran los ensayos

colorimétricos para la evaluación indirecta de la viabilidad celular como la técnica del **MTT** (reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a formazán), Sulforodamina B, Azul de Alamar o de forma directa por conteo celular no automático (\*) como el Test del Rojo Neutro, Azul de Tripano, clonogénico, etc (Maiso, 2012). En el caso de la técnica del Azul de Alamar, una de su principal ventaja es que permite seguir la misma muestra celular durante el tiempo que dure un experimento es decir se puede analizar varios días después de la primera lectura (Ahmed *et al.*, 1994; Nasiry *et al.*, 2007).

\* Existen contadores automatizados electrónicos “Contador automático Scepter” para contaje automático con resultados más rápidos (Anexo X.2).

### II.11. Ensayos de antiproliferación mediante cultivo celular *in vitro*: Prueba de inhibición del crecimiento celular de células normales y tumorales

En la mayoría de investigaciones trabajan con diversos diseños experimentales que toman en cuenta las variables y modelos cuando se refiere a evaluaciones de antiproliferación (**Figura 4**). El término efecto antiproliferativo tiende a variar dependiendo de la naturaleza del estudio, por ejemplo si las células mueren o simplemente tienen su metabolismo alterado, las evaluaciones principalmente son usadas porque son baratas, cuantificables y reproducibles.



**Figura 4. Esquema representativo del estudio de agentes antiproliferativos.** Diferentes tipos de estudios para evaluar el efecto antiproliferativo, de acuerdo a las condiciones necesarias o en las que se quiere aplicar (Amiel D. y Amiel J., 2013).

Muchos experimentos *in vitro*, tienen el propósito de determinar si una sustancia presenta potencial efecto antiproliferativo, porque van a ser usados por ejemplo como fármacos, alimentos o cosméticos y deben demostrar que no son tóxicos; o porque

van a ser usados como agentes anticancerígenos y necesitan presentar ese poder ya que es crucial para su mecanismo de acción (Freshney, 2000).

Existen diversas metodologías para evaluar tal potencial de extractos vegetales algunos autores usan líneas puras de cultivo celular continuo (líneas cancerígenas) y otros utilizan células no transformadas para someterlas a diversos extractos vegetales medicinales y alcaloides (linfocitos y eritrocitos humanos) (Barbosa *et al.*, 1995; Pinell *et al.*, 2009). Según Newman *et al.* (2003), en la década de los 90's el descubrimiento de agentes antitumores de origen natural estuvo basado en las pruebas de actividad antiproliferativa contra líneas celulares de cáncer usando modelos *in vitro* o *in vivo*, muchos agentes descubiertos por tales ensayos han mostrado ejercer su acción a través de la interacción con la tubulina o de la inhibición de la topoisomerasa (Walker *et al.*, 1991; Stevnsner y Bohr, 1993); con la identificación de un número creciente de blancos moleculares asociados con cánceres particulares, el descubrimiento de drogas anticancerígenas está basado ahora en el alto rendimiento de tamizar compuestos contra un rango de tales blancos. En 1991 se implementaron nuevas investigaciones *in vitro* en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos para el descubrimiento de nuevas drogas, con el propósito de examinar más de 10 000 nuevas sustancias cada año, y evaluar si los agentes poseían algún efecto antiproliferativo contra una gran diversidad de tumores, todo esto permitió la detección de la sensibilidad que un tumor puede tener a determinadas drogas; el principal objetivo del proyecto ya mencionado fue testar nuevas sustancias contra un amplio panel representativo de líneas celulares de tumores humanos (Monks *et al.*, 1991), este es un ejemplo del interés que actualmente se está prestando en la búsqueda de nuevos anticancerígenos.

Por otro lado Freshney (2000) menciona que los ensayos de antiproliferación se pueden clasificar en **ensayos de viabilidad** y **ensayos de supervivencia**, los primeros se emplean para determinar la proporción de células que inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas, mediante estos ensayos se puede evaluar el efecto antiproliferativo de un tratamiento en términos de concentraciones letales. La concentración letal 50 (LC50) es la concentración de la sustancia de tratamiento que causa la muerte al 50 % de las células presentes, evaluadas inmediatamente después del tratamiento (Cordero y Aristizábal, 2002a). Algunos ensayos como los de viabilidad se basan en la capacidad que tienen las células para excluir sustancias a las que son impermeables, ofrecen una interpretación instantánea, estos análisis se usan para medir la tasa de supervivencia directamente, las células que al ser expuestas al colorante no se tiñen,

se consideran viables y son de particular importancia para agentes tóxicos que efectos primarios sobre la integridad de la membrana (Freshney, 2000).

### II.11. 1. Ensayo azul de tripano

Prueba realizada mediante el conteo celular en una cámara de Neubauer a fin de calcular la densidad celular en el medio de suspensión. Se utiliza el colorante vital azul de tripano que teñirá las células muertas y así poder hallar un porcentaje de células viables (Strober, 2001), con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad celular} = \left( \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número total de células}} \right) * 100\%$$

### II.11. 2. Método colorimétrico del MTT

Muchos ensayos biológicos requieren medir la supervivencia y/o proliferación de las células, esto puede lograrse por varios métodos, entre éstos se tiene un ensayo colorimétrico rápido, versátil y cuantitativo, basado en una sal de tetrazolio MTT (metiltiazol tetrazolio) o (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5difeníl tetrazolio bromuro), que colorea sólo células vivas y el valor puede ser leído al espectrofotómetro o en lector de ELISA a través de la absorbancia entre 540–570 nm (densidad óptica) (Mosmann, 1983, Denizot y Lang, 1986). El MTT es una sal color amarillo que se utiliza para medir la actividad y viabilidad celular; se produce por la reducción (aceptación de un H<sup>+</sup>) del anillo de la sal de tetrazolio MTT por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales: succinato–deshidrogenasa, estas enzimas solo la presentan las células vivas. Luego de la reacción se forman unos cristales azules llamados formazán insolubles en agua, pero solubles en dimetilsulfóxido (DMSO) o isopropanol, la viabilidad celular es proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazán en solución (Angel, 1999, Castro, 2006) (**Figura 5**).

Con estos datos se puede obtener la Concentración Inhibitoria Media del crecimiento (IC50) mediante el análisis de regresión lineal. El método ha sido usado exitosamente para monitorear la sensibilidad de las células de tumores humanos a agentes quimioterapéuticos (Ferrari *et al.*, 1990, Patel *et al.*, 2009).

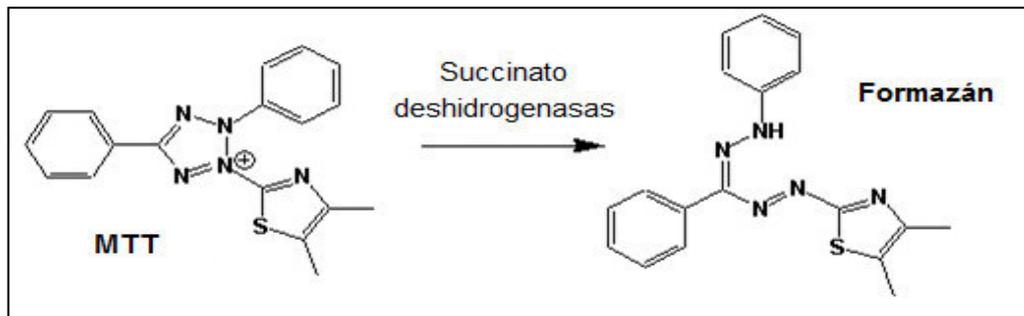


Figura 5. Reacción de la sal de tetrazolio MTT con la succinato–deshidrogenasa, y la formación de sales de formazán (Castro, 2006).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### III.1. Hipótesis y variables

##### III.1.1 Hipótesis

- **H1:** El extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. “aguaymanto” posee efecto antiproliferativo sobre los linfocitos humanos y la línea celular K562 (leucemia mieloide crónica).
- **H0:** El extracto acuoso *Physalis peruviana* L. “aguaymanto” no posee efecto antiproliferativo sobre los linfocitos humanos y la línea celular K562 (leucemia mieloide crónica).

##### III.1.2 Variables

La variable dependiente es:

- Número de células viables (viabilidad celular).
- Nivel de densidad óptica (490 nm).

La variable independiente es:

- Concentración del extracto acuoso de aguaymanto.

#### III.2. Objetivos

##### III.2.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto antiproliferativo del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. sobre linfocitos humanos y la línea celular K562 (leucemia mieloide crónica) sometidos a diferentes concentraciones.

##### III.2.2. Objetivos específicos

- Hallar la viabilidad de los linfocitos humanos y de la línea celular K562 a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. mediante conteo celular y ensayo MTT.
- Comparar los resultados de la viabilidad celular en linfocitos humanos y en la línea celular K562 sometidos a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. mediante conteo celular con azul de tripano y ensayo MTT.
- Demostrar si existe carácter selectivo en el extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. frente a la línea celular K562 comparado con linfocitos humanos.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1. Materiales

El presente trabajo fue del tipo experimental con corte longitudinal.

#### IV.1.1. Modelo biológico humano

Se trabajó como modelo biológico seres humanos (unidad muestral), y como material biológico:

**a) Linfocitos humanos de sangre periférica (unidad de análisis).** Se obtuvieron de muestras de sangre de donantes sanos a través de procedimiento de venopunción con el debido consentimiento informado (**Anexo X.3**).

**b) Células purificadas de una línea celular K562.** Proveniente de una médula ósea de un paciente que padecía leucemia mieloide crónica (unidad de análisis).

#### IV.1.2. Modelo biológico vegetal

Se trabajó con frutos frescos recolectados en el campo de la provincia de Carhuaz (Ancash) (**Figura 6**) para la preparación del extracto acuoso vegetal. Las muestras colectadas se trasladaran al Laboratorio de Genética Humana debidamente acomodadas en cajas térmicas para asegurar una temperatura entre 2 a 8° C en un plazo no mayor a 24 h.



**Figura 6. Zona de muestreo de los frutos frescos de *Physalis peruviana* L. en Carhuaz-Ancash.** Fotografía de arbustos muestreados en la zona de cultivo (Foto: Dalia Churampi).

### **IV.1.3. Identificación taxonómica**

La razón principal para muestrear el fruto en campo natural fue la recolección de una porción de la planta de aguaymanto (rama con hoja y/o fruto) para la identificación taxonómica por un personal capacitado, que fue realizada en el Museo de Historia Natural de la UNMSM (**Anexo X.4**).

### **IV.1.4. Materiales de laboratorio**

#### **IV.1.4.1 Materiales de vidrio o plástico**

- Botellas de vidrio (100, 250, 500 y 1000 ml).
- Crioviales (2 ml).
- Envases de pirex de 250, 500 y 1000 ml.
- Microtubos (2.5 ml).
- Placa de ELISA.
- Probetas de 100, 500 y 1000 ml.
- Tips de 10, 100, 1000 y 5000  $\mu$ l.
- Tubos de centrífuga (15 ml y 50 ml).
- Vaso de precipitado de 250, 500 y 1000 ml.

#### **IV.1.4.2 Reactivos**

- Ácido clorhídrico.
- Agua destilada y ultrapura.
- Alcohol de 70° de pureza.
- Antibiótico Gibco.
- Ficoll-Hypaque.
- Hidróxido de sodio.
- Medio RPMI-1640.
- Medio PB-MAX.
- MTT.
- Solución salina fosfatada (PBS).
- Suero bovino fetal (SBF).

#### **IV.1.5. Equipos y Aparatos**

- Agitador magnético
- Autoclave.
- Centrifuga
- Cámara Fotográfica.
- Cámara de Neubauer.
- Congeladora.
- Estufa.
- Incubadora.
- Lector de ELISA.
- Medidor de pH.
- Micropipetas de 10, 100, 1000 y 5000  $\mu$ l.
- Microscopio invertido.
- Microscopio óptico.
- Refrigeradora.
- Tanque de nitrógeno líquido.

#### IV.1.6. Otros

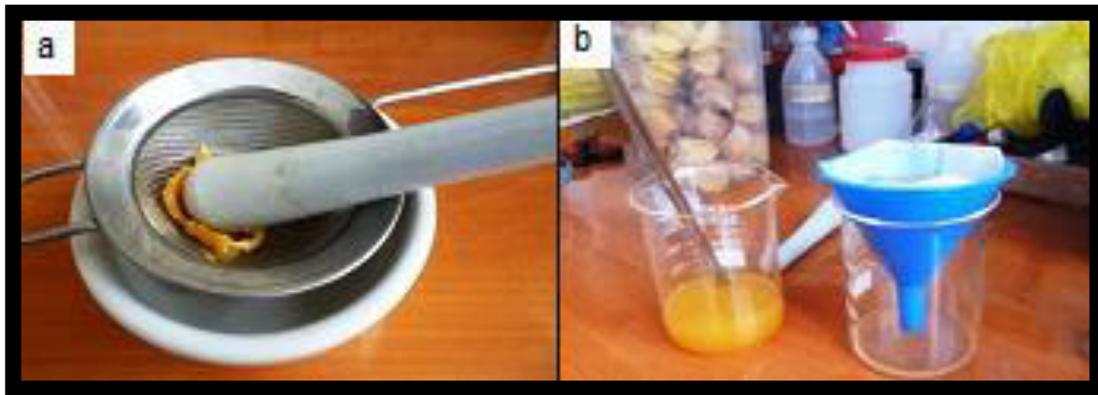
- Caja de papel aluminio.
- Embudo.
- Espátula.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga.
- Guantes estériles.
- Guantes látex.
- Mascarillas
- Papel toalla.
- Papel Whatman N°1.
- Papel parafilm.

#### IV.2. Metodología

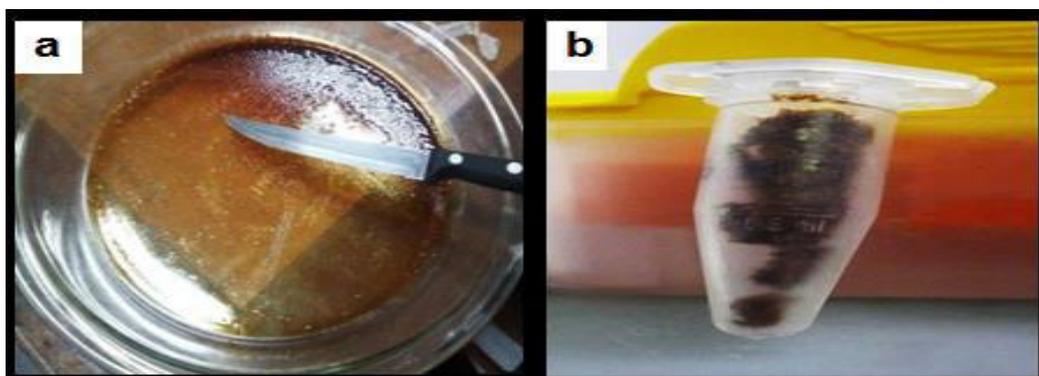
##### IV.2.1. Preparación del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L.

La preparación del extracto acuoso de los frutos de *Physalis peruviana* L. se realizó de acuerdo a la metodología de la MSc. Rosa Lorenza Oriondo Gates y del MSc. Rubén Lázaro Valdivieso Izquierdo en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (comunicación personal). Para ello se utilizaron 39 gramos de frutos frescos de aguaymanto, los cuales fueron molidos en un mortero hasta obtener una pulpa homogénea (**Figura 7a**) y se disolvieron en un vaso de precipitado con 58.5 ml de agua destilada estéril. En seguida se filtró para obtener una solución más homogénea (**Figura 7b**).

Posteriormente se sometió a 30 minutos en baño maría a 50 °C y luego se procedió a colocar todo el contenido en platos planos en un horno a 50°C para su desecación por evaporación. A los 6 días se obtuvo un producto sólido seco adherido a la superficie (**Figura 8a**) del cual se obtuvo un polvo fino, que se almacenó a 4°C y en oscuridad hasta el momento de su uso (**Figura 8b**). El extracto puro acuoso se utilizó para preparar cuatro concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto: 50, 100, 200 y 400 µg/ml que fueron diluidos en medio de cultivo según Areiza-Mazo *et al.* (2013) (**Tabla 6**).



**Figura 7. Trituración del fruto y filtración de la masa acuosa obtenida del fruto.** (a) Trituración del fruto. (b) Pulpa disuelta en agua filtrada.



**Figura 8. Deseccación de la masa acuosa.** (a) Solución acuosa seca. (b) Extracto acuoso sólido.

#### IV.2.2. Preparación de las diluciones del cisplatino

##### Control Positivo.

El control positivo es la sustancia que de antemano se conoce su poder antiproliferativo, en nuestro caso se utilizó el antineoplásico cisplatino debido a su amplio uso en la quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer, entre los que se incluyen sarcomas, algunos carcinomas, linfomas y tumor de células germinales. Este medicamento reacciona *in vivo*, uniéndose al ADN celular y causando la apoptosis de la célula. Se trabajó a 4 diluciones en medio de cultivo (0.3  $\mu\text{g/ml}$ , 0.6  $\mu\text{g/ml}$ , 1.25  $\mu\text{g/ml}$ , 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ), según Quispe-Mauricio *et al.* (2009) (**Tabla 6**).

##### Control Negativo.

Al cultivo que corresponde al control negativo no se le agregó ningún agente antiproliferativo, solo medio de cultivo.

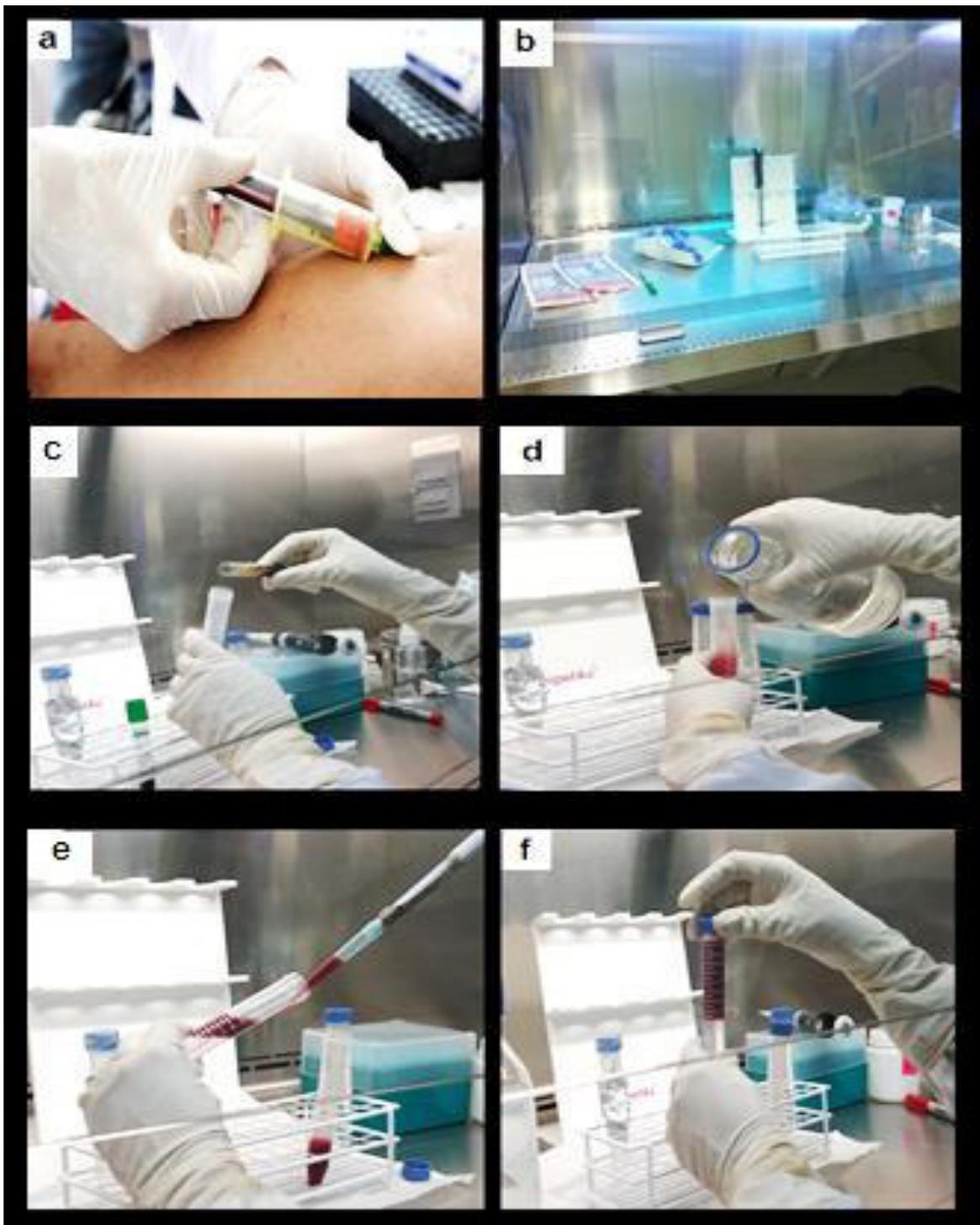
**Tabla 6. Concentraciones del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. y cisplatino.**

Extracto acuoso de <i>Physalis peruviana</i> L. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Control positivo Cisplatino ( $\mu\text{g/ml}$ )
50	0.3
100	0.6
200	1.25
400	2.5

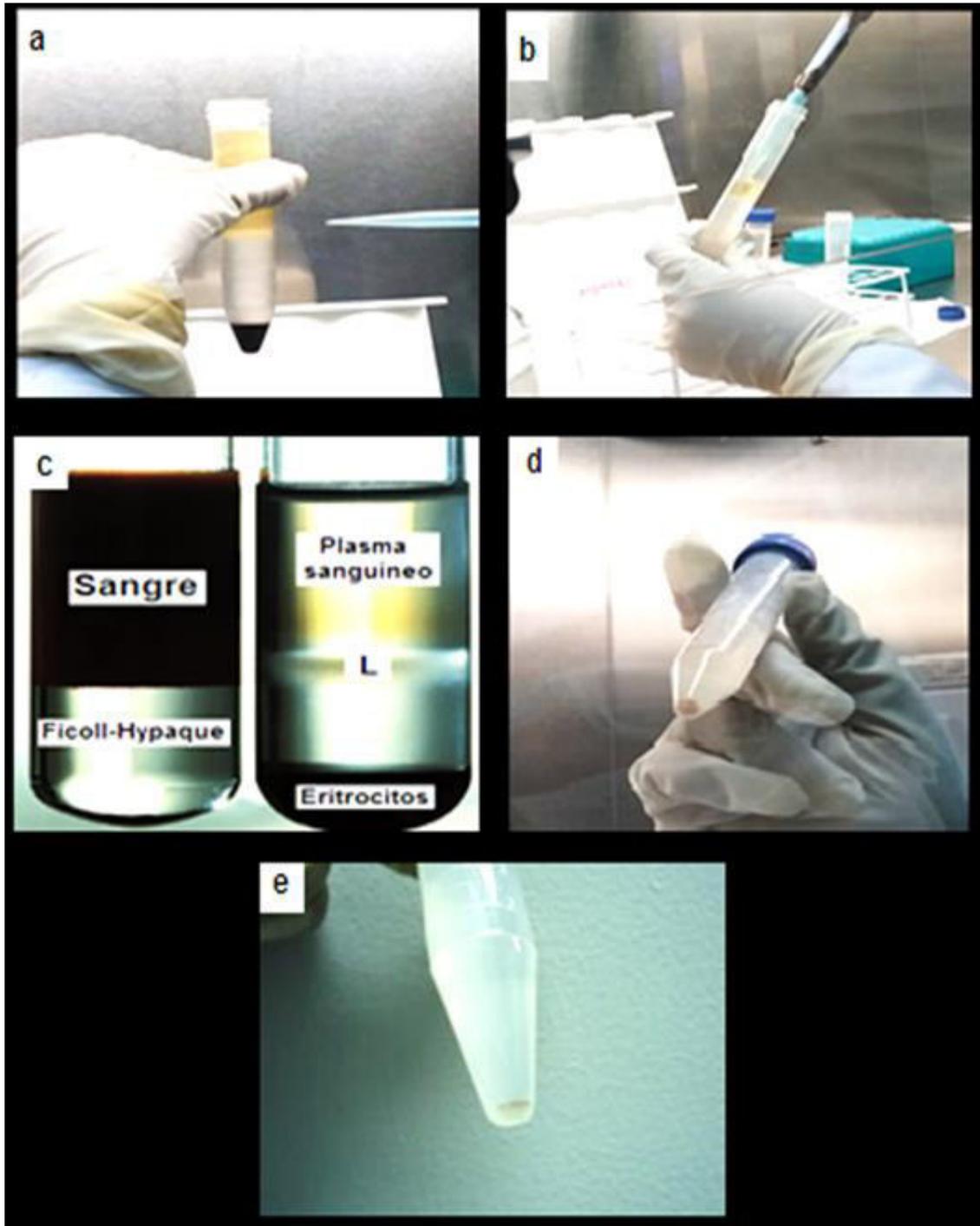
#### **IV.2.3. Obtención de linfocitos de sangre periférica**

Se extrajeron 8 ml de sangre periférica a través de procedimiento de venopunción por sistema al vacío, en seguida se procedió a realizar la purificación de células mononucleares por una separación de gradiente de densidad mediante el uso de Ficoll-Hypaque de acuerdo a la metodología de Castillo *et al.* (2011) (**Figura 9 y 10**). La sangre extraída en 2 tubos de heparina (**Figura 9a**) fue centrifugada a 1000 RPM por 10 minutos y luego fue transportada a una cabina de flujo laminar (**Figura 9b**), la sangre se separó en 2 fases (superior: plasma sanguíneo e inferior: eritrocitos) y entre estas había una delgada línea blanca (interfase) que se aisló con mucho cuidado (**Figura 9c**), seguidamente se mezcló con 4ml de PBS (**Figura 9d**) y se homogenizó delicadamente, luego la mezcla fue adicionada con mucho cuidado sobre un volumen de Ficoll-Hypaque (**Figura 9e y 9f**), se enderezó lentamente hasta que el tubo se encuentre de forma vertical y se centrifugó a 1000 rpm por 20 minutos.

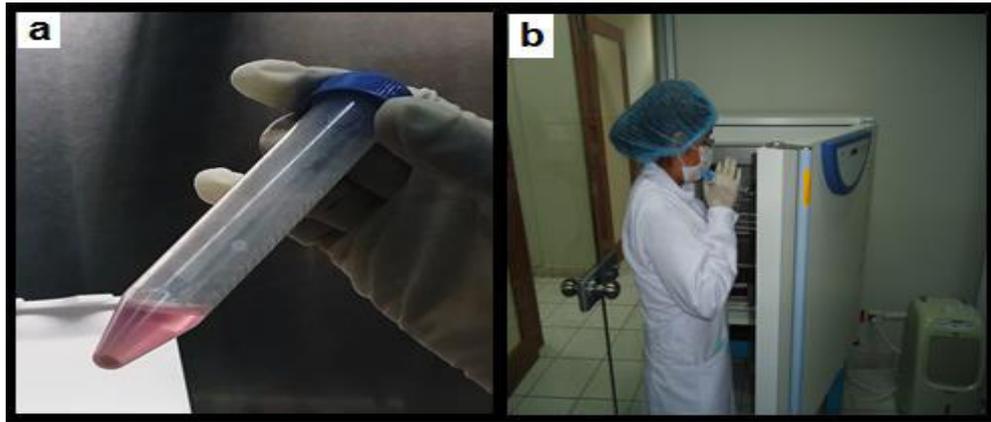
Luego de la centrifugación se obtuvieron 3 fases separadas (**Figura 10a**), la porción intermedia entre las 2 fases superiores fue aislada (**Figura 10b**), seguidamente se mezcló con 7 ml de PBS (**Figura 10d**) y se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos, luego se repite el lavado con PBS y finalmente se obtuvo un precipitado blanquecino (**Figura 10e**). Los linfocitos humanos aislados de la sangre total fueron resuspendidos en medio de cultivo PB-MAX (**Figura 11**), inmediatamente se realizó un conteo a las 0 horas para evaluar la viabilidad celular de la dilución ya que el Ficoll-Hypaque muchas veces es tóxico para las células.



**Figura 9. Metodología del aislamiento de linfocitos de sangre total. Parte 1.** (a) Extracción de sangre. (b) Procesamiento en la cámara de flujo laminar. (c) Aislamiento de la interfase. (d) Mezcla de la interfase con PBS. (e) Mezcla siendo agregada sobre Ficoll-Hypaque. (f) Mezcla sobre Ficoll-Hypaque.



**Figura 10. Metodología del aislamiento de linfocitos de sangre total. Parte 2.** (a) 3 fases formadas por gradiente de Ficoll-Hypaque. (b) Aislamiento de interfase. (c) Vista esquemática de la interfase blanquecina (L: linfocitos). (d) Precipitado de linfocitos luego de su primer lavado (e) Precipitado de linfocitos luego de su segundo lavado.

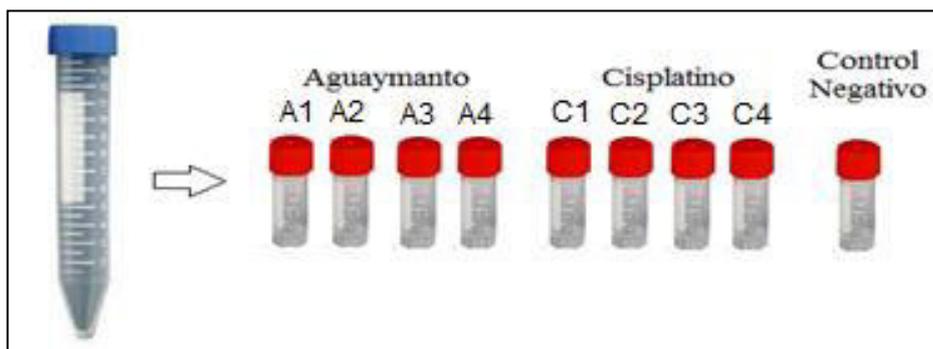


**Figura 11. Linfocitos aislados y en incubación.** (a) Linfocitos aislados diluidos en 2 ml de Medio de cultivo PB-MAX. (b) Incubación de los linfocitos a 37°C.

#### IV.2.4. Exposición de los linfocitos a los extractos acuosos del aguaymanto

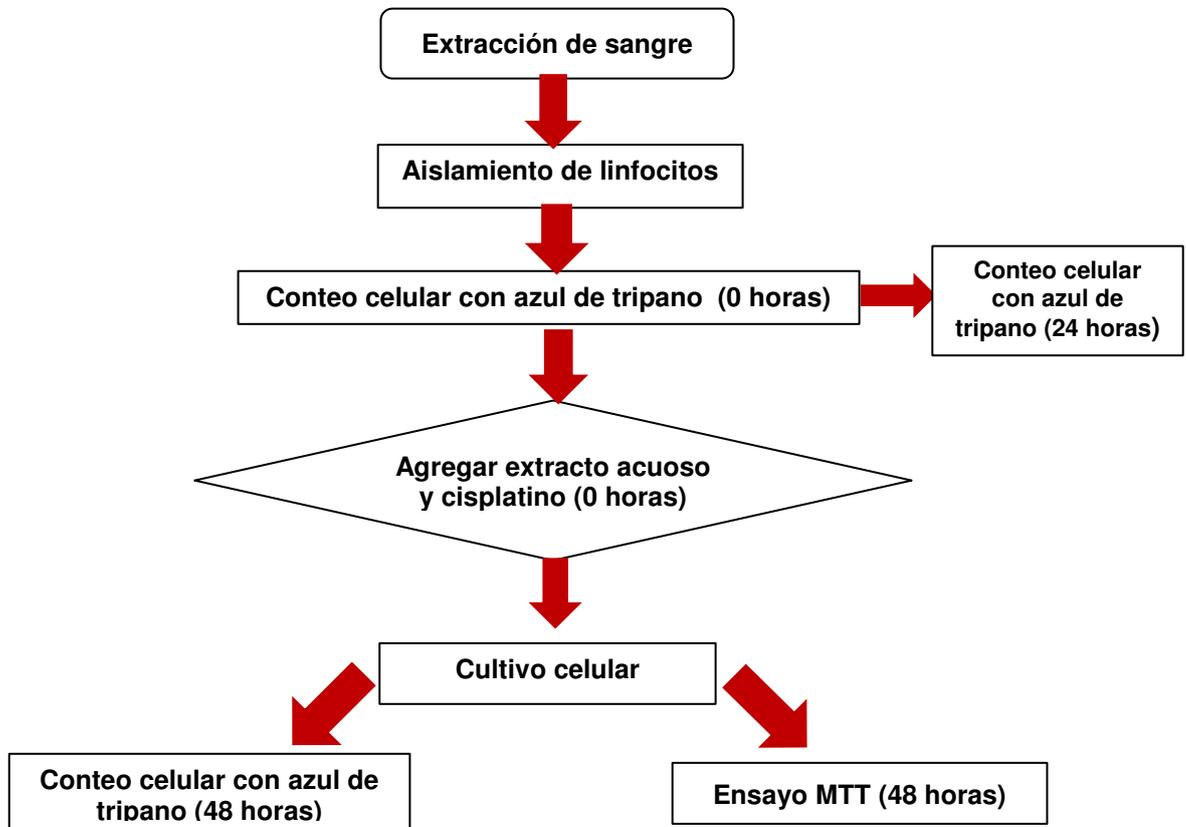
La suspensión de los linfocitos fue repartida (2 ml) en nueve crioviales y se añadió 200  $\mu$ l de las 4 concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto (50, 100, 200 y 400  $\mu$ g/ml), 4 correspondieron a diluciones del control positivo cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5  $\mu$ g/ml) y un criovial como control negativo solo con medio de cultivo PB-MAX (Figura 12).

Los crioviales fueron incubados a 37°C durante 48 horas, de inmediato se realizaron las pruebas de conteo celular con azul de tripano y del ensayo MTT.



**Figura 12. Exposición del cultivo celular linfocitario a los diferentes tratamientos.**

Las actividades realizadas con los linfocitos se muestran en la **Figura 13**.

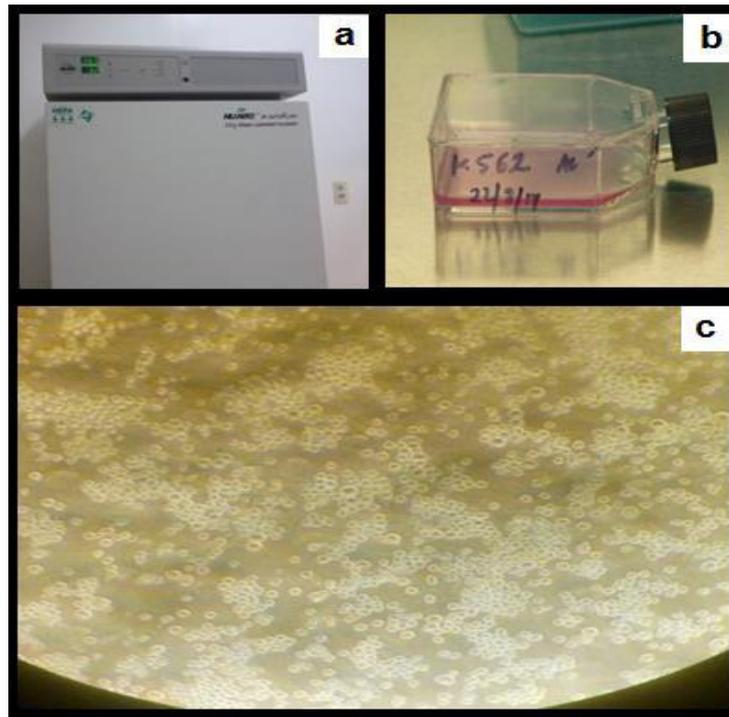


**Figura 13.** Flujograma de la metodología utilizada en los linfocitos humanos.

#### **IV.2.5. Transporte de la línea celular purificada al laboratorio**

La línea celular K562 fue donada gentilmente por el Dr. Abraham Jaime Vaisberg Wolach encargado del Laboratorio de Biología Celular y Virología de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Se trasladaron en frascos de cultivo celular al laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM para subcultivar en un plazo no mayor a 2 horas (**Figura 14**).

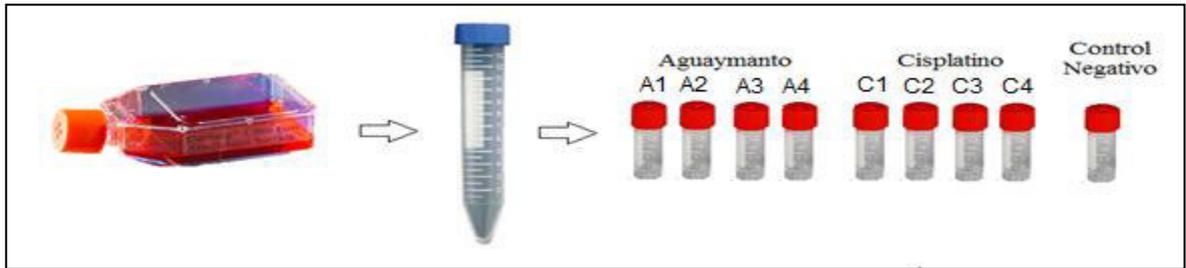


**Figura 14. Incubación y monitoreo de la línea celular K562.** (a) Incubación de la línea K562 a 37°C. (b) Frasco de cultivo con tapa hermética de la línea K562. (c) Células de la línea K562 vista con un objetivo de 40X en el microscopio invertido.

## IV.2.6. Cultivo, mantenimiento y criopreservación de las líneas celulares

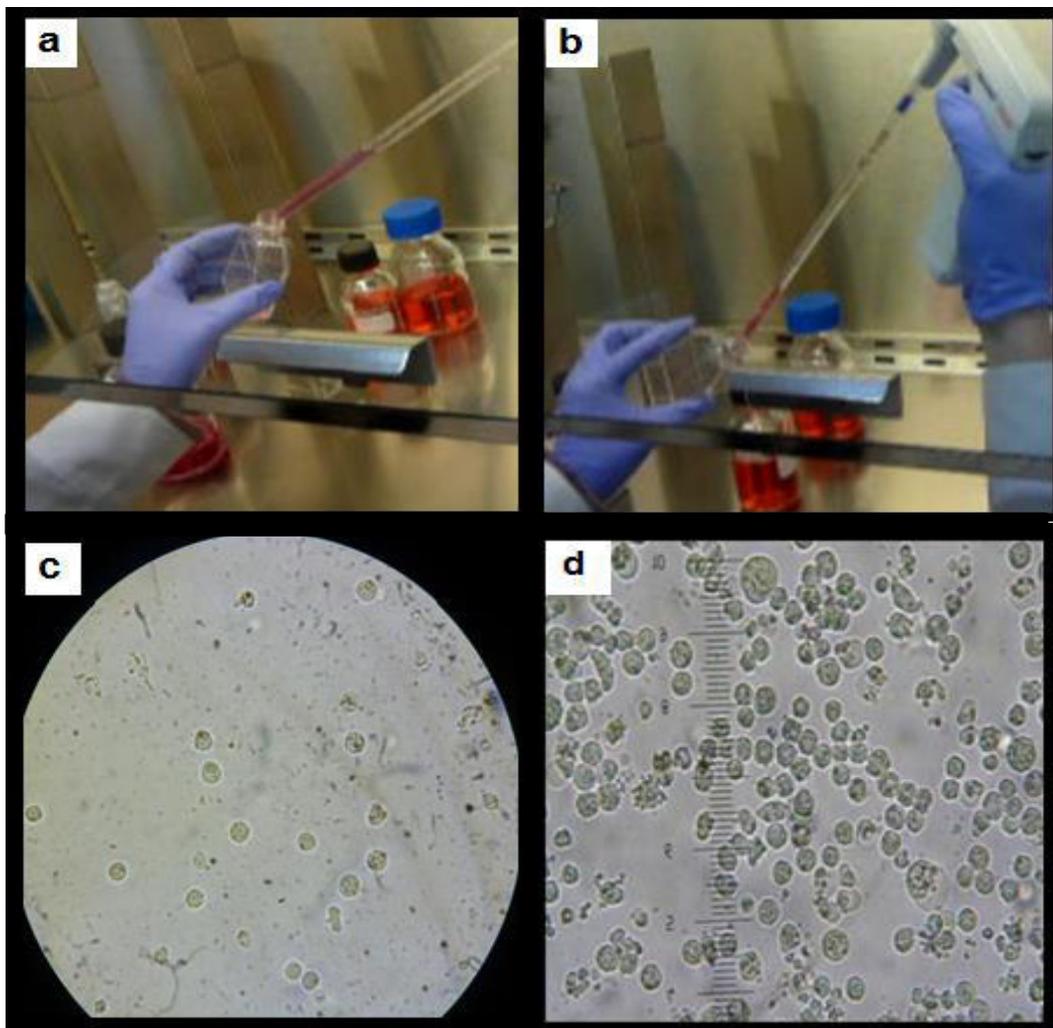
### IV.2.6.1. Cultivo de la línea celular K562

La línea celular K562 se resuspendió en 5ml medio de cultivo RPMI-1640 en un frasco plano para su monitoreo en el microscopio invertido cuando alcanzan confluencia, se aislaron 2 ml del cultivo celular en un tubo de centrifuga para luego repartirlo equitativamente en 9 crioviales con volúmenes iguales de 200  $\mu$ l (previo homogenización suave). Luego se les agregó 200  $\mu$ l de las diluciones del extracto y del cisplatino, 4 crioviales fueron expuestos a cuatro concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto (50, 100, 200 y 400  $\mu$ g/ml), 4 crioviales a diluciones del control positivo cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5  $\mu$ g/ml) y un criovial como control negativo solo con medio de cultivo RPMI-1640 (**Figura 15**).



**Figura 15. Exposición del cultivo celular K562 a los diferentes tratamientos.**

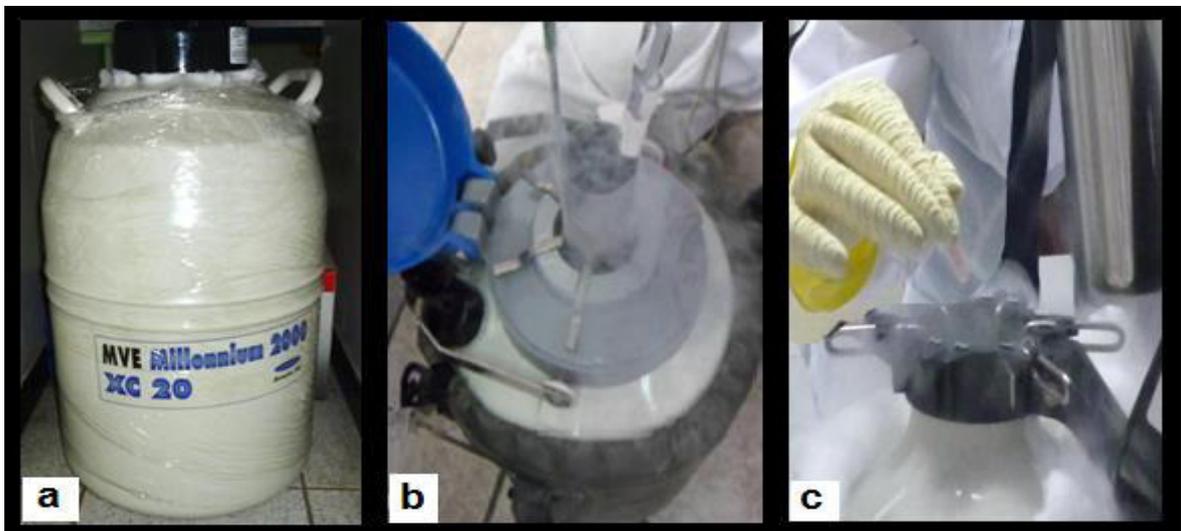
Este proceso se realizó en una cabina de flujo laminar estéril y luego se incubó a 37° C (Figura 16). Los crioviales fueron incubados a 37°C durante 48 horas.



**Figura 16. Cultivo y establecimiento de la línea K562.** (a) y (b) Proceso de lavado y renovación de medio RPMI-1640 en el cultivo de la línea K562. (c) Células de la línea K562 vista en microscopio invertido con un objetivo de 10X. (d) Células de la línea K562 vista con un objetivo de 40X en el microscopio invertido.

#### IV.2.6.2. Criopreservación de la línea celular K562

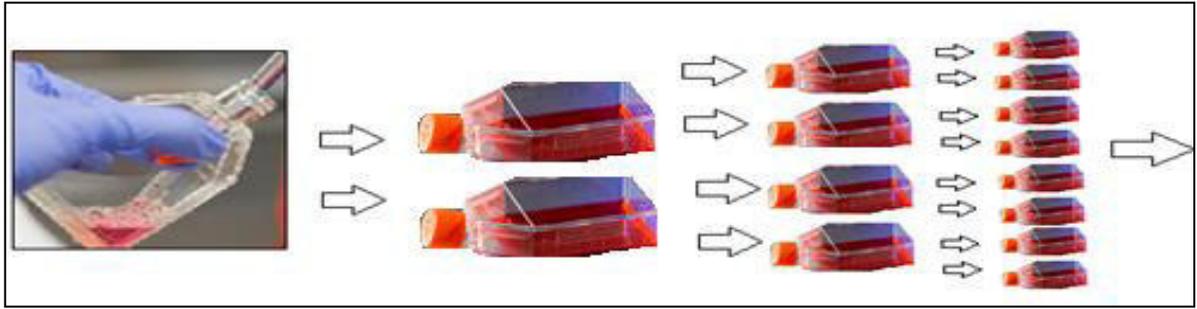
El almacenamiento se realizó con las indicaciones de la ficha de técnica de la línea K562, que fue resuspendida en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10 % suero bovino fetal y el criopreservante DMSO en un criovial. Luego se realizaron cambios de temperatura graduales de 37°C a 4°C, luego de 4°C a -80°C, luego de -80 °C a -120°C y finalmente de -120°C a los vapores del nitrógeno líquido (**Figura 17**). Para evaluar el protocolo de conservación siempre luego de la congelación se procedió a descongelar uno de los crioviales nuevamente para evaluar su viabilidad, este protocolo se realizará gradualmente para mantener la línea K562 congelada a disposición.



**Figura 17. Criopreservación de la línea K562.** (a) Tanque de nitrógeno líquido (20L). (b) Apertura de las ranuras. (c) Introducción de los crioviales para la congelación en los vapores del nitrógeno líquido.

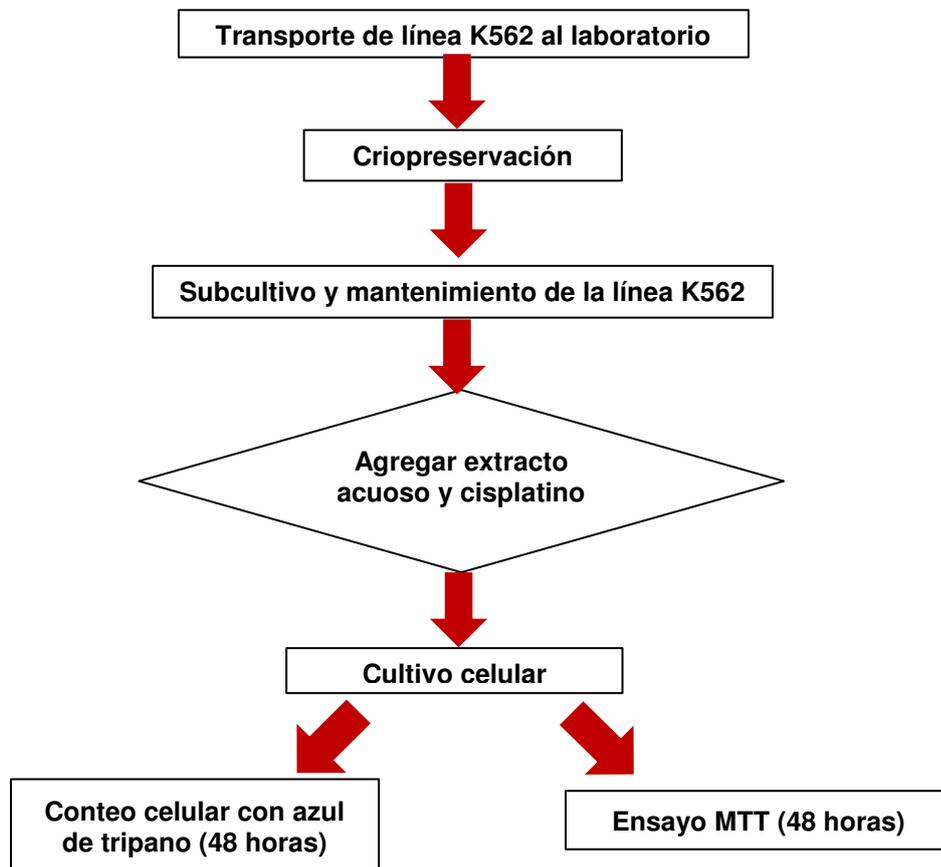
#### IV.2.6.3. Mantenimiento

Para el mantenimiento de la línea celular K562 se requirieron réplicas en subcultivos cada cierto tiempo y cambiarles el medio de cultivo gradualmente cada vez que alcanzaba confluencia. El mantenimiento se realizó mediante monitoreo con microscopio invertido ya que si no se realizan los cambios las células morirían por la insuficiencia de nutrientes en el medio y la presencia de desechos (**Figura 18**).



**Figura 18. Replicación y subcultivo de la línea K562 para su mantenimiento.** Imágen esquemática para visualizar como se realizan los lavados y mantenimientos de los cultivos a los largo del tiempo, cambiándoles del envase cada vez que se subcultiva.

Las actividades realizadas con la línea K562 se muestran en la **Figura 19.**



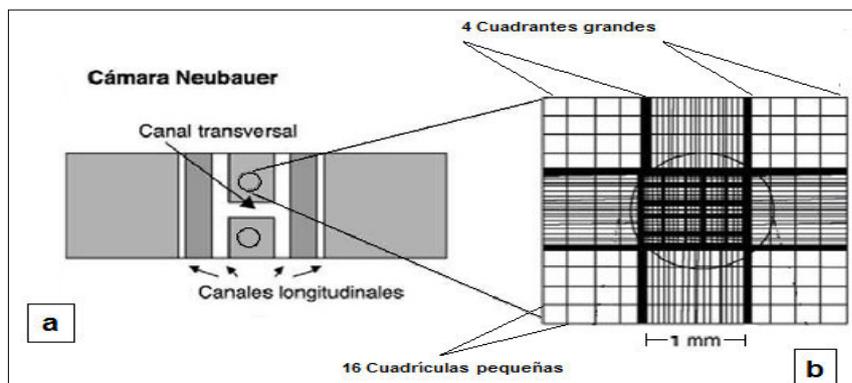
**Figura 19. Flujograma de la metodología utilizada con la línea K562**

#### IV.2.7. Conteo celular con azul de tripano para estimar la Viabilidad celular de los linfocitos humanos y la línea K562

La prueba fue realizada mediante el conteo celular en una cámara de Neubauer para calcular el número de células viables en el medio de suspensión, se usó el colorante vital azul tripano (solución madre) que tiñó las células muertas para poder hallar un porcentaje de células viables del total (Strober, 2001). La prueba se realizó también para evaluar el buen estado del medio de cultivo y su influencia en los cultivos para lo cual se hizo un conteo adicional a las 24 horas y luego de la incubación. Terminado el tiempo de incubación de 48 horas, se procedió a realizar un conteo para cada tratamiento, diluyendo 100 µl de suspensión celular con 100 µl de azul de tripano (Solución madre) y colocándolo en el cuadrante central señalado en la **Figura 20**, con esto se obtuvo la concentración celular de cada tratamiento respecto al control negativo que representa un 100 %. La fórmula usada es la siguiente:

$$\text{Número de linfocitos} = \frac{\text{Número total de linfocitos en la cámara de Neubauer} \times 10^4}{4 \times \text{F.D.}}$$

Esta fórmula nos brindó el número de linfocitos totales por 1 ml de suspensión y donde F.D. es el factor de dilución.



**Figura 20. Cámara de Neubauer.** (a) Esquema de la Cámara de Neubauer, (b) cuadrante y cuadrículas.

El número de células teñidas correspondió al número de células muertas y este dato se usó para obtener un índice de viabilidad (expresado en número de linfocitos) que representa el número total de linfocitos viables. Se finalizó la prueba de viabilidad con la selección de la concentración más adecuada del extracto de aguaymanto, es decir la dosis con menor número de células vivas (menor viabilidad) en los cultivos de la línea celular K562 y en los cultivos de linfocitos.

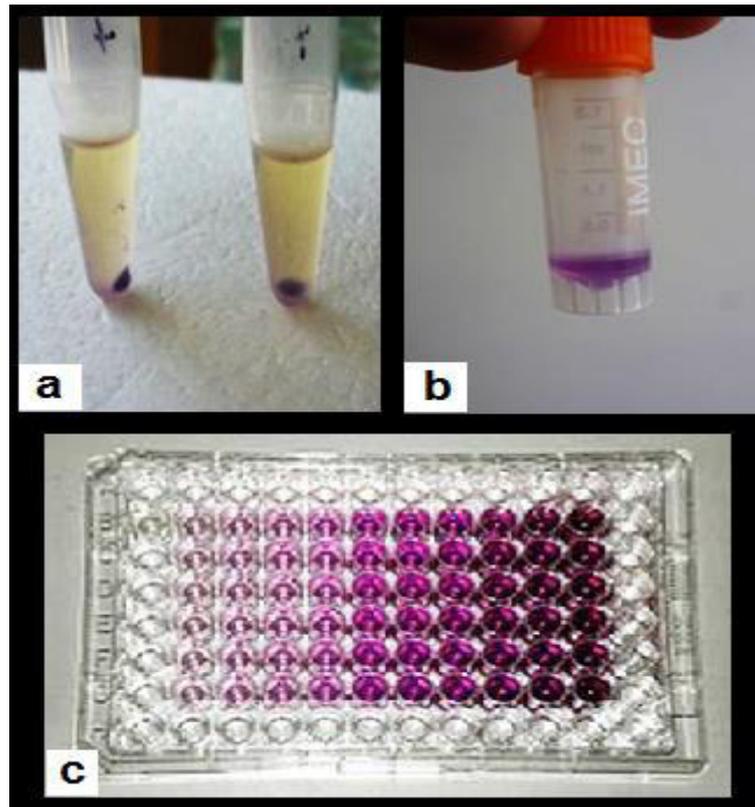
#### IV.2.8. Ensayo colorimétrico MTT para los linfocitos humanos y la línea K562

Para realizar la prueba de MTT previamente se debió determinar el volumen total de cada criovial (por variaciones de error en la micropipeta y evaporación del medio). para lo cual se colocó un volumen que no contenía un número mayor a  $9 \times 10^6$  células, ni menor a  $1 \times 10^4$  células por ml de suspensión, ya que podía interferir con la lectura en el Lector de ELISA. Los 9 crioviales contenían aproximadamente 300  $\mu$ l y se les adicionó 30  $\mu$ l de MTT (solución stock a 5 mg/mL) es decir el 10 % del volumen total.

Seguidamente se cubrió con papel aluminio durante 4 horas a 37°C en oscuridad, culminado el tiempo establecido dentro de cada criovial se formaron cristales de formazán, inmediatamente se centrifugó cada criovial a 1500 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante rápidamente por succión (**Figura 21a**), en seguida se adicionó 660  $\mu$ l de DMSO (correspondiente al doble de volumen) para disolver los cristales de formazán (**Figura 21b**). Para hallar el porcentaje de viabilidad celular se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Viabilidad celular} = \frac{\text{DO de las células tratadas}}{\text{DO de las células sin tratamiento}}$$

La cantidad de formazán–MTT formado es directamente proporcional a la viabilidad celular que se determinó midiendo la densidad óptica (DO) con el Lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm (Mosmann, 1983; Denizot y Lang, 1986, Fricker y Buckley, 1996).



**Figura 21. Ensayo MTT.** (a) Cristales de formazán formados al fondo del microtubo, (b) cristales mezclados con disolvente DMSO y (c) Placa de ELISA para ser leído por un lector de ELISA.

Con estos datos de absorbancia también se puede hallar el porcentaje de inhibición del extracto acuoso de aguaymanto que es la diferencia entre 100% y el porcentaje de viabilidad celular (Denizot y Lang, 1986). El porcentaje de viabilidad se analizó estadísticamente mediante regresión lineal (software STATA) para hallar la Concentración Inhibitoria Media (IC50), un dato muy usado en evaluaciones antiproliferativas de extractos vegetales para células no cancerígenas (linfocitos). Con el IC50 se halló el índice de selectividad (SI), otro dato muy importante en evaluaciones antiproliferativas de extractos vegetales para células cancerígenas (línea K562), que se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$SI = \frac{IC50 \text{ células no cancerígenas}}{IC50 \text{ células cancerígenas}}$$

Donde las células no cancerígenas son los linfocitos y las células cancerígenas son las células de la línea K562. Si el valor SI es mayor que 1, indica que la sustancia es más antiproliferativa para las células cancerígenas que para las células normales, si es menor que 1 significa indica que la sustancia es más antiproliferativa para las células normales que para las células cancerígenas.

#### **IV.2.9. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos promedio se realizó con el ensayo de error estándar de la media (con un nivel de significancia del 5 %) con el programa Microsoft Excel 2010. El análisis estadístico se realizó con el software STATA a un nivel del 5% (Kruskall-Wallis,  $p < 0.05$ ), con los datos de viabilidad celular de linfocitos y de la línea K562 sometidos a las diferentes concentraciones de aguaymanto y cisplatino.

## V. RESULTADOS

### V.1. Evaluación preliminar del cultivo de linfocitos

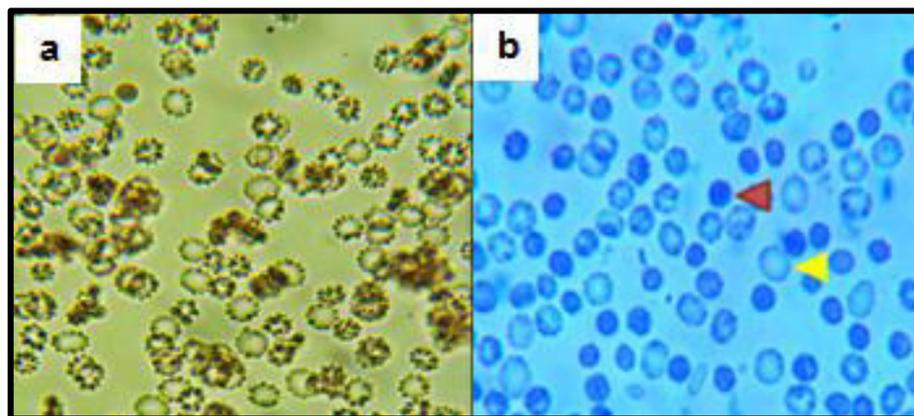
#### V.1.1. Mediante conteo celular con azul de tripano

El conteo celular permitió determinar si el medio de cultivo PB-MAX (fitohemaglutinina) inducía adecuadamente la proliferación celular en los linfocitos humanos, para esta prueba se contabilizaron los linfocitos a las 0 y 24 horas como se aprecia en la **Tabla 7**.

### V.2. Evaluación de la viabilidad celular en linfocitos humanos

#### V.2.1. Mediante conteo celular con azul de tripano

El conteo celular permitió determinar el número de linfocitos vivos en cada tratamiento, utilizando azul de tripano para distinguir las células viables (**Figura 22**).



**Figura 22. Linfocitos en cámara de Neubauer.** (a) Vista de una cuadrícula al microscopio óptico, linfocitos sin teñir. (b) Vista de una cuadrícula al microscopio óptico, linfocitos viables (flecha amarilla) y no viables (flecha roja).

Se realizó un análisis estadístico del Error estándar de la media con el programa Microsoft Excel 2010. El resultado nos dio una diferencia no significativa entre cada individuo (nivel del 5 %), por lo cual se pudo obtener un promedio del total de los 10 individuos.

**Tabla 7. Número y concentración de linfocitos obtenidos de 4ml de sangre de los 10 donantes:**

Individuos	Nº Linfocitos/ml de suspensión (0 horas)	Nº Linfocitos/ml de suspensión (24 horas)
1	$1.98 \times 10^6$	$3.60 \times 10^6$
2	$2.10 \times 10^6$	$3.50 \times 10^6$
3	$1.90 \times 10^6$	$3.30 \times 10^6$
4	$2.20 \times 10^6$	$3.70 \times 10^6$
5	$1.99 \times 10^6$	$3.80 \times 10^6$
6	$2.50 \times 10^6$	$3.87 \times 10^6$
7	$2.02 \times 10^6$	$3.66 \times 10^6$
8	$1.98 \times 10^6$	$3.78 \times 10^6$
9	$2.00 \times 10^6$	$3.77 \times 10^6$
10	$2.30 \times 10^6$	$3.90 \times 10^6$
<b>Promedio</b>	$2.10 \times 10^6$	$3.70 \times 10^6$

Error estándar de la media,  $p < 0.05$ .

La **Tabla 8** nos muestra los resultados obtenidos luego del tratamiento de los linfocitos a la acción antiproliferativa de la solución acuosa del aguaymanto a diferentes concentraciones, al cisplatino y al control negativo (todos los datos se expresaron multiplicándose  $\times 10^6$  linfocitos por 1 ml de suspensión).

Los resultados muestran el número de linfocitos viables de los 10 donantes sanos. Se realizó un análisis estadístico del Error estándar de la media entre los 10 individuos a un nivel del 5 %,  $p < 0.05$ , por lo cual se pudieron obtener datos promedio.

**Tabla 8. Conteo celular de linfocitos en la cámara de Neubauer (número de linfocitos x 10<sup>6</sup>):**

Concentración Individuo	Aguaymanto				Sin tratamiento	Cisplatino			
	400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	0 µg/ml	2.5 µg/ml	1.25 µg/ml	0.6 µg/ml	0.3 µg/ml
Individuo 1	2.60	2.90	3.65	5.33	7.86	1.35	2.5	2.38	2.55
Individuo 2	1.61	3.76	2.90	2.70	2.99	1.19	1.99	2.68	2.53
Individuo 3	1.55	1.85	3.58	4.60	5.66	1.33	2.00	2.36	2.80
Individuo 4	1.50	1.80	3.75	4.35	5.90	1.33	2.37	2.48	2.88
Individuo 5	1.37	1.77	3.56	3.80	4.80	1.25	1.92	2.57	3.00
Individuo 6	2.50	1.66	3.63	4.32	5.87	1.18	2.43	2.63	3.13
Individuo 7	2.43	3.21	3.59	5.40	6.10	1.31	2.50	2.48	3.25
Individuo 8	2.10	2.99	3.62	4.20	5.30	1.41	2.11	2.63	3.38
Individuo 9	3.02	3.43	3.77	5.30	6.50	1.19	2.25	2.69	3.50
Individuo 10	2.00	3.55	3.55	4.67	5.90	1.18	2.51	2.70	3.63
Promedio	2.07	2.67	3.56	4.47	5.69	1.27	2.26	2.56	3.07
Promedio en porcentaje	36.38	46.92	62.57	78.56	100	22.32	39.72	44.99	53.95

Error estándar de la media,  $p < 0.05$ .

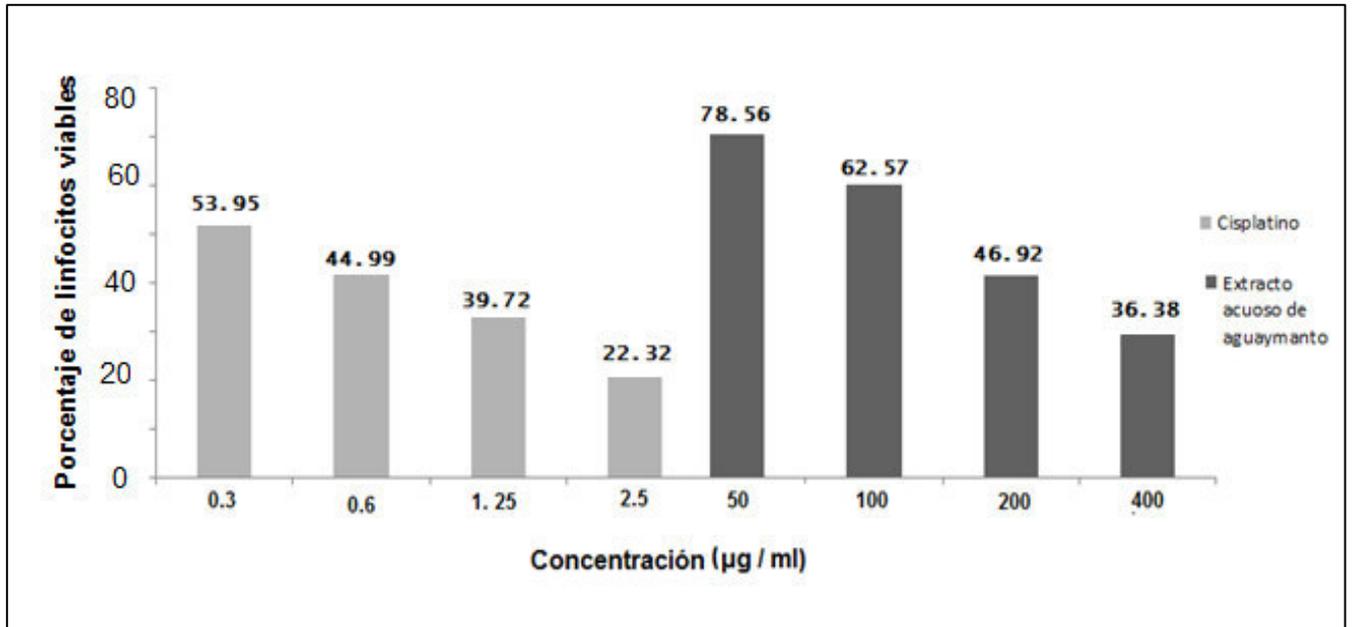
En la **tabla 8** se muestra como varia el promedio del número de linfocitos de acuerdo a la concentración que se utilizó. Se observa que tanto para el extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino, a mayor concentración (400 µg/ml, 2.5 µg/ml respectivamente) disminuyen los linfocitos viables.

Con los datos de la **Tabla 8** se obtuvieron las **Figuras 23** y **24** donde se observa la variación de la viabilidad de los linfocitos de los 10 individuos, en una curva de crecimiento promedio en porcentajes por cada tratamiento (**Figura 23**) y el promedio del número de linfocitos por tratamiento (**Figura 24**), expuestos a las diferentes dosis del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. así como de los controles positivo y negativo.

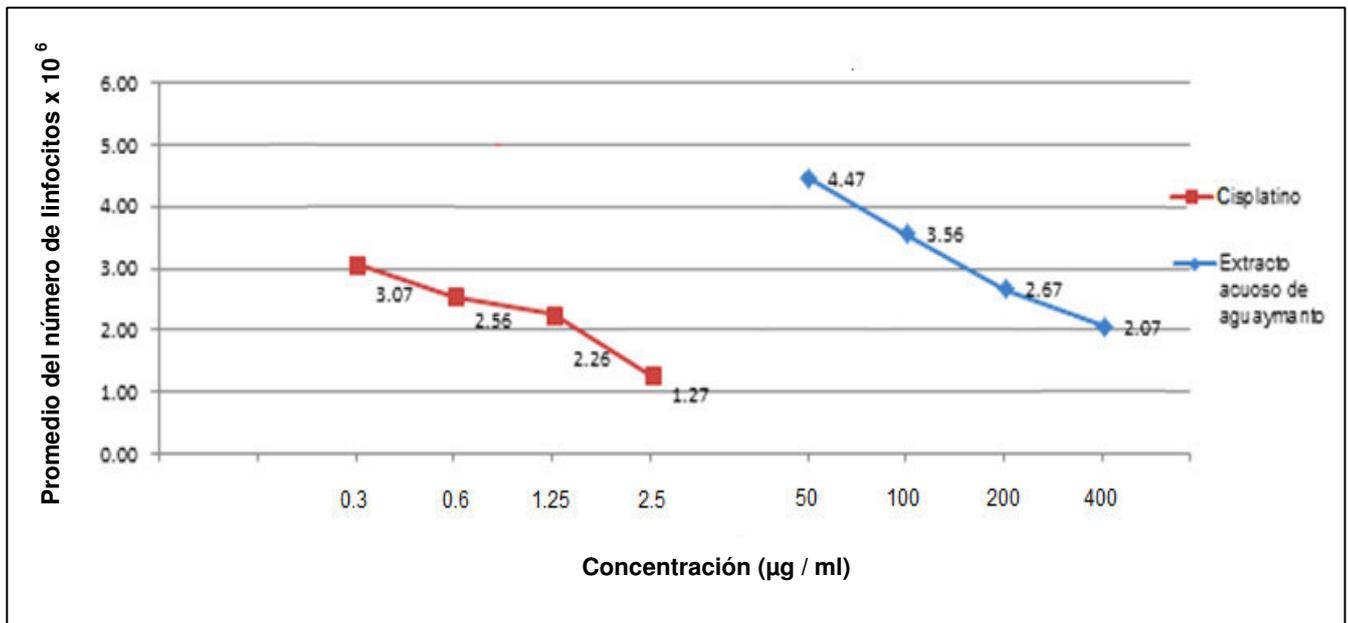
Para ambas gráficas el extracto acuoso de aguaymanto a las diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 400 µg/ml) y el cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml) inducen efecto antiproliferativo en los linfocitos y a medida que se aumenta la concentración para ambos el poder inhibitorio aumenta, por lo tanto se puede deducir que la viabilidad celular muestra un carácter dosis-dependiente de acuerdo a la concentración del tratamiento al que se sometió a los linfocitos.

Para el aguaymanto la dosis menos antiproliferativa en el aguaymanto fue de 50 µg/ml con un poder inhibitorio de 21.44 % ( $4.47 \times 10^6$  linfocitos /ml, viabilidad celular de 78.56 %) y la dosis más antiproliferativa fue de 400 µg/ml con un poder inhibitorio de 63.62 % ( $2.07 \times 10^6$  linfocitos viables /ml, viabilidad celular de 36.38 %)

Para el cisplatino la dosis menos antiproliferativa fue de 0.3 µg/ml con un poder inhibitorio de 46.05 % ( $3.07 \times 10^6$  linfocitos viables /ml, viabilidad celular de 53.95 %) y la dosis más antiproliferativa fue de 2.5 µg/ml que mostró un poder inhibitorio promedio de 77.68 % ( $1.27 \times 10^6$  linfocitos viables /ml, viabilidad celular de 22.32 %). Se observó que el extracto acuoso de aguaymanto presentó efecto antiproliferativo para las células linfocitarias.



**Figura 23. Viabilidad celular de linfocitos sometidos a los tratamientos.** Las barras representan el promedio de porcentaje de linfocitos viables obtenidos de 10 muestras independientes con las diferentes dosis de extracto acuoso de aguaymanto a 50, 100, 200 y 400 µg/ml y cisplatino a 0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml, test no paramétrico Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ .



**Figura 24. Curva de crecimiento del promedio de los linfocitos sometidos a los tratamientos.** Figura donde se aprecia el comportamiento antiproliferativo del cisplatino (línea roja) y del aguaymanto (azul), también se observa que a mayor concentración disminuye el número de linfocitos.

### V.2.2. Mediante el ensayo MTT

La viabilidad celular se determinó con la absorbancia obtenida en el Lector de ELISA, los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 9** por cada cultivo linfocitario de cada individuo sometido a esta evaluación con los diferentes tratamientos (extracto acuoso de aguaymanto, antineoplásico cisplatino y control negativo sin tratamiento).

**Tabla 9. Densidad óptica de linfocitos humanos en el ensayo MTT.**

Concentración Individuo	Aguaymanto				Sin tratamiento	Cisplatino			
	400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	0 µg/ml	2.5 µg/ml	1.25 µg/ml	0.6 µg/ml	0.3 µg/ml
Individuo 1	0.99	1.15	1.67	1.98	2.38	0.66	0.99	1.40	1.70
Individuo 2	0.66	1.09	1.66	1.87	2.29	0.57	1.00	1.55	1.74
Individuo 3	0.99	1.08	1.71	1.95	2.41	0.77	1.03	1.48	1.84
Individuo 4	0.97	1.07	1.78	2.01	2.63	0.88	1.01	1.47	1.88
Individuo 5	1.00	1.16	1.63	2.10	2.41	0.90	1.02	1.50	1.76
Individuo 6	0.98	1.10	1.40	1.94	2.50	0.85	0.99	1.43	1.76
Individuo 7	0.89	1.10	1.45	1.91	2.36	0.66	0.98	1.46	1.70
Individuo 8	0.88	1.23	1.39	1.94	2.57	0.68	0.89	1.51	1.80
Individuo 9	0.86	1.17	1.46	1.83	2.43	0.70	0.88	1.56	1.67
Individuo 10	0.88	1.22	1.26	2.00	2.47	0.65	1.00	1.50	1,70
Promedio de D.O.	0.91	1.14	1.65	1.94	2.44	0.73	0.98	1.49	1.76
Porcentaje de viabilidad celular	37.30	46.72	67.62	79.51	100	29.92	40.16	60.07	72.13

Error estándar de la media,  $p < 0.05$ .

En la **Tabla 9** se muestra como varia el porcentaje de viabilidad obtenido con el lector de ELISA, a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino. Cuando hay un valor mayor hay mayor viabilidad celular, la misma que va disminuyendo a medida que se aumentó la concentración en los tratamientos.

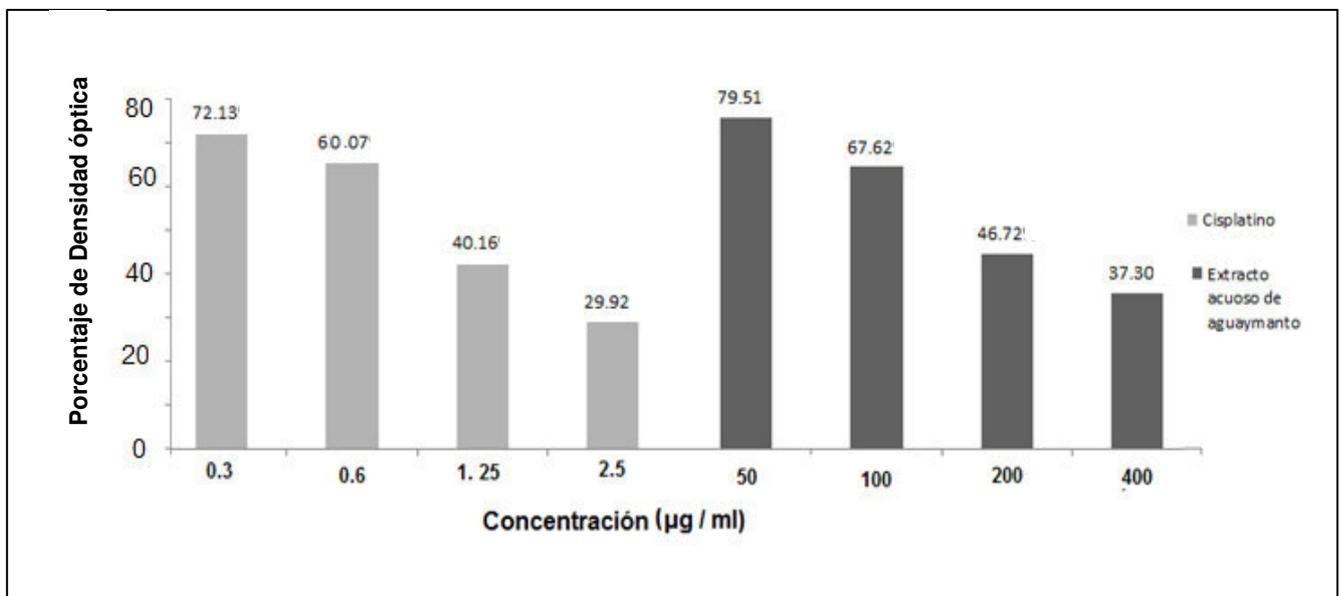
Se observa que para el extracto acuoso de aguaymanto (400 µg/ml) y el cisplatino (2.5 µg/ml), a mayor concentración disminuyen los valores de D.O. Se realizó un análisis estadístico del Error estándar de la media entre los 10 individuos a un nivel del 5%,  $p < 0.05$ , y mostró que no hay diferencias significativas, por lo cual se pudo obtener datos promedio. Con los datos de la **Tabla 9** se obtuvo la curva de crecimiento del promedio en porcentajes (**Figura 25**) y promedio de los valores de densidad óptica a 490 nm (**Figura 26**).

En ambas gráficas se observa que el extracto acuoso de aguaymanto a las diferentes concentraciones y el cisplatino tienen carácter antiproliferativo.

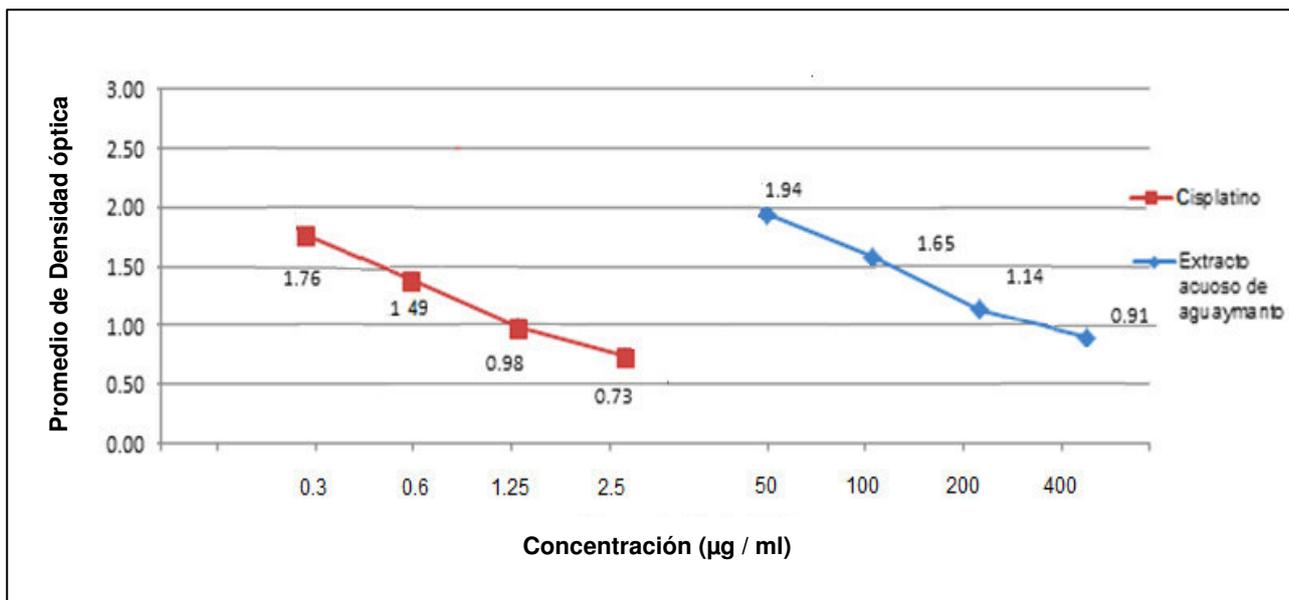
Es decir a medida que aumenta la concentración del extracto, el poder inhibitorio aumenta y el valor de D.O. disminuye (viabilidad celular decrece); es decir se evidencia un carácter dosis-dependiente de acuerdo a la concentración del extracto.

En la **Figura 25** se observa representada de forma esquemática en barras de la D.O. y en la **Figura 26** una curva de crecimiento de los linfocitos sometidos a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto y de cisplatino. Como se puede observar el aguaymanto induce un efecto antiproliferativo en los linfocitos por ello a medida que se aumenta la concentración del extracto acuoso el poder inhibitorio aumenta y el valor de D.O. disminuye. Los valores de D.O. que nos representan la viabilidad celular mostraron un carácter dosis-dependiente de acuerdo a la concentración del extracto a la que se sometieron a las células.

Para el aguaymanto la dosis menos antiproliferativa fue de 50  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio de 20.49 % (1.94, viabilidad celular de 79.51 %) y la dosis más antiproliferativa fue de 400  $\mu\text{g/ml}$  que mostró un poder inhibitorio de 62.70 % (0.91, viabilidad celular de 37.30 %). El cisplatino tuvo un mayor efecto en los linfocitos comparado con el extracto acuoso de aguaymanto, la dosis menos antiproliferativa fue de 0.3  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio de 27.87 % (1.76, viabilidad celular de 72.13 %) en la prueba del ensayo MTT y la más antiproliferativa fue de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio promedio de 70.08 % (0.73, viabilidad celular de 29.92).



**Figura 25. Viabilidad celular de linfocitos sometidos a los tratamientos en el ensayo MTT.** Las barras muestran el nivel de densidad óptica (D.O.) promedio a 490 nm medida por el lector de ELISA y que nos representan la viabilidad celular de los linfocitos obtenidos de los 10 individuos sometidos a las diferentes dosis de extracto acuoso de aguaymanto (50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$ ) y cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ), test no paramétrico.



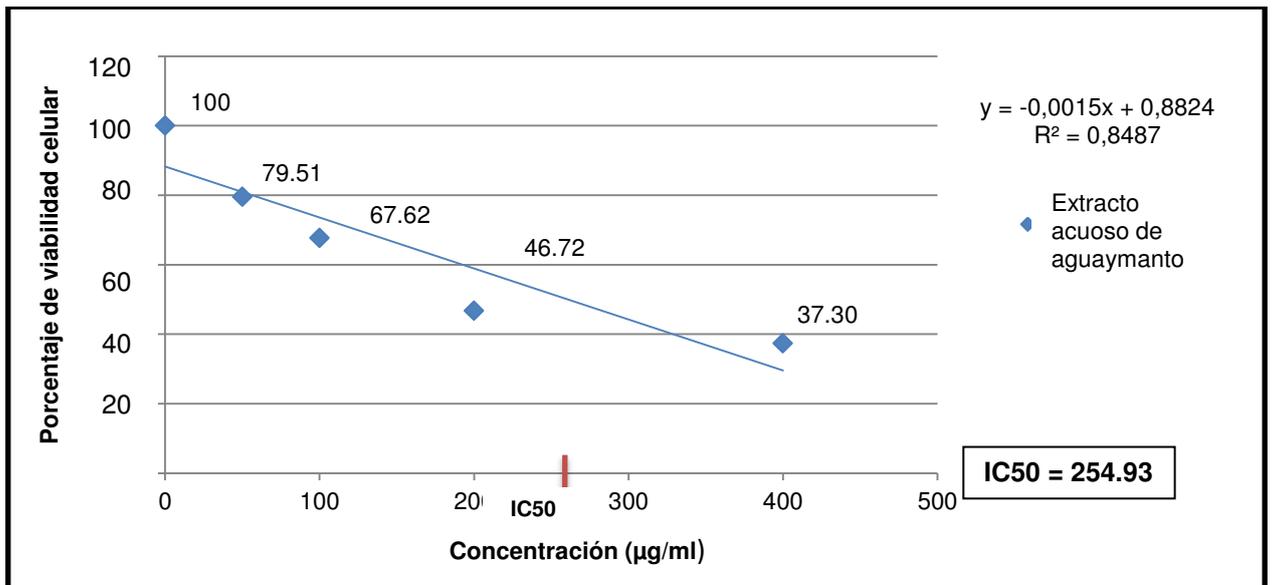
**Figura 26. Curva de crecimiento del promedio de los linfocitos sometidos a los tratamientos en el ensayo MTT.** Se aprecia el comportamiento antiproliferativo del cisplatino (línea roja) y del aguaymanto (línea azul), también se observa que a mayor concentración disminuye el valor de la densidad óptica.

### V.2.3. Concentración Inhibitoria Media (IC50)

Con los datos del porcentaje de viabilidad promedio de la **Tabla 9** se halló la concentración inhibitoria media (IC50) del extracto acuoso de aguaymanto en linfocitos (**Figura 27**), con el programa Microsoft Excel en el que se aplicó el análisis de regresión lineal, con el que se obtiene una fórmula:

$Y = -0.0015X + 0.8824$ ; donde al reemplazar  $Y = 0.5$  se obtiene el valor  $X$  (IC50) que fue de 254.93 µg/ml. Como un dato adicional también se halló el IC50 del cisplatino para los linfocitos y fue de 212.81 µg/ml.

El análisis estadístico nos indicó que existen diferencias significativas entre el porcentaje de viabilidad celular entre las diversas dosis del extracto, del cisplatino y el control negativo (test no paramétrico Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



**Figura 27. Concentración Inhibitoria Media en linfocitos.** Mediante el Análisis de regresión lineal ( $y = ax + b$ ) del extracto acuoso de aguaymanto ( $r^2 = 0.8487$ ) se halló la concentración inhibitoria media (IC50).

### V.3. Evaluación de la viabilidad celular en la línea celular K562

#### V.3.1. Mediante conteo celular con azul de tripano

En la **Tabla 10** se muestra el número de células de la línea K562 de cada cultivo sometido a los diferentes tratamientos (extracto acuoso de aguaymanto, antineoplásico cisplatino y control negativo). El ensayo de viabilidad permitió determinar el porcentaje de células vivas.

**Tabla 10. Conteo celular en los diferentes tratamientos de la Línea K562 (número de células x 10<sup>6</sup>)**

Concentración Repeticiones	Aguaymanto				Sin tratamiento	Cisplatino			
	400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	0 µg/ml	2.5 µg/ml	1.25 µg/ml	0.6 µg/ml	0.3 µg/ml
1	1.96	2.14	2.90	3.86	5.77	2.55	2.89	3.25	3.75
2	1.88	2.10	2.90	3.86	5.99	2.19	2.99	3.68	3.83
3	1.79	2.25	3.58	3.76	5.66	2.33	2.70	3.53	3.80
4	1.84	2.29	3.75	3.69	5.90	2.33	2.87	3.49	3.98
5	1.91	2.47	3.56	3.4	4.80	2.25	2.91	3.66	3.79
6	1.86	2.58	3.63	3.51	5.87	2.18	2.88	3.36	3.99
7	1.90	2.1	3.59	3.54	6.10	2.31	2.74	3.59	3.85
8	1.89	2.6	3.62	3.66	5.30	2.41	2.78	3.61	3.67
9	1.77	2.53	3.77	3.73	6.50	2.19	2.65	3.68	3.71
10	1.82	2.46	3.55	3.68	5.90	2.18	2.58	3.75	3.80
Promedio	1.86	2.35	3.49	3.67	5.78	2.29	2.80	3.56	3.82
Promedio en porcentaje	32.18	40.66	60.38	63.49	100	39.62	48.44	61.59	66.09

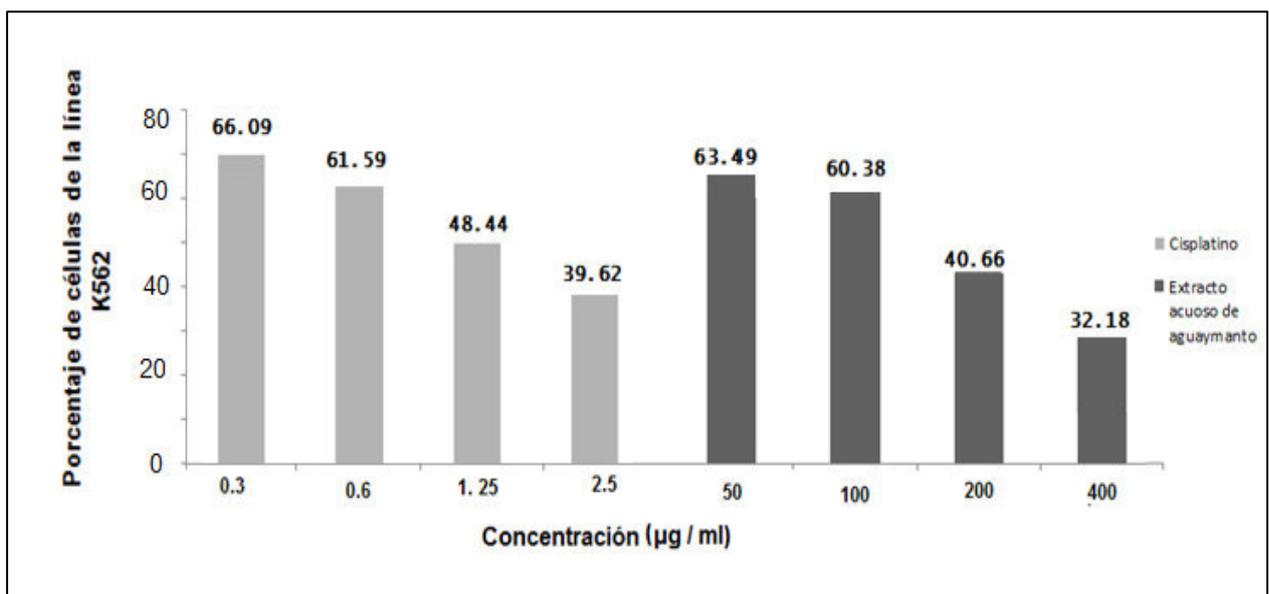
Error estándar de la media,  $p < 0.05$ .

En la **tabla 10** se muestra como varia el promedio del número de células de la línea K562 de acuerdo a la concentración que se utilizó. Se observa que para el extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino, a mayor concentración (400 µg/ml, 2.5 µg/ml respectivamente) disminuyen los linfocitos viables.

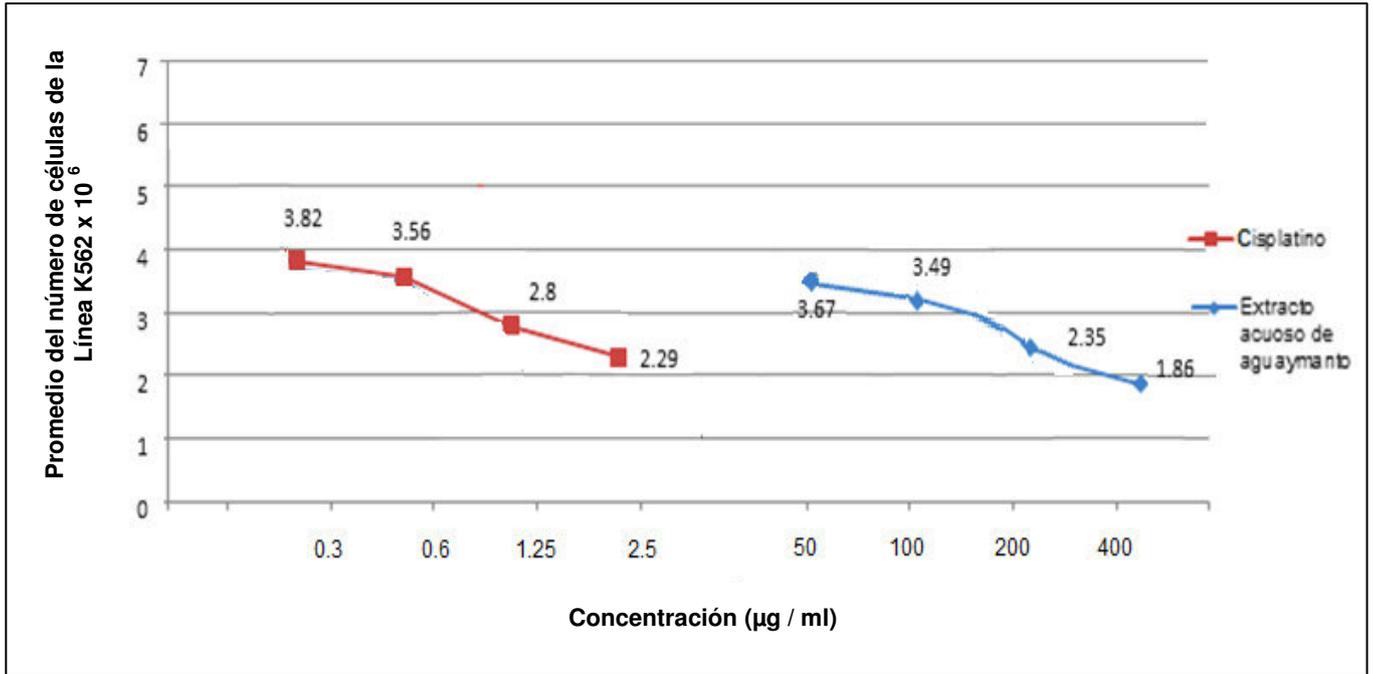
Con los datos de la **Tabla 10** se obtuvo la **Figura 28** donde se observa la variación de la viabilidad de las células de la línea K562 en una curva de crecimiento expresado en porcentajes y en la **Figura 29**, el promedio de las células viables por cada tratamiento, expuestos a las diferentes dosis del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. así como de los controles positivo y negativo.

Para ambas gráficas el extracto acuoso de aguaymanto (50, 100, 200 y 400 µg/ml) y cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml) indujeron antiproliferación, para el aguaymanto a medida que se aumenta la concentración del extracto acuoso el poder inhibitorio aumenta y el valor del promedio del células disminuye, por lo tanto se puede deducir que la viabilidad celular muestra un carácter dosis-dependiente.

Para el aguaymanto la dosis menos antiproliferativa fue de 50  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio de 36.51 % ( $3.67 \times 10^6$  células viables de la línea K562 /ml, viabilidad celular de 63.49 %) y la dosis más antiproliferativa fue de 400  $\mu\text{g/ml}$  que mostró un poder inhibitorio de 67.82 % ( $1.86 \times 10^6$  células viables de la línea K562 /ml, viabilidad celular de 32.18 %). Para el cisplatino la dosis menos antiproliferativa fue 0.3  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio de 33.95 % ( $3.82 \times 10^6$  células viables de la línea K562 /ml, viabilidad celular de 66.09 %) y la dosis más antiproliferativa fue de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio de 39.7 % ( $2.29 \times 10^6$  células viables de la línea K562 /ml, viabilidad celular de 39.66 %).

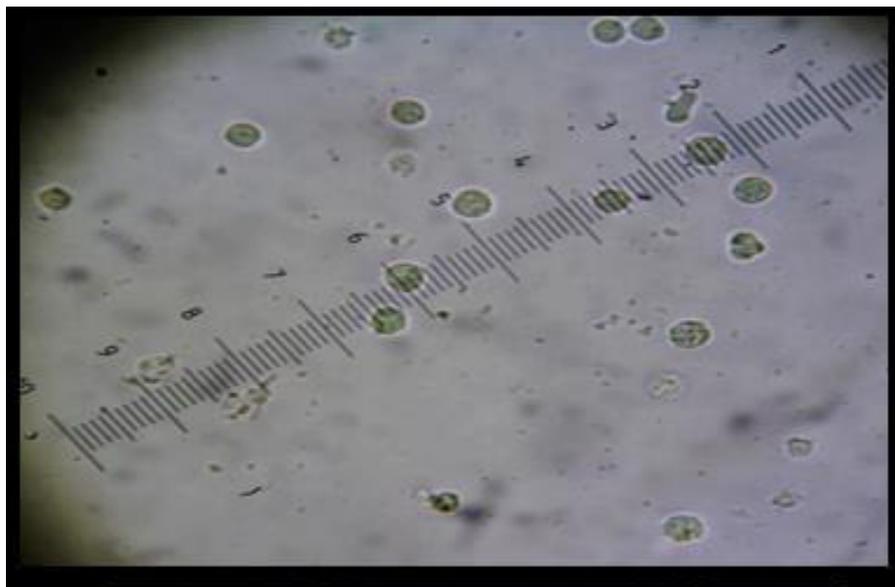


**Figura 28. Viabilidad celular de la línea K562 sometida a los tratamientos.** Las barras representan el promedio del porcentaje de células de la línea K562 de las 10 repeticiones independientes con las diferentes dosis del extracto acuoso de aguaymanto a 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$  y cisplatino a 0.3, 0.6, 1.25 y 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , test no paramétrico Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ .



**Figura 29. Curva de crecimiento del promedio de la línea K562 sometida a los tratamientos.** Figura donde se aprecia el comportamiento antiproliferativo del aguaymanto (línea azul) y del cisplatino (línea roja), también se observa que a mayor concentración disminuye el número de células de la línea K562.

El análisis estadístico nos indicó que existen diferencias significativas entre el porcentaje de células de la línea K562, entre las diversas dosis del extracto, del cisplatino y el control negativo (test no paramétrico Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



**Figura 30. Células de la línea K562 viables.** Línea K562 ( $10^3$  células) resuspendida en 6 ml de medio RPMI-1640 observadas a microscopio invertido con un objetivo de 40X.

### V.3.2. Mediante el ensayo MTT

La viabilidad celular se determinó con la absorbancia obtenida en el Lector de ELISA, los datos medidos se muestran en la **Tabla 11** por cada repetición sometida a esta evaluación con los diferentes tratamientos (extracto acuoso de aguaymanto, antineoplásico cisplatino y control negativo sin tratamiento).

**Tabla 11. Densidad óptica de la Línea K562 en el Ensayo MTT.**

Concentración Repeticiones	Aguaymanto				Sin Tratamiento	Cisplatino			
	400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	0 µg/ml	2.5 µg/ml	1.25 µg/ml	0.6 µg/ml	0.3 µg/ml
1	1.25	1.47	1.66	1.93	2.88	1.44	1.78	1.90	2.30
2	1.23	1.38	1.67	1.86	2.99	1.46	1.70	1.97	2.52
3	1.20	1.46	1.71	1.94	2.88	1.41	1.78	1.93	2.61
4	1.20	1.44	1.79	2.01	2.79	1.70	1.75	1.95	2.59
5	1.19	1.46	1.63	1.99	2.75	1.33	1.68	1.90	2.56
6	1.17	1.44	1.73	2.01	2.97	1.44	1.71	1.94	2.10
7	1.21	1.4	1.71	1.97	2.95	1.45	1.66	1.95	2.13
8	1.24	1.45	1.74	1.95	2.77	1.55	1.79	1.89	2.15
9	1.22	1.46	1.68	1.96	2.81	1.53	1.71	1.97	2.10
10	1.20	1.47	1.69	1.93	2.93	1.49	1.53	1.99	2.47
Promedio de D.O.	1.21	1.44	1.70	1.96	2.87	1.48	1.71	1.94	2.35
Porcentaje de viabilidad celular	42.16	50.17	59.23	68.29	100	51.57	59.58	67.60	81.88

Error estándar de la media,  $p < 0.05$ .

En la **Tabla 11** se muestra como varía el porcentaje de viabilidad obtenido con el lector de ELISA, a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino. Cuando hay un valor mayor hay mayor viabilidad celular, la misma que va disminuyendo a medida que aumenta la concentración en los tratamientos. Se realizó un análisis estadístico del Error estándar de la media entre las 10 repeticiones a un nivel del 5 %,  $p < 0.05$  y mostró que no hay diferencias significativas, por lo cual se pudo obtener datos promedio.

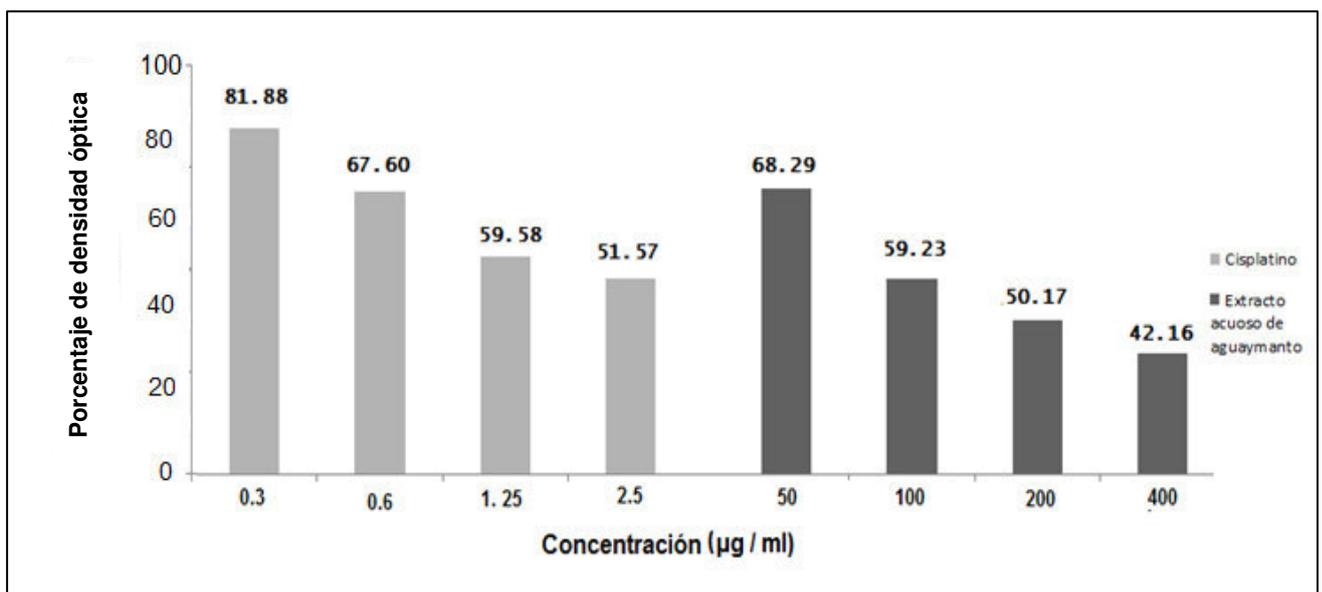
En la **Figura 31** se observa el porcentaje de los valores de D.O. de las 10 repeticiones representada de forma esquemática en barras para el extracto acuoso de aguaymanto (50, 100, 200 y 400 µg/ml) y para el cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml). Se puede observar que el aguaymanto induce un efecto antiproliferativo en la línea

K562 por ello a medida que se aumenta la concentración del extracto acuoso el poder inhibitorio aumenta y el valor de D.O. disminuye.

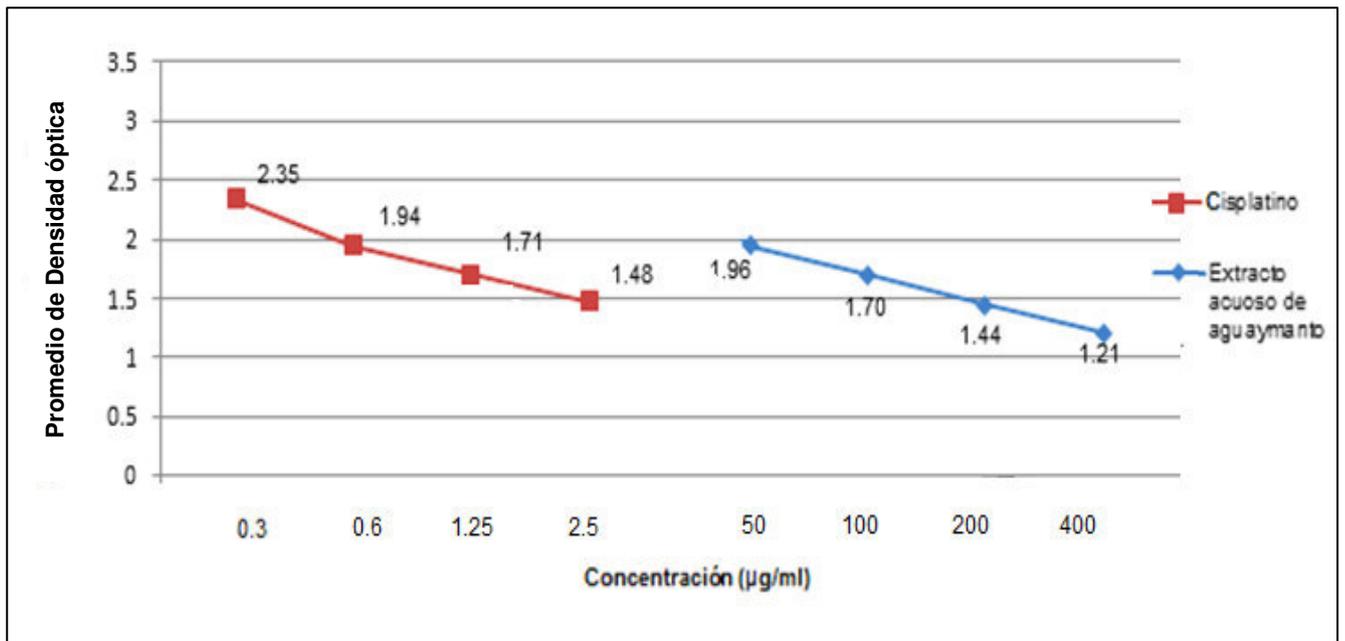
En la **Figura 32** se observa el promedio de los valores de D.O. de las 10 repeticiones representada en una curva de crecimiento. Los valores de D.O. que nos representan la viabilidad celular mostraron un carácter dosis-dependiente de acuerdo a la concentración del extracto a la cual se sometieron las células de la línea K562.

Considerando el estudio de aguaymanto, la dosis menos antiproliferativa fue de 50  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio de 31.71 % (1.96, viabilidad celular de 68.29 %) y la dosis más antiproliferativa fue de 400  $\mu\text{g/ml}$  que mostró un poder inhibitorio de 57.84 % (1.21, viabilidad celular de 42.16 %) como se aprecia en las **Figuras 31 y 32**.

Para el cisplatino la dosis menos antiproliferativa fue de 0.3  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio de 18.12 % (2.35, viabilidad celular de 81.88 %) y la dosis más antiproliferativa fue de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  con un poder inhibitorio de 48.43 (1.48, viabilidad celular de 51.57 %) en el Ensayo MTT.



**Figura 31. Viabilidad celular de la línea K562 sometida a los tratamientos en el ensayo MTT.** Las barras muestran el nivel de densidad óptica (D.O.) promedio a 490 nm medida por el lector de ELISA y que nos representan la viabilidad celular de las células de la línea K562 de las 10 repeticiones con las diferentes dosis de extracto acuoso de aguaymanto (50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/ml}$ ) y cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ), test no paramétrico Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ .



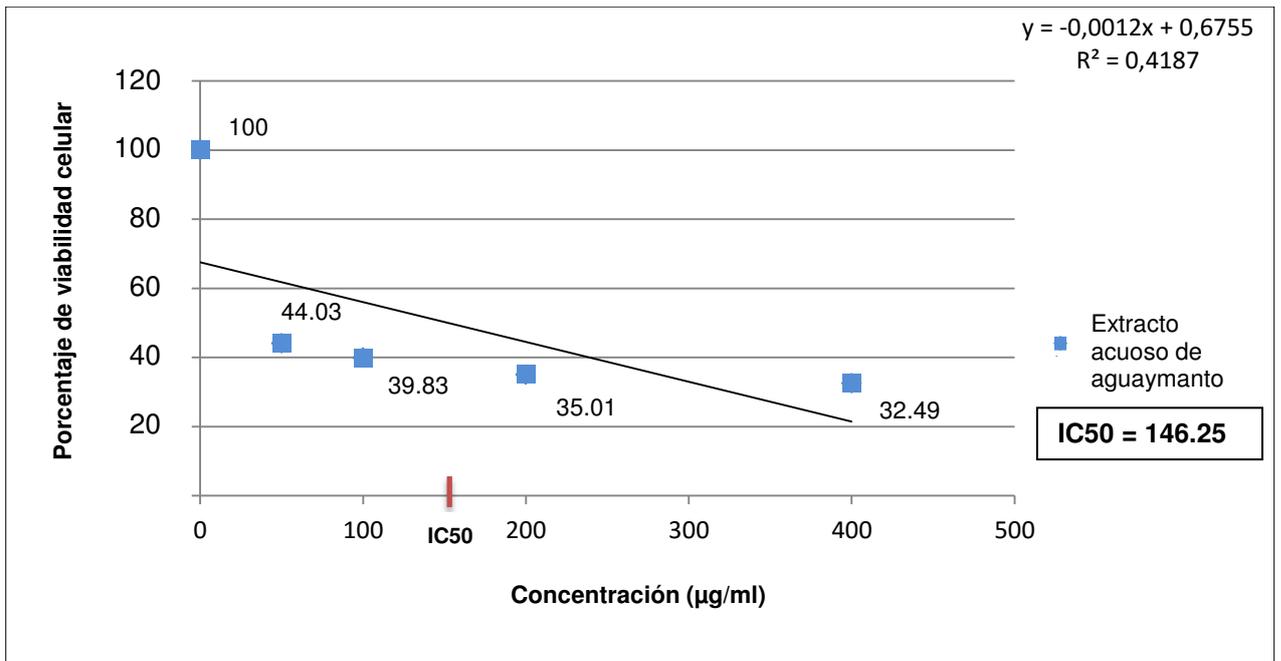
**Figura 32. Curva de crecimiento del promedio de la línea K562 sometida a los tratamientos en el ensayo MTT.** Se aprecia el comportamiento antiproliferativo del aguaymanto (línea roja) y del cisplatino (línea roja), también se observa que a mayor concentración disminuye el valor de la densidad óptica.

### V.3.3. Concentración Inhibitoria Media

Con los datos de la **Tabla 11** se halló la concentración inhibitoria media (IC50) del extracto acuoso de aguaymanto en la línea K562 (**Figura 33**). Con el programa Microsoft Excel se aplicó el análisis de regresión lineal y se obtuvo la siguiente fórmula:

$Y = -0.0012X + 0.6755$ , donde al reemplazar  $Y = 0.5$  se obtiene el valor  $X$  (IC50) que fue de 146.25 µg/ml. Como un dato adicional también se halló el IC50 del cisplatino para la línea K562 y fue de 347 µg/ml.

El análisis estadístico nos indicó que existen diferencias significativas entre el porcentaje de viabilidad celular entre las diversas dosis del extracto, del cisplatino y el control negativo (test no paramétrico Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ).



**Figura 33. Concentración inhibitoria media en la línea K562.** Mediante el Análisis de regresión lineal ( $y = ax + b$ ) del extracto acuoso de aguaymanto ( $r^2 = 0.4187$ ) se halló la concentración inhibitoria media (IC50).

#### V.4. Índice de selectividad.

Finalmente, se halló el Índice de Selectividad (IS) del aguaymanto en la línea tumoral, siendo mayor a 1 cuando el efecto antiproliferativo para las células tumorales supera al efecto en las células normales, menor a 1 cuando el efecto antiproliferativo para las células normales supera al efecto en células tumorales. La concentración inhibitoria media (IC50) de los linfocitos fue de 254.93 µg/ml (**Figura 27**) y de la línea K562 fue de 146.25 µg/ml (**Figura 33**), el resultado de la división de estos parámetros fue el **IS** (1.74); lo que nos indica que el extracto acuoso de aguaymanto presenta un efecto antiproliferativo superior en células tumorales humanas de leucemia que en linfocitos humanos. También se halló el **IS** del cisplatino y fue de 0.61. Para este análisis, se utilizó Microsoft Office Excel 2010.

## VI. DISCUSIÓN

Los productos de la medicina natural, siempre han sido fuente de diversos agentes terapéuticos para tratamientos de muchas enfermedades, ya que en su mayoría poseen propiedades quimioterapéuticas, antibióticas, antipiréticas, inmunomoduladoras, antifúngicas, etc (Perry, 1980; Zavala *et al.*, 2006; Osorio, 2009). Estos recursos naturales han jugado un papel importante en la obtención de fármacos quimioterapéuticos derivados principalmente a partir de plantas superiores (Newman *et al.*, 2000; Laza *et al.*, 2003).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto antiproliferativo de los extractos acuosos a partir del fruto de aguaymanto sobre linfocitos humanos y células derivadas de un paciente que padecía leucemia mieloide crónica (línea K562). Además se utilizó como control positivo un antineoplásico muy utilizado en los hospitales, el cisplatino que en todo momento fue un patrón de comparación de los efectos nocivos que puede tener un fármaco sobre células no cancerígenas.

### **VI.1. Viabilidad celular de linfocitos sometidos a extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. evaluada mediante conteo celular y ensayo MTT**

Para evaluar la viabilidad celular se utilizó la técnica de conteo celular con azul de tripano, metodología muy utilizada en la literatura (Sanabria *et al.*, 1997 y Strober, 2001). Según los resultados obtenidos se determinó que los linfocitos fueron los menos sensibles a las cuatro concentraciones del extracto de aguaymanto comparados con la línea K562. Para la dosis menor del extracto de aguaymanto (50 µg/ml) los resultados de viabilidad celular fueron los valores más altos (4.47 x 10<sup>6</sup> y 78.56 %) considerando el promedio y el porcentaje de linfocitos respectivamente, y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (400 µg/ml) los valores menores (2.07 x 10<sup>6</sup> y 36.38 %). Los linfocitos mostraron un resultado similar con el ensayo MTT (Denizot y Lang, 1986) donde la viabilidad celular fue calculada en datos de densidad óptica (490 nm), para la dosis menor del extracto de aguaymanto (50 µg/ml) los resultados de densidad óptica fueron los valores más altos (1.94 y 79.51 %) considerando el promedio y el porcentaje de D.O. respectivamente, y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (400 µg/ml) los valores menores (0.91 y 37.30 %).

Comparando la viabilidad celular en ambas pruebas se observa que el comportamiento es correlacional debido a que disminuye la viabilidad celular cuando se aumenta la concentración del extracto lo que indica que ambos ensayos son válidos para evaluar el carácter antiproliferativo de cualquier sustancia.

Estos hallazgos coinciden con Areiza–Mazo *et al.*, 2013 quienes trabajaron con extracto acuoso de fruto de aguaymanto, sus resultados mostraron que el efecto antiproliferativo se incrementó en forma dependiente de la dosis del extracto (25–400 µg/ml). En el estudio de células no transformadas (epitelio de riñón) los resultados obtenidos por conteo celular en porcentajes fueron de 100 % (25 µg/ml), 90 % (50 µg/ml), 85 % (100 µg/ml), 60% (200 µg/ml) y 50 % (400 µg/ml). Los resultados obtenidos por el ensayo MTT también mostraron comportamientos similares, la D.O. (540 nm) varió para las dosis de 25-400 µg/ml en un rango de 0.75 y 0.2, disminuyendo el valor de la D.O. cuando se aumentó la concentración del extracto. Al igual que en nuestros resultados el efecto antiproliferativo es dosis-dependiente a la concentración del extracto, otra concordancia con nuestro estudio es que los grados de mayor efecto antiproliferativo fueron las concentraciones de 200 y 400 µg/ml y que mostraron los valores más bajos de viabilidad celular y D.O. en el conteo celular (36.38 % y 46.92 %) y en el ensayo MTT (0.91 y 1.14) respectivamente.

En otro estudio realizado por Quispe-Mauricio *et al.*, 2009 con extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto se obtuvieron por conteo celular resultados en porcentajes de viabilidad celular en células no transformadas (epitelio de riñón), y fueron de -8 % (62.5 µg/ml), 43 % (15.63 µg/ml), 85 % (3.91 µg/ml) y 98 % (0.98 µg/ml). Aunque a diferencia de nuestro trabajo la referencia mencionada expresa un dato de viabilidad celular con valor negativo (debido a que contabilizan como negativo la mortandad celular) también describe un comportamiento dosis-dependiente del efecto antiproliferativo del aguaymanto con respecto a la concentración al igual que en nuestros resultados.

En un estudio adicional con aguaymanto realizado por Zavala *et al.*, 2006 con extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto, se evaluó el efecto antiproliferativo sobre células no transformadas (fibroblastos), y los resultados de la viabilidad celular en porcentaje fueron de -27 % (125 µg/ml), -13 % (31.3 µg/ml), 26 % (7.8 µg/ml), 79 % (2 µg/ml), 142 % (0.5 µg/ml). Esto nos indica también un comportamiento dosis-dependiente del efecto antiproliferativo con respecto a la concentración al igual que en nuestros resultados.

## **VI.2. Efectos en la viabilidad celular de linfocitos sometidos a extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino**

Para corroborar los resultados del experimento se utilizó como control positivo el antineoplásico cisplatino. Para la dosis menor del cisplatino (0.3 µg/ml) los resultados de viabilidad celular fueron los valores más altos ( $3.07 \times 10^6$  y 53.95 %) considerando el promedio y el porcentaje de linfocitos respectivamente, y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (2.5 µg/ml) los valores menores ( $1.27 \times 10^6$  y 22.32 %). Asimismo las diluciones de cisplatino mostraron un resultado similar en el ensayo MTT donde la viabilidad celular fue calculada en datos de densidad óptica (490 nm), para la dosis menor del cisplatino (0.3 µg/ml) los resultados de densidad óptica fueron los valores más altos (1.76 y 72.13 %) considerando el promedio y el porcentaje de D.O. respectivamente, y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (2.5 µg/ml) los valores menores (0.73 y 29.92 %).

Estos hallazgos coinciden con Quispe-Mauricio *et al.*, 2009 que además de trabajar con aguaymanto utilizó como control positivo el antineoplásico cisplatino, sus resultados mostraron que el efecto antiproliferativo del cisplatino se incrementó en forma dependiente de la concentración (0.04-2.5 µg/ml). En el estudio de células no transformadas (epitelio de riñón) sometidas al cisplatino, los resultados obtenidos por conteo celular en porcentaje fueron de 110 % (0.04 µg/ml), 95 % (0.16 µg/ml), 70 % (0.63 µg/ml) y 20 % (2.5 µg/ml). Al igual que en nuestros resultados el efecto antiproliferativo fue dosis-dependiente a la concentración, otra concordancia con nuestro estudio es que el grado de mayor efecto antiproliferativo fue de 2.5 µg/ml y que en nuestro trabajo mostró el valor más bajo de viabilidad celular en el conteo celular (22.32 %).

Estos resultados también concuerdan con los reportados por Zavala *et al.*, en el 2006 y Areiza-Mazo *et al.*, 2013 que trabajaron con células no cancerígenas y líneas de cáncer. En ambas investigaciones los controles positivos fueron antineoplásicos muy usados en el tratamiento contra el cáncer, al igual que en la presente investigación sus resultados indican que el antineoplásico cisplatino inhibió las células a medida que se aumentaba la concentración y que indujo mayor efecto en células no cancerígenas comparadas con las líneas de cáncer.

### **VI.3. Viabilidad celular de la línea K562 sometida a extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. evaluada mediante conteo celular y ensayo MTT**

Según los resultados obtenidos se determinó que la línea K562 fue la más sensible a las cuatro concentraciones de los extractos de aguaymanto comparada con los linfocitos. Para la dosis menor del extracto de aguaymanto (50 µg/ml) los resultados de viabilidad celular fueron los valores más altos ( $3.67 \times 10^6$  y 63.49 %) considerando el promedio y el porcentaje de células de la línea K562 respectivamente, y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (400 µg/ml) los valores menores ( $1.86 \times 10^6$  y 32.18 %).

La línea K562 mostró un resultado similar con el ensayo MTT donde la viabilidad celular fue calculada en datos de densidad óptica (490 nm), para la dosis menor del extracto de aguaymanto (50 µg/ml) los resultados de densidad óptica fueron los valores más altos (1.96 y 68.29 %) considerando el promedio y el porcentaje de D.O. respectivamente, y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (400 µg/ml) los valores menores (1.21 y 42.16%).

Comparando la viabilidad celular en ambas pruebas se observa que el comportamiento es correlacional debido a que disminuye la viabilidad celular cuando se aumenta la concentración del extracto lo que indica que ambos ensayos son válidos para evaluar el carácter antiproliferativo de cualquier sustancia.

Estos hallazgos coinciden con Areiza–Mazo *et al.*, 2013 quienes trabajaron con extracto acuoso de aguaymanto, sus resultados mostraron que el efecto antiproliferativo se incrementó en forma dependiente de la dosis del extracto (25–400 µg/ml). En el estudio de células cancerígenas (cáncer de colon) los resultados obtenidos por conteo celular en porcentaje fueron de 41 % (400 µg/ml), 51 % (200 µg/ml), 62.5 % (100 µg/ml), 86 % (50 µg/ml) y 95 % (25 µg/ml). Los resultados obtenidos por el ensayo MTT también mostraron comportamientos similares, la D.O. (540 nm) varió para las dosis de 25-400 µg/ml en un rango de 1.2 y 0.25, disminuyendo el valor de la D.O. cuando se aumentó la concentración del extracto. Al igual que en nuestros resultados el efecto antiproliferativo es dosis-dependiente a la concentración del extracto, otra concordancia con nuestro estudio es que los grados de mayor efecto antiproliferativo fueron las concentraciones de 200 y 400 µg/ml y que

mostraron los valores más bajos de viabilidad celular y D.O. en el conteo celular (40.66 % y 32.18 % respectivamente) y en el ensayo MTT (1.44 y 1.21 respectivamente).

En otro estudio realizado por Quispe-Mauricio *et al.*, 2009 con extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto se obtuvieron por conteo celular resultados en porcentajes de viabilidad celular en células cancerígenas de leucemia mieloide crónica (línea K562), de 41.3 % (0.98 µg/ml), 3 % (3.91 µg/ml), 1 % (15.63 µg/ml), -24.6 % (62.5 µg/ml). Aunque a diferencia de nuestro trabajo la referencia mencionada expresa un dato de viabilidad celular con valor negativo (debido a que contabilizan como negativo la mortandad celular) también describe un comportamiento dosis-dependiente del efecto antiproliferativo del aguaymanto con respecto a la concentración al igual que en nuestros resultados.

En un estudio adicional con aguaymanto realizado por Zavala *et al.*, 2006 con extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto, se evaluó el efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas de leucemia mieloide crónica (línea K562), y los resultados fueron de 87.36 % (0.5 µg/ml), 47 % (2 µg/ml), 23 % (7.8 µg/ml), -3 % (31.3 µg/ml) y -11.91 % (125 µg/ml). Aunque a diferencia de nuestro trabajo la referencia mencionada expresa datos de viabilidad celular con valor negativo (debido a que contabilizan como negativo la mortandad celular) también describe un comportamiento dosis-dependiente del efecto antiproliferativo del aguaymanto con respecto a la concentración al igual que en nuestros resultados.

#### **VI.4. Efectos en la viabilidad celular de la línea K562 sometida a extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino**

Para la dosis menor del cisplatino (0.3 µg/ml) los resultados de viabilidad celular fueron los valores más altos ( $3.82 \times 10^6$  y 66.09 %) considerando el promedio y el porcentaje de linfocitos respectivamente, y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (2.5 µg/ml) los valores menores ( $2.29 \times 10^6$  y 39.62 %).

Asimismo las diluciones de cisplatino mostraron un resultado similar en el ensayo MTT donde la viabilidad celular fue calculada en datos de densidad óptica (490 nm), para la dosis menor del cisplatino (0.3 µg/ml) los resultados de densidad óptica fueron los valores más altos (2.35 y 81.88 %) considerando el promedio y el porcentaje de D.O. respectivamente, y a medida que se aumentó la concentración los valores de

viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (2.5 µg/ml) los valores menores (1.48 y 51.57 %).

Estos hallazgos coinciden con Quispe-Mauricio *et al.*, 2009 que además de trabajar con aguaymanto utilizó como control positivo el antineoplásico cisplatino, sus resultados mostraron que el efecto antiproliferativo se incrementó en forma dependiente de la dosis de la dilución del fármaco (0.04-2.5 µg/ml). En el estudio de células cancerígenas de leucemia mieloide crónica (línea K562) sometidas al cisplatino, los resultados obtenidos por conteo celular fueron de 78 % (0.04 µg/ml), 58 % (0.16 µg/ml), 10 % (0.63 µg/ml) y -10 % (2.5 µg/ml). Al igual que en nuestros resultados el efecto antiproliferativo fue dosis-dependiente de la concentración del cisplatino, otra concordancia es que el grado de mayor efecto fue de 2.5 µg/ml y que en nuestro trabajo alcanzó un valor de viabilidad de 39.62 %.

Estos resultados también concuerdan con los reportados por Zavala *et al.*, en el 2006 y Areiza-Mazo *et al.*, 2013 que trabajaron con células no cancerígenas y líneas de cáncer. En ambas investigaciones los controles positivos fueron antineoplásicos muy usados en el tratamiento contra el cáncer, al igual que en la presente investigación sus resultados indican que el antineoplásico cisplatino inhibió las células a medida que se aumentaba la concentración y que indujo mayor efecto en células no cancerígenas comparadas con las líneas de leucemia.

Los resultados de las pruebas de viabilidad celular mostraron que los extractos acuosos de aguaymanto inhiben de alguna forma la progresión del ciclo celular, siendo la línea K562, la más sensible a su efecto antiproliferativo, contrariamente para el cisplatino los más sensibles son los linfocitos humanos. Esto explicaría los efectos adversos que mayormente ejerce en las personas que lo consumen, la razón por la que el aguaymanto y el cisplatino han presentado esos efectos podría ser por las diferencias estructurales presentadas en su composición química (Quispe-Mauricio *et al.*, 2009). Estos resultados, evidencian las ventajas y diferencias entre los efectos que puede tener un agente natural (extracto de aguaymanto) comparada con un fármaco sintético (cisplatino) sobre células no cancerígenas (Chiang, 1992b, Isnard-Bagnis *et al.*, 2005, Diaz, 2013). Aunque estas observaciones deben repetirse, los datos preliminares nos permiten especular que el aguaymanto tendría componentes que causarían la detención del ciclo celular, lo cual es muy interesante teniendo en cuenta que las moléculas candidatas a fármacos anticancerígenos deben presentar un bajo índice de efectos adversos en células no transformadas.

## VI.5. Concentración Inhibitoria Media (IC50) e Índice de Selectividad (IS)

En las investigaciones de extractos vegetales se viene utilizando el concepto de IC50 que es la concentración a la cual una sustancia puede inhibir el 50 % de la población celular, con estos valores se puede hallar un parámetro más que es el Índice de selectividad (IS) que nos indica si la sustancia estudiada podría tener una preferencia en efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas (Patel *et al.*, 2009). Debido a que el cisplatino es un fármaco utilizado ampliamente contra diversos tipos de cáncer, resulta necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con propiedades antitumorales que no sean tan nocivos con las células no cancerígenas. Existen diversos estudios que evidencian que *P. peruviana* posee un carácter selectivo hacia células cancerígenas y podría ser una fuente de compuestos bioactivos capaces de inhibir o detener la proliferación celular mediante inducción de apoptosis, esta propiedad podría brindarnos un posible nuevo agente quimioterapéutico y quimiopreventivo para el tratamiento del cáncer humano (Zavala *et al.*, 2006; Quispe-Mauricio *et al.*, 2009; Areiza-Mazo *et al.*, 2013).

Los valores de Concentración Inhibitoria Media (IC50) del extracto acuoso de aguaymanto mostrados en nuestra investigación sobre los linfocitos humanos y en la línea K562 fueron de 254.93 y de 146.25  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. El Índice de selectividad (IS) fue de 1.74 siendo este resultado mayor que 1. Ambos valores concuerdan con los valores descritos previamente por otros autores para los extractos de aguaymanto sobre líneas cancerígenas y sobre células no cancerígenas (Zavala *et al.*, 2006; Areiza-Mazo *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Zavala *et al.* (2006) fueron evaluados los extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto sobre líneas de cáncer de colon y K562, sus resultados mostraron que para células no cancerígenas (fibroblastos de ratón) los extractos de tallos y hojas presentaron IC50 de fueron de 2.67 y 4.59  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente y para las células de la línea K562 fueron de 2.1 y 2.42  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente; al igual que en nuestro estudio el IC50 para la línea K562 fue menor que en células no cancerígenas (linfocitos). Con estos valores los IS (Índice de selectividad) de los extractos de tallos y hojas alcanzaron valores de 1.1 y 2.18 y en nuestros resultados de 1.74 coincidiendo en superar la unidad para ambos casos y en estar dentro del rango de la referencia (Zavala *et al.*, 2006). Como un dato adicional aparte de la línea K562 se evaluó el aguaymanto también en líneas de cáncer de colon en donde los IC50 de extractos de tallos y hojas fueron de 0.84 y 1.93  $\mu\text{g/ml}$

respectivamente y los IS de extractos de tallos y hojas fueron de 1.38 y 5.46 respectivamente mostrando un comportamiento similar a la línea K562.

En un estudio adicional realizado por Areiza-Mazo *et al.*, 2013, fueron evaluados los extractos acuosos del fruto de aguaymanto sobre líneas de cáncer de colon. Sus resultados mostraron que los IC50 de las líneas SW480 y SW620 para los extractos acuosos fueron 44.2 y 85.1  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente y para las células no cancerígenas (epitelio de riñón) el IC50 fue de 514.2  $\mu\text{g/ml}$ ; al igual que en nuestro estudio para la línea K562 los IC50 de los carcinomas fueron menores que los de células no cancerígenas. Con estos valores los IS de los extractos acuosos alcanzaron valores en las líneas SW620 y SW480 de 6 y 11.6 respectivamente y en nuestros resultados de 1.74 coincidiendo en superar la unidad para ambos casos (Areiza-Mazo *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por Quispe-Mauricio *et al.*, 2009 evaluó los extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto en la línea K562, sus resultados mostraron que los valores de IC50 de los extractos de tallos y hojas en la línea K562 fueron de 0.02 y 0.03  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, y los IC50 de los extractos de tallos y hojas en células no cancerígenas (epitelio de riñón) fueron de 4.9 y 6.2  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente; al igual que en nuestro estudio para la línea K562 el IC50 fue mucho menor que en las células no cancerígenas (linfocitos). Con estos valores los IS (Índice de selectividad) de los extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto alcanzaron valores de 206 y 246 respectivamente en la línea K562 y en nuestros resultados de 1.74 coincidiendo en superar la unidad para ambos casos (Quispe-Mauricio *et al.*, 2009).

Los valores de Concentración Inhibitoria Media (IC50) del cisplatino mostrados en nuestra investigación sobre los linfocitos humanos y en la línea K562 fueron de 212.81 y de 347  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. El Índice de selectividad (IS) fue de 0.61 siendo este resultado menor que 1. Ambos valores concuerdan con los valores descritos previamente por otros autores para el cisplatino sobre líneas cancerígenas y sobre células no cancerígenas, ya que al ser menor de la unidad no presenta una selectividad marcada y dañaría por igual o más a células normales comparadas con células de cáncer. Estos resultados coinciden con Zavala *et al.*, 2006 que utilizó el antineoplásico 5-FU contra líneas K562 en sus investigaciones y obtuvo un **IS** de 0.032. Otra investigación nos proporciona un **IS** de 7.3 (Quispe-Mauricio *et al.*, 2009). En todos los casos mencionados el **IS** del control positivo es menor que el del aguaymanto al igual que en nuestro caso.

Esto demuestra, el buen perfil antitumoral de los extractos de aguaymanto, superando ampliamente a los antineoplásicos mencionados, los cuales, forman parte de estudios, manejo y tratamiento de carcinomas en el mercado mundial. Con la prueba Kruskal–Wallis se compararon los resultados de los linfocitos con cada uno de los resultados de la línea K562 para cada tratamiento, los resultados nos indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos (aguaymanto) y el control (cisplatino); en linfocitos y línea K562 (células cancerígenas). Por lo tanto se rechazó la  $H_0$ , el extracto acuoso *Physalis peruviana* L. “aguaymanto” posee efecto antiproliferativo sobre los linfocitos humanos y sobre la línea celular K562 (leucemia mieloide crónica).

Los extractos acuosos del aguaymanto exhibieron un efecto mayor sobre la línea K562 comparado al de los linfocitos humanos, estos resultados son consistentes, con la presencia de sustancias presentes mayormente polares, estos componentes también se evidenciaron en el momento de preparar los extractos para los bioensayos puesto que las fracciones sólidos aisladas mostraron solubilidad en los solventes usados (Zavala *et al.*, 2006).

En resumen los resultados obtenidos en esta investigación y según la literatura son promisorios y resaltan el potencial bioactivo del aguaymanto aportando una nueva confirmación de los compuestos presentes de forma abundante en el fruto. Es necesario continuar estudios sobre los diferentes beneficios y propiedades antitumorales de *Physalis peruviana* L. a fin de aislar sus principales componentes (physalinas, witanóidos, fenoles, etc.) y evaluarlos en otras líneas tumorales, como una fuente potencial con aplicación quimiopreventiva y quimioprotectora en cáncer humano (Areiza-Mazo *et al.*, 2013).

## VII. CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. presenta efecto antiproliferativo dosis-dependiente, siendo las concentraciones 200 y 400 µg/ml las que presentaron mayor efecto en linfocitos y en la línea K562.
2. Las concentraciones del cisplatino con mayor efecto antiproliferativo fueron 1.25 y 2.5 µg/ml en la línea K562 y en linfocitos humanos.
3. *Physalis peruviana* L. induce menor efecto antiproliferativo que el cisplatino en linfocitos y mayor efecto que el cisplatino en línea K562.
4. El extracto de *Physalis peruviana* L. presenta selectividad hacia células cancerígenas de la línea K562.
5. Los ensayos de conteo celular con azul de tripano y MTT son válidos para evaluar el carácter antiproliferativo de extractos vegetales.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Continuar investigaciones con más tipos de líneas cancerígenas y con diferentes tipos de extractos del fruto del aguaymanto como etanólico, metanólico, hidroalcohólico, etc.
- Realizar estudios con mayor número de muestra de personas donantes de linfocitos de sangre periférica para robustecer el soporte estadístico.
- Aislar los principales componentes de *P. peruviana* L. (physalinas, witanólidos, fenoles, etc.) y evaluarlos en líneas tumorales.
- Ampliar el estudio del efecto de *Physalis peruviana* L., a diferentes dosis y extractos en el rango estudiado.
- Los datos obtenidos por conteo en cámara de Neubauer y el contador automatizado no presentan diferencias significativas, así que se recomienda usarlo solamente por la rapidez de resultados.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmad S, Malik A, Afza N, Yasmin R. A New Withanolide Glycoside from *Physalis peruviana*. J Nat Prod. 1999; 62(3):493-4.
2. Ahmed SA, Gogal RM Jr y Walsh JE A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. J ImmunolMetho, 1994; 170,211–224.
3. Alvarado, A., Mendoza, L. Posibles efectos citotóxicos de sustancias aisladas de diferentes especies vegetales colombianas. Tesis de grado para optar al título de Microbióloga industrial. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología Industrial; 2002.
4. Amiel D, Amiel J. Metodologías utilizadas en la investigación de plantas antitumorales: Descripción y comentarios. Científica. 2013; 4 (5): 19-25. Disponible en: <<https://issuu.com/bibliotecacientifica/docs/cientifica-v4n5>>. [Acceso 17/02/2014].
5. Andrighetti-Fröhner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CR, Simões CM. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98 (6):843-8.
6. Angel, A. C. Estudio fitoquímico preliminar, toxicidad y determinación de la actividad antitumor de extractos etanólicos de *Cucumis dipsaceus*. Tesis de grado para optar al título de Química farmacéutica. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química Farmacéutica; 1999.
7. Angulo, R. Uchuva: el cultivo. Bogotá: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Centro de Investigaciones y Asesoría Agroindustriales, 2005; 78 p.
8. Aparcana Ataurima, Isabel Mercedes y Villarreal Inca, Leydi Steffani. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto” de diferentes lugares geográficos del Perú. [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Bertha Jurado Teixeira. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y bioquímica; 2014.
9. Areiza-Mazo N, Maldonado ME, Rojano B. Aqueous extract of golden berry (*Physalis peruviana*): antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities. Perspectivas en Nutrición Humana. junio de 2013; 15(1):41-55.

10. Arencibia D, Rosario L, Curveco D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología en línea*. 2003; 49-52.
11. Aristizábal Montoya, Ana María. Percepción del paciente oncológico sobre su calidad de vida y apoyo social en el "Hospital Santa Rosa". [Tesis Título de Especialista en Alimentación y Nutrición]. Ana María Restrepo Duque. Antioquia: Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ingenierías Especialización en Alimentación y Nutrición. 2013.
12. Arun M, Asha V. Preliminary studies on antihepatotoxic effect of *Physalis peruviana* Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats. *J Ethno pharmacol*. 2007, 111 (1):110-4.
13. American Type Culture Collection (ATCC), Estados Unidos: The essentials of life science research. [Actualizada en 2015]; [acceso 16 junio 2015]. Disponible en: <<http://www.atcc.org/en/Products/Collections/CellBiologyCollections.aspx>>.
14. Asociación Argentina de Bancos de Tejido, Argentina. [Actualizada en 2015]; [acceso 15 octubre del 2015]. Disponible en: <[http://www.fundacionfavaloro.org/banco\\_homoinjertos.html](http://www.fundacionfavaloro.org/banco_homoinjertos.html)>.
15. Asociación Banco Argentino de Células (ABAC), Argentina. [Actualizada en 2015]; [acceso 15 octubre del 2015]. Disponible en: <<http://www.abac.org.ar/>>.
16. Auroma O. *Phytochemicals and Phythopharmaceuticals*. 2da ed. Champaign, Illinois: AOCS; 1999. Chapter 4, Conceptualization of the Pro oxidant and Antioxidant Actions of Plant Food Chemicals; 32-46.
17. Bailey Lh. *Manual of Cultivated Plants*. Macmillan, New York; 1977, pp. 871.
18. Barbosa H de J, Guerrero CA, Arias D. Aplicación de una metodología. *Rev colomb ciencias quim farm*. diciembre de 1995;(24):12-8.
19. Bermudez, A; Oliveira-Miranda, M. y Velazquez, D. La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INCI*. 2005; 30 (8):453-459.
20. Bernal H, Correa J. *Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello* [Internet]. Bogotá. Editora Guadalupe Ltda. 1998 [consultado 24 de julio 2014]. 441 p. Disponible en:

<[http://books.google.com.pe/books/about/Especies vegetales promisorias de los pa.html?id=jFRgAAAAMAAJ&redir\\_esc=y](http://books.google.com.pe/books/about/Especies_vegetales_promisorias_de_los_pa.html?id=jFRgAAAAMAAJ&redir_esc=y)>.

21. Bucay Moroch, Luis Carlos. Estudio Farmacognóstico y actividad antimicrobiana de la Violetilla (*Hybanthus parviflorus*). Tesis doctoral para optar al título de doctor en Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador, 2009.
22. Caicedo A, Andrés M. Estudio de la cadena productiva de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra norte del Ecuador. 2010 [citado 16 de diciembre del 2014]. Disponible en: <<http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/950>>. Acceso 16/12/14.
23. Calvo Villegas, Ivam. EL CULTIVO DE LA UCHUVA (*Physalis peruviana*). San José, Costa Rica, 2009. Acceso: <<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00170.pdf>>.
24. Campos J, Bobadilla D, Huamán M, Bazán M. Effect of *Physalis peruviana* «tomatillo» fruit extract in *Mus musculus* var. swis with induced hyperlipidemi. *Scientia Agropecuaria*. 2011; 2(2):83-89.
25. Castillo E, Guevara-Fujita ML, Fujita R. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis. *Rev peru biol*. 26 de agosto de 2011; 18(2):261-3.
26. Castro AM, Rodríguez L, Vargas EM. Secado de uchuva *Physalis peruviana* L.) por aire caliente con pretratamiento de osmodeshidratación. 2008 [citado 16 de diciembre del 2014]. Disponible en: <<http://148.215.2.11/resumen.oa?id=169815391004>>. Acceso 16/12/14.
27. Castro Díaz, Sandra Liliana. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. [Trabajo de grado para optar por el Título de Ingeniería Industrial]. Tellez Alfonso Alba Nohemi. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias; 2006.
28. Cedeño, M. Montenegro, D. Plan Exportador, Logístico y de Comercialización de Uchuva al Mercado de Estados Unidos Para Frutexpo S.C.I. LTDA. [Trabajo de grado para optar al Título de Bióloga], Chavarro Leonardo. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ingeniería; 2004.

29. Chiang H C, SMJ. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. *Anticancerresearch*. 1992 a; 12(4):1155-62.
30. Chiang H C, SMJ. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer research*. 1992b; 12(3):837-43.
31. Colombia el Instituto Nacional de Cancerología. Colombia: 2015. [Actualizada en 2015]; [acceso 15 octubre del 2015]. Disponible en: <http://www.incan.salud.gob.mx/>.
32. Cordell GA. Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 2000; 55 (6): 463-80.
33. Cordero C, Aristizábal F. Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2002a; 4 (1): 100-106.
34. Cordero, C., Aristizabal, F. Implementación de un método in vitro de evaluación preliminar de actividad anticáncer de extractos vegetales empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Trabajo de grado. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias; 2002b.
35. Corrales, I., Reyes J., González R. Plantas medicinales de interés estomatológico. *Revista 16 de Abril* 2014. 2014; 53(256): 79-98.
36. Cortez V., Macedo-Ceja J., Hernández M., Arteaga G., Espinosa D., Rodríguez L. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Rev Biomed*. 2004; 15 (2):123-136.
37. Cortés-Funes, H. El médico ante las enfermedades mortales: el caso del cáncer. *Educ. méd*. 2006; 9(1):32-38.
38. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 1997; 60: 52-60.
39. Cragg GM, Newman DJ. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *CancerInvest*. 1999; 17(2):153-63.
40. Demir T, Ozen M, Hames-Kocabas. Antioxidant and Cytotoxic Activity of *Physalis peruviana* Medicinal Plant Research. 2014, 4 (3):30-34.

41. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 89(2):271-7.
42. Díaz Ledesma, Carmen Rosa. Percepción del paciente oncológico sobre su calidad de vida y apoyo social en el "Hospital Santa Rosa". [Tesis Título de Especialista en Enfermería en Salud Pública]. Juana Elena Durand Barreto. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina; 2013.
43. Dinan LN, Sarker SD, Šik V. 28-Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*. 1997; 44(3):509-12.
44. Elliger CA, Eash JA, Waiss ACJ. Kaempferol and quercetin di- and triglycosides from *Physalis peruviana* leaves. (en línea). *Biochemical Systematics and Ecology (United Kingdom)*. 1992 [Citado 16 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9405796>>. Acceso 16/12/14.
45. El Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), Colombia: 2015. [Actualizada en 2015]; [acceso 15 octubre del 2015]. Disponible en: <http://ciquibic.fcq.unc.edu.ar/>>.
46. Escalona Arranz, Julio César. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias de la Salud. República de Cuba. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales. Departamento de Farmacia, 2011.
47. European Collection of Cell Cultures (ECACC), United Kingdom. [Actualizada en 2015]; [acceso 15 octubre del 2015]. Disponible en: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx>>.
48. Erkaya, T., Dagdemir, E., & Şengül, M. Influence of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) addition on the chemical and sensory characteristics and mineral concentrations of ice cream. *Food Research International*. 2012; 45(1), 331-335.
49. Fang, S. The new withanolides from *Physalis peruviana*. *Steroids*. ed. 1-2, v. 77, p. 36-44, 2011. Disponible en: <http://www.mycocchem.cn/Article/UploadFiles/201202/2012020313493525.pdf>. Acceso 16/10/14.

50. Farnsworth N, Akerele O, Bingel A, Soejarto D, Guo Z. Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organ. 1985; 63(6):965-81.
51. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. Int J Cancer. 2010; 127(12):2893-917.
52. Ferrari, M., Fornasiero, M.C & Isetta, A.M. MTT colorimetric assays for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. Journal of Immunological Methods. 1990. 131 (2): 165-172.
53. Fischer, G., Ebert, G. and Lüdders, P. Provitamin a carotenoids, organic acids and ascorbic acid content of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) Ecotypes grown at two tropical altitudes. Acta Hortic. 2000; 531: 263-268.
54. Fischer G, Almanza-Merchán P y Miranda D. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Brasileira de Fruticultura. 2014; 36(1):01-15.
55. Flórez, V. J., G. Fischer y A. Sora. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Universidad Nacional de Colombia, Fac. de Agronomía, Bogotá. 2000. p. 176.
56. Freshney, I. "Culture of animals cells: a Manual of basic Technique". 4° edición. John Wiley and Sons Inc. 2000. 329-343.
57. Fricker SP, Buckley RG. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity end point for an *in vitro* screen for antitumor agents. Anticancer Res. 1996; 16 (6B):3755-60.
58. Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Colombia. [Actualizada en 2015]; [acceso 15 octubre del 2015]. Disponible en: <<http://www.fidic.org.co/pagina/index.html>>.
59. Gonzales, G; Valerio, L. Medicinal plants from Peru: A review of Plants as potencial agents against cancer. Anticancer Agents Med. Chem. 2006; 6(5):429-44.
60. Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. J Ethnopharmacol 2000; 73: 347-377.

61. Gottesman M, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62:385-427.
62. Hamburger M, Hostettmann K. Phytochemistry bioactive in plants. The link between phytochemistry & medicine. *Phytochemistry.* 1991; 30: 3864-3867.
63. Hartwell, J. Plants used against cancer. *Lloydia.* 1971; 34(4):386-425.
64. Hassanien MFR. *Physalis peruviana*: A Rich Source of Bioactive Phytochemicals for Functional Foods and Pharmaceuticals. *Food Reviews International.* 2011; 27(3):259-73.
65. Hernández, R.; Gally, M. Uso y dosificación de las 184 plantas más usadas en américa latina. 1ed. México: Árbol Editorial, S.A. de C.V., 1981 [Citado 21 de febrero del 2015] Disponible en <https://books.google.com.pe/books?id=PwwTU-CE6mIC&pg=PA258&lpq=PA258&dq=Uso+y+dosificaci%C3%B3n+de+las+184+plantas+m%C3%A1s+usadas+en+am%C3%A9rica+latina+Rafael+Hern%C3%A1ndez&source=bl&ots=5xRKIPELmA&sig=Hqi5PHSusCZoTOLkP6FxxShHE5w&hl=es-419&sa=X&ved=0CCQQ6AEwAmoVChMI1Jloq2HyAIVSVweCh2U6Ar6#v=onepage&q&f=false>. ISBN. 968-461-005-X>.
66. Huang P, Oliff A. Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: 343-348.
67. Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Estados Unidos. [Actualizada en 2015]; [acceso 15 octubre del 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol>>.
68. Ismail N, Alam M. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia.* 2001; 72(6):676-9.
69. Isnard-Bagnis C, Moulin B, Launay-Vacher V, Izzedine H, Tostivint I, Deray G. Anticancer drug-induced nephrotoxicity. *Nephrol Ther.* 2005; 1(2):101-14.
70. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2010; 60(5):277-300.
71. Johnson, R. Screening methods in antineoplastic drug discovery. *J. Nat Cancer Inst.* 1990. 82(13): 1082- 1083.

72. Koeffler H, Golde D. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980; 56 (3): 344-350.
73. Laza D, Rodríguez I, Sardina G. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev Cubana PlantMed*. 2003 [citado el 12 de noviembre de 2014.]; 8(3). Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962003000300012&script=sci\\_arttext&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962003000300012&script=sci_arttext&lng=es)>. Acceso 15/03/15.
74. Legge, A. Notes on the history, cultivation and uses of *Physalis peruviana* L. *Journal of the Royal Horticultural Society*, 1974; 99(7), 310–314.
75. León C, Gómez S, Morantes S, Cordero C, Ancízar F. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro. *Biomédica* 2006; 26:161-8.
76. Lieberman, M., Patterson, G., Moore, R. *In vitro* bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Lett*. 2001; 173 (1): 21-29.
77. Ling YH, Priebe W, Perez-Soler R. Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Res*. 1993; 53(8):1845-52.
78. Lozzio B, Lozzio B. A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1981; 166(4):546-50.
79. Maiso P. Evaluación de la respuesta antiproliferativa en cáncer colorrectal del oxaliplatino en monoterapia y en combinación. Trabajo fin de Máster, Máster Investigación en Ciencias de la Salud, Curso 2011-2012. Pamplona, 2012.
80. Madriñan Palomino, Carlos Eduardo. Caracterización morfológica de accesiones de *Physalis peruviana* L. del banco de germoplasma de la universidad nacional de Colombia sede Palmira. [Tesis de grado presentada como requisito para optar por el título de magíster en ciencias, línea de investigación en recursos fitogenéticos neotropicales]. Jaime Eduardo Muñoz Florez. Universidad nacional de Colombia. Facultad de ciencias agropecuarias. Coordinación general de postgrados palmira. 2010.
81. Maguiña Vargas C. Ser médico en el Perú (Vivencias y algo más). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2005; 47(3):138-138.

82. Mans DR, da Rocha AB, Schwartzmann G. Anticancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*. 2000; 5:185-98.
83. Marín A, Z. T., Cortés R, M., & Montoya C, O. I. Frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) ecotipo 'Colombia' mínimamente procesados, adicionados con microorganismos probióticos utilizando la Ingeniería de Matrices. *Rev. Fac. Nal. Agr.* 2010; 63(1), 5395-5407.
84. Márquez C, C. J., Trillos G, O., Cartagena V, J. R., & Cotes T, J. M. Evaluación fisicoquímica y sensorial de frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Vitae*. 2009; 16(1), 42-48.
85. Martínez-Carpio. P, Navarro, M. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Rev Oncol*. 2003; 5(4):184-91.
86. Martinez Salazar, Verónica Sofía. Optimización del cultivo de células hek293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus. universidad de chile. Chile. Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. departamento de ingeniería química y biotecnología; 2007.
87. Mendoza J, Rodríguez A, Millán P. Caracterización físico química de la uchuva (*Physalis peruviana*) en la región de Silvia Cauca. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2012; 10 (2):188-196.
88. Meneau R. Métodos Alternativos en Toxicología. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 2014; 45 (1): 18-28.
89. Mier H, Cáez G. Contenido de polifenoles, carotenos y capacidad antioxidante en frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en relación a su estado de maduración [Internet]. 2da Ed. Vol 11. Calí: Universidad de la Sabana. Sep 2011 [consultado 1 de septiembre 2014]. Disponible en: [https://books.google.com.pe/books?id=52kTsiE5s7YC&pg=PA105&lpg=PA105&dq=Contenido+de+polifenoles.+carotenos+y+capacidad+antioxidante+en+frutos+de+uchuva+\(Physalis+peruviana+L.\)+en+relaci%C3%B3n+a+su+estado+de+maduraci%C3%B3n&source=bl&ots=rFJ3hcQIUu&sig=ZO-SRne27OeAHXKM-8Mm-k-DoTk&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiD64DWjJDLAhXFKx4KHenQAhgQ6AEIHzAB](https://books.google.com.pe/books?id=52kTsiE5s7YC&pg=PA105&lpg=PA105&dq=Contenido+de+polifenoles.+carotenos+y+capacidad+antioxidante+en+frutos+de+uchuva+(Physalis+peruviana+L.)+en+relaci%C3%B3n+a+su+estado+de+maduraci%C3%B3n&source=bl&ots=rFJ3hcQIUu&sig=ZO-SRne27OeAHXKM-8Mm-k-DoTk&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiD64DWjJDLAhXFKx4KHenQAhgQ6AEIHzAB).
90. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., GrayGoodrich, M.,

- Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cells lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991; 83(11): 757-766.
91. Moo-Puc R, Robledo D, Freile-Peigrín Y. (en línea). In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Marinas*. 2009 [Citado 16 de diciembre del 2014]. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=48013184003>>. Acceso 16/12/14.
92. Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone R, Suárez AI, Arvelo F. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Lett.* 2005; 218(1):109-16.
93. Morgan S y Darling D. Cultivo de células animales. Editorial. Acribia, Zaragoza., España, 1995.
94. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16 de diciembre de 1983; 65(1-2):55-63.
95. Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C and Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*. 2007; 22 (5): 1304–1309.
96. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 2000; 17: 215-234.
97. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003; 66: 1022-1037.
98. Osorio, E. Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín (Colombia). 2009.
99. Pardo JM, Fontanilla MR, Ospina LF, Espinosa, Lady. Determining the Pharmacological Activity of *Physalis peruviana* Fruit Juice on Rabbit Eyes and Fibroblast Primary Cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008; 49(7):3074-3079.
100. Patel NA, Song SS, Cooper DR. PKC delta alternatively spliced isoforms modulate cellular apoptosis in retinoic acid-induced differentiation of human NT2 cells and mouse embryonic stem cells. *Gene Expr*. 2006; 13(2):73-84.

101. Patel S, Gheewala N, Suthar A., Shah A. In-vitro cytotoxicity activity of solanum nigrum extract against HELA cell line and VERO cell line. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2009; 1(1): 38-46.
102. Perry L. Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. Cambridge, Massachusetts and London, England: The MIT Press; 1980. p. 87-8.
103. Pinell, G.; Terán, C.; Guarachi, E.; Illanes, J. Actividad citotóxica in vitro en líneas celulares y células de sangre periférica humana de los alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* (Evanta). Rev. Bol. Quim. 2009; 26(2):96-100.
104. Pinzon, R. Echeverri, F., Quiñonez, W. Propuesta de un programa colombiano de bioprospección (Procolbio). En: Tópicos en productos naturales: la biodiversidad como fuente de moléculas activas. Universidad de Antioquia, Colombia, 1997; 259-266.
105. Puente, L.A., Pinto-Muñoz, C.A., Castro, E.S., Cortés, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review (2011) Food Research International, 44 (7), pp. 1733-1740.
106. Pui CH, Crist WM, Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 15 de octubre de 1990; 76(8):1449-63.
107. Quispe-Mauricio A, Callacondo D, Rojas J, Zavala D, Posso M, Vaisberg A. Actividad citotóxica de *Physalis peruviana* (aguaymanto) en cultivos celulares de adenocarcinoma colorectal, próstata y leucemia mieloide crónica. Revista de Gastroenterología del Perú. 2009; 29(3):239-46.
108. Ramadan MF. *Physalis peruviana*: A rich source of bioactive phytochemicals for functional foods and pharmaceuticals. Food Rev Int. 2011, 27 (3):259-73.
109. Rates, SM. Plants as source of drugs. Toxicon. 2001; 39 (5): 603-613.
110. Restrepo, A. Nuevas perspectivas de consumo de frutas: Uchuva (*Physalis peruviana* L.) y fresa (*Fragaria vesca* L.) mínimamente procesadas fortificadas con vitamina E. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 2008.
111. Rodríguez Ulloa, S. L, y Rodríguez Ulloa, E. M. Efecto de la ingesta de *Physalis peruviana* (aguaymanto) sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes. Rev. Med. Vallejana, 2007; 4(1), 43 - 53.

112. Sanabria, A. Echeverri, F, Quinonez, W. De la especie vegetal al medicamento: mito y realidad. Tópicos en productos naturales: la biodiversidad como fuente de moléculas activas. Universidad de Antioquia, Colombia, 1997; 231-257.
113. Sausville EA, Johnson JI. Molecules for the millennium: How will they look? New Drug Discovery year 2000. Br J Cancer. 2000; 83 (11):1401-4.
114. Skehan, P, Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Nat. Cencer Inst. 1990; 82(13): 1107-1112.
115. Smith BD, Bambach BJ, Vala MS, Barber JP, Enger C, Brodsky RA. Inhibited apoptosis and drug resistance in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. septiembre de 1998; 102(4):1042-9.
116. Soares MBP, Bellintani MC, Ribeiro IM, Tomassini TCB, Ribeiro dos Santos R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. European Journal of Pharmacology. 2003; 459(1):107-112.
117. Soares MBP, Brustolim D, Santos LA, Bellintani MC, Paiva FP, Ribeiro YM, Tomassini TC, Ribeiro-dos-Santos. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. Intlmmuno pharmacol. 2006; 6 (3): 408-414.
118. Soejarto D, Farnsworth N. Tropical rain forest: potential source of new drugs? Persp. Biol. Med., 1989; 32 (2): 244-256.
119. Solidoro Santisteban, A. Cáncer en el Siglo XXI. Acta méd. peruana. 2006, 23 (2): 112-118.
120. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Curr Protoc Immunol. 2001; 111 (A3.B): 1-3.
121. Stevnsner T, Bohr VA. Studies on the role of topoisomerases in general, gene- and strand-specific DNA repair. Carcinogenesis. 1993; 14(9):1841-50.
122. Takimoto CH. Anticancer drug development at the US National Cancer Institute. Cancer Chemother Pharmacol 2003; 52(Suppl.1):29-33.

123. Tejada E, Castañón M. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. (en línea). Boletín epidemiológico de la mortalidad por cáncer. 2011 [Citado 16 de diciembre del 2014]. Disponible en: <<http://www.tacna.minsa.gob.pe/uploads/epidemiologia/2014/BOLETIN%20CANCER%202011-TACNA.pdf>>. Acceso 16/12/14.
124. Ulin H. Uso y manejo actual de las plantas medicinales en el poblado Iquinuapa, Jalpa de Méndez, Tabasco [Tesis]. Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; 2006.
125. United States Department of Agriculture (USDA) (en línea). Natural Resources Conservation Service. 2000. [Citado 15 de diciembre del 2014]. Disponible en: <<http://plants.usda.gov/java/>>. Acceso 15/12/14.
126. Uscanga Palomeque Ashanti Concepción. Efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de *Cuphea aequipetala*, sobre líneas celulares de cáncer y un modelo murino. Universidad autónoma de nuevo león. Grado de maestro en ciencias con acentuación en inmunobiología, Noviembre, 2014.
127. Valdenegro, M., Fuentes, L., Herrera, R., & Moya-León, M. A. Changes in antioxidant capacity during development and ripening of golden berry (*Physalis peruviana* L.) fruit and in response to 1-methylcyclopropene treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 2012. 67(0): 110-117.
128. Vega-Ávila, E., Velasco-Lezama, R. y Jiménez-Estrada, M. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica*. 2006. 31(3): 97-111.
129. Verpoorte, R. Pharmacognosy in the New Millennium: Lead finding and Biotechnology. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000. 52: 253-262.
130. Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res*. 1991; 51(4):1078-85.
131. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer*. 1999; 35(10):1517-25.
132. Watson DG, Oliveira EJ. Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine

- after consumption of Ginkgo biloba tablets. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 723(1-2):203-10.
133. World Health Organization. (en línea). The global burden of disease. 2004. Geneva: WHO. 2008 [Citado 15 de diciembre del 2014]. Disponible en: <[http://www.who.int/topics/global\\_burden\\_of\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/en/)>. Acceso 15/12/14.
134. World Health Organization (WHO). (en línea). Cancer. 2015 [Citado 20 de diciembre del 2015]. Disponible en: <<http://www.who.int/cancer/es/>>. Acceso 20/12/15.
135. Wu S-J, Ng L-T, Lin D-L, Huang S-N, Wang S-S, Lin C-C. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Lett.* 25 de noviembre de 2004; 215(2):199-208.
136. Wu SJ, Ng LT, Huang YM, Lin DL, Wang SS, Huang SN, *et al.* Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 963-6.
137. Wu SJ, Tsai JY, Chang SP, Lin DL, Wang SS, Huang SN, *et al.* Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 108(3):407-13.
138. Yamori T. Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 52 (Suppl.1):74-9.
139. Yen C-Y, Chiu C-C, Chang F-R, Chen JY, Hwang C-C, Hseu Y-C, *et al.* 4 $\beta$ -Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana* (golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G2/M arrest. *BMC Cancer.* 2010; 10(1):46.
140. Yu-Hsuan Lan F-RC. New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. *Food Chemistry.* 2009;(2):462-9.
141. Zaharia M. (en línea). El Cáncer Como Problema De Salud Pública En El Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2013 [Citado 16 de diciembre del 2014]. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=36326085001>>. Acceso 16/12/14.

142. Zavala D, Quispe A, Posso M, Rojas J, Vaisberg A. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* L. (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. An Fac med. 2006; 67(4):283-9.
143. Zhang XY, Li WG, Wu YJ, Zheng TZ, Li W, Qu SY *et al.* Proanthocyanidin from grape seeds potentiates antitumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. Int Immunopharmacol 2005; 5:1247-57.

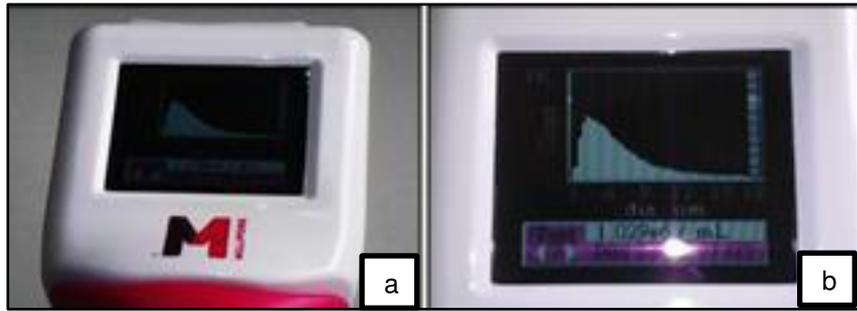
## X. ANEXOS

### X.1. Glosario

- **Droga:** Es todo material de origen natural, ya sea en bruto (por ejemplo, las hojas, la corteza de un árbol) u obtenido por sencillas operaciones (por ejemplo, los extractos) que contienen los principios activos con actividad farmacológica para su uso directo o para la elaboración de medicamentos (**Tabla 5**). La droga está relacionada entonces con la materia prima de interés farmacéutico. Una segunda definición, que conlleva un concepto más generalizado, interpreta la droga como toda sustancia de origen natural o sintético con efectos sobre el sistema nervioso central, utilizada con fines extra-terapéuticos, sin embargo, las sustancias definidas con esta segunda definición, no son el objeto de estudio de la *farmacognosia*.
- **Droga vegetal:** Parte de la planta que contiene los principios activos y que se utiliza en terapéutica.
- **Planta medicinal:** Cualquier especie vegetal que contenga en uno de sus órganos, o en toda la planta, los principios activos con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos o que se pueda emplear como prototipo para obtener nuevos fármacos por hemisíntesis.
- **Principio activo:** Sustancia química pura (aislada de la droga) responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico que se le atribuye a una droga.
- **Medicamento:** Toda sustancia medicinal (natural o sintética) con propiedades para prevenir, curar, diagnosticar una enfermedad: se prescribe a una dosis y se ha elaborado de una forma correcta para su administración.

### X.2. Contador automático

Contador automático SCEPTER (Merck Perú) se utilizó para una calibración de los resultados que obtuvimos con la cámara de Neubauer, los que fueron analizados con grado de confianza del 95 %, brindándonos diferencias no significativas (además nos da como dato el diámetro celular en menos de 30 segundos). El contador nos brindó el número de células por cada ml de suspensión (**Figura 34a**) y además el tamaño de los linfocitos mayoritarios que se visualizan en la **Figura 34b** (3-5  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 34. Contador automático SCEPTER.** (a) Pantalla con resultados, (b) histogramas en pantalla.

### **X.3. Consentimiento informado**

**A. TITULO:** “EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Physalis peruviana* (AGUAYMANTO) EN CULTIVOS CELULARES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA Y LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA”

La srta. Dalia Violeta Churampi Mancilla, bachiller de la Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se encuentra realizando en el Laboratorio de Genética Humana, su proyecto de tesis que está orientado a investigar el efecto antiproliferativo que presentaría el extracto acuoso de aguaymanto en linfocitos humanos de sangre periférica. Los donantes deben ser personas sanas con una edad entre 18 a 25 años y que no estén bajo ningún tratamiento farmacéutico. Invito a Ud. su participación en esta investigación.

#### **B. PROCEDIMIENTO:**

Si Ud. decide participar en el estudio consideraremos su colaboración en lo siguiente:

- 1) Se le pedirá sus datos personales: nombre completo, edad, correo electrónico y DNI.
- 2) Esta evaluación se realizará una vez más de ser necesario.
- 3) El procedimiento consiste en extraer 8ml de sangre periférica.

#### **C. CONFIDENCIABILIDAD:**

Si Ud. decide participar en este estudio su nombre se guardará en completa reserva. Su nombre no será utilizado en ningún reporte o publicación. Sus datos personales nos servirán para conveniencia de la investigación.

#### **D. BENEFICIOS:**

El resultado de la investigación ayudará en una futura aplicación a poder descubrir un posible fármaco natural derivado del aguaymanto para el tratamiento contra el cáncer.

## E. COSTOS:

Si Ud. decide participar en la investigación, no tendrá que asumir costo alguno y la donación que usted autoriza por medio de este documento está basada en criterios altruistas y desinteresados, sin que la donación genere, a su favor, derecho alguno de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con sus muestras, ni sobre la investigación a desarrollar.

Declaro haber sido informado/a sobre el proceso de DONACIÓN de sangre, manifiesto mediante mi firma del presente consentimiento, mi deseo de someterme a este procedimiento.

Nombre del Donante:

DNI:

Edad:

Fecha:

Correo electrónico:

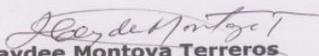
---

Firma del Donante  
principal

---

Firma del investigador

#### X.4. Identificación taxonómica

	<b>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS</b> Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA	
<b>MUSEO DE HISTORIA NATURAL</b>		
<i>"Año de la Consolidación del Mar de Grau"</i>		
<b>CONSTANCIA N° 18-USM-2016</b>		
<p>LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal (tallo, hojas) recibida de <b>Dalia Violeta CHURAMPI MANCILLA</b>; alumna de la UNMSM de la Fac. de Ciencias Biológicas; ha sido estudiada y clasificada como: <b><i>Physalis peruviana</i> L.</b> y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).</p>		
<p><b>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</b></p>		
<p><b>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</b></p>		
<p><b>SUBCLASE: ASTERIDAE</b></p>		
<p><b>ORDEN: SOLANALES</b></p>		
<p><b>FAMILIA: SOLANACEAE</b></p>		
<p><b>GENERO: <i>Physalis</i></b></p>		
<p><b>ESPECIE: <i>Physalis peruviana</i> L.</b></p>		
<p>Nombre vulgar: "aguaymanto" Determinado por Blgo. Severo Baldeón Malpartida.</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.</p>		
		Fecha, 12 de febrero de 2016
<p><b>JEFE</b> Herbario San Marcos</p>		 <b>Dra. Haydee Montoya Terreros</b> JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS
Av. Arenales 1256, Jesús María Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú	Telfs. (511)471-0117, 470-4471, 470-7918, 619-7000 anexo 5703	e-mail: museohn@unmsm.edu.pe http://museohn.unmsm.edu.pe