



Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de Agraz y su posible efecto

Citotóxico *in vitro* en células leucémicas OCI AML3 y MOLT4.

Martha M. González-Beltrán.^{1*}, Luis G. Sequeda-Castañeda¹

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

Carrera 7 No. 43 - 82 Tel: (571) 3208320 Bogotá, D.C., Colombia.

gonzalez-martha@javeriana.edu.co*, lsequeda@javeriana.edu.co

Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de Agraz y su posible efecto
Citotóxico *in vitro* en células leucémicas OCI AML3 y MOLT4.

Ingrid Schuler García
Decana académica

Andrea Patricia Forero
Directora de Carrera de Biología

Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de Agraz y su posible efecto

Citotóxico *in vitro* en células leucémicas OCI AML3 y MOLT4.

Martha M. González-Beltrán.^{1*}, Luis G. Sequeda-Castañeda¹

Zulma Yanira Casas Corredor
Jurado

LuisGonzalo Sequeda Castañeda
Director de trabajo de grado

NOTA DE ADVERTENCIA

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

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

Tabla de contenido

RESUMEN.....	6
INTRODUCCION.....	7
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
MARCO TEORICO.....	9
Radicales libres (ROS, RNS y papel de los antioxidantes en la célula).....	9
El agraz (descripción y compuestos antioxidantes).....	11
Extracción con metanol y agua	12
Ensayos de la actividad antioxidante(ABTS y DPPH).....	13
Cáncer.....	14
Líneas celulares (OCI AML 3 y MOLT 4).....	15
Quimioterapia (Doxorrubicina).....	16
OBJETIVO GENERAL.....	17
Objetivos Específicos.....	17
METODOLOGÍA	17
Selección de muestra	17
Células.....	17
Fenoles totales.....	17
Caracterización del potencial antioxidante del Agraz.....	18
Pruebas químicas preliminares.....	19
Efecto del extracto de Agraz y de la doxorrubicina en la proliferación celular de células OCI AML3 yMOLT4.....	20
Análisis Estadísticos	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Fenoles totales.....	21
Caracterización del potencial antioxidante del Agraz.....	22
Pruebas químicas preliminares.....	23
Efecto del extracto de Agraz MeOH y de la doxorrubicina en la proliferación celular de células OCI AML-3 y MOLT 4.....	24
Conclusiones.....	28
Recomendaciones.....	28
Referencias.....	29

RESUMEN

Objetivo. Evaluación de la capacidad antioxidante y posibles efectos citotóxicos de extractos de Agraz. **Materiales y métodos.** Se realizaron cuatro extracciones de antioxidantes; metanol al 95%, metanol-agua destilada, agua destilada y Jugo. Todos los extractos fueron rotaevaporados y finalmente liofilizados. La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó por medio del método del catión radical ABTS⁺ (etilbenzotiazolina-6-sulfónico) desarrollado por Re et al, 1993,1999 y por el método DPPH de Brand-Willams *et al*, 1995. Para los extractos de Agraz-Metanol, Agraz-Metanol-Agua y Agraz-Agua se mezcló diferentes volúmenes de ABTS ó DPPH junto con diferentes volúmenes del extracto completando 1ml por mezcla en cada celda espectrofotométrica a la que se le midió su absorbancia cada minuto durante 30 minutos consecutivos. Los resultados obtenidos se expresaron en TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) mediante la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones de TROLOX® (Arts et al 2004). Luego se procedió a medir la capacidad citotóxica efectuando una caracterización de los efectos del extracto en la proliferación y supervivencia de células OCI AML3 y MOLT 4 utilizando placas de 96 pozos para la siembra de células y realizando el conteo por hemocitómetro a las 48, 72 y 96h (Thorkild et al 1985). También se caracterizó los efectos de la quimioterapia (doxorubicina). **Resultados.** Se determinó una capacidad antioxidante en la extracción con metanol al 95% de $63, \pm 3,3$ ppmTEAC/ml al minuto 30 y en el jugo de $64,4 \pm 3,2$ ppm TEAC/ml al minuto 30. También se determinó una disminución de la proliferación de células OCI AML-3 del 24,4% y de las MOLT 4 del 23,0% con agraz MeOH y el 98,8% con doxorubicina. **Conclusiones.** Es necesario repetir la dosificación de los extractos de carambolo, uva y corozo ya que son resultados muy ambiguos. El IC 50 del Agraz en las pruebas antioxidantes disminuye con el tiempo debido a que el extracto sigue reaccionando con el ABTS o DPPH hasta que la reacción se estabiliza. El jugo de agraz puede ser una buena herramienta de investigación de la citotoxicidad para el futuro debido a los resultados de su capacidad antioxidante. La Doxorubicina

tiene un efecto mayor en la disminución de la proliferación de células OCI AML3 (85%) que la del extracto de Agraz MeOH (24%).

INTRODUCCION

Colombia posee una alta diversidad de especies vegetales que presentan una amplia gama de moléculas orgánicas (Pezzuto 1997; Sanabria 1983), estas moléculas entre las que se encuentran los antioxidantes; flavonoides en su mayoría muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas, neurológicas, etc (Kuskoski et al, 2005). Algunas frutas tienen un alto contenido de antioxidantes, debido a que estas moléculas disminuyen o retardan las reacciones de oxidación sobre diferentes sustratos (Montoya et al, 2009) así que es importante su consumo frecuente. Por lo tanto se han venido adelantando desde hace ya algunos años, varios estudios sobre los antioxidantes de origen natural en algunas especies vegetales como frutas, verduras, etc. con el fin de que puedan ser utilizados en la industria alimentaria, cosmética y medicinal ya que se presume no causan problemas para la salud (Garzón 2008). En las dos últimas décadas, los estudios sobre la capacidad antioxidante y la capacidad citotóxica de plantas y frutos ha aumentado debido al desarrollo de nuevas técnicas y la necesidad de mejorar la salud humana. Se han realizado estudios sobre la capacidad antioxidante en frutas como el arándano (Canter et al 2004; Prior et al 1998), moras salvajes (Deighton et al 2000), diferentes bayas (Kähkönen et al 2001), frutas parientes del agraz y el arándano como *Vaccinium floribundum Kunth* (Vasco et al 2009), incluso para el agraz (Garzón et al 2009). Uno de los compuestos encontrados en estas frutas son las antocianinas las cuales muestran un efecto citotóxico (Wang et al 1999; Kamei et al 1995). En *Agraz* se ha encontrado un alto contenido de antocianinas 329 ± 28 mg cianidin 3-glucoside/100 g FW (Garzón, 2009) y por lo tanto una alta capacidad antioxidante 45.5 ± 2.3 μ mol TE/g FW en comparación con algunas especies pertenecientes al género *Vaccinium* y a otros tipos de especies que poseen una alta capacidad antioxidante. Se ha hablado sobre la capacidad antioxidante de muchas frutas pero poco se ha hablado de su citotoxicidad así que separadamente se han adelantado varios estudios sobre la citotoxicidad de

frutas relacionadas con el agraz como el *vaccinium uliginosum* en el cual se encontró una alta citotoxicidad en cepas de cáncer de colon (Zu et al 2010). También se han realizado estudios con arándanos mostrando un efecto sinérgico sobre células de cáncer de ovario (Singh et al 2009). Incluso, se ha estudiado el potencial antioxidante y la citotoxicidad en algunas bayas de los bosques franceses (Bendaoud et al 2010) también se ha hablado de una posible asociación entre el potencial antioxidante y la citotoxicidad (Wang et al, 2007) ya que las ROS intervienen en vías como la AP-1 y la NF-kB y presentan propiedades proapoptóticas, anti-inflamatorias, antiproliferativas (Yang C S. et al, 2001) algunas antiocianinas y sus agliconas como cianidina, pelargonina, delfidina, etc. Muestran actividad antiproliferativa y proapoptótica en adenocarcinoma gástrico (HT-29) y cáncer de colon (Caco-2) (Yi W et al, 2005) muchos estudios se han realizado con el ánimo de encontrar métodos más naturales para combatir el cáncer ya que actualmente existen procedimientos bastante nocivos para el organismo como por ejemplo la quimioterapia siendo esta el tratamiento más utilizado para combatir el cáncer a pesar de tener efectos secundarios muy perjudiciales para los pacientes, por ejemplo; el uso de la doxorubicina proporciona una respuesta de disminución de células entre el 40 y 50%, pero a su vez provoca, náuseas, mucositis, neutropenia y riesgo de miocardiopatía congestiva (Winchester, 2001). Por todo lo anterior el objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad antioxidante y posibles efectos citotóxicos de extractos de Agraz en células OCI AML3 y MOLT 4 con el fin de encontrar un tratamiento alternativo para prevenir y/o combatir el cáncer.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades cardiovasculares y el cáncer constituyen los principales problemas de salud en Colombia y en países industrializados, siendo las principales causas de mortalidad prematura, antes de los 65 años. En Colombia se encontró un reporte de 28.279 muertes por cáncer, es decir el 14.7% de todas las muertes del país, con un promedio de edad entre los 67 y los 72 años (Jaramillo et al 2004). Recientes investigaciones han demostrado el potencial terapéutico de compuestos antioxidantes en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles. Paradójicamente, los resultados sugieren que el potencial antioxidante de un compuesto que protege células

normales contra el estrés oxidativo asociado con ciertas condiciones metabólicas puede prevenir el crecimiento de células tumorales. El propósito de éste trabajo es el de conocer el potencial antioxidante y citotóxico de una fruta que se produce en Colombia, el Agraz.

MARCO TEORICO

Radicales libres (ROS, RNS y papel de los antioxidantes en la célula)

Los radicales libres se definen como átomos o moléculas que tienen un electrón desapareado el cual les confiere inestabilidad éstos se forman normalmente durante el metabolismo celular, Gerschman habló por primera vez sobre la teoría de la toxicidad del oxígeno en 1945 en la cual proponía que la toxicidad del oxígeno se debía a formas de oxígeno reducidas parcialmente (Gerschman et al, 1954). Luego, Denham Harman propuso que los radicales libres jugaban un papel importante en el envejecimiento (Harman, 1956). En 1969, McCord y Fridovich descubrieron la enzima superóxido dismutasa (SOD) y dieron evidencia suficiente sobre la importancia de los radicales libres. (McCord et al, 1969). En 1977, Mittal y Murad mostraron evidencia de que el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) activaba la formación de segundos mensajeros importantes para la célula, proponiendo la existencia de una coevolución entre la producción de radicales libres y los procesos celulares. Se mostró que a bajas concentraciones, los radicales puede tener efectos benéficos en la célula jugando un papel importante en la respuesta a agentes infecciosos, vías de señalización celular, la senescencia y la apoptosis celular (Valko et al, 2007) y la inducción a la respuesta mitogénica, pero por otro lado una sobre producción de estos radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) producen estrés oxidativo un proceso deletéreo el cual puede producir cambios en la estructura celular (lípidos y membranas), proteínas y ADN y puede inducir y mantener la oncogénesis de células cancerosas. Las ROS son radicales libres derivados del oxígeno, el oxígeno molecular o dióxígeno es considerado el ROS primario, este interactúa con otras moléculas y genera ROS secundarios (Valko et al, 2005) como el peróxido de hidrógeno el cual se produce en su mayoría en la mitocondria (Cadenas et al, 1998) en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones y produce iones libres de hierro (Liochev et al, 1994), este hierro libre puede participar en

reacciones tipo Fenton y Haber Weiss produciendo radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Valko et al, 2005) altamente reactivos (Pastor et al, 2000). También existen otros radicales derivados del oxígeno como lo son los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) como por ejemplo el hidroperoxil ($\text{HOO}\cdot$) el cual inicia la peroxidación de ácidos grasos (Valko et al, 2007). El consumo de oxígeno en los peroxisomas produce peróxido de hidrógeno H_2O_2 el cual es usado para oxidar algunas enzimas (Valko et al, 2007) este es contrarrestado por la catalasa para evitar toxicidad por acumulación de H_2O_2 si se daña éste mecanismo el H_2O_2 va al citosol y causa estrés oxidativo (Valko et al, 2007). Por otro lado, las RNS son especies reactivas derivadas del nitrógeno, el $\text{NO}\cdot$ es una molécula que contiene un electrón desapareado y se produce en tejidos biológicos por acción de la Oxido nítrico sintasa (NOSs) para metabolizar arginina y citrulina (Ghafouriafar et al, 2005). El $\text{NO}\cdot$ es importante en diversos procesos fisiológicos incluyendo neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación muscular y regulación inmune (Bergendi et al, 1999).

El estrés oxidativo produce un desbalance redox el cual ha sido encontrado en varias células cancerosas en comparación con las células normales, así que este puede estar relacionado con la oncogénesis (Valko et al, 2007). Los antioxidantes son mecanismos de defensa desarrollados por los organismos para combatir la exposición a los radicales libres (cadenas, 1997), entre los cuales encontramos enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y otros compuestos no enzimáticos como el ácido ascórbico (Vitamina C), α -tocoferol, (Vitamina E), glutatión (GSH; abundante en el citosol "transporte de aminoácidos", núcleo "reparación y expresión del ADN" y mitocondria, ataca directamente a singletes de oxígeno y a radicales hidroxilo) carotenoides, flavonoides y otros (Valko et al, 2007). Los antioxidantes son importantes en varias vías metabólicas como por ejemplo: AP-1 factor de transcripción importante en el crecimiento celular y diferenciación y NF- κ B importante en respuestas antiinflamatorias, crecimiento celular y diferenciación (Hofseth et al, 2004). Las antocianidinas son estructuras básicas de las antocianinas, las antocianidinas (agliconas) consisten en un anillo aromático [A] unido a un heterociclo [C] que contiene oxígeno, también unidos por un enlace carbono-carbono en un anillo aromático tercero [B] (Konczak y Zhang, 2004). Cuando las antocianidinas se

encuentran en su forma glicósido son conocidas como antocianinas. Las principales diferencias entre ellas son el número de grupos hidroxilados, la naturaleza y la cantidad de azúcares unidos a su estructura, los carboxilatos alifáticos o aromáticos unidos a la molécula de azúcar (Kong et al, 2003) . Hasta el momento se ha informado de más de 500 diferentes antocianinas (Andersen & Jordheim, 2006) y 23 antocianidinas (Andersen & Jordheim, 2006; Kong et al, 2003; Rein, 2005).

El agraz (descripción y compuestos antioxidantes)

En Colombia se producen grandes cantidades de frutas durante todo el año, este tipo de frutas tropicales proporcionan un poderoso medio para aumentar los ingresos de los pequeños agricultores ya que son cultivos de alto valor comercial (CIAT, 2011). Una de estas frutas de interés comercial es el agraz también conocido como mortiño el cual es producido en algunas regiones de Colombia entre los 2200 y 3400 msnm (ICA, 2011). Esta planta crece hasta 3.5 m de altura y su tallo alcanza 50 cm de diámetro Usualmente es muy ramificada y su copa es de forma redonda (SIAC, 2011). Sus hojas son simples, alternas, de forma elíptica, de 1 a 3.5 cm de largo por 0.6 a 1.4 cm de ancho, de base obtusa, ápice acuminado, borde finamente aserrado, haz de color verde lustroso y envés pálido (SIAC, 2011). Sus inflorescencias se disponen en racimos axilares o terminales de unos 3.5 a 7.5 cm de largo, con una gran cantidad de flores a lo largo del eje. Sus flores son pequeñas, de color blanco y corola tubular. Sus frutos son bayas globosas y carnosas de 9 a 14 cm de diámetro, de color morado oscuro a negro al madurar. Cada fruto contiene numerosas semillas pequeñas (Toro et al 2002). En el noroccidente medio de Antioquia se encuentra en rastrojos bajos, bosques secundarios y en la vegetación arbustiva del subpáramo (Toro et al 2002). El agraz contiene muchos antioxidantes entre los que se encuentran las antocianinas entre estas cianidina y glucósidos de delfinidina (Vasco et al., 2009) siendo éstos colorantes naturales que han suscitado un creciente interés debido a su amplia gama de colores y efectos sobre la salud. A pesar del gran potencial de aplicación que las antocianinas representan para la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, su uso ha sido limitado debido a su relativa inestabilidad y bajos porcentajes de extracción. En la actualidad, la mayoría de

las investigaciones sobre las antocianinas se centran en la solución de estos problemas, así como la purificación y la identificación (Castañeda-Obando et al, 2009). Otros compuestos encontrados en el agraz son ácidos hidroxicinámicos y flavonoles (Garzón et al, 2009). Las antocianinas pertenecen a la familia de los flavonoides los cuales se han venido estudiando desde 1960 (Taylor and Francis grupo, 2006). Se han investigado los genes responsables de la biosíntesis de enzimas flavonoides, factores de regulación de la estructura y función, etc. Los flavonoides se derivan de la fenilalanina (vía siquimato y arogenato) y del malonil-CoA (vía de los TCA) en la vía de los fenilpropanoides la cual produce otros metabolitos secundarios como ácidos fenólicos, lignina, lignanos y estilbenos. Esta biosíntesis ocurre en el citosol y de allí se transportan dentro y fuera de la célula, cabe resaltar que poco se sabe sobre la degradación de los flavonoides. Los primeros flavonoides son las chalconas, derivadas de ésteres de HCA-CoA aunque en algunas especies se utilizan otras enzimas como sustrato para producir las chalconas por ejemplo; el cafeoil-CoA y el feruloil-CoA. El Acetil-CoA necesario para producirlos se origina en la mitocondria, en los peroxisomas, en los plástidos y en el citosol por varias vías, el acetil-CoA se carboxila por acción de la ACC (acetil-CoA carboxilasa implicada en la vía de los ácidos grasos en plástidos) y el Mg^{2+} como cofactor y se convierte en malonil-CoA en el citosol para la producción de diferentes flavonoides

Extracción con metanol y agua

La estructura química del metanol (MeOH) es muy similar a la del agua, con la diferencia de que el ángulo del enlace C-O-H en el metanol (108.9°) es un poco mayor que en el agua (104.5°), porque el grupo metilo es mucho mayor que un átomo de hidrógeno. El metanol es el solvente más utilizado para extraer flavonoides (flavones, flavonoles, flavo-glicosidos y dímeros de flavona) (Escribano et al, <http://kurdchemists.org/files/Polyphenols.pdf>) ya que es un solvente polar que disuelve compuestos orgánicos. La mayoría de los flavonoides como se ha dicho anteriormente están glicosidados y muestran alta solubilidad en agua comparado con moléculas agliconas por lo tanto el uso de metanol:agua (1:1) es suficiente para producir una buena extracción de glucósidos de la mayoría de plantas pero debido a la variedad de combinaciones heterosidicas de ciertos grupos de flavonoides como las flavones y

flavonoles pueden estar en forma aglicona y por lo tanto pueden no ser extraídos con el agua (Escribano et al, <http://kurdchemists.org/files/Polyphenols.pdf>), además de esto el metanol es soluble en el agua.

Ensayos de la actividad antioxidante (ABTS y DPPH)

El primer ensayo ABTS•(Re et al, 1993) se basó en la activación de metmioglobina con peróxido de hidrógeno en la presencia de ABTS• para producir el catión radical, en presencia o ausencia de antioxidantes, esta metodología causo un gran impacto debido a la facilidad de su realización y a su bajo costo pero fue muy criticada debido a que la rápida reacción de compuestos antioxidantes también podría contribuir a la reducción del radical ferrilomioglobina (Re et al, 1999). Por lo tanto en 1999 Re, et al propusieron la mejora en la técnica para la generación de ABTS• consistiendo en la producción directa de la ABTS azul/verde• cromóforo a través de la reacción entre el ABTS y persulfato de potasio teniendo máximos de absorción a longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. Esta reducción está dada en una escala de tiempo en función de la actividad antioxidante, la concentración de los antioxidantes y la duración de la reacción. Así, el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del ABTS • catión radical se determina en función de la concentración y el tiempo y se calcula en relación con la reactividad de Trolox como un estándar, en las mismas condiciones. Este método puede utilizarse para el estudio de compuestos solubles en agua, lípidos, compuestos puros y extractos de alimentos (Re et al, 1999).

El ensayo de la actividad antioxidante utilizando este compuesto se basa en la decoloración de la disolución de ABTS desde verde-azuloso a incoloro, debida a la reducción del catión radical por los compuestos dadores de electrones (antioxidantes) presentes en los extractos (Re et al, 1999).

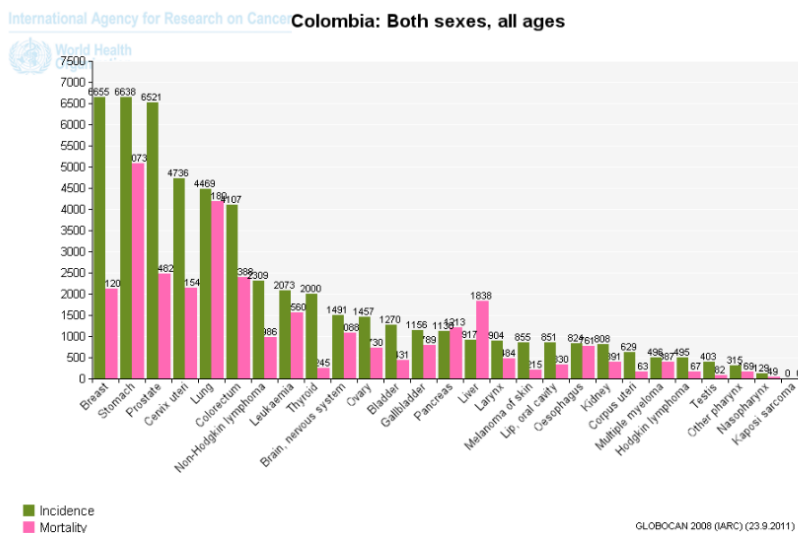
El radical estable DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo) fue desarrollado por Brand-Willams *et al* y se basa en la reducción de la absorbancia medida a 516 nm del radical DPPH• pasando de morado intenso a amarillo por la acción de antioxidantes incluidos a la solución. Los resultados de ambos métodos se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox ($\mu\text{M/g}$ de muestra peso fresco) (Brand-Willams *et al*, 1995).

Cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte en los países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en los países en desarrollo (*World Health Organization*.2008).La carga del cáncer está aumentando en los países en vía de desarrollo debido a la adopción de estilos de vida como el tabaquismo, la inactividad física y las dietas "occidentales" (Jemal et al, 2011).

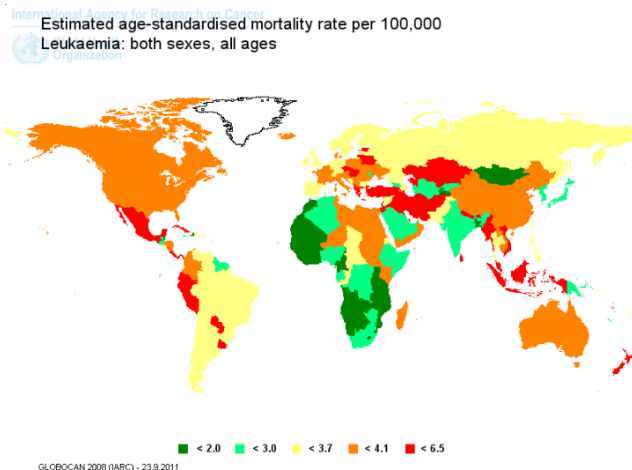
En Colombia encontramos que la mayoría de los casos de cáncer existentes en el país son más por incidencia de la enfermedad que por la mortalidad, encontrando varios tipos comunes de cáncer como; cáncer de seno, de estómago, de próstata, de cérvix, pulmón, colonrecto, linfoma, leucemia, etc. (**Grafica 2**).

Grafica 2 incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en Colombia. GLOBOCAN 2008



Más específicamente la leucemia mieloide (LMA) es uno de los tipos más comunes de leucemia en los adultos a nivel mundial (**Gráfica 3**), el octavo en Colombia (**Grafica 2**) con un índice de mortalidad alto. Este tipo de cáncer es raro en personas de 40 años y por lo general ocurre alrededor de los 60. La LMA es más común en hombres que en mujeres. Las personas con este tipo de cáncer tienen células anormales dentro de su médula ósea. Las células crecen muy rápido y reemplazan las células sanguíneas sanas (Appelbaum, 2007). La médula ósea, que ayuda al cuerpo a combatir infecciones, finalmente deja de trabajar correctamente. Las personas con leucemia se

vuelven más propensas a las infecciones y tienen un mayor riesgo de sangrado como el número de células sanguíneas sanas disminuyen (Appelbaum, 2007).



Grafica 3 mortalidad por leucemia a nivel mundial. GLOBOCAN 2008

Líneas celulares (OCI AML 3 y MOLT 4)

Una línea celular es un producto de células inmortales es decir que las células pueden perpetuar indefinidamente la división a diferencia de las células normales, que sólo se puede dividir aproximadamente 50 veces (Berk, 2005). Estas células provienen de la multiplicación *In vitro* de un clon obtenido de un cultivo primario, con propiedades metabólicas, inmunológicas y morfológicas específicas y definidas (Gil-Loyzaga). Estas células son "útiles" para la experimentación en los laboratorios, ya que siempre están disponibles para los investigadores como un producto (Berk, 2005). La línea celular HeLa fue la primera línea celular que existió y fue obtenida en 1952 a partir de un tumor de cuello uterino. Las ventajas de trabajar con líneas celulares son muchas por ejemplo; se puede disponer de un gran número de células idénticas que se multiplican simultáneamente durante muchos ciclos celulares, las células pueden expresar cambios fenotípicos y/o genotípicos ante la presencia de diferentes sustancias citotóxicas, su costo es bajo ya que reduce el número de animales empleados para la experimentación, etc. Por otro lado existen algunas desventajas de trabajar con líneas celulares como por ejemplo; alteraciones genotípicas y/o fenotípicas debido a su multiplicación indefinida, no se pueden contrastar los resultados *in vivo*, etc. Específicamente, el cultivo celular de células OCI AML3 fue establecido a partir de la

sangre periférica de un hombre de 57 años de edad con leucemia mieloide aguda (**Fig. 1**) al momento del diagnóstico, en 1987; las células llevan una mutación en el gen NPM (www.ATTC.org, 2011).

La línea celular MOLT 4 se estableció a partir de células tomadas de un paciente con leucemia linfoblástica aguda el cual recibió quimioterapia con múltiples fármacos. Esta línea celular posee una mutación en el codón 248 del gen p53 deteniendo su expresión (www.ATTC.org,2011).

Quimioterapia (Doxorrubicina)

La quimioterapia es el uso de químicos como tratamiento contra el cáncer. En 1940 la quimioterapia daba sus primeros pasos, la mostaza de nitrógeno muy utilizada en la primera y segunda guerra mundial se utilizaba como tratamiento para la leucemia aguda y un metabolito de ácido fólico (5-FU), pero solo fue hasta 1970 cuando la quimioterapia se estableció como un tratamiento eficaz contra el cáncer (Bucher, 2004). Existen dos tipos de fármacos quimioterapéuticos; los no específicos del ciclo celular, los cuales tienen su efecto sobre las células que están en proceso de reposo G_0 , replicación y proliferación y los específicos del ciclo celular los cuales tienen efectos sobre las fases G_1 , S_1 G_2 ó M y estos generalmente se administran en combinación con otros agentes ya que el objetivo primordial de la quimioterapia es reducir el número de células cancerosas presentes en los sitios del tumor primario y/o metastásico (Bucher, 2004). La doxorrubicina es una antraciclina la cual puede intercalarse entre las bases del ADN, bloqueando así la transcripción o puede inhibir la actividad de la topoisomerasa II produciendo rompimiento del ADN (Emory University, 2008). La doxorrubicina puede provocar una disminución en el número de células sanguíneas presentes en la médula ósea. El uso a largo plazo de este medicamento también puede provocar daño severo al corazón, incluso años después de haber dejado de tomarlo. El riesgo del daño al corazón después de haber descontinuado el tratamiento es mayor en los niños (Winchester, 2001).

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de la capacidad antioxidante y posibles efectos citotóxicos de extractos de Agraz.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar el potencial antioxidante de extractos de Agraz.
2. Caracterizar la composición química preliminar del Agraz.
3. Caracterizar los efectos de extracto de Agraz y la doxorubicina en la proliferación de células OCI AML3 y MOLT 4.

METODOLOGÍA

Selección de muestra

El Agraz es producido en Colombia desde hace algún tiempo, de ésta fruta se seleccionó el material vegetal que se encontraba en estadio maduro, que no tuviese partes en mal estado ni partes con colores, cobrizos, amarillos, etc. Diferentes a los colores naturales de la fruta y se almacenaron a -80 C° hasta su utilización en las pruebas.

Células

Las células OCI AML3 y MOLT4 se mantuvieron en RPMI 1640 suplementado con 5% FCS, 1% de glutamina, y 100 unidades/ml de penicilina en una incubadora a 37°C y 5% CO₂.

Fenoles totales

Antes de la Caracterización del potencial antioxidante fue necesario realizar la determinación de fenoles totales mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al, 1965). En éste, se construyó una curva patrón usando como estándar ácido gálico. Para evaluar el extracto, este debe diluirse a una concentración a la cual el contenido de fenoles se encuentra dentro del intervalo de la curva medida a una longitud de onda de 545 nm, ésta fue hecha con 2mg extracto + RFC + carbonato de sodio. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/100g de extracto (Singleton et al, 1965).

Caracterización del potencial antioxidante del Agraz

Para caracterizar el potencial antioxidante se realizaron extracciones de la fruta en buen estado con metanol al 95% pesando 100g de agraz fresco los cuales se les realizó una disgregación mecánica para luego agregarles 200ml de metanol (MeOH) al 95%, solamente agua destilada (H₂O) ó una mezcla de metanol-agua destilada (MeOH:H₂O) (1:1). Después, se filtraron los extractos primero con filtro de tela y luego con filtros de papel de retención baja, media y alta para eliminar al máximo residuos sólidos que interfirieran con los resultados. El líquido filtrado se llevó a rotavapor a 90 rpm a una temperatura aproximada de 45°C para destilar el solvente con el cual se realizó la extracción obteniendo la viscosidad de jarabe o hasta la tercera parte del volumen inicial (Bilbao, 1997). A continuación el líquido se envasó y se congeló a -80 C° para ser liofilizado a una temperatura de -40°C y una presión de 0,028 mbar durante 48h aproximadamente. Con el polvo obtenido se caracterizó el potencial antioxidante por el método ABTS (2,2'-azinobis-3-etil benzotiazolina-6- ácido sulfónico, sal diamonio) descrito por Re et al. (1993; 1999) y DPPH descrito por Brand-Williams *et al*, 1995. Para obtener el catión ABTS se preparó una solución stock con 25mg de ABTS, 10ml de agua destilada y 2,4mg de persulfato de potasio para luego mantenerla a temperatura ambiente en la oscuridad durante 16 horas antes de su uso metodología de Re et al 1993, modificada por Re et al 1999. Una vez el radical fue formado, la absorbancia a 734 nm se ajustó a 0,7 por dilución con metanol analítico al 95% por otro lado el DPPH se preparó con 100 mg de DPPH en 10ml de metanol analítico y la absorbancia a 516 nm se ajustó a 0,7 por dilución. En seguida se preparó una solución stock del extracto de Agraz pesando 0.0026g del extracto liofilizado en un eppendorf y posteriormente añadiendo 1000 μ l de agua destilada. Luego, se añadió 10 μ l de la solución stock de la muestra de Agraz a 990 μ l de la dilución de ABTS consecutivamente hasta 50 μ l de la solución stock de la muestra de Agraz y se midió su absorbancia a 735nm cada minuto durante 30 minutos, se añadieron los mismos volúmenes para DPPH. Para los extractos en metanol al 95%, metanol-agua destilada y agua destilada, se realizaron diferentes soluciones stock para caracterizar la capacidad antioxidante de estos añadiendo un volumen determinado de extracto a cierta concentración (ppm) a un volumen determinado de ABTS (Re et al, 1999; Kuskoski, 2005) o de DPPH según

fuera el caso. El porcentaje de disminución de la absorbancia se calculó con la fórmula $IC_{50} = 50 - b/x$. Los resultados se expresan como valores TEAC mediante la construcción de una curva patrón usando diferentes concentraciones de TROLOX® (Arts et al., 2004). Cada medición se repitió 3 veces.

Pruebas químicas preliminares

Estas pruebas se hicieron para el jugo de agraz liofilizado y para el extracto en MeOH. Se pesaron 0.0568g de jugo liofilizado de agraz y 0.333g de agraz MeOH se disolvieron en 5ml de EtOH (etanol), también se requería solubilizarlo en cloroformo o éter de petróleo pero al no poder solubilizarlo se tomó la determinación de realizar una prueba de solubilidad y realizar todas las pruebas químicas en la dilución de EtOH de la siguiente manera:

Extracto en éter de petróleo ó $CHCl_3$: Terpenos y esteroides.

- a) Lieberman-Burchard. (esteroides y esteroles)

Muestra / EtOH 2ml + Reactivo → Color rosa (0'), violeta (1'), azul (5') y verde (20')

Reactivo: 1 mL $CHCl_3$ + 1 mL de anhídrido acético + 1 -2 gotas de H_2SO_4

- b) Prueba de Salkowski (terpenos)

Muestra / EtOH 2ml + H_2SO_4 (gotas) → Color amarillo – rojo

- c) Prueba de Baljet (terpenos y esteroles)

Muestra / EtOH 2ml + Sol. A + Sol. B → Color amarillo

Reactivos: Sol. A = 1ml Acido pícrico Sol. B = 1ml NaOH

- d) Prueba de Hidroxamato férrico (Sequiterpenlactonas)

Muestra / EtOH + 2 gotas de solución MeOH 2N de Clorhidrato de hidroxilamina + 2 gotas de solución MeOH 2N de KOH.

Se calienta al baño de María, se acidula con HCl 0.5N + gotas de $FeCl_3$ 1% → Color café o violeta.

Extracto Etanólico: flavonoides, fenoles y alcaloides.

- a) Prueba de Shinoda.(flavonoides y fenoles)

Muestra / EtOH 2ml + Mg ó Zn (1 cm) + gotas HCl 2N → Color naranja – rojizo (forma gas)

- b) Prueba de Cloruro férrico ($FeCl_3$) (flavonoides y fenoles)

Muestra / EtOH + (gotas) $FeCl_3$ 1% → Color verde intenso

- c) Prueba de Antrona (Glicósidos de flavonoides o de terpenos)

Muestra / EtOH + (gotas) Reactivo por pared → Anillo verde en la interfase

Reactivo: Antrona disuelta en H₂SO₄ concentrado.

d) Prueba de Dragendorff (Alcaloides)

Muestra / EtOH + HCl + Reactivo (gotas) → Precipitado naranja

Reactivo de Dragendorff: Yoduro de bismuto

Esta metodología fue desarrollada de acuerdo a la forma en que se realiza en las prácticas de fotoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. Los resultados de cada extracto se reportaron en una tabla. Los resultados de la prueba de solubilidad se expresan con +++ (solubilidad alta), ++ (solubilidad media), + (solubilidad baja) y – (no solubilidad).

Efecto del extracto de Agraz y de la doxorubicina en la proliferación celular de células OCI AML3 y MOLT4

Para la caracterización de los efectos de los extractos de Agraz y de la doxorubicina en la proliferación y supervivencia de células OCI AML3 y MOLT4 primero se obtuvieron cultivos de las células en medio RPMI en t-flask de cultivo, al tercer día se homogeneizó su contenido y se sacó una alícuota de 1000 μ l en seguida, se realizó el conteo de células por hemocitómetro según el protocolo establecido por Mary C. Phelan and Gretchen Lawler en *Current Protocols in Cytometry* (1997), se realizaron los cálculos correspondientes para sembrar aproximadamente 1E6 células por pozo (Lonza, 2011). Se utilizaron placas de 96 pozos para la siembra de las células y a cada pozo se añadió 100 μ l de medio RPMI+células (Ryan, 2011; FAQ. 2006). Para ambas líneas celulares se realizó una dilución stock del extracto de Agraz metanol 1000 μ g/ml y de esta se agregó para las OCI AML3 1 μ l a los pozos de la fila B de la placa (concentración de 10 μ g/ml), 5 μ l a los pozos de la fila C (concentración de 50 μ g/ml) y 10 μ l a los pozos de la fila D (concentración de 100 μ g/ml) teniendo a la fila A como control (concentración de 0 μ g/ml). Para las MOLT 4 se agregó 1 μ l a los pozos de la fila F de la placa (concentración de 10 μ g/ml), 5 μ l a los pozos de la fila G (concentración de 50 μ g/ml) y 10 μ l a los pozos de la fila H (concentración de 100 μ g/ml) teniendo a la fila E como control (concentración de 0 μ g/ml) La dosificación se realizó con el extracto Agraz metanol (mayor capacidad antioxidante) por un lado para todas las líneas celulares y

con la doxorubicina por otro lado para las células OCI AML-3 ya que por muerte de las células MOLT4 no se pudo seguir trabajando con esta línea celular. Luego de dosificar cada placa, se almacenó en la incubadora a 37°C, con CO₂ 5% y se realizó el conteo de células vivas por hemocitómetro con tripan azul (Thorkild et al 1985; C. Phelan and Lawler, 1997) a las 48h, 72h y 96h. Se calculó el porcentaje de disminución de la proliferación causada por el extracto y la doxorubicina, estos los resultados se expresaron en $\mu\text{g/ml}$ de extracto y en ng/ml de doxorubicina (Ryan, 2011; FAQ. 2006).

Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software IBM SPSS Statistics 19. Se realizaron pruebas ANOVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenoles totales

Se encontró una mayor cantidad de fenoles totales en el jugo de Agraz $2333,73 \pm 76,01$ mg de ácido gálico/100g de extracto (ver **Tabla 1**) a diferencia de lo encontrado en la publicación de Garzón, (2010) en la cual dice que el agraz tiene un contenido de fenoles totales de $758,6 \pm 62,3$ mgAG/100g. En contraste, esta cantidad de fenoles encontrados en el Agraz es mayor a la encontrada en varias frutas como *V. floribundum* de Ecuador (882mgAG/100g) (Vasco et al.2009) *V.myrtillus* 525 mgAG/100g de América del Norte y un rango de entre 190 y 473mgAG/100g de variedades de *V.corymbosum*, *V.ashei* y *Vaccinium angustifolium* (Garzón, 2010), aunque comparando estos resultados con los resultados con los métodos de extracción con metanol (MeOH), agua (H₂O) y metanol agua (MeOH:H₂O) vemos que tienen un contenido de fenoles totales menor que el propuesto por Garzón (2010). Por lo tanto se puede decir que la cantidad de compuestos fenólicos totales en una muestra determinada puede verse afectada por el método de extracción o por el proceso de liofilización ya que al realizar las pruebas del jugo sin ningún método de extracción específico o proceso de liofilización se observa una altísima cantidad de fenoles en comparación a las propuestas en la publicación de Garzón (2010) aunque cabe resaltar que estas diferencias de resultados también pueden estar mediadas simplemente por la

variación cuantitativa de los diferentes estadios fisiológicos y de desarrollo del fruto (Kause et al, 1999).

RFC - Agraz				
mg AG/ 100g *	Extracto en:			
	Jugo Líquido	MeOH	H2O:MeOH	H2O
1	2407,7	111,2	37,8	97,9
2	2255,8	113,4	48,1	103,0
3	2337,7	113,0	46,7	57,3
Media	2333,7	112,5	44,2	86,1
DesvStd	76,0	1,2	5,6	25,1
RSD,%	3,3	111,2	12,6	29,1

* mg de Acido gálico por 100 gramos de muestra

Tabla 1 RFC totales de los diferentes métodos de extracción

Caracterización del potencial antioxidante del Agraz

Los extractos que tuvieron mayor capacidad antioxidante en comparación a los controles (Trolox y VitC **Tabla 2**) fueron el de metanol (MeOH) por DPPH siendo 63,4,± 3,3 ppm al minuto 30 y el del jugo sin liofilizar por ABTS siendo 64,4,± 3,2 ppm al minuto 30 (ver **Tabla 2**) debido a que la interacción de los diferentes compuestos antioxidantes con los radicales, depende en gran medida de su composición estructural ya que ciertos compuestos reaccionan más rápidamente con el ABTS o el DPPH, el DPPH es netamente lipofílico mientras que el ABTS es lipofílico e hidrofílico así que se presume que en el extracto de MeOH hay mayor cantidad de compuestos hidrofílicos mientras que en el jugo sin liofilizar hay más presencia de compuestos lipofílicos. El extracto que tuvo menor capacidad antioxidante fue el Agraz MeOH:H₂O por ABTS y DPPH (**Tabla 2**) debido a las propiedades del agua para diluir el metanol y pocos compuestos polares. Se decidió dosificar las células con el extracto de Agraz MeOH ya que no se le puede administrar una transfusión de jugo a un paciente, esta medición del jugo se realizó más que todo para comprobar cómo afecta el proceso de extracción y liofilización la cantidad de compuestos antioxidantes presentes en el Agraz además de la falta de metanol en el laboratorio.

IC 50 [ppm]

Extractos de agraz en:

No.2	MeOH		H ₂ O:MeOH		H ₂ O		Jugo sin Liofilizar		Jugo Liofilizado	
	ABTS ^a	DPPH ^b	ABTS ^a	DPPH ^b	ABTS ^a	DPPH ^b	ABTS ^a	DPPH ^b	ABTS ^a	DPPH ^b
1	163,4	60,8	3006,0	724,9	760,6	147,8	67,5	211,8	891,0	1296,3
2	146,2	67,0	2912,2	718,3	617,8	154,0	64,8	202,9	956,5	1325,5
3	146,8	62,3	3046,9	718,3	721,1	162,4	61,1	232,3	959,4	1325,7
Media	152,1	63,4	2988,4	720,5	699,9	154,7	64,4	215,7	935,7	1315,9
DesvStd	9,8	3,3	69,0	3,8	73,8	7,3	3,2	15,1	38,7	16,9
RSD,%	6,4	5,1	2,3	0,5	10,5	4,7	5,0	7,0	4,1	1,3

a : 30 min (to) b : 30 min (to)

Tabla 2. IC 50 [ppm] de los diferentes extractos de agraz por ABTS y DPPH al min 30.**Pruebas químicas preliminares**

MUESTRA	PRUEBA	RESULTADO
Agraz MeOH	Lieberman-Burchard. (esteroides y esteroides)	+ (rosa)
	Salkowski (terpenos)	+ (rojo)
	Baljet (terpenos y esteroides)	- (rojo)
	Hidroxamato férrico(Sequiterpenlactonas)	+ (café)
	Shinoda.(flavonoides y fenoles)	+ (rojo)
	Cloruro férrico (FeCl ₃) (flavonoides y fenoles)	+ (verde intenso)
	Antrona (Glicósidos de flavonoides o de terpenos)	- (sin anillo)
	Dragendroff (Alcaloides)	- (sin precipitado)
Agraz Jugo	Lieberman-Burchard. (esteroides)	+ (rosa)
	Salkowski (terpenos)	+ (rojo)
	Baljet (terpenos y esteroides)	+ (amarillo)
	Hidroxamato férrico(Sequiterpenlactonas)	+ (café)
	Shinoda.(flavonoides y fenoles)	+ (rojo)
	Cloruro férrico (FeCl ₃) (flavonoides y fenoles)	+ (verde intenso)
	Antrona (Glicósidos de flavonoides o de terpenos)	- (sin anillo)
	Dragendroff (Alcaloides)	- (sin precipitado)

Tabla 3. Resultados de los ensayos preliminares en extractos agraz.

Los resultados de las pruebas químicas preliminares (**Tabla 3**) muestran similitud de compuestos en el jugo del Agraz y la extracción hecha en MeOH, por lo menos de forma cualitativa proponiendo que el método de extracción funciona aunque por los

resultados de capacidad antioxidante se podría decir que puede existir una diferencia en la cantidad y/o presencia de compuestos en el jugo y la extracción con MeOH.

SOLVENTE	MUESTRA	SOLUBILIDAD
Dimetilsulfoxido	Agraz jugo	++
	Agraz MeOH	+++
Butanol	Agraz jugo	+
	Agraz MeOH	++
Acetonitrilo, Éter de petróleo y Cloroformo.	Agraz jugo	-
	Agraz MeOH	-
Metanol y Etanol	Agraz jugo	+++
	Corozo jugo	+++
	Agraz MeOH	+++

Tabla 4 Los resultados de la prueba de solubilidad.

Los resultados de la prueba de solubilidad se realizaron con los solventes disponibles en el laboratorio, esta prueba mostró que en los solventes apolares (**Tabla 4**) como es el caso del acetonitrilo, éter de petróleo y cloroformo la solubilidad es nula y que en los solventes polares existe solubilidad así sea baja, indicando que las muestras son polares, por esta razón no solubilizó en cloroformo y las pruebas químicas preliminares se hicieron en dilución de etanol (EtOH).

Efecto del extracto de Agraz MeOH y de la doxorrubicina en la proliferación celular de células OCI AML-3 y MOLT 4

La proliferación celular disminuyó con el extracto de Agraz MeOH en las células OCIAML3 (**Fig. 2**) estadísticamente existe una diferencia significativa (sig 0,000 $p \leq 0,05$) entre las medias de todas las concentraciones probadas 0ug/ml (Control), 10µg/ml, 50µg/ml y 100 µg/ml sin embargo no fue una disminución biológicamente significativa siendo esta de 11,8% con la dosis de 10ug/ml, 20,8% con la dosis de 50ug/ml y 24,4% con la dosis de 100 ug/ml, para las células MOLT 4 (**Fig. 3**) el resultado fue similar biológicamente pero estadísticamente fue igual (sig 0,969 $p \leq 0,05$) entre las medias de todas las concentraciones probadas 0ug/ml (Control), 10µg/ml, 50µg/ml y 100 µg/ml probablemente debido a que no hay muchos datos para comparar por lo que se realizo

el conteo únicamente a las 48 y 72h. Así mismo, biológicamente no se obtuvo una disminución en la proliferación significativa ya que se obtuvieron valores de 2,4% con la dosis 10ug/ml, 12,8% con la dosis 50ug/ml y 23,0% con la dosis 100ug/ml por lo tanto en ninguno de los dos ensayos existe una dosis respuesta así que el paso a seguir fue caracterizar la proliferación celular con doxorubicina.

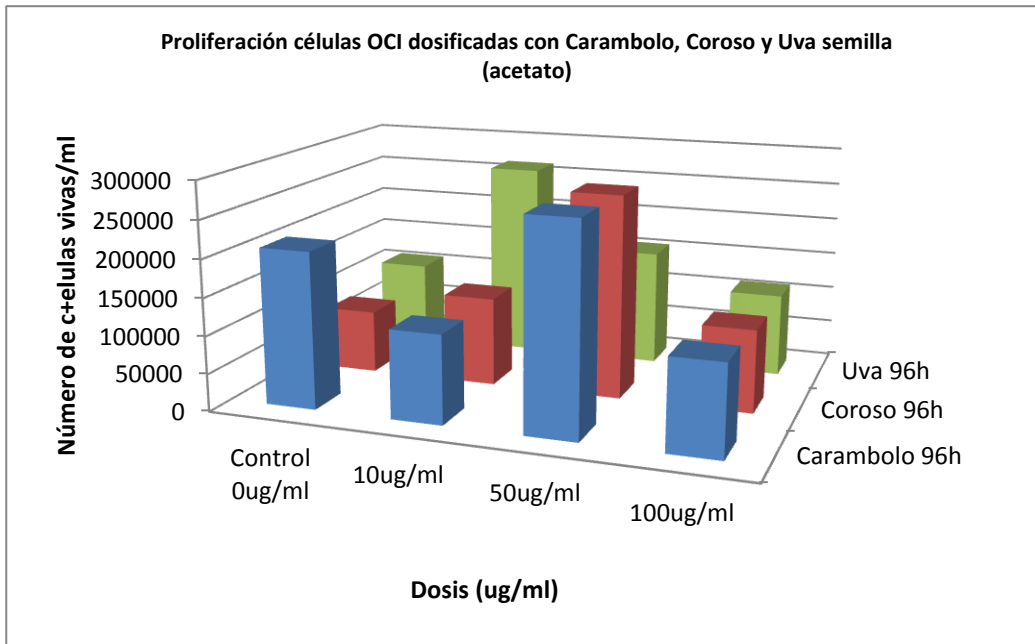


Fig. 2 Proliferación células OCI AML-3 con el extracto de Agraz MeOH a concentraciones de 0ug/ml (Control), 10ug/ml, 50ug/ml y 100 ug/ml, Conteos a las 48, 72 y 96h.

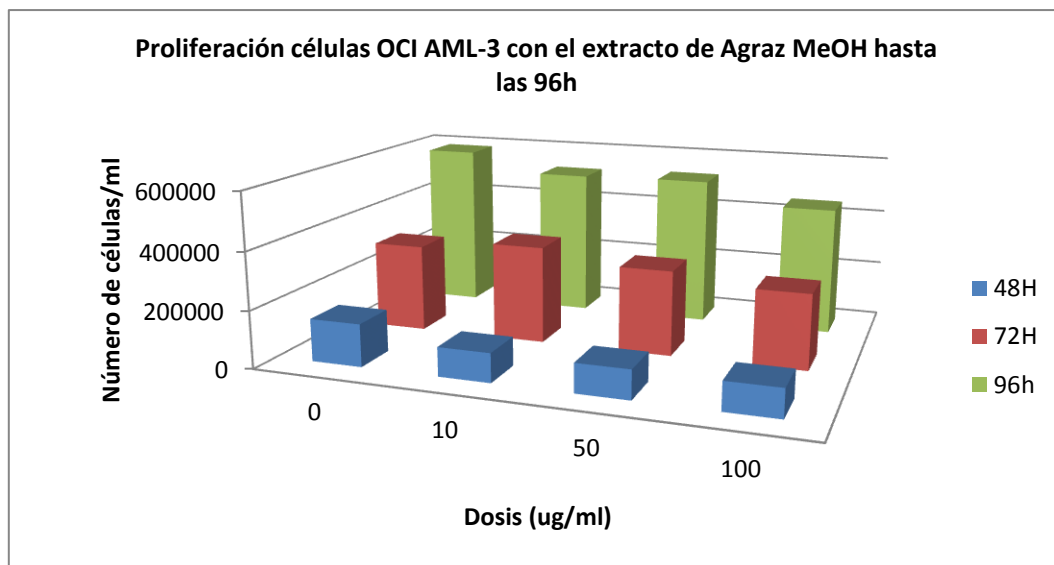


Fig. 3 Proliferación células MOLT4 a concentraciones de 0ng/ml (Control), 100ng/ml, 50ng/ml y 10ng/ml hasta las 72h. Conteo a las 48 y 72.

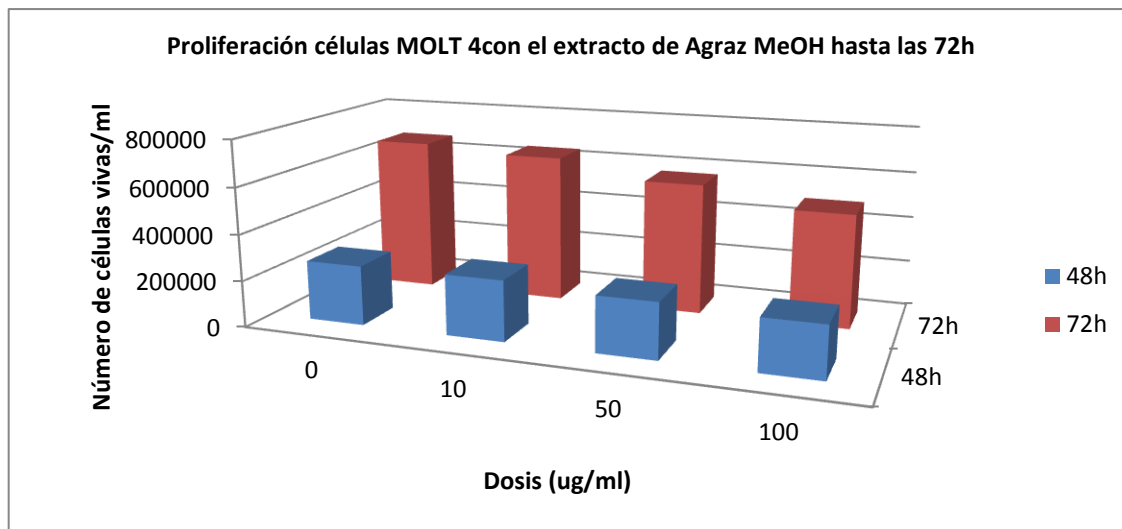


Fig. 4 Proliferación células OCI AML-3 con Doxorrubicina a concentraciones de 0ng/ml (Control), 10ng/ml, 25ng/ml y 50ng/ml hasta las 96h. Conteo a las 48, 72 y 96h

El extracto de agraz inhibe la proliferación celular aunque no de forma significativa, el mecanismo por el cual el extracto inhibe la proliferación es incierto pero como lo han dicho otros autores en estudios sobre citotoxicidad puede deberse a la inducción de la apoptosis (Shih, P.H. *et al*, 2005) por vías como las de la NF-kB y AP1 (Wang *et al*, 2007), la inhibición de algunas enzimas como las ciclooxigenasas (Seeram *et al*, 2003) o algunos otros factores.

Debido a que no se pudo seguir trabajando con la línea celular MOLT 4 se probaron otros extractos en la línea OCI AML3, obteniéndose resultados bastante ambiguos debido a que con el extracto de carambolo obtenido en MeOH (**Fig. 5**), se observa disminución en la proliferación celular en las dosis de 10ug/ml y 100ug/ml pero se observa un aumento en la proliferación en la dosis de 50ug/ml así que es algo contradictorio, con el extracto obtenido en MeOH del corozo pasa algo parecido ya que se observa un aumento leve en la proliferación en las dosis de 10ug/ml y 100ug/ml y por el contrario en la dosis de 50ug/ml vemos mayor proliferación que en las dos anteriores. En el extracto de uva hecho con acetato de etilo, se observa un aumento considerable en la proliferación celular con la dosis de 10ug/ml, un aumento leve en la dosis de 50ug/ml mientras que la dosis de 100ug/ml permanece con un número de células semejante al control, por esto se podría decir que a bajas concentraciones puede haber un efecto de pro-proliferación, mientras que a concentraciones altas puede

existir un efecto de inhibición en la proliferación, aunque faltaría demostrar esta proposición realizando nuevos ensayos con concentraciones mayores. Estos resultados ambiguos pueden deberse a fallas en el pipeteo, en el recuento de células, etc. y por eso se recomienda repetir el ensayo.

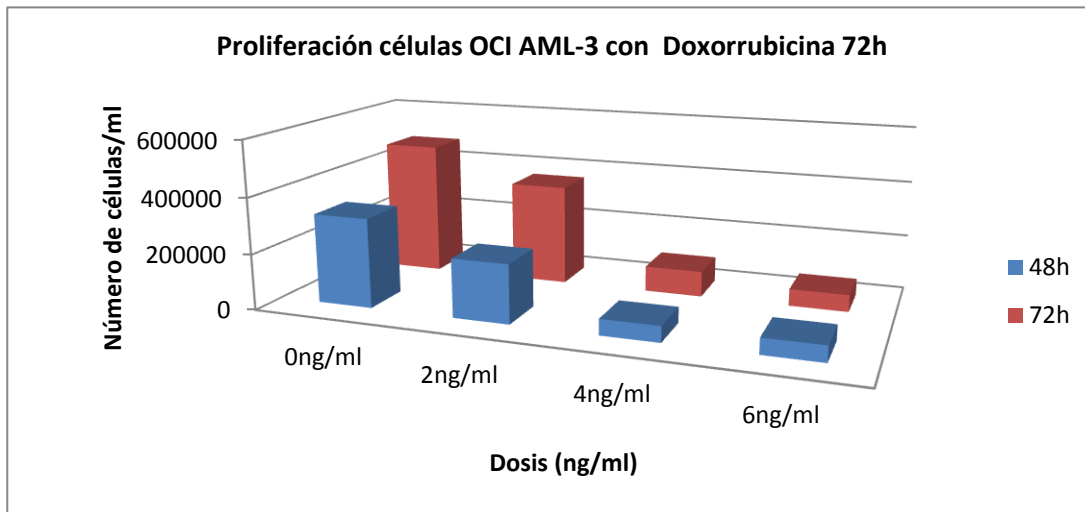


Fig. 5 Proliferación células OCI AML-3 con Doxorrubicina a concentraciones de 0 ng/ml (Control), 2 ng/ml, 4 ng/ml y 6 ng/ml hasta las 72h. Conteo a las 48 y 72.

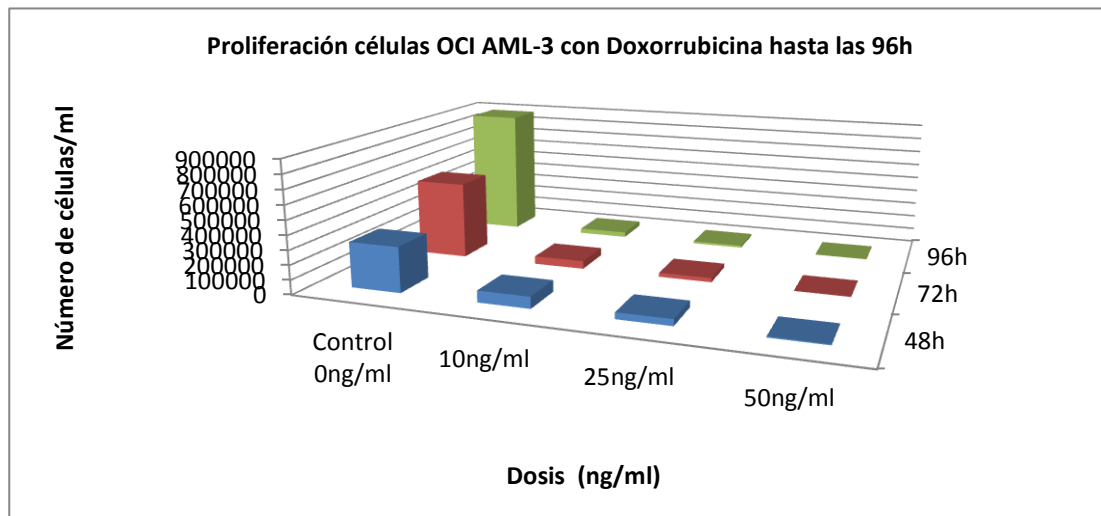


Fig. 6 Proliferación células OCI AML-3 con Doxorrubicina hasta las 96h a concentraciones de 0 ng/ml (Control), 10 ng/ml, 25 ng/ml y 50 ng/ml hasta las 96h. Conteo a las 48, 72 y 96h

El efecto de la doxorubicina en la proliferación de células OCIAML3 (**Fig. 5**) con concentraciones de 0ng/ml (Control), 10ng/ml, 25ng/ml y 50ng/ml no fue significativo estadísticamente ($0,845p\leq 0,05$) ya que las concentraciones probadas disminuían mucho la proliferación celular y sus medias eran estadísticamente iguales. Por otro lado, biológicamente si fueron significativas ya que a muy bajas concentraciones se esta inhibiendo la proliferación celular en un 84,1% con la dosis de 10ng/ml, 91,3% con la dosis de 25ng/ml y 98,8% con la dosis de 50ng/ml, se repitió el experimento pero esta vez las dosis fueron mucho mas pequeñas, 2ng/ml, 4ng/ml y 6ng/ml y vemos que en la dosis de 2ng/ml (**Fig. 6**) se observa mejor el comportamiento de las células la doxorubicina con un porcentaje de inhibición del 29% para la dosis de 2ng/ml, 81% para la dosis de 4ng/ml y 85% para la dosis de 6ng/ml así que en estudios futuros se piensa probar dosis con concentraciones menores junto con el extracto de agraz para observar si existe un efecto del extracto de agraz y la quimioterapia (sinérgico, antagonico,etc).

Conclusiones

Es necesario repetir la dosificación de los extractos de carambolo, uva y coroso ya que son resultados muy ambiguos .El IC 50 del Agraz en las pruebas antioxidantes disminuye con el tiempo debido a que el extracto sigue reaccionando con el ABTS o DPPH hasta que la reacción se estabiliza. El jugo de agraz puede ser una buena herramienta de investigación de la citotoxicidad para el futuro debido a los resultados de su capacidad antioxidante. La Doxorubicina tiene un efecto mayor en la disminución de la proliferación de células OCI AML3 (85%) que la del extracto de Agraz MeOH (24%).

Recomendaciones

- Realizar fraccionamiento de muestras ya que solo algunos compuestos presentes en los extractos pueden influir en la disminución de la proliferación celular por ejemplo; el número y posición de OH en el anillo B inhiben ó activan algunas enzimas.

Referencias

1. Andersen M., & Jordheim, M. 2006. The anthocyanins. In Ø. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids* (2nd ed.. Chemistry, biochemistry and applications, pp. 452–471). Boca Raton, FL: CRC Press.
2. Appelbaum FM. 2007. The acute leukemias. In Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007: chap 194.
3. Arts M, Dallinga S, Voss H P, Haenen G, Bast A. 2004. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem* 88:567-570.
4. Brand-Williams, Cuvelier and Berset.1994. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28:25-30 (1995)
5. Bendaoud H, Romdhane M, Souchard JP, Cazaux S, Bouajila J. 2010. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *J Food Sci.*;75(6):C466-72.
6. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z.,&Ferencik, M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.*, 65,1865–1874.
7. Berk A, Lodish H. 2005. *Biología Celular Y Molecular/ Molecular and Cellular Biology*, Ed. Médica Panamericana, ISBN9500613743, 9789500613743N.º de páginas973 páginas
8. Bilbao M. 1997. Análisis fitoquímico preliminar: química de productos naturales. Armenia: Universidad del Quindío. 183p.
9. Bucher L, Giddens JF, O'Brien P, Lewis SM. 2004. *Enfermería medicoquirúrgica: valoración y cuidados de problemas clínicos*. Edición6. Elsevier España,ISBN8481747238, 9788481747232N.º de páginas 2036 páginas
10. Cadenas, E. 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6, 391–397.
11. Cadenas, E., & Sies, H. (1998). The lag phase. *Free. Radic. Res.*, 28, 601–609.
12. Canter, P. H., & Ernst, E. 2004. Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (bilberry) for night visions a systematic review of placebo controlled trials. *Survey of Ophthalmology*, 49, 38–50.
13. Castañeda-Ovando A, Pacheco-HernándezMa, Páez-Hernández Ma, Rodríguez J, Galán-Vidal C. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* Volume 113, Issue 4, 15 April 2009, Pages 859-871
14. CIAT. 2011. <http://webapp.ciat.cgiar.org/inicio.htm>. Página consultada el 10 de septiembre del 2011.
15. Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H. V. 2000. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Chemistry*, 80, 1307–1313.
16. EMORY UNIVERSITY, Winship Cancer Institute.2008. © 2008 Emory University. Derechos Reservados. Dirigir preguntas y comentarios a cancerquest@emory.edu. Modificación más reciente July 29, 2008 <http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=494&lang=spanish>. Consultada el 4 de julio del 2011.
17. Escribano MT, Santos-Buelga C. polyphenol extraction from foods Chapter 1, <http://kurdchemists.org/files/Polyphenols.pdf> consultada el 22 de septiembre de 2011

18. FAQ. 2006. FAQs for Suspension Cells for ICW Protocols. The most recent version of this protocol is posted at <http://biosupport.licor.com/support>.
19. Ghafourifar, P., & Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.*, 26, 190–195.
20. Garzón G. 2008 .las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión Anthocyanins as Natural Colorants and Bioactive Compounds. A Review. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 13 No. 3, 27 – 36.
21. Garzón G, Narváez C, Riedl K, Schwartz S. 2009. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale Swartz*) from Colombia. *Food Chemistry* 122 (2010) 980–986.
22. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation—A mechanism in common. *Science*, 119, 623–626.
23. Gil-Loyzaga P. ¿?. *Cultivo de Celulas Animales y Humanas*. Visión Libros ISBN8499837379, 9788499837376
24. Hofseth, L. J., Hussain, S. P., & Harris, C. C. 2004. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25, 177–181.
25. ICA, 2011, <http://www.ica.gov.co/>.Página consultada el 10 de septiembre del 2011.
26. Jaramillo F, Montoya L, 2004, Mortalidad por cáncer en Colombia 2001. *Revista CES MEDICINA Volumen 18 No.2*.
27. Jemal A, Bray F, Melissa M, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics CA: A Cancer Journal for Clinicians Volume 61, Issue 2, pages 69–90, March/April 2011
28. Kähkönen, M. P., Hopla, A. I., & Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076–4082.
29. Kamei, H.; Kojima, T.; Hasegawa, M.; Koide, T.; Umeda, T.; Yukawa, T.; Terabe, K. 1995. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer InVest.*, 13, 590-4.
30. Kause, A., Ossipov, V., Haukioja, E., Lempa, K., Hanhimäki, S., & Ossipova, S. 1999. Multiplicity of biochemical factors determining quality of growing leaves. *Oecologia*, 120, 102–112.
31. Konczak, I., & Zhang, W. 2004. Anthocyanins-more than nature´s colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 239–240.
32. Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923–933.
33. Kuskoski M, Agustín G. Asuero A. Troncoso, Mancini J, Roseane fett3. 2005. aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cien. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4): 726-732, out.-dez.
34. Liochev, S. I., & Fridovich, I. (1994). The role of O₂ in the production of HO: In vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 29–33.
35. Lonza. 2011. http://www.lonzabio.com/no_cache/extras/cell-transfection-database/cell-details/cell/530/, página consultada el 14 septiembre 2011
36. Montoya C, Ospina C, Mesa N, Cano C, Arias M, García P, Martínez A, Tenorio A, Pérez Y, Rojano B. 2009. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale*

- SW) Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (6), 519 – 528.
37. National Research Council (U.S.). Advisory Committee on Technology Innovation .1989. Lost crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Edición reimpressa National Academies, 415 páginas.
 38. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., & Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBPDNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. *J. Mol. Biol.*, 304, 55–68.
 39. Pezzuto, J. 1997. Plant - derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 53: 121-133.
 40. Phelan, M and . Lawler, G. *Current Protocols in Cytometry*(1997) A.3A.1-A.3A.4 Copyright © 1997 by John Wiley & Sons, Inc.
 41. Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., et al. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686–2693.
 42. Re, R., Pellegrinni, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical in Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
 43. Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins.
 44. Helsinki: University of Helsinki. pp. 10–14.
 45. Ryan J, Corning incorporated life sciences. 2011. *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook-2nd Edition*.
 46. Sanabria A.1983. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
 47. Seeram. N, Zhang. Y, and Nair. M, Inhibition of Proliferation of Human Cancer Cells and Cyclooxygenase Enzymes by Anthocyanidins and Catechins. *Nutrition and Cancer*, 46:1, 101-106
 48. SIAC, 2011 <http://www.siac.gov.co/portal/default.aspx>. Página consultada el 10 de septiembre del 2011.
 49. Shih, P.H. et al. (2005) Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem. Toxicol.*, 43, 1557–1566.
 50. Singh AP, Singh RK, Kim KK, Satyan KS, Nussbaum R, Torres M, Brard L, Vorsa N. Cranberry . 2009. Proanthocyanidins are cytotoxic to human ca. *Phytother Res.* (8):1066-74.
 51. Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158.
 52. Wang S, Feng R, Bowman L, Lu Y, Ballington J, Ding M. 2007. Antioxidant Activity of *Vaccinium stamineum*: Exhibition of anticancer capability in human lung and leukemia cells.
 53. Taylor & Francis Group. 2006. *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications / edited by Øyvind M. Andersen and Kenneth R. Markham*. ISBN 0-8493-2021-6

54. Thorkild C, Hansen B. Proceedings of the IUB Symposium No. 144: the Seventh International Lectin Meeting, Bruxelles, Belgium, 1985. Volumen 5 de Lectins--biology, biochemistry, clinical biochemistry Proceedings of Iub Symposium No 144, 7th International Lectin Meeting, Bruxelles, Belgium Número 144 de I.U.B. symposium series. W. de Gruyter, 1986 ISBN0899251021, 9780899251028.
55. Toro J, Vanegas G. 2002. Flora de los páramos y bosques alto andinos del noroccidente medio de Antioquia.
56. Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12, 1161–1208.
57. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 44–84
58. Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. 2009. Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8274–8281.
59. Wang, H.; Nair M. G.; Strasburg, G. M.; Chang, Y.; Booren, A. M.; Gray, J. I.; DeWitt, D. L. 1999. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J. Nat. Prod.* 62, 294-296.
60. Wang S, Feng R, Bowman L, Ballington J, Ding M. 2007. Antioxidant activity of *Vaccinium stamineum*: Exhibition of anticancer capability in human lung and leukemia cells. *Planta Med* 2007;73:451-460. ISSN 0032-0943.
61. Winchester D. 2001. Cáncer de mama Atlas de oncología clínica . Elsevier España, ISBN8481745367, 9788481745368 N.º 298 páginas.
62. World Health Organization. 2008. The Global Burden of Disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization.
63. www. ATCC.COM consultada el 22 de octubre 2011.
64. Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. 2004. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6122–6128.
65. Yang, C.S. et al. (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*, 21, 381–406.
66. Yi, W. et al. (2005) Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8804–8812.
67. Zhao L, Wientjes G, L-S J. Au. 2004. Evaluation of Combination Chemotherapy Integration of Nonlinear Regression, Curve Shift, Isobologram, and Combination Index Analyses. 10.1158/1078-0432.CCR-04-1087 *Clin Cancer Res.*
68. Zu XY, Zhang ZY, Zhang XW, Yoshioka M, Yang YN, Li J. 2010. Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD-1 and COLO205 cells. *Chin Med J (Engl)*. 2010 Oct;123(19):271