

METAANÁLISIS DE EXPERIENCIAS O INHIBICIÓN CELULAR INTENTADA CON EXTRACTOS DE PLANTAS Y VERIFICADA MEDIANTE LA TÉCNICA XTT

META-ANALYSIS OF EXPERIENCES OR CELULAR INHIBITION TRIED WITH PLANT EXTRACTS AND VERIFIED BY THE XTT TECHNIQUE

José Amiel Pérez^{1,2}, Nathaly Enciso¹, Alejandro Fukusaki², José Amiel Sáenz³

RESUMEN

Se hace un metaanálisis de seis artículos publicados en la revista *Científica* y la *Revista de la Sociedad Química del Perú* en los que se utiliza la técnica XTT para hacer una determinación celular, verificar si hay inhibición o estímulo del crecimiento de células en la búsqueda de sustancias citotóxicas o de expansión de células madre, a partir de plantas cultivadas en el Perú. Se han seleccionado siete variables, de las cuales las más importantes son la variable independiente VI, los solventes, la absorbancia y el control blanco. Los resultados muestran muchas diferencias en cada una de estas variables que imposibilitan que se cumpla el objetivo fundamental del metaanálisis, que es aumentar el número de muestras con el fin de aplicar una estadística más consistente que permita incorporar al conocimiento científico nuevas evidencias. Así, la longitud de onda varía, en cada caso, 450 nm, 540 nm y 560 nm. Los solventes con expresiones cualitativas distintas son agua y metanol, y las variables independientes son los extractos de plantas con y sin fraccionar, que pueden encontrarse incluidas variables de confu-

sión (intervenientes) por su complejidad. En conclusión, a este estudio no se le podrá aplicar estadística, pero sí será muy útil para mejorar la técnica XTT, cuando se investiga con plantas medicinales.

Palabras clave: metaanálisis, técnica XTT, inhibición celular, expansión celular, plantas medicinales.

ABSTRACT

A meta-analysis is made of six articles published in the *Científica Journal* and the *Journal of the Chemical Society of Peru* where the technique XTT is used, for making a cell count, determine whether there is inhibition or stimulation of cell growth in the search for cytotoxic substances or stem cell expansion, from plants grown in Peru. Seven variables have been selected, the most important are: The independent variable VI, solvents, absorbance and white control. The results show many differences in each of these variables which prevent the fundamental objective of the meta-analysis which is to increase the number of samples with the objective to apply more consistent statistics that will allow incorporating new evidence to scientific knowl-

¹ LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

² LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

³ ESCUELA DE INGENIERÍA DE SISTEMAS, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

edge. Thus, the wavelength varies in each case: 450nm, 540nm, 560nm and 600nm.

Solvents with different qualitative expressions are water and methanol and the independent variables are the extracts with and without being fractioned; confounding variables (participants) may be included as well, because of its complexity. In conclusion to this study, statistics may not be applicable but will be very useful to improve XTT technique when investigating medicinal plants

Keywords: Meta-analysis, technical XTT, cell inhibition, cell expansion, medicinal plant

I. INTRODUCCIÓN

El metaanálisis es un método de investigación muy utilizado en ciencias sociales y recientemente en psicología y medicina. Consiste en una revisión sistemática de la literatura científica existente sobre un tema específico, se observan diferencias importantes en los resultados y, si no se logra consenso, se propone realizar un análisis cuali-cuantitativo para determinar la posibilidad de aplicar correctamente pruebas estadísticas y sintetizar así, en un solo escrito, los datos de múltiples trabajos de investigación realizados sobre un mismo tema (9).

El cáncer es una enfermedad cuya incidencia aumenta de manera constante y aun cuando los tratamientos y medidas preventivas han ido mejorando, paralelamente, su incremento reciente ha sido significativo. La utilización de sofisticados aparatos emisores de radiación ionizante y los nuevos productos quimioterapéuticos han contribuido notablemente al logro de mayores éxitos en la recuperación de los pacientes. En el caso de la quimioterapia, la participación de productos fitoquímicos se ha reforzado con nuevos descubrimientos como el taxol y otros principios activos que invitan a continuar su búsqueda en el reino vegetal (1).

En el caso que nos ocupa, el Perú es un país de muchos microclimas y gran diversidad de especies vegetales por estudiar. La labor de búsqueda de sustancias anticarcinogénicas se inició seleccionando plantas nativas con antecedentes de efectos antitumorales, las que fueron estudiadas con técnicas utilizadas por muchos investigadores de la especialidad, entre ellas la XTT, que detecta el crecimiento celular y su inhibición por muerte celular (2).

Posteriormente, se aplicó la misma técnica XTT (y, eventualmente, la similar MTT) en otros trabajos realizados sobre la expansión de células madre (3, 4, 5, 6), requerida en medicina regenerativa con el objetivo de lograr cantidad suficiente para tratamientos con células madre, pero buscando que estas no se alteren por el uso de agentes estimulantes de su desarrollo, como el suero fetal bovino (SFB) (7, 8). Las células madre tienden a mutar según los factores presentes en los órganos o tejidos en los que se implantan, como también por acción de las diversas sustancias de su medio de cultivo o del ambiente en el que se las conserva.

Para efectos estadísticos, tener un mayor tamaño de muestra permitirá obtener consistentes resultados, más exactos y precisos (10). Este propósito de integrar varios trabajos individuales, y experimentales, en nuestro caso, sobre el tópico específico de la inhibición o expansión celular, exige condiciones de similitud previas que usualmente no se cumplen por razones propias del espíritu permanente de perfeccionamiento del investigador, quien constantemente y con el fin de mejorarlas, va realizando variaciones en el tratamiento, los métodos y las técnicas empleadas, que derivan de su experiencia en el laboratorio y de la literatura científica actualizada que normalmente va apareciendo, variación que es mejor cuando se trata de investigadores diferentes. Para disminuir

estas variaciones se decidió hacer un análisis del trabajo llevado a cabo, es decir, un autometaanálisis (11).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Los medios de cultivos utilizados para el crecimiento y multiplicación de células madre se integran con sustancias que estimulan su desarrollo. La más utilizada con ese fin es el suero fetal bovino (SFB).

Por su estructura muy cercana a la del genoma del hombre y de los mamíferos con altas posibilidades de mutación de la célula madre de origen humano, se decidió reemplazar el SFB por extractos de plantas medicinales cultivadas en el Perú para el caso de la expansión de células madre; además, también para la búsqueda de plantas antitumorales en las que se trata de determinar la inhibición del crecimiento celular por los extractos vegetales.

TÉCNICA XTT

Esta técnica permite detectar células metabólicamente activas, es decir, células vivas (2). Solamente estas son capaces de reducir mediante sus enzimas mitocondriales las sales de tetrazolium, siempre que las células que se estudien puedan emitirlos, es decir, que estén vivas. Estas enzimas transforman las sales de tetrazolium, originalmente de color transparente o ligeramente amarillo, en un compuesto de formazán de color francamente anaranjado, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de células vivas existentes, coloración cuya intensidad en las experiencias exitosas de expansión deberá haber aumentado significativamente (12). En cambio, al morir las células por acción de las sustancias citotóxicas de los extractos vegetales antitumorales, dejan de inmediato de emitir estas enzimas, con lo que desaparece o disminuye sensiblemente la coloración naranja que

sí se observará en la prueba comparativa de control positivo.

Sin embargo y a pesar de presentarse la XTT como una prueba muy específica, son muchos los factores que pueden distorsionar los resultados a obtenerse. Cualquier color igual o similar que presente la variable independiente (VI, causa) u otras variables de confusión pueden afectar los resultados a esperar en una determinada prueba y que no corresponderán al efecto (variable dependiente, VD), lo que distorsiona los valores reales que sí corresponderían al efecto esperado.

Muchos otros fenómenos concomitantes en el proceso mismo también pueden modificar (13, 14, 15, 16, 17) sensiblemente los resultados: temperatura, pH, contaminaciones, luz, etc.

ANÁLISIS DE VARIABLES

Para poder utilizar los datos finales de todas y cada una de las experiencias publicadas, que son seis, y aplicarles pruebas estadísticas válidas y de baja dispersión, es necesario hacer un análisis de las variables que interesan y que hemos considerado en este estudio. Estas son las siguientes:

- Variable independiente
- Absorbancia
- Solventes
- Medio nutritivo
- Prueba en blanco
- Control positivo
- Células utilizadas
- Efecto esperado de la variable independiente

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto los resultados de la densidad óptica (DO) como las observaciones y recomendaciones se muestran en las columnas de la derecha del cuadro que observamos a continuación.

EXPANSIÓN E INHIBICIÓN DE CÉLULAS MADRE Y CARCINOGENICAS: RESULTADOS PUBLICADOS

Revista y fecha de publicación	Título	Variante independiente (VI)	Solventes para extracción	Absorbancia	Medio nutritivo (MN) y Medio de cultivo (MC)	Prueba en blanco	Control positivo	Células utilizadas y efecto esperado de la variante independiente (VI)	Resultados: Densidad óptica (DO), o TIC de inhibición y de TEC estimulación celular en %	Observaciones y recomendaciones
Científica Volumen 5, número 3/4 01/12/2008	Efectos sobre la proliferación de fibroblastos y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de plantas medicinales peruanas	Extracto hidroalcohólico de 7 plantas, con 3 dosis: 20, 33 y 100 µg <i>Buddleja globosa</i> MATCO, <i>chorisia speciosa</i> Palo borracho, <i>Chuquiraga rotundifolia</i> Huamanpinta, <i>Muehlenbeckia volcanica</i> Berth Mullaca, <i>Bidens pilosa</i> Amor seco, <i>Scorzonera hispánica</i> Escorzonera, <i>Malachra alceaifolia</i> Malva	Hidroalcohólicos, etanol - agua 4:1 (V/V)	Lector de Elisa del Hospital Militar. 450-655 nm	MC - MN: RPMI-1640 - A, P+E (antibióticos) No indicado en pu-blicación - DMSO (Viabilizador) No indicado en publicación, - SFB al 10% (estimulante)	Medio de cultivo (MC) sin extracto pero con solventes	5-Fluoruracilo (5-FU) 24 horas 0,555 48 horas 0,370	Prueba por triplicado (igual que controles) 5000 células de fibroblastos primarios. Vi-Citotóxica Fórmula para el cálculo de: TIC = $\frac{DO \text{ DE CÉLULAS TRATADAS}}{DO \text{ DE CÉLULAS CONTROL}}$	Destaca de las 5 plantas que estimulan: <i>Buddleja globosa</i> con TIC de -126.57%, a 48 horas y dosis de 100 µg, DO 2,253 Plantas que inhiben: <i>Scorzonera hispánica</i> , con 33 µg a 24 horas DO de 0.577 Y TIC de 62.8%, y a 48 horas DO de 0.715 Y 28.8% de TIC. Con 20 µg a 24 horas DO 0.550 y TIC de 66.8%, y a 48 horas, DO 0.697 y TIC de 30.6% <i>Malachra alceaifolia</i> , 20 µg a 48 horas con DO 0.712, 100 µg a 48 horas y TIC de 29,1% con DO 1,412 y una TIC de - 41,6%	1) Se observa que no se ha usado un blanco apropiado. 2) Para S. Hispánica y M. Alceaifolia se recomienda programar su calidad inhibidoras, a las dosis 10 µg, 20 µg y 33 µg, con técnicas mejoradas.
Científica Volumen 6, número 2 01/08/2009	Diferentes efectos sobre la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos por extractos de <i>Buddleja incana</i>	Extractos de <i>Buddleja incana</i> con dosis: 155, 254, y 769 µg	Hidroalcohólico (metanol-agua 4:1 V/V) Hexano, cloroformo, metanol y agua	Lector de Elisa del Hospital Militar. 450-655 nm	MC ID. Anterior	Medio de cultivo (MC) sin extracto, con solvente	5-FU 43,1%	Prueba con tres muestras por dosis. Igual en controles. 5000 células de fibroblastos primarios. Vi-Citotóxica No se presenta fórmula para el cálculo de $\frac{DO}{TIC} \cdot 1 \times 100$ TE=	Aplicando la tasa de inhibición TIC: Extractos con Hexano 45.8%, Cloroformo 42.9% y acuoso 59.4% Aplicando la tasa de inhibición TIC: Extractos con Hexano 45.8%, Cloroformo 42.9% y acuoso 59.4%. Tasa de estimulación TEC: Hidroalcohólico 180.6% Metanólico 282.6%	1) ¿5-FU es el control apropiado? 2) Se observa que no se ha usado un blanco adecuado. 3) No se muestra fórmula de cálculo utilizada
Revista de la Sociedad Química del Perú Volumen 76 (1) 2010	Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de cuatro plantas medicinales y estimulación de la proliferación de fibroblastos	Extractos de <i>Bixa orellana</i> , <i>Eupatorium triplernerve</i> , <i>Phisalis peruviana</i> y <i>Equisetum arvense</i> con dosis 154, 254 y 769 µg/ml	Hidroalcohólico metanol-agua 4:1 V/V)	Lector de Elisa del Hospital Militar. 450-655 nm	MC ID. anterior Se usó tripsina al 0.5%, como agente disociador de células	MC sin extracto, con solvente	SFB AL 10%	Prueba con tres muestras. Igual con controles 5000 células de fibroblastos Vi-Citotóxica No se presenta fórmula para el cálculo de TEC	Aplicando la TEC, Tasa de estimulación celular, a 24 y 48 horas. 1) <i>Equisetum arvense</i> -Cola de caballo 277 y 277 % 2) <i>Phisalis peruviana</i> -Aguyamanto 164 y 168% 3) <i>Bixa orellana</i> -Achiote 155 y 204% 4) <i>Eupatorium triplernerve</i> -Asmachilla - 75 y 76%	• Los resultados estimulantes del crecimiento no concuerdan con los de otros trabajos científicos, que por el contrario son inhibidores.

Metaanálisis de la técnica XTT utilizada en estudios de extractos de plantas en la inhibición o expansión celular

<p>Científica Volumen 7, número 3 01/12/2010</p>	<p>Efecto de la <i>Buddleja incana</i> sobre la proliferación de células de carcinoma hepato celular humano (Hep G2)</p>	<p>Extractos de 5, 30 y 60 µg/ml a) Extracto acuoso de <i>Buddleja incana</i> b) Extracto metanólico de <i>Buddleja incana</i> c) Subfracción acuosa F1 obtenida con HCl 4M, a 10 µg, 20, 40, 80, 160 y 320 µg</p>	<p>1. Agua 2. Metanol 3. Fracción F1, del extracto acuoso a) HCl 4M + refujo b) Neutralización a) NaOH + Bicarbonato c) Cloroformo</p>	<p>Lector Elisa de la Científica del Sur, no se indica longitud de onda de absorbanza</p>	<p>MC: DMEM+HG (high glucosa)</p>	<p>Células en MC DMEM, sin extracto con solvente metanol</p>	<p>5-FU a dosis 64 µg/ml: 51% a 72 horas</p>	<p>Prueba con tres muestras. Igual en controles 1,46 x 10⁴ Células de adenocarcinoma mamario humano (ATCC) MCF-7 Vi- Citotóxica, anticancerígena fórmula para el cálculo de TC_{50} = $\frac{100 \times \text{CÉLULAS TRATADAS}}{100 - \text{CÉLULAS CONTROL}}$</p>	<p>Prueba blanco: Células con medio de cultivo (MC) El control de muestra blanco debería ser: extracto + solvente + medio de cultivo (MC)</p>	<p>Muestras de <i>Buddleja incana</i> se cultivaron a 24, 48 y 72 horas. Resultados de ext. acuosos: Tasa de inhibición TIC 1) Dosis máxima 60 µg/ml a 72 horas 83% los valores de los resultados aumentan con el tiempo de incubación. 2) Para 5 µg/ml y 72 horas es del 10% 3) Con 30 µg/ml a 24 horas 60% aprox. 4) Con la fracción F1 y dosis máxima de 320 µg/ml a 24 horas, el estímulo de crecimiento fue 341%. Los resultados decrecen con el tiempo de incubación.</p>	<p>Científica Volumen 8, número 2 01/08/2011</p>	<p>Obtención de extractos de plantas que estimulan la proliferación de una línea humana de células madre mesenquimales</p>	<p>Extracto metanólico de hojas de <i>Equisetum arvense</i>, <i>Bixa orellana</i> y <i>Buddleja incana</i> con 6 dosis: 40, 80, 160, 320, 640 y 1280 µg</p>	<p>Metanol</p>	<p>Lector Elisa de la Científica del Sur 560 nm</p>	<p>MC: DMEM+HG (high glucosa)</p>	<p>Células en MC DMEM, sin extracto con solvente metanol</p>	<p>MC DMEM, células cultivadas y SFB al 10%: 83,5%</p>	<p>Prueba con tres muestras. Igual en controles 5 x 10³ Mesenquimales humanas de adipositos (ADSC) (importados de invitrogen, USA y conservadas a -80 °C. Vi- Proliferativa</p>	<p>Mayores valores en ensayos a 24, 48 y 72 horas sin SFB 1) <i>Equisetum arvense</i>: 174% con 1280 µg/ml (48 h) 2) <i>Bixa orellana</i>: 107% - 48 horas 3) <i>Buddleja incana</i>: 81% - 48 horas. Mayores valores a 48 h con SFB 1) <i>Equisetum arvense</i>+ SFB: 367% a 1280 µg/ml 2) <i>Bixa orellana</i>+ SFB: 338% con 1280 µg/ml 3) <i>Buddleja incana</i>+SFB: 226% con 1280 µg/ml</p>	<p>• Dosis de extracto muy elevadas, puede utilizarse 5, 10 Y 20 µg. Además deberá prepararse por lo menos una curva patrón de referencia • Los resultados favorables responden probablemente a variables de contaminación en las muestras. • La adición de SFB potencia el estímulo del crecimiento celular.</p>	<p>Científica Volumen 10, número 1 2013</p>	<p>Efecto de extractos de <i>Buddleja incana</i> sobre la proliferación de células hormonales sensibles del cáncer mamario</p>	<p>Fracción Aq-1 Muestra seca y molida + agua dest. a 44 °C x 6 horas refujo x 24 horas fracción BL-H fracción Aq-1 Hidrolizada con HCl 6M + bicarbonato, luego cloroformo antibióticos: P.E. y anfotericina</p>	<p>DO con lector Elisa de la Científica del Sur a 540 nm de longitud de onda</p>	<p>Línea celular ATCC MC: EMEM + insulina bovina + SFB al 10%</p>	<p>Solo MC y EMEM con suplementos</p>	<p>5-FU a dosis 64 µg/ml: 51% a 72 horas</p>	<p>Prueba con tres muestras. Igual en controles: 1,4 X 10⁴ Células de adenocarcinoma mamario humano (ATCC) MCF-7 Vi- Citotóxica, anticancerígena fórmula para el cálculo de TC_{50} = $\frac{100 \times \text{CÉLULAS TRATADAS}}{100 - \text{CÉLULAS CONTROL}}$</p>	<p>Tasas de inhibición celular (TIC). Extractos Aq. 1, a 24 horas con dosis de 10 µg/ml: 62% B.H. a dosis de 10, 20 y 40 µg/ml 72 horas, con dosis de 160 µg/ml: 72%</p>	<p>Blanco incompleto. Resultados de fracción B-H a dosis muy elevada: (160 µg/ml). Se recomienda: Dosis menores para la fracción Aq. 1 en nuevo ensayo. Mejorar el blanco en cantidad y calidad. Separar y aislar el principio activo y aumentar a diez las tres muestras por dosis. Igualmente para la medición de la proliferación.</p>
--	--	---	--	---	-----------------------------------	--	--	--	---	---	--	--	---	----------------	---	-----------------------------------	--	--	--	--	---	---	--	--	--	---	---------------------------------------	--	--	--	---

LEYENDA

MN: MEDIO NUTRITIVO
 MC: MEDIO DE CULTIVO (MN+ADICIONALES)
 P: PENICILINA
 E: ESTREPTOMICINA
 SFB: SUERO FETAL BOVINO
 VI: VARIABLE INDEPENDIENTE

En las primeras dos columnas de la izquierda, se ha colocado el nombre de la revista en la que se han publicado las experiencias realizadas, así como la fecha y título de estos trabajos, y en las siete columnas siguientes las ocho variables a ser analizadas.

En general, se puede apreciar que las variables se han modificado con mucha frecuencia, pero las que pueden afectar más la constancia de los resultados son la absorbancia, los solventes y los controles blancos.

V. DISCUSIÓN

Se han analizado las ocho variables incluidas en nuestro estudio:

- a. La variable independiente es muy diversa, se utilizan plantas distintas en la búsqueda de los objetivos indicados. Extractos de plantas inhibidoras del crecimiento celular, con el fin posterior de encontrar fracciones y principios activos que pudieran inhibir el crecimiento de las células cancerosas o extractos que estimulen el crecimiento celular, para expandir las células madre. Las dosis presentan una escala muy amplia, que si bien se inicia con 20 µg, 30 µg y 100 µg, posteriormente se amplía a otra que va desde 10 µg a 1280 µg. Esta extensión de la concentración ha permitido hacer un estudio amplio de dosis. Sin embargo, se recomienda diseñar y realizar pruebas con aumento progresivo más cercano entre dosis: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg/ml, para disminuir las diferencias entre una y otra.
- b. Los solventes utilizados para la extracción también difieren. Esencialmente se emplean extractos etanol + agua (4:1), además de hexano, cloroformo, metanol y agua, pero en mayor medida metanol y agua. Justifica esta selección el resultado de la experiencia inicial, que indicó que las soluciones acuosas son inhibidoras y las alcohólicas (metanol) estimulantes del crecimiento celular.
- c. La absorbancia a 450 y 655 nm es correcta y se utilizó para las tres primeras publicaciones efectuadas, como lo recomienda la técnica XTT. Sin embargo y teniendo en cuenta la posibilidad de que la compleja variable independiente, entre las muchas moléculas distintas que la componen, esté conformada también por pigmentos cuya coloración la acerque a la zona de 450 a 500 nm recomendada, se desplazó la lectura hacia el pico secundario de la clorofila, a 630-690 nm y otras sustancias interferentes con la lectura, seleccionando las longitudes de onda de 540 y luego 560 nm, para establecer así una banda ancha que pretenda llegar al pico secundario de la clorofila.
- d. Medios nutritivos. Básicamente, los normalmente utilizados no varían. A ellos se les adicionaron antibióticos para mantener la esterilidad de la prueba, dimetil sulfóxido (DMSO) como viabilizador e, inicialmente, suero fetal bovino (SFB) al 10%, como estimulante. Para el caso de las células madre, debido a su alta tendencia a la mutación, se cuestiona la inclusión del SFB, por la mayor similitud del genoma de los bovinos debiéndose reemplazar por otros elementos biológicos, como extractos de plantas medicinales. En algunos de los trabajos aún en análisis se usó únicamente como control positivo.
- e. Las pruebas en blanco utilizadas se adecuaron a las exigencias de cada tipo de prueba. La técnica remitida por el proveedor indica que la prueba en blanco debe contener el medio nutritivo completo y en el mismo

volumen de los medios de cultivo, pero sin adicionar las células a ser utilizadas en el trabajo. Comúnmente, la metodología recomienda que el blanco esté constituido por los medios de cultivo y toda otra sustancia que pueda afectar la medición, pero de ninguna manera por la variable independiente cuyo efecto debemos demostrar. En estas investigaciones se ha cumplido con dicha indicación, así como con todas las condiciones exigidas para estas pruebas (solvente, pH, tiempos de incubación, exposición a la luz, etc.). De acuerdo con esos criterios, no se han incluido los extractos como prueba en blanco.

- f. El control positivo se ha adecuado a las exigencias de cada tipo de experimentación: como estimulante SFB y para inhibir el crecimiento celular 5-FU.
- g. Las células utilizadas, en número de 5000 unidades, inicialmente han sido fibroblastos primarios, posteriormente células hepáticas cancerosas, luego células de adenocarcinoma mamario humano importadas de ATCC y, finalmente, células madre mesenquimales humanas de adipositos, utilizadas para estudios de expansión celular.
- h. Con la variable independiente (VI) se han buscado efectos citotóxicos y antitumorales, y también de proliferación de células madre.

OBSERVACIONES GENERALES

Los resultados obtenidos comparados por su densidad óptica (DO) muestran que los extractos acuosos son inhibidores del crecimiento celular tanto de células humanas normales como de animales y células cancerosas. En cambio los extractos alcohólicos tienden a ser estimulantes del crecimiento celular de

las células madre que constituyen normalmente el organismo humano y animal. Estos aparentes resultados deberán ser confirmados con pruebas que eliminen la participación de variables de confusión en la VI.

Los extractos de plantas ensayados que resultan inhibidores son *Scorzonera hispánica* - Escorzonera, *Malachra alceifolia* - Malva, *Buddleja incana* - Quishuar y las plantas que destacan como estimulantes, pero con extractos alcohólicos, principalmente son *Buddleja globosa*-Matico, *M. Alceifolia* - Malva y también el extracto alcohólico de *Buddleja incana* - Quishuar, *Equisetum arvense* - Cola de Caballo, *Phisalis peruviana* - Aguaymanto y *Bixa Orellana*- Achiote.

Se observó mucha variación en los diseños experimentales: solventes, absorbancia con distintas longitudes de onda para los lectores de Elisa. La DO de la absorbancia de referencia deberá siempre sustraerse de la DO de la lectura principal, que mide variables inespecíficas y otras que pueden afectar la prueba. Las dosis seleccionadas para realizar estas experiencias han ido desde bajas a bastante elevadas en todos los casos. En la literatura científica común, se considera que las concentraciones bajas son las más apropiadas y cumplen correctamente con mostrar la línea recta, que exige la ley de Lambert y Beer. Diversos resultados positivos en el estímulo del crecimiento determinados en estas experiencias no concuerdan con otros trabajos científicos que indican que, por el contrario, son inhibidores o pueden serlo. Sun et al. (2004) afirman que los agentes quimiopreventivos son típicamente productos naturales o sus análogos, y señalan el mecanismo que estimula la apoptosis (19). Morgan et al. (2010) comunican que los fotosensibilizadores derivados de la clorofila son indicados para su uso en terapia de tumores y

pueden ser afectados en su respuesta por transformadores ABCG2 (20). En ambos casos se estudian mecanismos que permitirán generalizar su efecto antitumoral. Esto solo debe considerarse de magnitud importante.

La variable independiente constituida por extractos de plantas es sumamente compleja y está conformada por numerosas sustancias químicas que posibilitarían errores de medición, algunas de las cuales podrían ser variables de confusión. Convendría, por tanto, purificar y separar químicamente los extractos de las plantas utilizadas o perfeccionar las pruebas en blanco, incluyendo estas variables de confusión utilizando dosis más bajas, como las de 10 μg , 20 μg y 33 μg , como fue mencionado en la primera publicación, revista *Científica*, Vol. 5, número 3-4.

Cuando se han utilizado solo tres muestras por dosis, particularmente cuando se trata de la prueba en blanco se han obtenido resultados inesperados al aplicar las fórmulas con solo una muestra significativamente diferente de las otras dos. Un solo valor de muestra con muy alta dispersión puede dar lugar a errores indeseables. Por ello se

recomienda utilizar, por lo menos, 10 muestras por dosis. Igualmente para el blanco y el control positivo.

Los resultados logrados con tratamiento previo de la muestra, por separación química o fracciones cromatográficas, han ofrecido significativos valores que se traducen en mejores orientaciones para trabajos experimentales futuros.

En conclusión, son muchas las modificaciones efectuadas de una publicación a otra, por lo que no es posible aplicar estadística a estos resultados. Se recomienda reducir considerablemente el número de sustancias químicas que conforman la variable independiente y, entre ellas, la variable de confusión y, de ser posible, identificar el principio activo, la molécula química. En cambio, por los análisis minuciosos realizados, el presente estudio sí permite mejorar las técnicas aplicadas y los resultados obtenidos. Para ello se requiere proponer la modificación de ciertos aspectos de la técnica original recomendada por los proveedores y validarlas con experiencias apropiadas que harán posible la investigación de plantas, sus extractos, fracciones y principios activos, con la técnica XTT.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Laza D, Rodríguez L y Sardiña G. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med.* 2003; 8 (3): 1-8.
2. Cui K, Nan KJ, Tian T, Guo YH, Zhao N, Wang L. Chinese medicinal compound delisheng has satisfactory anti-tumor activity, and is associated with up-regulation of endostatin in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 in three-dimensional culture. *World J Gastroenterol.* 2007; 13 (41): 5432-9.
3. Bunnell BA, Flaate M, Gagliardi Ch, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansión and differentiation. *Methods Stem Cell Res.* 2008; 45 (2): 115-20.
4. Turnovcova K, Ruzickova K, Vanecek V, Sykova E, Jendelova P. Properties and growth of human bone marrow mesenchymal stromal cells cultivated in different media. *Cytotherapy* 2009; 25: 1-12.
5. Shen B, Chen L, Zhou K, Jin KK. Effects of astragalus and angelica on bone marrow stem cells proliferation and VEGF protein expression in vitro. *Zhongguo Gu Shang* 2011; 24 (8): 652-5.
6. Si YC, Zhang JP, Xie CE, Zhang LJ, Jiang XN. Effects of Panax notoginseng saponins on proliferation and differentiation of rat hippocampal neural stem cells. *Am J Chin Med.* 2011; 39 (5): 999-1013.
7. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, Klüter H. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansión of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells.* 2009; 27 (9): 2331-41.
8. Tonti GA, Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansión in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol.* 2008; 52 (8): 1023-32.
9. Ellis PD. *The essential guide to effect sizes: an introduction to statistical power, meta-analysis and the interpretation of research results.* United Kingdom: Cambridge University Press. ISBN 0-521-14246-6. 2010
10. Bonett DG. Varying coefficient meta-analysis methods for alpha reliability, *Psychological Methods* 2010; 15: 368-85.
11. Al Khalaf MM, Thalib L, Doi SA. Combining heterogenous studies using the random-effects model is a mistake and leads to inconclusive meta-analyses. *Journal of Clinical Epidemiology* 2011; 64: 119-23.
12. XTT Cell Proliferation Assay Kit. ATCC. 2011. Disponible en: <http://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>.

13. Enciso J, Amiel J, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Amiel D, Enciso N et al. Efectos sobre la proliferación de fibroblastos y actividad y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de plantas medicinales peruanas. *Científica* 2008; 5 (3-4): 164-76.
14. Guija E, Amiel J, Fukusaki A, Reátegui O, Amiel D, Enciso JA, Valdivia E et al. Diversos efectos sobre la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos por extractos de *Buddleja incana*. *Científica* 2009; 6 (2): 222-31.
15. Enciso J, Amiel J, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Amiel D, Enciso N et al. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de cuatro plantas medicinales y estimulación de la proliferación de fibroblastos. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2010; 76 (1): 73-9.
16. Amiel J, Enciso N, Fukusaki A, Guija E, Reátegui O, Enciso J. Efecto de la *Buddleja Incana* sobre la proliferación de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). *Científica* 2010; 7 (3): 224-31.
17. Enciso N, Amiel J, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Enciso J. Obtención de extractos de plantas que estimulan la proliferación de una línea humana de células madre. *Científica* 2011; 8 (2): 89-97.
18. Enciso J, Amiel J, Enciso N, Fukusaki A. Efecto de extractos de *Buddleja incana* sobre la proliferación de células hormona-sensibles del cáncer mamario. *Científica* 2013; 10 (1): 10-6.
19. Sun SY, Hail N, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cáncer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004; 96 (9): 662-72.
20. Morgan J, Jackson J, Zheng X, Pandey S, Pandey R. Substrate affinity of photosensitizers derived from chlorophyll-a: The ABCG2 transporter affects the phototoxic response of side population stem cell- like cáncer cells to photodynamic therapy. *Mol Pharm* 2010; 7 (5): 1789-804.

RECIBIDO: 13/09/2014

ACEPTADO: 02/11/2014

COAUTOR: JOSÉ AMIEL PÉREZ

CORRESPONDENCIA: jamielp@cientifica.edu.pe