

## TÉCNICA XTT: PIGMENTOS INTERFERENTES EN FRACCIONES DE EXTRACTO METANÓLICO DE *Bidens pilosa*

TECHNIQUE XTT: INTERFERING PIGMENTS IN FRACTIONS OF METHANOLIC  
EXTRACT OF *Bidens pilosa*

Alejandro Fukusaki<sup>1</sup>, José Amiel Pérez<sup>1,2</sup>, Nathaly Enciso<sup>2</sup>, Álvaro Marcelo<sup>1,2</sup>, Carlos Altamirano<sup>1</sup>,  
Rafael Amiel<sup>3</sup>, Obert Marín-Sánchez<sup>4</sup>, Javier Enciso<sup>2</sup>

### RESUMEN

El objetivo es determinar la presencia de pigmentos vegetales que interfieren con lecturas espectrofotométricas de extractos de plantas medicinales y sus fracciones químicas en una longitud de onda de 600 nm, para establecer protocolos que permitan aplicar la técnica XTT o sus modificaciones y detectar metabolitos secundarios que estimulen o inhiban el crecimiento celular. Se ha trabajado con extractos y fracciones cromatográficas de *Bidens pilosa* (Amor seco) aplicando la técnica XTT, pero en una zona de longitud de onda espectrofotométrica de 600 nm, diferente a la indicada tradicionalmente por los proveedores de los reactivos, que es de 450 a 500 nm. Los procedimientos de separación química y cromatográficos se han efectuado con los solventes metanol, cloroformo, acetona y acetato de etilo. Los equipos utilizados son el espectrofotómetro Pharo 300, para mediciones en el rango UV/ VIS, y el

lector de microplacas de absorbancia ELx808, para ejecutar la prueba de Elisa.

Los resultados se muestran en ocho figuras para la densidad óptica (DO) y una figura para la tasa de estímulo del crecimiento (TEC). Las fracciones ASAR, ASAA y ASF7 no muestran diferencias al compararlas con los valores blanco y control positivo. Se han analizado procedimientos que muestran presencia o ausencia de los pigmentos vegetales que acompañan a los extractos metanólicos de *Bidens pilosa* y algunas de sus fracciones que muestran las desviaciones que ocurren cuando se quiere encontrar metabolitos secundarios que estimulen o inhiban el crecimiento celular. Los resultados a una longitud de onda de 600 nm no deberían ser positivos, ya que la mayoría de pigmentos presentan sus picos en la zona que se extiende de 450 a 550 nm. Sin embargo, lo son, pero en menor grado, con una DO de 0,584 y 0,767. En conclusión, las fracciones ASAR, ASAA y ASF7, libres de pigmentos, pueden ser útiles para

<sup>1</sup> LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR.

<sup>2</sup> LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR.

<sup>3</sup> DEPARTAMENTO DE ECONOMÍA PARA AMÉRICA LATINA. ESTADÍSTICA. I.H.S. FILADELFIA.

<sup>4</sup> INSTITUTO DE MEDICINA REGENERATIVA, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR.

desarrollar técnicas de tinción que se lean a una longitud de onda de 600 nm al efectuar mediciones en un lector de microplacas. Estas podrían obtenerse con separaciones químicas a las que después se aplican procedimientos cromatográficos.

**Palabras claves:** Técnica XTT, pigmentos vegetales interferentes, separación cromatográfica de *Bidens pilosa*

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the presence of plant pigments interfering with spectrophotometric readings of extracts of medicinal plants and their chemical fractions at a wavelength of 600 nm, and to establish protocols that allow applying the XTT technique or its modifications and to detect secondary metabolites stimulating or inhibiting cell growth. **Materials and methods.** We have worked with extracts and chromatographic fractions of *Bidens pilosa* (dry love) applying XTT technique, but in an area of spectrophotometric wavelength of 600 nm, unlike the 450 to 500 nm range, traditionally indicated by the suppliers of reagents. Methanol, chloroform, acetone and ethyl acetate were the solvents used to perform chemical separation and chromatographic procedures. The equipment used are the Pharo 300 spectrophotometer for measurements in the range UV/VIS and the Microplate Reader for Absorbance ELx808 to run the Elisa test. **Results.** These are shown in eight charts for optical density (OD) and one chart for the rate of growth stimulation (TEC). The fractions ASAR, ASAA and ASF7 do not show differences when compared with blanks values and positive control. **Discussion.** We have analyzed procedures showing the presence or absence of plant pigments accompanying methanolic extracts of *Bidens pilosa* and some of their fractions showing the deviations occurring when

we want to find secondary metabolites stimulating or inhibiting cell growth. The results at a wavelength of 600 nm, should not be positive since most pigments have their peaks in the area ranging from 450 to 550 nm. However, they are, but to a lesser degree, with an OD from 0,584 and 0.767. In conclusion, the fractions ASAR, ASAA and ASF7, free of pigments, can be useful to develop staining techniques which are read at a wavelength of 600 nm when measurements are made in a microplate reader. These could be obtained with chemical separations followed by chromatographic procedures.

**Keywords:** technique XTT, interfering plant pigments, chromatographic separation of *Bidens pilosa*.

## I. INTRODUCCIÓN

Para la investigación de células madre (1, 2, 3) y la obtención de compuestos químicos antitumorales se vienen realizando trabajos científicos que permiten utilizar protocolos para el cultivo y expansión de células madre, identificando extractos y fracciones de plantas medicinales que pudieran estimular el crecimiento celular o su inhibición, y aislando aquellos que cuentan con potencial suficiente para aplicarse en medicina regenerativa o tratamiento del cáncer.

La técnica XTT, una prueba específica utilizada frecuentemente para estudios de crecimiento e inhibición celulares (4), puede, en ciertos casos, necesitar mayor especificidad, para lo que requiere el perfeccionamiento apropiado que le permita superar los problemas de medición que se pudieran presentar.

Cuando se trabaja con plantas medicinales o sus derivados, los principales problemas se suscitan por la cantidad y variedad de pigmentos que contienen en su estructura. La

clorofila, los carotenoides, la xantófila, la antocianina y otros pigmentos pueden dar lugar a resultados erróneos al aplicarse la técnica XTT, porque los picos o áreas subtendidas en ellos aparecen en la misma longitud de onda en el lector de Elisa. Esta técnica detecta las células vivas en crecimiento o su inhibición por la presencia (o ausencia) de actividad de enzimas mitocondriales que reducen las sales de tetrazolium a compuestos de formazán, enzimas que dejan de emitirse cuando la célula muere. La coloración del formazán, cuando se añade el reactivo XTT, es naranja y se observa en la zona de 450 a 500 nm de longitud de onda en el lector de Elisa, zona que coincide con aquella en la que pueden observarse los pigmentos antes mencionados.

Por lo tanto, cualquier extracto de planta en el que se busquen metabolitos secundarios con efectos estimulantes del crecimiento y que contenga pigmentos de color anaranjado u otros, con absorción entre 450 y 500 nm, podría ofrecer resultados positivos como si fuera estimulante y deberá considerarse, por tanto, como una variable de confusión (5). La presencia de estos pigmentos en la variable independiente enmascara la situación e impide verificar si hay o no sustancias activas estimulantes de la expansión celular. Lo mismo ocurrirá si la experiencia que se realiza es la búsqueda de sustancias químicas antitumorales, en la que se puede tener resultados negativos de inhibición, cuando en realidad pudiera haberlos favorables.

En la búsqueda de productos quimioterapéuticos procedentes de plantas, se han obtenido muy buenos resultados a partir de diversas especies del reino vegetal, de sus extractos y fracciones; y cuando el estudio es más profundo y completo, se logran identificar los compuestos químicos que actúan exitosamente en el tratamiento de cáncer, como ocurrió con el paclitaxel obtenido de

*Taxus brevifolia* L. en 1968, que luego de numerosos estudios fue aprobado por la FDA en 1992 para pacientes con cáncer de ovario y en 1994, para pacientes con cáncer de mama. Este mismo año se publicó la síntesis total del paclitaxel (6).

Son muy importantes los estudios de expansión de cultivos celulares efectuados con plantas medicinales para reemplazar el suero fetal bovino (SFB), en el caso de células madre (7), porque algunas sustancias de origen animal como el SFB, por su similitud genómica con el ADN del hombre, puedan inducir en las células mutaciones genéticas que podrían propiciar alteraciones de las células madre primarias, particularmente si se trabaja con células obtenidas después de varios pasajes (8).

Este trabajo tiene como objetivo determinar las desviaciones que pueden ocurrir en las lecturas cuantitativas realizadas a una longitud de onda de 600 nm, y eliminar los pigmentos del extracto con el fin de establecer el crecimiento o inhibición celular. Para ello se utilizan separaciones por solventes y procedimientos cromatográficos que permitan obtener fracciones que no contengan los pigmentos antes mencionados, y se leen los resultados en una longitud de onda apropiada.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRA

La muestra vegetal *Bidens pilosa* (Amor seco) fue recolectada en el distrito de Cieneguilla, departamento de Lima, en el valle del río Lurín, a 360 m. s. n. m., a una temperatura promedio de 25 °C y 87% de humedad.

Su ubicación taxonómica fue realizada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se utilizaron las hojas secadas a la sombra entre 22 °C y 25 °C, molidas y tamizadas, de las que se obtuvo un polvo de color marrón verdoso.

## MATERIALES

Se utilizaron los solventes metanol, acetato de etilo, ácido acético, acetona, 1-butanol, todos de calidad p. a., y los siguientes materiales: columna cromatográfica de vidrio, placas 20 x 20 preparadas con sílica gel GF254+366, sílica gel G60 mesh 60-200, sílica gel G60 PF 254-366, cámara de desarrollo para placas de 20 x 20 cm y lámpara ultravioleta (onda corta y larga).

## EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CROMATOGRAFÍA

Se muestra el diagrama correspondiente (figura 1). Se pesaron 300 g de polvo de la muestra de *B. pilosa*. Fueron extraídos con 1500 ml de metanol p. a. y colocados a baño maría a 40 °C por 24 horas. La solución se filtró y al remanente se le agregaron 750 ml de metanol; esta operación se repitió seis veces, hasta lograr el agotamiento. Luego, se concentró al rotavapor a 39 °C y a presión de 200 mbar, con lo que se obtuvieron 40,4 gramos, con un rendimiento de 13,47% de extracto metanólico.

Se tomaron 15 g del extracto, que fueron disueltos en 250 ml de metanol

a 40 °C y filtrados con filtro de 0,45 mm (ASMeOH1). Se dejó reposar y se precipitaron 772 mg de un sólido de color marrón de aspecto arenoso (ASSMe y después de centrifugar AS-Sól).

El extracto metanólico, después del filtrado (ASMeOH1), fue lavado con 350 ml de n-hexano utilizando un tubo de decantación; quedó en la fase inferior el extracto metanólico (ASMeOH2).

A estos 250 ml del extracto metanólico se les agregaron 250 ml de agua y se extrajo con 200 ml de acetato de etilo por tres veces, hasta obtener el ASAcOEt (capa superior) y ASSAcOEt. Al ASAcOEt se le añadieron 250 ml de acetona y se precipitó un sólido que fue centrifugado (AS-Sól2).

El remanente del ASAcOEt, que es el ASMe2CO, se pasó a través de una columna y fue eluido con 14 l de acetato de etilo, con lo que se obtuvieron 1535 tubos de ensayo del colector de fracciones Spectrum, los que fueron agrupados en 15 fracciones.

Las fracciones 4 y 5 son las más apropiadas para el objetivo de este fraccionamiento.

Se separaron las sustancias ASAR y ASAA después de la cromatografía de 40 placas preparativas utilizando el solvente BAW (butanol - ácido acético y agua 4:1:1).

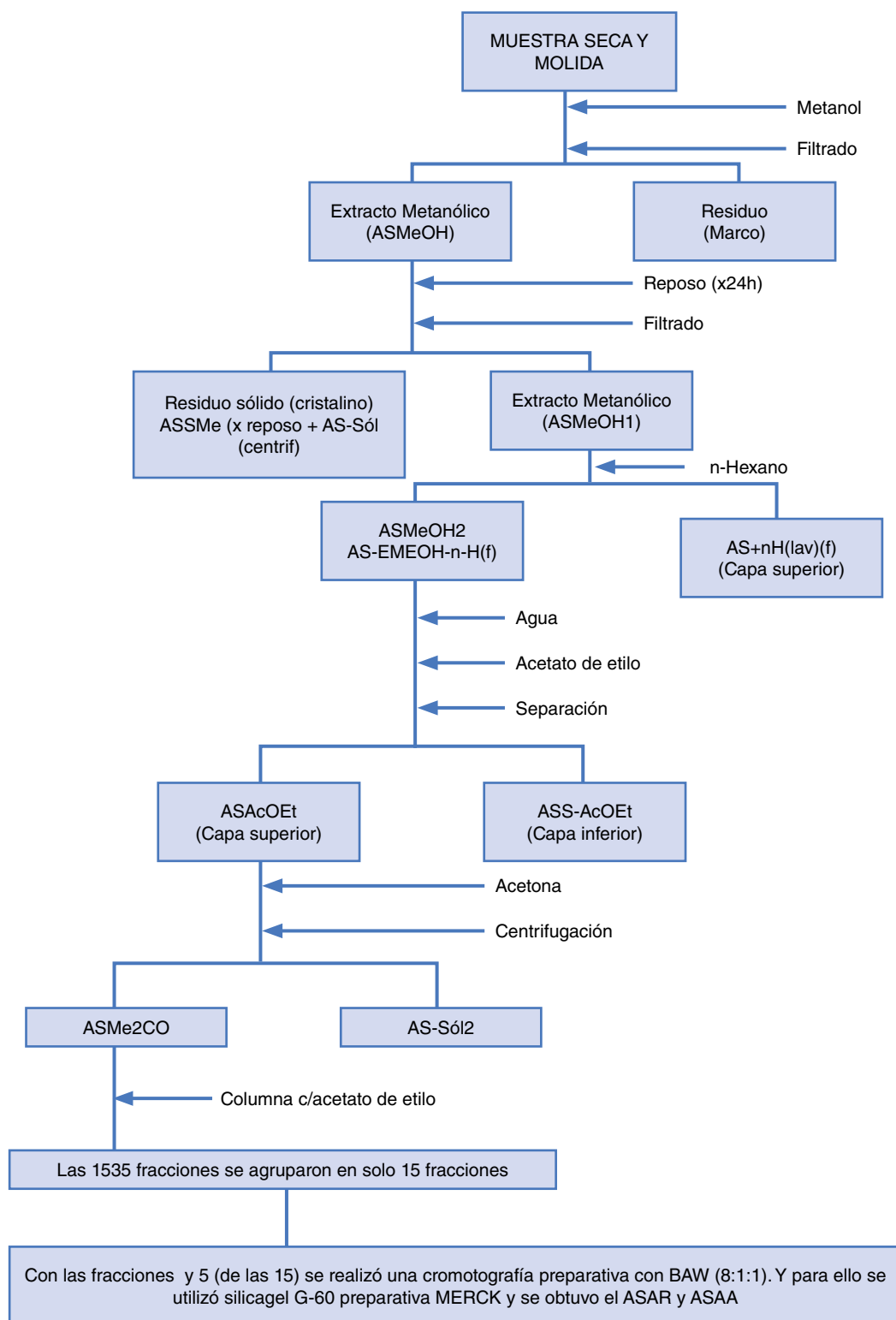


FIGURA 1. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA EXTRACCIÓN POR SEPARACIÓN CON SOLVENTES Y FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO.

TABLA 1. MUESTRAS PREPARADAS

|    | Muestra | Peso vial con muestra | Peso vial | Peso neto (mg) |
|----|---------|-----------------------|-----------|----------------|
| 1  | ASAR    | 2,2345                | 2,1944    | 40,1           |
| 2  | ASAA    | 2,3059                | 2,224     | 81,9           |
| 3  | AS-Sól  | 2,1949                | 2,1824    | 12,5           |
| 4  | ASMe2CO | 2,2431                | 2,2199    | 23,2           |
| 5  | ASMeOH  | 2,3067                | 2,2343    | 72,4           |
| 6  | AS-Sól2 | 2,2030                | 2,1862    | 16,8           |
| 7  | ASF9    | 2,2332                | 2,2129    | 20,3           |
| 8  | ASM1    | 2,2277                | 2,2090    | 18,7           |
| 9  | ASAcOEt | 2,2670                | 2,2125    | 54,5           |
| 10 | ASA     | 2,3200                | 2,2245    | 95,5           |
| 11 | ASF7    | 2,1956                | 2,1734    | 22,2           |
| 12 | ASSMe   | 2,3032                | 2,2179    | 85,3           |

TABLA 2. LEYENDA DE CÓDIGOS

| Códigos                  | Significados   |
|--------------------------|--|
| 1 ASMeOH                 | Extracto metanólico de <i>Bidens pilosa</i> (original)   |
| 2 ASMeOH 1               | Extracto metanólico de <i>Bidens pilosa</i> (después de mantenerlo en reposo por 24 horas) precipitó una pequeñísima cantidad de sólidos de color marrón (ASSMe) |
| 3 ASMeOH 2 o AS-EMeOH-nH | Extracto de <i>Bidens pilosa</i> después del lavado con n-hexano. Es un extracto metanólico limpio.  |
| 4 AS+nH(lav)             | Es la capa superior de lavado con n-hexano.  |
| 5 ASAcOEt                | Extracto acetato de etilo de <i>Bidens pilosa</i> (capa superior)  |
| 6 ASS-AcOEt              | Extracto metanólico extraído después con acetato de etilo  |
| 7 ASMe2CO                | Extracto acetónico de <i>Bidens pilosa</i> , después de la centrifugación  |
| 8 AS-Sól                 | Residuo de extracto de <i>Bidens pilosa</i> después del centrifugado   |
| 9 ASAR                   | Fracción de <i>Bidens pilosa</i> de tono rojizo detectado después de la cromatografía preparativa (CCP) de las fracciones F4 y F5                                |
| 10 ASAA                  | Fracción de tono amarillento, después de la CCP  |
| 11 ASF9                  | Fracción 9 de la columna   |
| 12 ASM1                  | Fracción metanólica de <i>Bidens pilosa</i> , después de extraída con acetato de etilo   |
| 13 ASF7                  | Fracción 7 después de pasar por la columna   |
| 14 ASSMe                 | Sólido de <i>Bidens pilosa</i> después de reposo x 24 horas  |
| 15 AS-Sól2               | Sólido, después de agregar acetona al ASAcOEt  |

## DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROLIFERATIVO

Se utilizaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (ADSC). Para iniciar el procedimiento de prueba se sembraron 5,000 células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo humano de 4 pasajes, colocándolas en cada pocillo de una microplaca de 96 a la que se añadieron el medio de cultivo celular DMEM - F12, las fracciones o el suero fetal bovino (SFB) según correspondiera.

El efecto a comprobar se evaluó por triplicado a las 24, 48 y 72 horas con dosis crecientes de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280 µg/ml para extractos y fracciones, y como control SFB al 10%. Todas las pruebas incluyeron DMSO, así como también la prueba en blanco. Se incubaron a 37 °C durante 2 horas para favorecer la adherencia de las células, sin medio de cultivo y en un ambiente del 5% de CO<sub>2</sub> para medir el estímulo de crecimiento o bien los pigmentos interferentes.

## LA TÉCNICA XTT

Se utilizó la técnica XTT basada en la reducción de sales de tetrazolium (9). La densidad óptica (DO) se midió en el lector de Elisa a una longitud de onda de 600 nm, diferente a la establecida regularmente que es de 450 a 500 nm, alejada de la zona de interferencia y verificando si esta es útil al comparar las fracciones con los grupos de control blanco y control positivo. El resultado de la intensidad de color referido a la menor o mayor dosis (concentración en µg/ml) se expresa en densidad óptica y, eventualmente, en porcentajes como tasa de estimulación celular (TEC) (10).  $TEC = [(DOP/DOC) - 1] \times 100$  en donde:

DOP = densidad óptica de la prueba

DOC = densidad óptica del control

Otra forma de evitar o disminuir la interferencia es seleccionando en el lector de microplacas una zona de longitud de onda libre de la incidencia de pigmentos vegetales. De acuerdo con la literatura científica (11, 12) verificada en este trabajo (ver anexo I), por espectrofotometría, usando un espectrofotómetro Pharo 300, para mediciones en el rango UV/ VIS, las zonas comprometidas por los pigmentos vegetales son las que se muestran en la tabla 3.

TABLA 3. LONGITUDES DE ONDA CORRESPONDIENTES A LOS PIGMENTOS VEGETALES DETECTADOS EN FRACCIONES DE EXTRACTO METANÓLICO DE *BIDENS PILOSA*

| Pigmentos    | Longitud en nanómetros |
|--------------|------------------------|
| Clorofila a  | 429 y 660              |
| Clorofila b  | 453 y 643              |
| Xantófilas   | De 430 a 490           |
| β-caroteno   | De 450 a 500           |
| Antocianinas | De 500 a 540           |

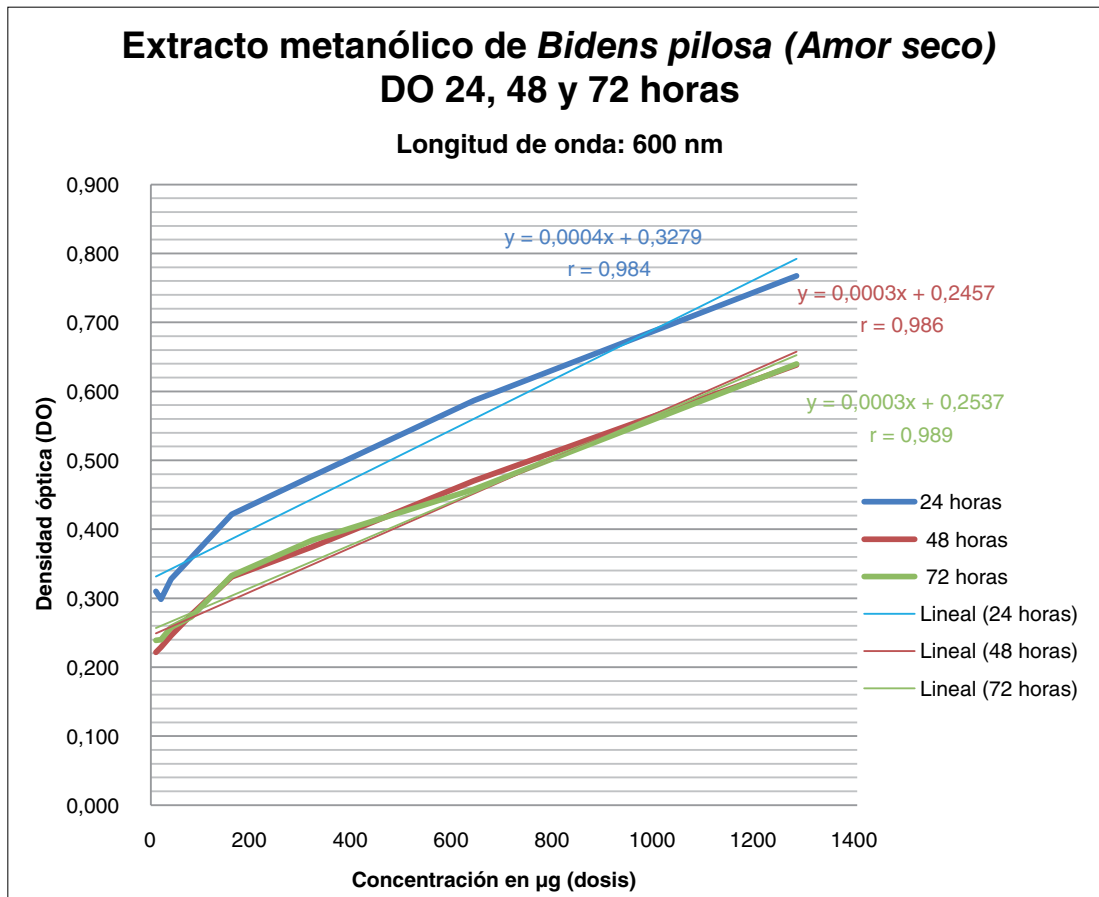
Por este motivo se seleccionó 600 nm de longitud de onda que se estableció como la zona libre de pigmentos apta para realizar en ella las experiencias antes mencionadas.

## ESTADÍSTICA

Se aplicaron a los resultados las pruebas estadísticas requeridas, utilizando la hoja de cálculo del programa Microsoft Excel: análisis de regresión lineal, correlación, promedios, desviación estándar, prueba t de Student de comprobación de hipótesis por diferencia de promedios de las pruebas blanco con el control positivo y con la prueba especial ANOVA (ver anexo II).

### III. RESULTADOS

Los resultados de absorbancia obtenidos como densidad óptica (DO) se muestran en las nueve figuras que se observan a continuación. Ocho corresponden a las diversas concentraciones de extractos de la especie *Bidens pilosa* y de sus fracciones obtenidas por solventes o por procesos cromatográficos, dosis (concentraciones) que aumentan gradualmente de 10 µg/ml hasta 1280 µg/ml. Además, se reservó una figura para ensayos de simulación que se expresan como la tasa de estímulo celular (TEC).



**FIGURA 2.** DENSIDAD ÓPTICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *BIDENS PILOSA* SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y LA DOSIS EXPRESADA EN µG/ML

SE OBSERVA UNA BUENA CORRELACIÓN Y LA DO PROGRESIVAMENTE AUMENTADA CONFORME SE INCREMENTA LA CONCENTRACIÓN.



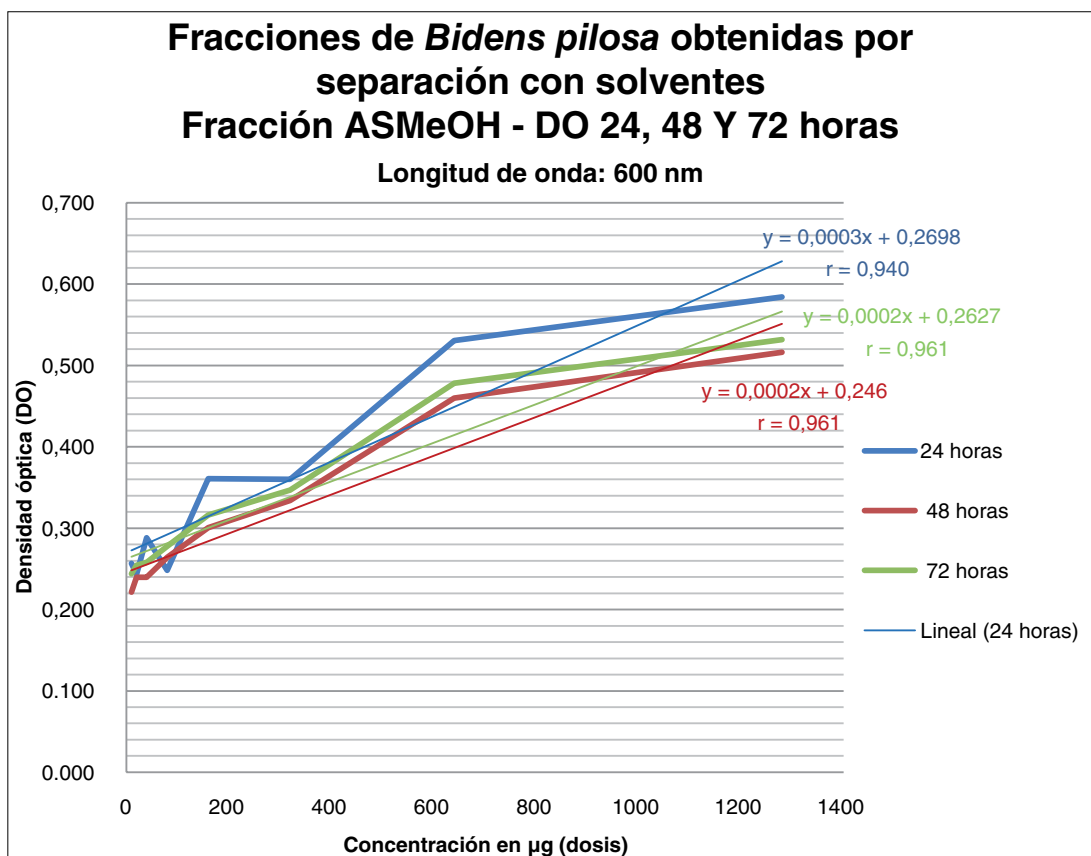


FIGURA 3. DENSIDAD ÓPTICA DE UNA FRACCIÓN DE *BIDENS PILOSA* OBTENIDA POR SEPARACIÓN CON SOLVENTES SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y LA DOSIS EXPRESADA COMO CONCENTRACIÓN EN  $\mu\text{G}/\text{ML}$ .

EL ÍNDICE DE CORRELACIÓN DISMINUYE CON RESPECTO AL ANTERIOR (FIGURA 2). LA DO NO SE INCREMENTA COMO SE OBSERVA EN LA FIGURA ANTERIOR.

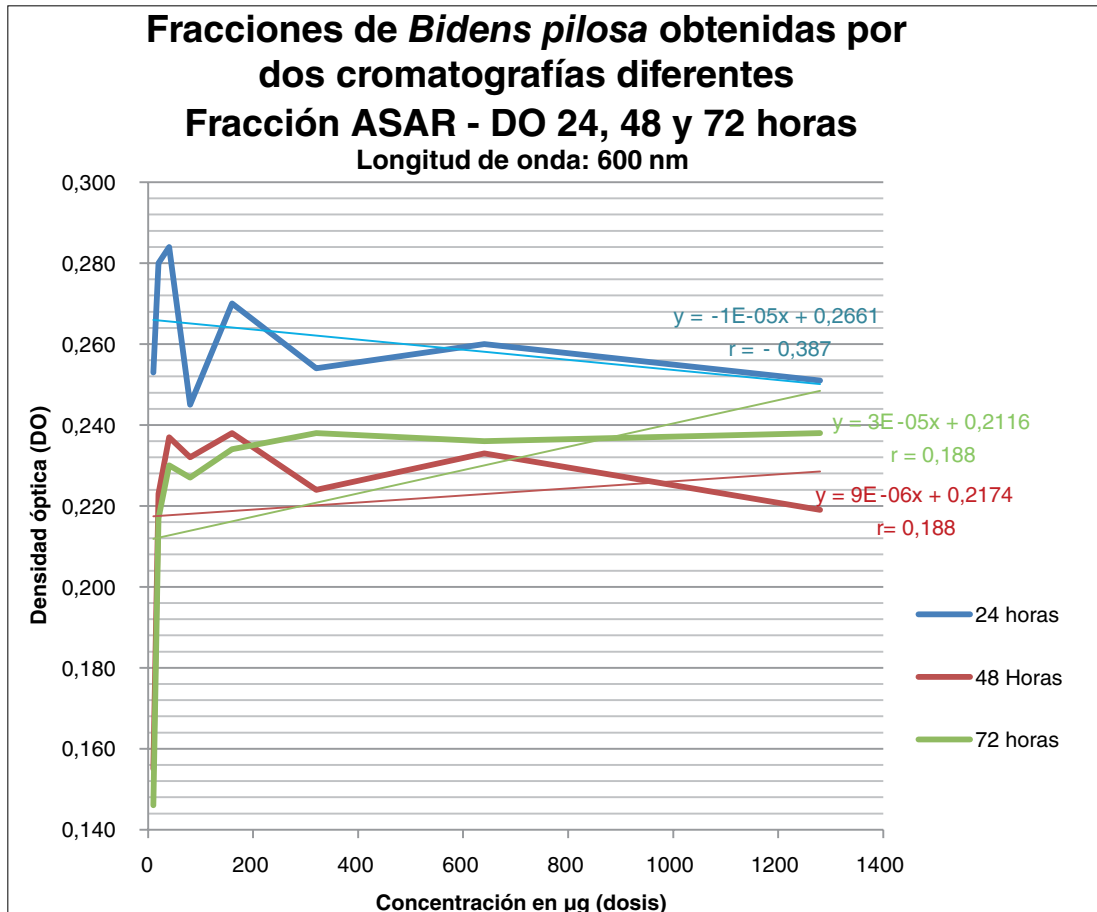


FIGURA 4. DENSIDAD ÓPTICA (DO) DE LA FRACCIÓN ASAR, SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN (24, 48 Y 72 HORAS) Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN µG/ML.

LA ABSORBANCIA EXPRESADA COMO DO ES TAN BAJA COMO LA DE LA PRUEBA BLANCO Y NO SE INCREMENTA CON EL AUMENTO GRADUAL DE LA DOSIS.

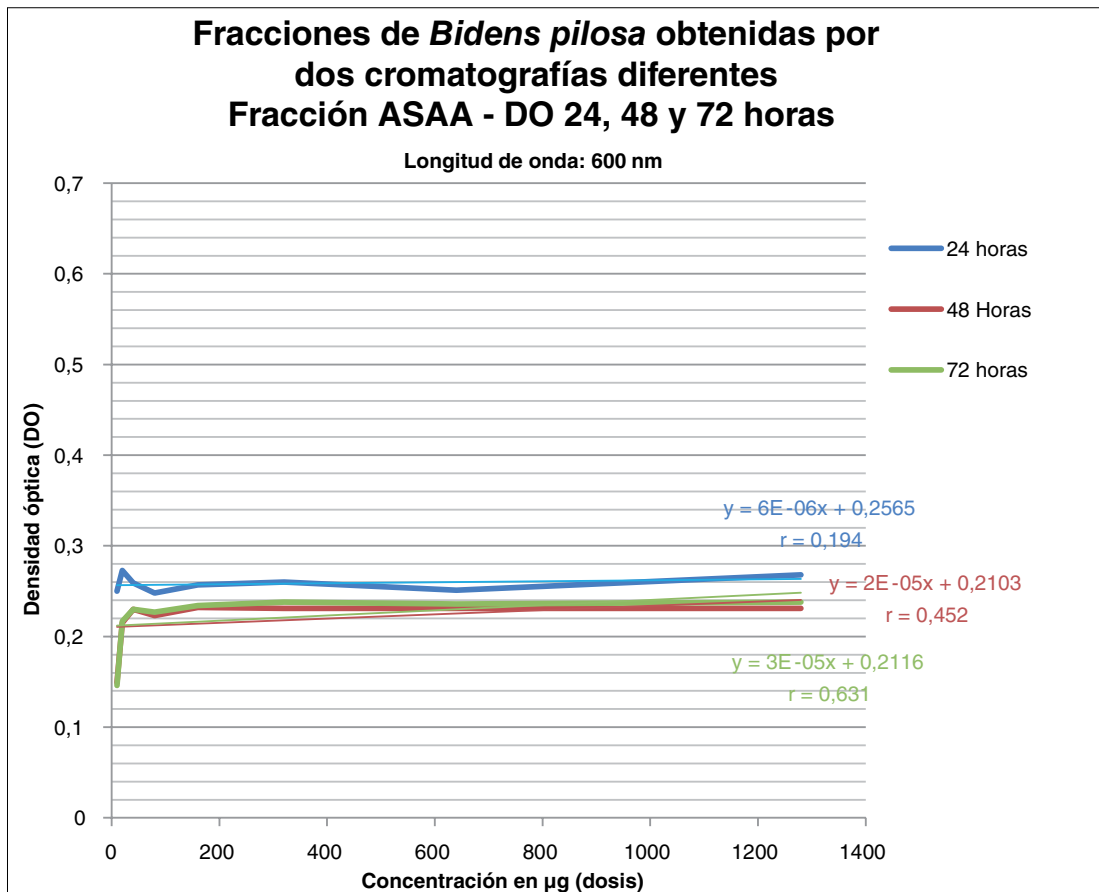


FIGURA 5. DENSIDAD ÓPTICA (DO) DE LA FRACCIÓN ASAA, SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN (24, 48 Y 72 HORAS) Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN  $\mu$  G/ML.

DO MUY BAJA E ÍNDICE DE CORRELACIÓN TAMBIÉN.

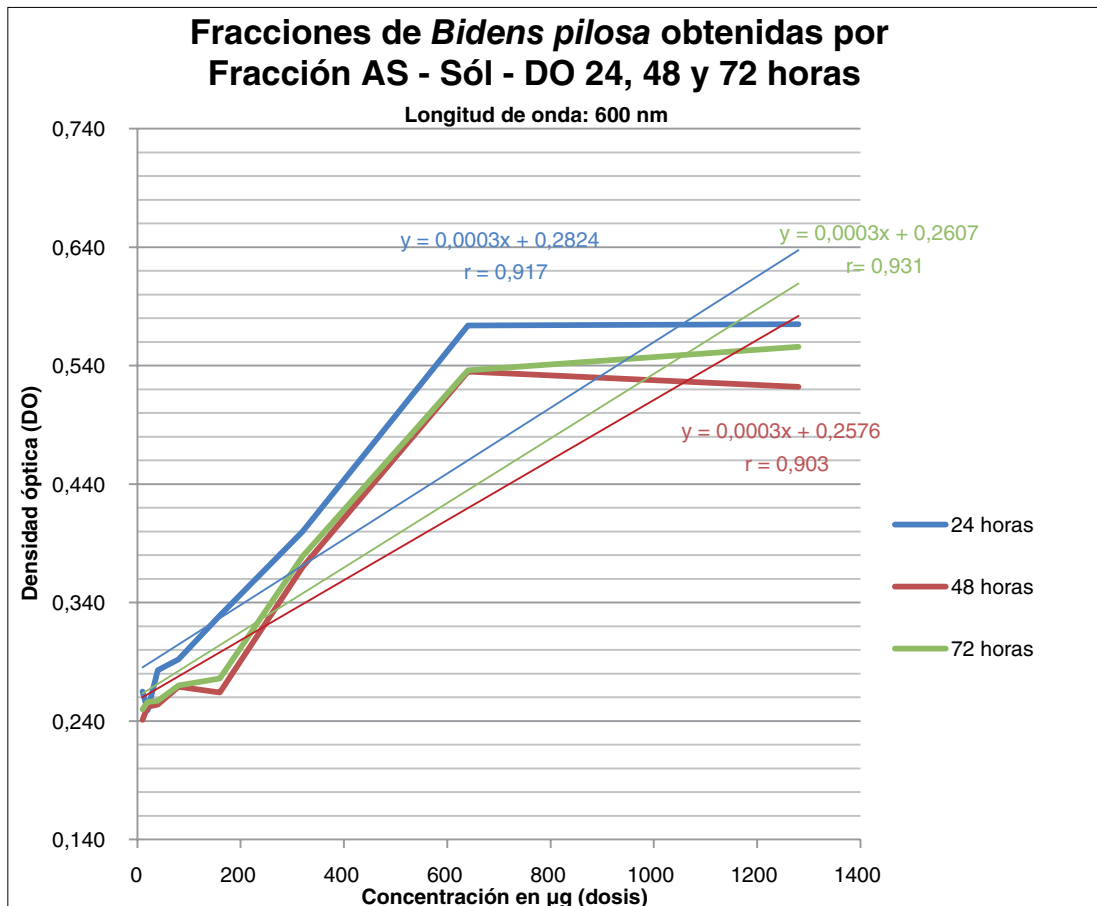


FIGURA 6. DO DE LA FRACCIÓN AS-SÓL, SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y LA DOSIS EXPRESADA COMO CONCENTRACIÓN EN µ G/ML.

EL ÍNDICE DE CORRELACIÓN HA MEJORADO GRACIAS AL AUMENTO PROGRESIVO DE LA DOSIS Y LA DO. SIN EMBARGO, ESTOS AUMENTOS SE DETIENEN A PARTIR DE LA CONCENTRACIÓN DE 640 µ G/ML.

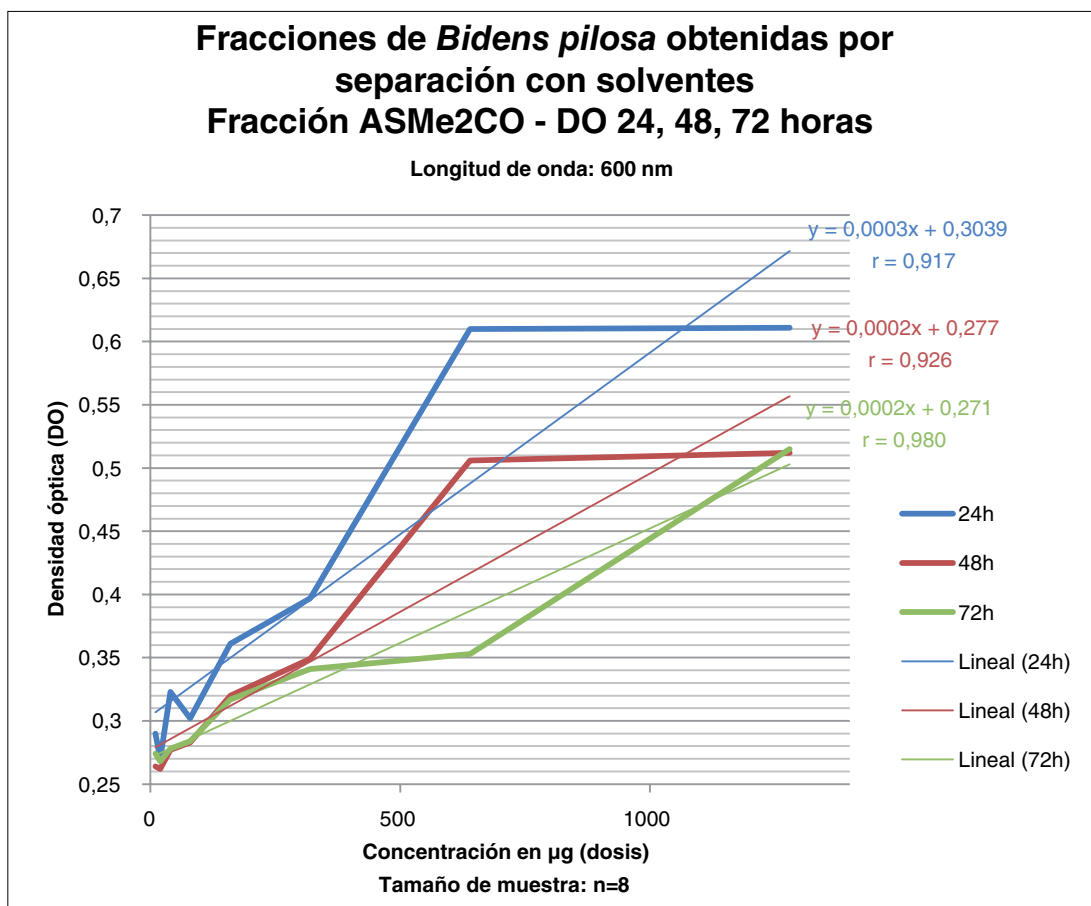


FIGURA 7A. DENSIDAD ÓPTICA (DO) DE LA FRACCIÓN ASMe2CO, SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN (24 H, 48 H Y 72 H) Y LAS DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN µ G/ML.

LA DO AUMENTA PROGRESIVAMENTE CONFORME CRECEN LAS DOSIS HASTA LLEGAR A 640 µ G/ML. A PARTIR DE ALLÍ NO AUMENTA EN EL HITO SIGUIENTE, 1280 µ G/ML Y SUS VALORES SON SIMILARES Y AÚN MENORES CON INCUBACIONES DE 48 Y 72 HORAS. A PESAR DE ELLO, LOS ÍNDICES DE CORRELACIÓN SE MUESTRAN ELEVADOS.

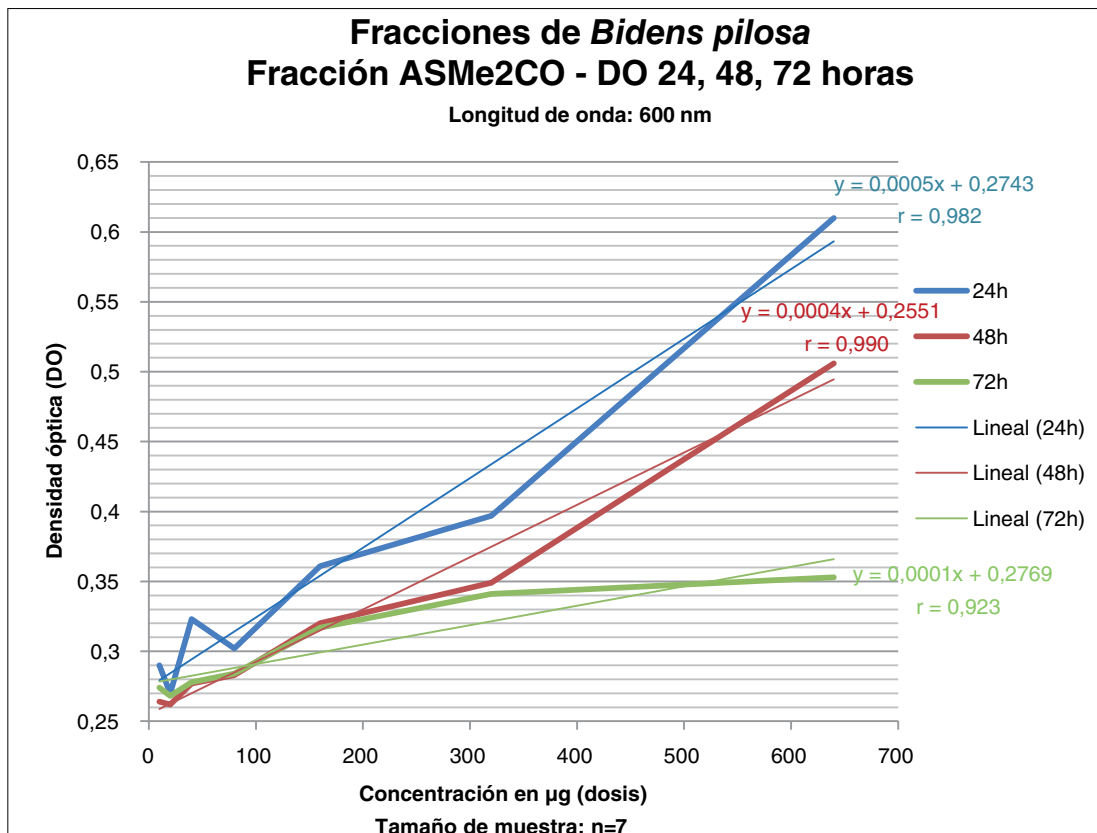
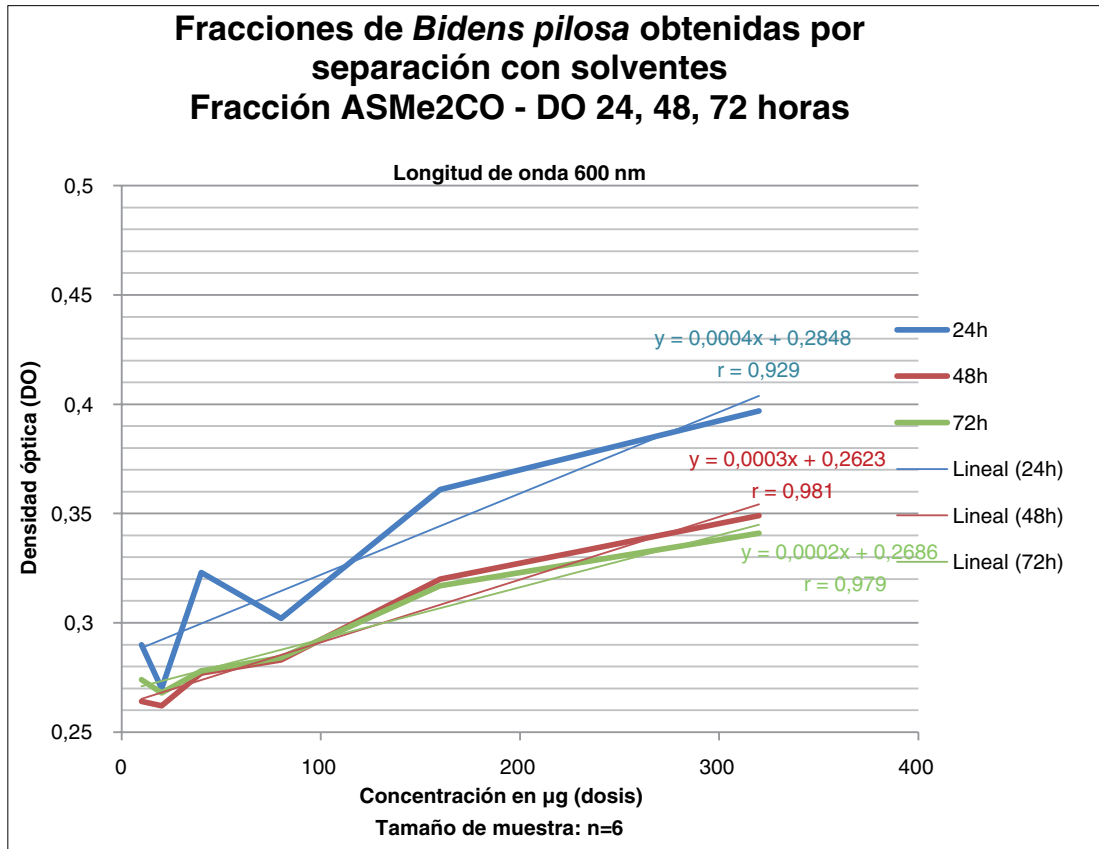


FIGURA 7B. DENSIDAD ÓPTICA (DO) DE LA FRACCIÓN ASMe2CO, SEGÚN TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN µ G/ML.

LA APLICACIÓN ESTADÍSTICA SE REALIZA SOLO HASTA LA DOSIS DE 640 µ G/ML. SE OBSERVA QUE LA CORRELACIÓN ES MEJOR AÚN QUE LA MOSTRADA EN LA FIGURA 7A.



**FIGURA 7C.** DENSIDAD ÓPTICA (DO) DE LA FRACCIÓN ASMe2CO, SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN  $\mu\text{G/ML}$ . APLICACIÓN ESTADÍSTICA SOLO HASTA LA DOSIS DE 320  $\mu\text{G/ML}$ .

LA DO SE INCREMENTA CONFORME AUMENTA LA DOSIS, PERO MUESTRA MAYOR VARIACIÓN. LA CORRELACIÓN ES LIGERAMENTE MENOR QUE AQUELLA QUE SE OBSERVA EN LA FIGURA 7B.

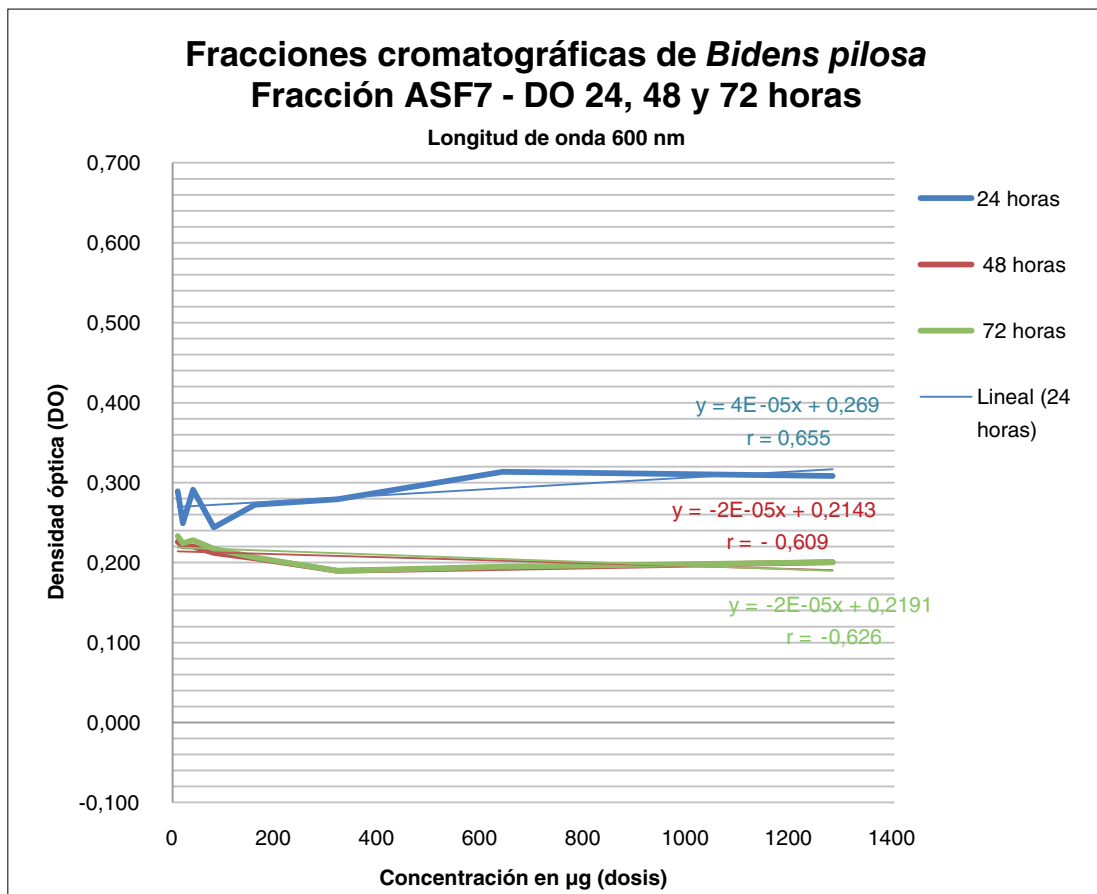
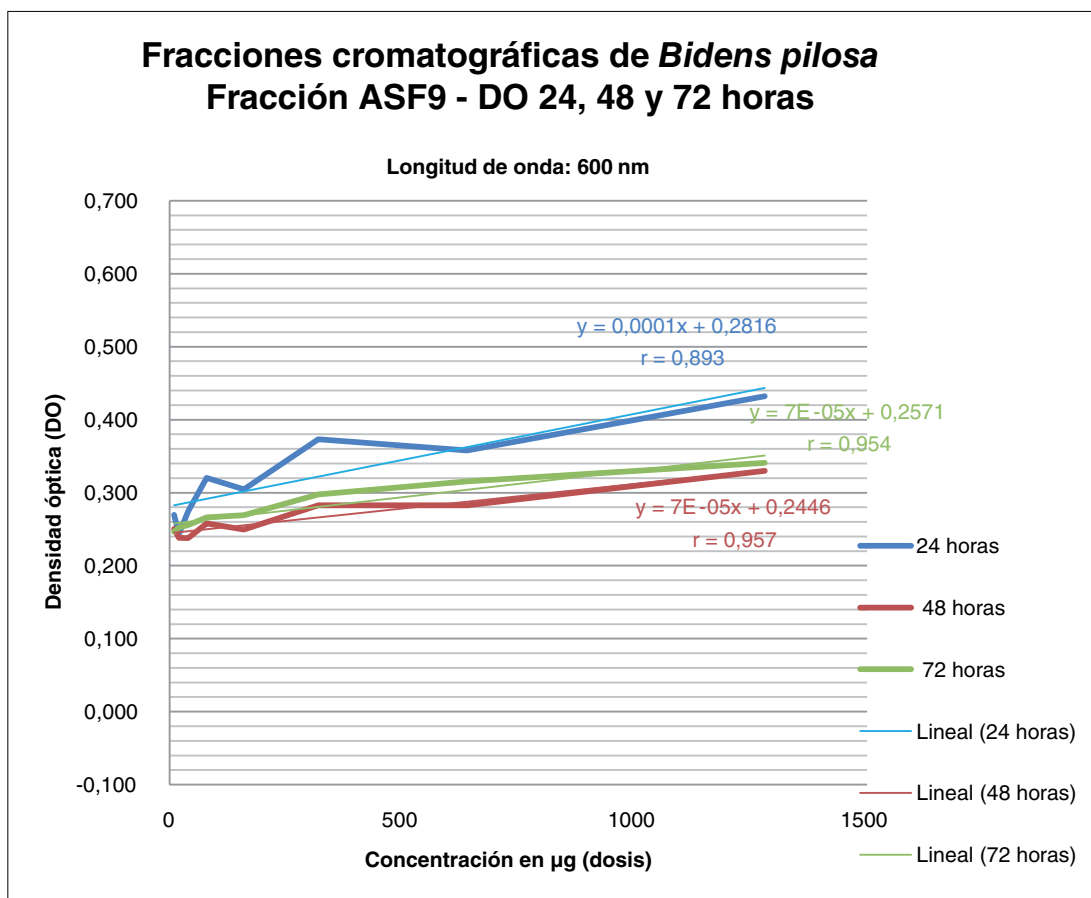


FIGURA 8. DENSIDAD ÓPTICA (DO) DE LA FRACCIÓN CROMATOGRÁFICA ASF7, SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN  $\mu\text{G/ML}$ .

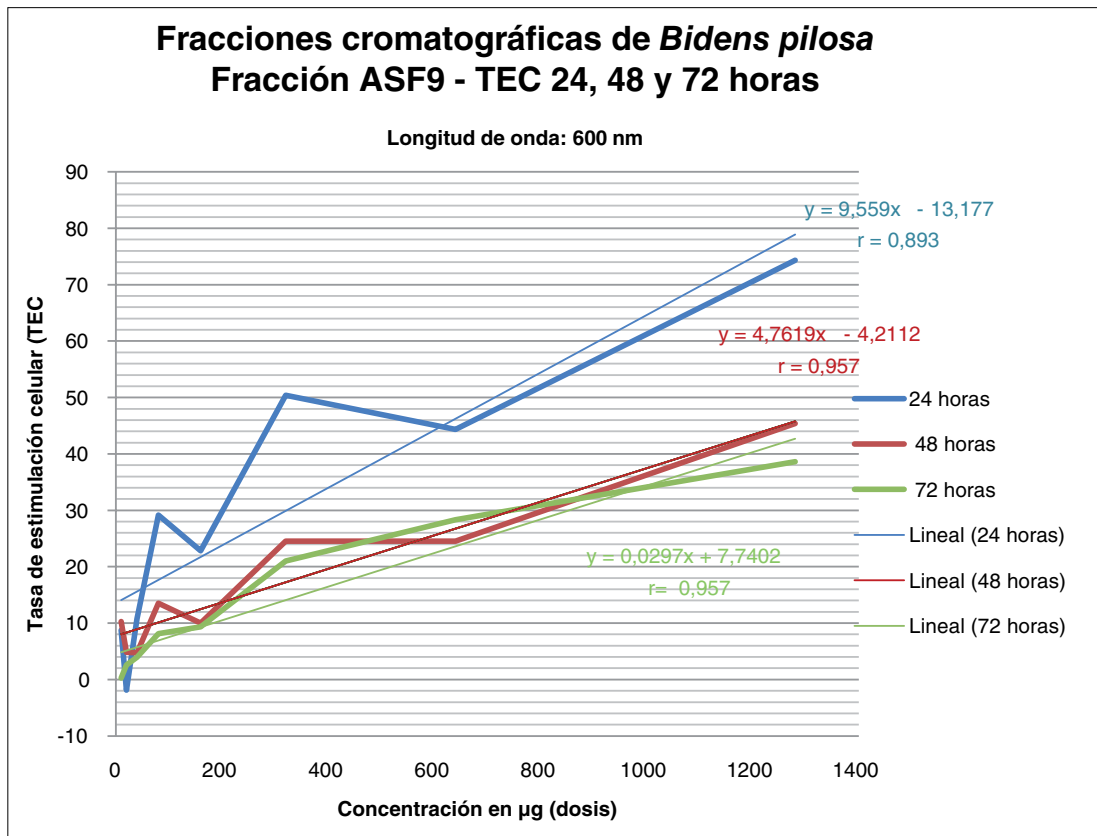
DO MUY BAJAS, PARTICULARMENTE EN INCUBACIONES A 48 Y 72 HORAS. CORRELACIÓN NEGATIVA PARA INCUBACIONES A 48 Y 72 HORAS.





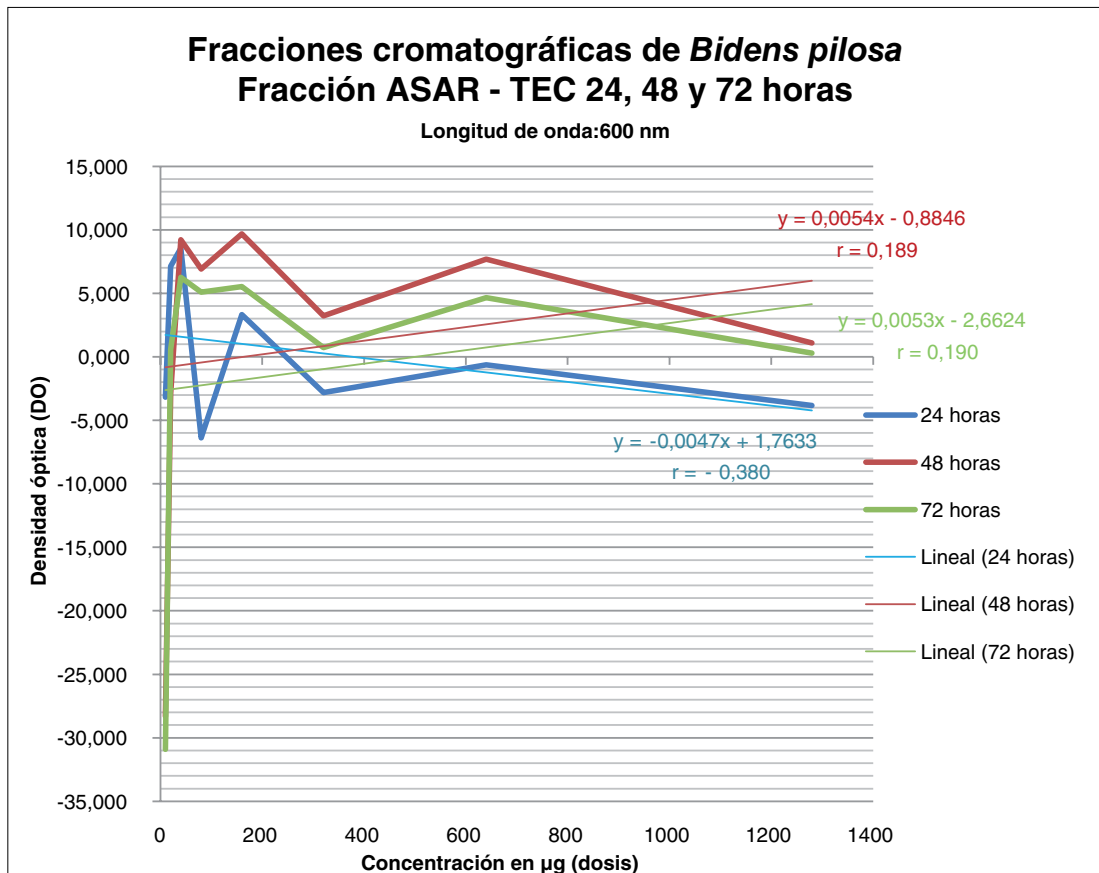
**FIGURA 9.** DENSIDAD ÓPTICA (DO) DE LA FRACCIÓN CROMATOGRÁFICA ASF7, SEGÚN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN µG/ML.

AUNQUE AUMENTAN PROGRESIVAMENTE LOS VALORES DE DO, CONFORME LO HACEN LAS DOSIS, NO SE MUESTRAN MUY ELEVADOS. LA CORRELACIÓN ES POSITIVA Y ALTA, PARTICULARMENTE EN INCUBACIONES A 48 Y 72 HORAS.



**FIGURA 10A.** TASA DE ESTIMULACIÓN DE CRECIMIENTO (TEC) DE LA FRACCIÓN CROMATOGRÁFICA ASF9 DE *BIDENS PILOSA*, SEGÚN TIEMPO DE INCUBACIÓN (24, 48 Y 72 HORAS) Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN µG/ML.

LAS TEC AUMENTAN PROGRESIVAMENTE CONFORME LO HACEN TAMBIÉN LAS DOSIS. LA CORRELACIÓN ES BUENA Y POSITIVA.



**FIGURA 10B.** SIMULACIÓN DE LA TASA DE ESTIMULACIÓN DE CRECIMIENTO (TEC) DE LA FRACCIÓN ASAR DE *BIDENS PILOSA*, SEGÚN TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN µG/ML.

LA INCUBACIÓN A 24 HORAS MUESTRA DISMINUCIÓN EN SU VALOR DE TEC CON CORRELACIÓN SIGNIFICATIVAMENTE NEGATIVA. LAS INCUBACIONES DE 48 Y 72 HORAS SON POSITIVAS, PERO SUS VALORES DE TEC NO SON ELEVADOS, MÁS BIEN MODERADOS.

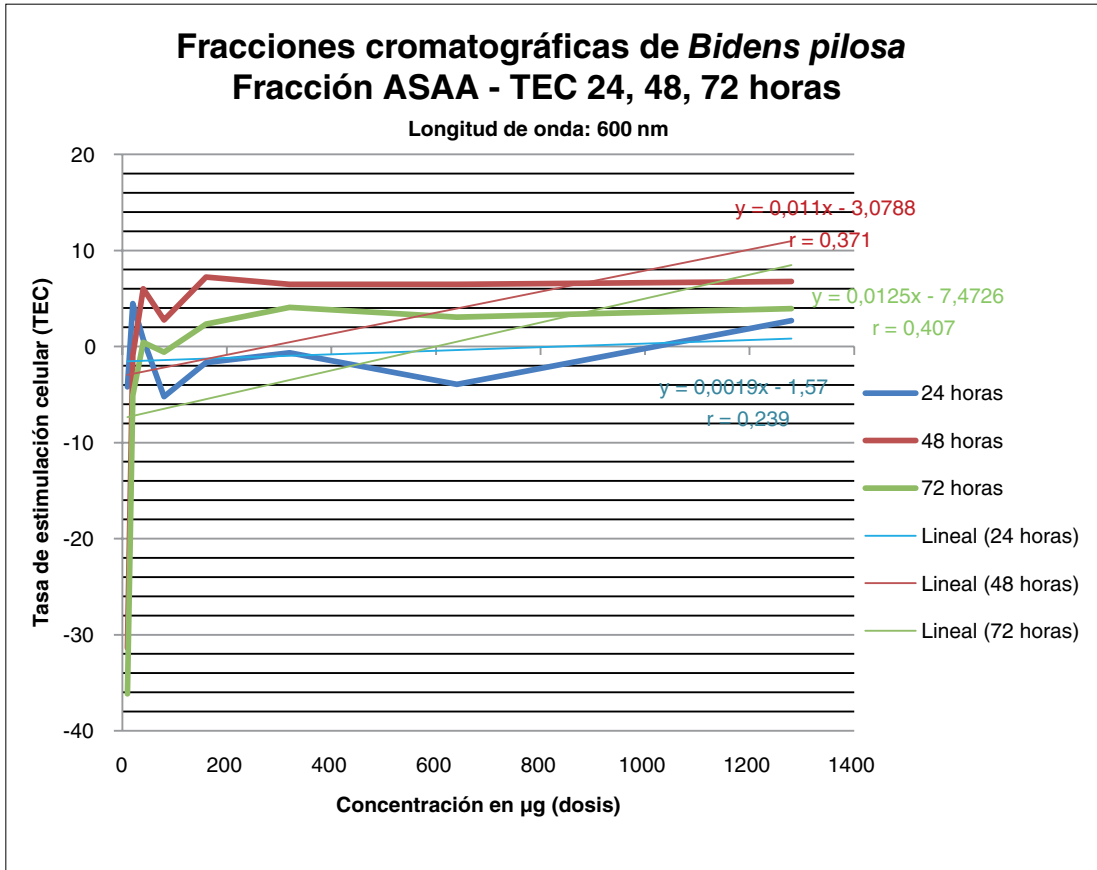


FIGURA 10C. SIMULACIÓN DE LA TASA DE ESTIMULACIÓN DE CRECIMIENTO (TEC) DE LA FRACCIÓN ASAA DE *BIDENS PILOSA*, SEGÚN TIEMPO DE INCUBACIÓN Y DOSIS EXPRESADAS COMO CONCENTRACIÓN EN µG/ML.

VALORES DE TEC SON SIGNIFICATIVAMENTE BAJOS, INCLUSO ALGUNOS NEGATIVOS. LA CORRELACIÓN NO ES BUENA.

LOS RESULTADOS EN LAS FIGURAS B Y C MUESTRAN QUE CUANDO LOS VALORES SON MODERADOS O NEGATIVOS, Y SIMILARES EN DO A LOS PROMEDIOS DEL CONTROL BLANCO, NO AFECTAN EL OBJETIVO DEL TRABAJO (DE ESTÍMULO DEL CRECIMIENTO).

La prueba blanco realizada con células madre mesenquimales humanas (MSC-H), medios de cultivo DMEM más el 1% de los antibióticos estreptomina y penicilina presenta un promedio de 0,257 de DO para un total de 108 observaciones. El control positivo conformado además de los componentes del blanco (células madre, medios de cultivo y antibióticos) con suero fetal bovino (SFB), reconocido como el mejor estimulante del crecimiento celular a la fecha, adicionado al 10% y cuya DO obtenida en promedio de 54 observaciones es de 0,242, no muy distinto al de la prueba blanco. A estos valores se ha aplicado la prueba estadística t de Student que establece la diferencia entre ambos y concluye que no la hay, validando la hipótesis nula.

Este resultado es lógico porque estas pruebas, como todas las otras, se leen en una zona (pico) de 600 nm que no corresponde a la detección de crecimiento celular establecida para la prueba XTT, que es de 450 a 500 nm de longitud de onda en el lector de microplacas.

Las figuras 2 y 3 muestran resultados de extractos de *Bidens pilosa* con valores crecientes a partir de 20 mg/ml con DO de 0,229 y 0,240 hasta la dosis de 1280 mg/ml con DO de 0,767 y 0,584.

Las fracciones AS-Sól y ASMe2CO (figs. 6 y 7) obtenidas por simple separación con solventes muestran en sus concentraciones más altas, 640 mg/ml y 1280 mg/ml, y después de un crecimiento gradual, sus DO máximas de 0,575 y 0,611, respectivamente.

Las fracciones ASF7 y ASF9 (figs. 8 y 9) son dos de las quince que se obtuvieron de la columna cromatográfica. La primera, la ASF7, así como las dos que se sometieron a una segunda cromatografía con placas preparativas y utilizando el solvente BAW, se denominaron ASAR y ASAA (Figura 4 y 5), y no muestran

diferencias significativas al compararlas con los valores blanco y control positivo; por tanto, pueden ser útiles para, después de desarrollar técnicas de tinción que manifiesten crecimiento o inhibición celular en la longitud de onda de 600 nm, buscar las sustancias químicas de interés.

La figura 7, fracción ASMe2CO, permite apreciar la correlación con valores de dosis totales (7a) y parciales (7b y 7c) logradas con la aplicación estadística a solo 320 mg/ml y 640 mg/ml, respectivamente, efectuadas para apreciar mejor la correlación y validez de la curva de pigmentos en esta fracción hasta una dosis de 640 mg/ml. A partir de esta concentración, en este estudio, no aumenta la DO y en consecuencia no tienen validez cuantitativa, pruebas realizadas con concentraciones tan elevadas. Por ello y para aplicar correctamente la Ley de Lambert y Beer, se recomienda trabajar con muestras diluidas.

La correlación para una dosis de 1280 mg/ml e incubación a 48 horas fue de 0,926 y mejora a 0,990 leída en una concentración de 640 mg/ml.

#### IV. DISCUSIÓN

Este trabajo es parte de un conjunto de ensayos que pretenden establecer procesos de utilización de técnicas sencillas de alto rendimiento, bajo costo y rápida ejecución.

Hemos mostrado con estas experiencias que una técnica con estas características es la prueba XTT, pero que plantea problemas en su aplicación cuando se utiliza para mediciones de extractos de plantas y sus derivados que contienen pigmentos que afectan sus resultados.

Las lecturas a realizarse en un lector de microplacas (Elisa) deben efectuarse

a una longitud de onda de 450 a 500 nanómetros. Sin embargo, se han utilizado en este trabajo todas las lecturas a 600 nm de longitud de onda, con los resultados que se han apreciado antes, habiéndose extraído previamente los pigmentos de los extractos de *Bidens pilosa* con solventes apropiados para, en la última etapa, fraccionar la solución cromatográficamente.

Las fracciones así obtenidas mantienen valores significativamente mayores al blanco y su presencia o ausencia concuerda con las propiedades de los solventes empleados en las diferentes etapas de separación.

Los valores de absorción máximos obtenidos en este trabajo experimental, expresados como DO, para concentraciones de 640 y 1280 mg/ml, varían entre 0,584 y 0,767. Posiblemente, detectan algunos pocos pigmentos a esta longitud de onda de 600 nm; pero son significativamente menores a los que usualmente se observa cuando se miden extractos hidroalcohólicos de *Buddleja globosa* a una longitud de onda de 450 nm, que van de 1,938 (24 horas) a 2,253 (48 horas) de DO para una concentración de 100 mg/ml (13).

Sorprende que los resultados de las pruebas comparativas de las muestras de extractos de *Bidens pilosa*+células madre, que se denominan pruebas especiales en este estudio, no muestran mayor diferencia en cuanto a su DO: 0,240 con las pruebas blanco y, por ende, con las pruebas control positivo, cuando deberían resultar con valores claramente más altos, si es que los pigmentos por sí solos fueran responsables del aumento de la DO, como ocurre con el extracto metanólico de *Bidens pilosa* que a concentraciones de 640 y 1280 mg/ml presenta una DO de 0,470 y 0,638, para una incubación de 48 horas.

Lo único diferente entre los componentes de la prueba especial y los de la prueba experimental del extracto metanólico de *Bidens pilosa* es que a esta última se le ha agregado el medio de cultivo celular DMEN. Este medio está constituido por el colorante rojo de metilo, como indicador de pH en la prueba, y pudiera modificar los resultados habidos en la prueba especial, en favor del aumento de la DO observada y que pudiera haber ocurrido al sumarse este colorante a la mezcla de pigmentos de *Bidens pilosa*. No se descartan otras posibilidades.

Teóricamente, las curvas espectrofotométricas obtenidas de los extractos acuosos y metanólicos de *Zea mays* L. (maíz morado) (ver Anexo I) indicarían que las antocianinas que contienen pudieran ser responsables de esta elevación de la DO. Pero no en este caso, porque si así fuera también habría aparecido este aumento en la prueba especial.

La simulación evidencia un resultado positivo de TEC, cuando en la muestra existen pigmentos registrados en el lector de microplacas. A estos se les denomina, en este estudio, pigmentos vegetales interferentes, porque distorsionan los resultados y no deben aceptarse como tasa de estímulo celular (TEC).

Estos estudios no han abordado la posibilidad de que los pigmentos vegetales mismos pudieran ser la causa de estimulación del crecimiento de las células mesenquimales. Se recomienda realizar experiencias para determinar la DO de otras plantas, además de *Bidens pilosa*.

Es este un ejemplo más acerca de la importancia de identificar y cuantificar las variables (14), particularmente las intervinientes o de confusión (15), y cuando estas forman parte de la variable

independiente, anularlas por separación, extracción u otros procedimientos que impidan su accionar interferente.

En conclusión, la longitud de onda de 600 nm corresponde a una buena zona que no detecta significativamente los pigmentos contenidos en los vegetales, pero tampoco es útil para detectar crecimiento celular según la técnica XTT, que lo hace en forma apropiada en una longitud que va de 450 a 500 nm. Se propone, por ello, desarrollar técnicas de tinción que se lean en la longitud de onda de 600 nm, modificando el color resultante del reactivo que afecta a los compuestos enzimáticos mitocondriales o ensayando otro tipo de pruebas bioquímicas.

Se ha obtenido, a partir del extracto metanólico de *Bidens pilosa*, las fracciones cromatográficas ASAR, ASAA y ASF7 libres de pigmentos vegetales cuando se leen a 600 nm de longitud

de onda, fraccionamiento que puede complementar la eficiencia de la técnica antes sugerida.

Deberá verificarse si este extracto metanólico, así tratado y leído espectrofotométricamente, conserva los metabolitos secundarios o moléculas químicas capaces de estimular o inhibir el crecimiento celular.

## V. AGRADECIMIENTOS

A la Sra. Laura Castro, por su eficiente colaboración en la preparación de este artículo.

### **Fuente de financiamiento**

Este trabajo fue financiado por la Universidad Científica del Sur.

### **Conflictos de interés**

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## ANEXO I

### ESPECTROFOTOMETRÍA DE PIGMENTOS VEGETALES

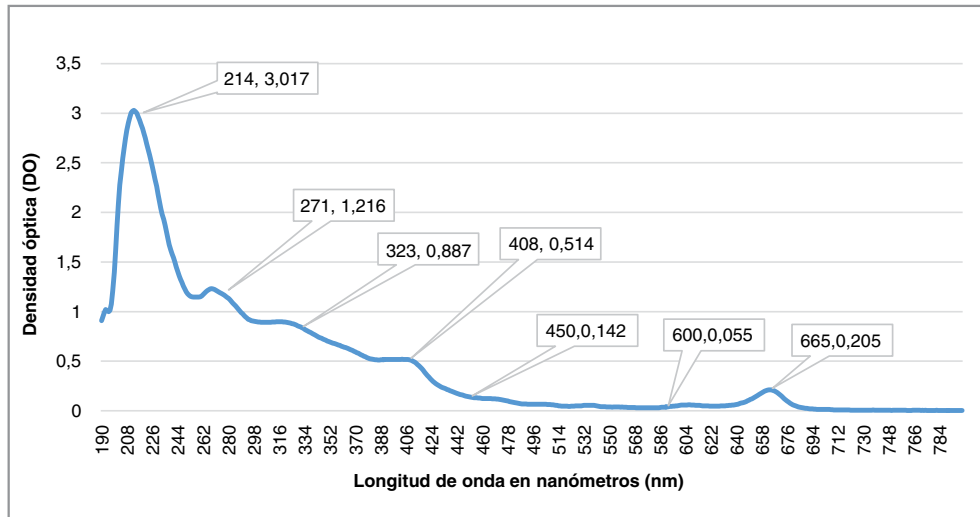


FIGURA 11. EXTRACTO METANÓLICO DE *MEDICAGO SATIVA* (ALFALFA), 2.5 MG/ mL CON ALTO CONTENIDO DE CLOROFILA.

SE OBSERVAN VALORES IMPORTANTES A 450 NM Y A 665 NM. NO ASÍ A 600.

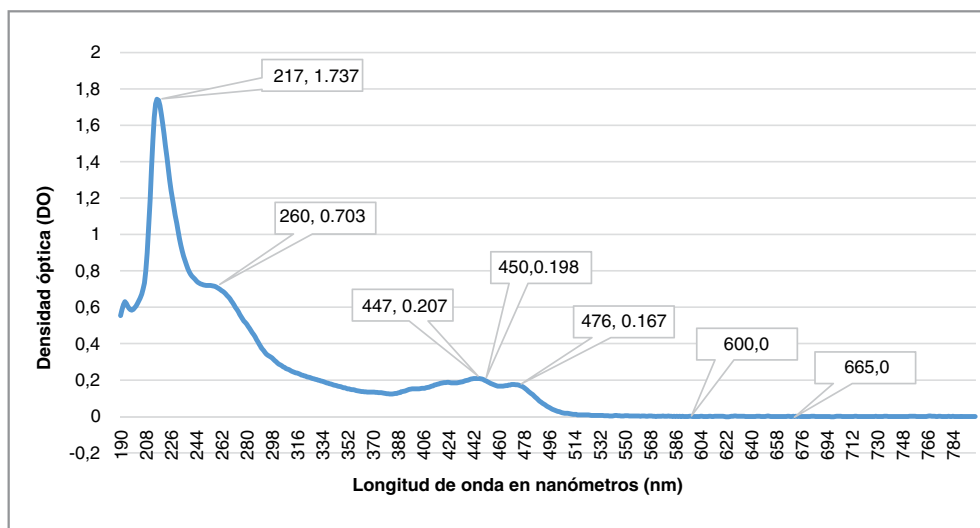


FIGURA 12. EXTRACTO METANÓLICO DE *DAUCUS CAROTA* (ZANAHORIA) 51.3 MG/ mL, CON ALTO CONTENIDO DE B CAROTENO.

SE MUESTRAN VALORES IMPORTANTES EN DO ENTRE 447 Y 476 NM DE LONGITUD DE ONDA.



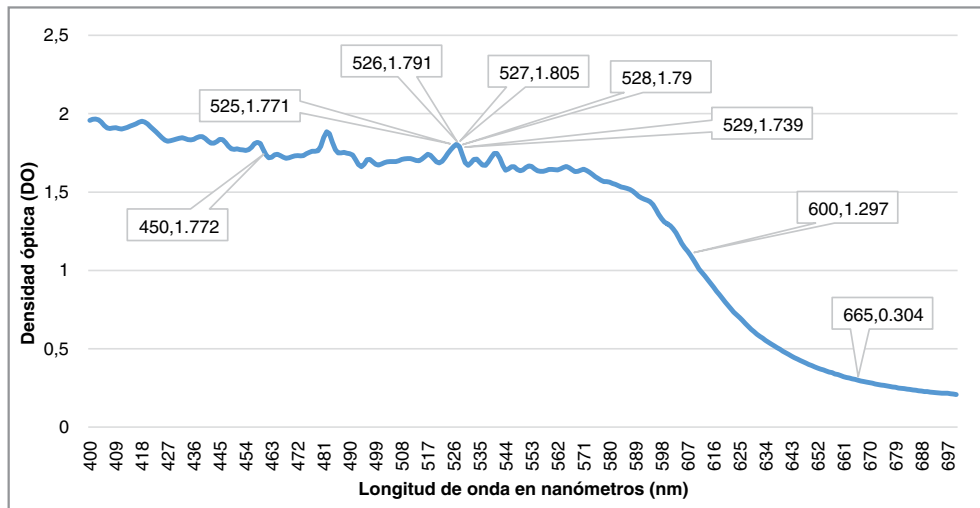


FIGURA 13. EXTRACTO METANÓLICO DE *ZEA MAYS* L. (MAÍZ MORADO) 1.77 MG/ ML CON ALTO CONTENIDO DE ANTOCIANINAS.

SE OBSERVAN VALORES IMPORTANTES EN DO A 600 NM DE LONGITUD, AUNQUE MENORES SIGUEN SIÉNDOLO A 665 NM, E INCLUSO A MAYOR LONGITUD DE ONDA

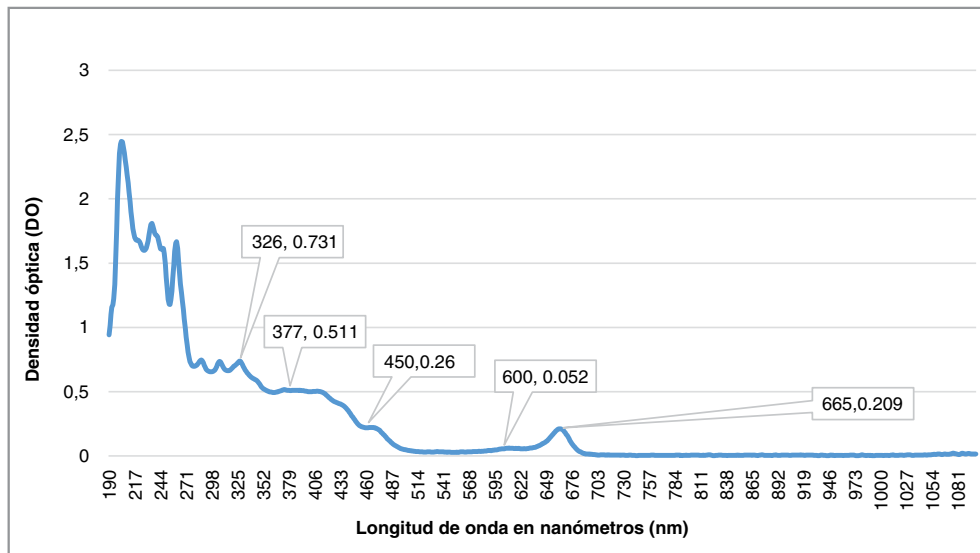


FIGURA 14. EXTRACTO METANÓLICO DE *BIDENS PILOSA* (AMOR SECO) 0.2 MG/ ML CON ALTO CONTENIDO DE CLOROFILA Y PROBABLEMENTE OTROS PIGMENTOS.

SE MUESTRAN VALORES IMPORTANTES EN DO DE 450 A 478 NM DE LONGITUD DE ONDA, PERO NO A 600 NM.

## ANEXO II

## ESTADÍSTICA

TABLA 4. COMPARACIÓN DE LA PRUEBA BLANCO CON EL CONTROL POSITIVO SFB

## A) PRUEBA EN BLANCO

| Incubación: 24 horas |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Placa 1              | 0,247 | 0,261 | 0,276 | 0,272 | 0,288 | 0,272 |
| Placa 2              | 0,157 | 0,265 | 0,294 | 0,238 | 0,259 | 0,255 |
| Placa 3              | 0,272 | 0,210 | 0,234 | 0,231 | 0,228 | 0,221 |
| Placa 4              | 0,257 | 0,235 | 0,253 | 0,252 | 0,290 | 0,529 |
| Placa 5              | 0,271 | 0,249 | 0,280 | 0,255 | 0,374 | 0,268 |
| Placa 6              | 0,230 | 0,451 | 0,709 | 0,284 | 0,313 | 0,299 |

| Incubación: 48 horas |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Placa 1              | 0,204 | 0,221 | 0,225 | 0,251 | 0,245 | 0,234 |
| Placa 2              | 0,208 | 0,231 | 0,240 | 0,241 | 0,240 | 0,231 |
| Placa 3              | 0,205 | 0,209 | 0,221 | 0,216 | 0,237 | 0,227 |
| Placa 4              | 0,240 | 0,217 | 0,224 | 0,226 | 0,246 | 0,242 |
| Placa 5              | 0,227 | 0,214 | 0,225 | 0,223 | 0,423 | 0,229 |
| Placa 6              | 0,189 | 0,193 | 0,308 | 0,210 | 0,224 | 0,213 |

| Incubación: 72 horas |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Placa 1              | 0,215 | 0,234 | 0,237 | 0,250 | 0,260 | 0,250 |
| Placa 2              | 0,222 | 0,242 | 0,253 | 0,251 | 0,252 | 0,243 |
| Placa 3              | 0,224 | 0,231 | 0,243 | 0,250 | 0,257 | 0,254 |
| Placa 4              | 0,255 | 0,239 | 0,245 | 0,246 | 0,256 | 0,253 |
| Placa 5              | 0,236 | 0,227 | 0,238 | 0,235 | 0,702 | 0,239 |
| Placa 6              | 0,208 | 0,219 | 0,230 | 0,229 | 0,239 | 0,231 |

## B) CONTROL POSITIVO CON SFB

|         | 24 horas |       |       | 48 horas |       |       | 72 horas |       |       |
|---------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
|         | Placa 1  | 0,251 | 0,307 | 0,289    | 0,238 | 0,254 | 0,229    | 0,237 | 0,268 |
| Placa 2 | 0,228    | 0,268 | 0,257 | 0,216    | 0,249 | 0,235 | 0,226    | 0,258 | 0,247 |
| Placa 3 | 0,222    | 0,248 | 0,235 | 0,216    | 0,228 | 0,210 | 0,232    | 0,243 | 0,229 |
| Placa 4 | 0,255    | 0,277 | 0,258 | 0,222    | 0,248 | 0,232 | 0,238    | 0,257 | 0,243 |
| Placa 5 | 0,245    | 0,268 | 0,237 | 0,219    | 0,238 | 0,225 | 0,23     | 0,252 | 0,237 |
| Placa 6 | 0,281    | 0,283 | 0,259 | 0,199    | 0,218 | 0,195 | 0,223    | 0,236 | 0,210 |

C) DOS MUESTRAS, ASUMIENDO VARIANZAS DISTINTAS

|  | Prueba en Blanco | Control positivo Con SFB |
|--|------------------|--------------------------|
| Promedio                                   | 0,256787037      | 0,241722222              |
| Varianza                                   | 0,006035739      | 0,000498544              |
| Observaciones                              | 108              | 54                       |
| Hipótesis sobre la diferencia de promedios | 0                |                          |
| Grados de libertad                         | 138              |                          |
| t-Estadístico                              | 1,866855476      |                          |
| P(T<=t) una cola                           | 0,032021778      |                          |
| t Crítica una cola                         | 1,655970383      |                          |
| P(T<=t) dos colas                          | 0,064043555      |                          |
| t Crítica dos colas                        | 1,977303512      |                          |

SE RECHAZA LA HIPÓTESIS NULA QUE ESTIPULA QUE NO HAY DIFERENCIA ENTRE LOS PROMEDIOS O, LO QUE ES LO MISMO, QUE LA DIFERENCIA ENTRE PROMEDIOS ES IGUAL A CERO.

TABLA 5. COMPARACIÓN DE LA PRUEBA BLANCO CON LA PRUEBA ESPECIAL (EXTRACTO DE AMOR SECO + CÉLULAS MADRE)

A) PRUEBA EN BLANCO. Ver página anterior y compararla con lo siguiente:

B) PRUEBA ESPECIAL

| Incubación | 24 horas            | 48 horas            | 72 horas            |
|------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Placa 1    | 0,246, 0,267, 0,262 | 0,231, 0,255, 0,254 | 0,236, 0,256, 0,258 |
| Placa 2    | 0,205, 0,271, 0,298 | 0,249, 0,253, 0,268 | 0,252, 0,254, 0,273 |
| Placa 3    | 0,300, 0,255, 0,255 | 0,241, 0,232, 0,245 | 0,260, 0,255, 0,264 |
| Placa 4    | 0,242, 0,278, 0,278 | 0,223, 0,247, 0,251 | 0,241, 0,265, 0,267 |
| Placa 5    | 0,273, 0,283, 0,324 | 0,238, 0,243, 0,255 | 0,247, 0,250, 0,262 |
| Placa 6    | 0,313, 0,313, 0,317 | 0,217, 0,219, 0,228 | 0,232, 0,232, 0,238 |

t-Test: Dos muestras asumiendo varianzas distintas

|  | Blanco       | Prueba especial de extracto de <i>Bidens pilosa</i> |
|--|--------------|---|
| Promedio                                   | 0,256787037  | 0,25687037  |
| Varianza                                   | 0,006035739  | 0,00063653  |
| Observaciones                              | 108          | 54  |
| Hipótesis sobre la diferencia de promedios | 0            |   |
| Grados de libertad                         | 144          |   |
| t-Estadístico                              | -0,010129957 |   |
| P(T<=t) una cola                           | 0,495965811  |   |
| t Crítica una cola                         | 1,655504178  |   |
| P(T<=t) dos colas                          | 0,991931622  |   |
| t Crítica dos colas                        | 1,976575034  |   |

NO EXISTE LA DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE LAS MEDIAS (PROMEDIOS) Y NO SE PUEDE RECHAZAR LA HIPÓTESIS NULA (HIPÓTESIS CERO EN EL CUADRO ANTERIOR), LO QUE SIGNIFICA QUE NO HAY DIFERENCIAS ENTRE LAS DOS MUESTRAS COMPARADAS, BLANCO Y PRUEBA ESPECIAL. EL VALOR T-ESTADÍSTICO CALCULADO ES -0,010129957.

**TABLA 6.** DOSIS ÓPTICA OBTENIDA DE APLICAR LA TÉCNICA XTT AL EXTRACTO METANÓLICO TOTAL DE *BIDENS PILOSA* + CÉLULAS MADRE + MEDIO DE CULTIVO DMEM E INCUBADO, A 24, 48 Y 72 HORAS

|                           | Incubado a 24 horas  | Incubado a 48 horas | Incubado a 72 horas |
|---------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Microgramos/<br>mililitro | Densidad óptica (DO) |                     |                     |
| 10                        | 0,288, 0,306, 0,336  | 0,207, 0,223, 0,234 | 0,227, 0,239, 0,251 |
| 20                        | 0,290, 0,302, 0,304  | 0,224, 0,226, 0,237 | 0,237, 0,235, 0,247 |
| 40                        | 0,305, 0,334, 0,345  | 0,229, 0,244, 0,264 | 0,244, 0,259, 0,270 |
| 80                        | 0,361, 0,366, 0,350  | 0,270, 0,272, 0,286 | 0,266, 0,268, 0,284 |
| 160                       | 0,387, 0,428, 0,450  | 0,312, 0,334, 0,347 | 0,316, 0,335, 0,348 |
| 320                       | 0,474, 0,491, 0,466  | 0,370, 0,383, 0,370 | 0,383, 0,390, 0,380 |
| 640                       | 0,575, 0,585, 0,599  | 0,457, 0,476, 0,478 | 0,459, 0,438, 0,476 |
| 1280                      | 0,778, 0,751, 0,773  | 0,661, 0,618, 0,636 | 0,665, 0,615, 0,639 |

LA MAYOR DOSIS DE 1280 MICROGRAMOS DE ESTA PRUEBA ES LA MISMA DE LA PRUEBA ESPECIAL DE EXTRACTO DE *BIDENS PILOSA* + CÉLULAS MADRE, PERO DIFIERE SIGNIFICATIVAMENTE DE ESTA, PORQUE CONTIENE EL MEDIO DE CULTIVO DMEM Y SUS RESULTADOS EN DO SON MÁS ELEVADOS.

EN LA MISMA PLACA 6, SE HA TRABAJADO LA PRUEBA EXPERIMENTAL CONSTITUIDA POR EL EXTRACTO METANÓLICO TOTAL DE *BIDENS PILOSA*, CON DOSIS QUE VAN DE 10 A 1280 MICROGRAMOS E INCUBADAS DURANTE 24, 48 Y 72 HORAS.

**TABLA 7.** COMPARACIÓN POR ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS RESULTADOS PROMEDIO EN DO DE TRES POBLACIONES, INCUBADAS A 24, 48 Y 72 HORAS, PARA DETERMINAR SI SON IGUALES O DIFERENTES

24 horas

0,247, 0,157, 0,272, 0,257, 0,271, 0,230, 0,261, 0,265, 0,210, 0,235, 0,249, 0,451, 0,276, 0,294, 0,234, 0,253, 0,280, 0,709, 0,272, 0,238, 0,231, 0,252, 0,255, 0,284, 0,288, 0,259, 0,228, 0,290, 0,374, 0,313, 0,272, 0,255, 0,221, 0,529, 0,268, 0,299, 0,251, 0,228, 0,222, 0,255, 0,245, 0,281, 0,307, 0,268, 0,248, 0,277, 0,268, 0,283, 0,289, 0,257, 0,235, 0,258, 0,237, 0,259

48 horas

0,204, 0,208, 0,205, 0,240, 0,227, 0,189, 0,221, 0,231, 0,209, 0,217, 0,214, 0,193, 0,225, 0,240, 0,221, 0,224, 0,225, 0,308, 0,251, 0,241, 0,216, 0,226, 0,223, 0,210, 0,245, 0,240, 0,237, 0,246, 0,423, 0,224, 0,234, 0,231, 0,227, 0,242, 0,229, 0,213, 0,238, 0,216, 0,216, 0,222, 0,219, 0,199, 0,254, 0,249, 0,228, 0,248, 0,238, 0,218, 0,229, 0,235, 0,210, 0,232, 0,225, 0,195

72 horas

0,215, 0,222, 0,224, 0,255, 0,236, 0,208, 0,234, 0,242, 0,231, 0,239, 0,227, 0,219, 0,237, 0,253, 0,243, 0,245, 0,238, 0,230, 0,250, 0,251, 0,250, 0,246, 0,235, 0,229, 0,260, 0,252, 0,257, 0,256, 0,702, 0,239, 0,250, 0,243, 0,254, 0,253, 0,239, 0,231, 0,237, 0,226, 0,232, 0,238, 0,230, 0,223, 0,268, 0,258, 0,243, 0,257, 0,252, 0,236, 0,248, 0,247, 0,229, 0,243, 0,237, 0,210

**RESUMEN**

| Grupos   | Muestras | Suma total | Media    | Varianza |
|----------|----------|------------|----------|----------|
| 24 horas | 54       | 14,947     | 0,276796 | 0,006518 |
| 48 horas | 54       | 12,430     | 0,230185 | 0,001068 |
| 72 horas | 54       | 13,409     | 0,248315 | 0,004128 |

**ANOVA**

| Variación de fuente | SS       | df  | MS       | F        | P-valor  | F crítico |
|---------------------|----------|-----|----------|----------|----------|-----------|
| Entre grupos        | 0,059625 | 2   | 0,029812 | 7,635643 | 0,000682 | 3,052891  |
| En grupos           | 0,620793 | 159 | 0,003904 |          |          |           |
| Total               | 0,680417 | 161 |          |          |          |           |

Alejandro Fukusaki, José Amiel Pérez, Nathaly Enciso, Álvaro Marcelo, Carlos Altamirano, Rafael Amiel, Obert Marín-Sánchez, Javier Enciso

EL RESULTADO MUESTRA QUE LOS PROMEDIOS DE LAS TRES POBLACIONES (24, 48, 72 HORAS) NO SON IGUALES; POR TANTO, SE RECHAZA LA HIPÓTESIS NULA  $H_0$ , QUE TODOS SON IGUALES: "AL MENOS UNA ES DIFERENTE".

t-Test: Dos muestras asumiendo varianzas distintas

|  | 24 horas    | 48 horas    |
|--|-------------|-------------|
| Media                                      | 0,276796296 | 0,230185185 |
| Varianza                                   | 0,006517750 | 0,001067814 |
| Observaciones                              | 54          | 54          |
| Hipótesis sobre la diferencia de promedios | 0           |             |
| Grados de Libertad                         | 70          |             |
| t-Estadístico                              | 3,932714223 |             |
| P(T<=t) una cola                           | 9,7636E-05  |             |
| t Crítica una cola                         | 1,66691448  |             |
| P(T<=t) dos colas                          | 0,000195272 |             |
| T Crítica dos colas                        | 1,994437086 |             |

t-Test: Dos muestras asumiendo varianzas distintas

|  | 24 horas    | 72 horas    |
|--|-------------|-------------|
| Promedio                                   | 0,276796296 | 0,248314815 |
| Varianza                                   | 0,006517750 | 0,004127503 |
| Observaciones                              | 54          | 54          |
| Hipótesis sobre la diferencia de promedios | 0           |             |
| Grados de libertad                         | 101         |             |
| t-Estadístico                              | 2,028530129 |             |
| P(T<=t) una cola                           | 0,022569106 |             |
| t Crítica una cola                         | 1,660080631 |             |
| P(T<=t) dos colas                          | 0,045138213 |             |
| t Crítica dos colas                        | 1,983730950 |             |

t-Test: Dos muestras asumiendo varianzas distintas

|  | 48 horas     | 72 horas    |
|--|--------------|-------------|
| Promedio                                   | 0,230185185  | 0,248314815 |
| Varianza                                   | 0,001067814  | 0,004127503 |
| Observaciones                              | 54           | 54          |
| Hipótesis sobre la diferencia de promedios | 0            |             |
| Grados de libertad                         | 79           |             |
| t-Estadístico                              | -1,848331179 |             |
| P(T<=t) una cola                           | 0,034148219  |             |
| t Crítica una cola                         | 1,664371410  |             |
| P(T<=t) dos colas                          | 0,068296438  |             |
| t Crítica dos colas                        | 1,990450177  |             |

COMO LA PRUEBA ANOVA NO INDICA CUÁLES SON LAS MEDIAS DIFERENTES DE ESTAS TRES POBLACIONES, SE HICIERON PRUEBAS T (STUDENT) POR PARES. HIPÓTESIS NULA: LOS PROMEDIOS SON IGUALES.

- COMPARANDO, AL 95% DE CONFIANZA, LOS RESULTADOS DE 24 Y 48H, SE RECHAZA LA HIPÓTESIS NULA.
- COMPARANDO, AL 95% DE CONFIANZA, LOS RESULTADOS DE 24 Y 72H, SE RECHAZA LA HIPÓTESIS NULA.
- COMPARANDO, AL 95% DE CONFIANZA, LOS RESULTADOS DE 48 Y 72H, NO SE RECHAZA LA HIPÓTESIS NULA.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liu ZJ, Zhuge Y, Velásquez OC. Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 106: 984-91.
2. Yang JA, Chung HM, Won CH, Sung JH. Potential application of adiposederived stem cells and their secretory factors to skin: discussion from both clinical and industrial viewpoints. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(4): 495-503.
3. Kuhbier JW, Weyand B, Sorg H, Radtke C, Vogt PM, Reimers K. Stem cells from fatty tissue: A new resource for regenerative medicine? *Chirurg.* 2010; 81(9): 826-32.
4. Lam HW, Lin HCH, Lao SCH, Gao JL, Hong SJ, Leong CHW, Yue PYK, Kwan YW, Leung AYH, Wang YT, Lee SM. The angiogenic effects of *Angeliuca sinensis* extracto on HUVEC in vitro and zebrafish in vivo. *J. Cell. Biochem.* 2008; 103: 195-211.
5. Amiel-Pérez J, Enciso N, Fukusaki A, Amiel-Sáenz J. Metaanálisis de la técnica XTT utilizada en estudios de extractos de plantas en la inhibición o expansión celular. *Científica* 2014; 11(3): 205-14.
6. Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nanterment PG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud J, Coladourous EA, Paulvannan K, Sorensen EJ. Total synthesis of taxol. *Nature* 1994; 367: 630-4.
7. Vicente MA, Vázquez MN, Entrena A, Olmedillas S, García-Arranz M, García-Olmo D, Zapata AG. Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. *Stem Cells and Development* 2011; 20(6): 1011-9.
8. Baer PC, Griesche N, Luttmann W, Schubert R, Luttmann A, Geiger H. Human adipose-derived mesenchymal stem cells *in vitro*: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. *Cytotherapy* 2010; 12(1): 96-106.
9. Scudiero DA et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in cultura using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48: 4827-33.
10. Cui J, 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 hepatocelular carcinoma cell line HepG2 in three-dimensional cultura. *World J Gastroenterol* 2007; 13(41): 5432-9.
11. Dikio ED, Isabirye DA. Determination of chlorophyll-a, pheophytin-a and  $\beta$ -carotene contents of isolated photosynthetic reaction centre complexes. *Asian Journal of Chemistry*; 2011; 23(11): 5001-3.

12. Yang Z, Zhai W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2010; (11): 169-76.
13. Enciso J, Amiel J, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Amiel D, Enciso N, Valdivia E, Rodríguez R, Neyra K, Cano A. Efectos sobre la proliferación de fibroblastos y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de plantas medicinales peruanas. *Científica* 2008; 5: 164-76.
14. Bunge M. *La investigación científica. Su estrategia y su filosofía*. 2da. ed. corregida. Barcelona: Ariel; 1983.
15. Amiel-Pérez J. *Metodología y diseño de la investigación científica*. 1ra. ed. Lima: Fondo Editorial de la Universidad Científica del Sur; 2014.

RECIBIDO: 9/11/2015

ACEPTADO: 19/12/2015

COAUTOR: JOSÉ AMIEL PÉREZ

CORRESPONDENCIA: [jamielp@cientifica.edu.pe](mailto:jamielp@cientifica.edu.pe)