

## REVISIÓN DE LA TÉCNICA XTT. INNOVACIONES PARA SUPERAR VARIABLES INTERFERENTES EN EXTRACTOS DE *Bidens pilosa*

REVIEW OF THE XTT TECHNIQUE. INNOVATIONS TO OVERCOME INTERFERING VARIABLES IN EXTRACTS OF *Bidens pilosa*.

José Amiel-Pérez<sup>1,2,3</sup>, Nathaly Enciso<sup>1,4</sup>, Ana Mayanga<sup>1,2</sup>, Alejandro Fukusaki<sup>1,3</sup>, Salyoc Tapia<sup>1,2</sup>, Álvaro Marcelo<sup>1,3</sup>, Víctor Miranda<sup>1,3</sup>, Javier Enciso-Gutiérrez<sup>1,2</sup>

### RESUMEN

Los estudios que investigan efectos anti-tumorales se van incrementando significativamente desde el descubrimiento del paclitaxel (taxol), principio activo proveniente de la planta *Taxus brevifolia* y aprobado por la Food Drug Administration para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Un aporte destacado en esta búsqueda lo proporcionaron las técnicas que utilizan derivados de las sales de tetrazolium, particularmente la técnica XTT, de la que nos ocupamos en este estudio metodológico. El problema radica en ciertas imprecisiones y resultados a veces inciertos que presenta su aplicación, particularmente cuando esta ocurre con plantas medicinales constituidas por pigmentos, principalmente clorofila y betacaroteno. Los objetivos de este trabajo experimental son determinar si el extracto metanólico de *Bidens pilosa* es un estimulante mejor que el suero fetal bovino para la expansión de las células

madre mesenquimales humanas, y a la vez perfeccionar la técnica XTT para superar, de manera simple, los problemas antes expuestos. Después de extraer las muestras con metanol a 40 °C, se verificó su efecto proliferativo sobre las células madre mesenquimales utilizando los procedimientos establecidos para el efecto y cuantificando los resultados mediante la técnica colorimétrica XTT. En el diseño experimental, las pruebas con los extractos se prepararon en concentraciones crecientes, desde 0,625 µg/mL hasta 160 µg/mL, y las pruebas comparativas consideraron las pruebas blanco, una para cada concentración, con todos los elementos que conformaban las pruebas experimentales, pero sin células madre. Para el control positivo se usó suero fetal bovino al 10%. Se concluye, a partir de los resultados obtenidos, que el extracto metanólico de *Bidens pilosa* no estimula la expansión de las células madre mesenquimales humanas, a diferencia del suero fetal bovino, que sí lo

<sup>1</sup> UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. INSTITUTO DE MEDICINA REGENERATIVA.

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

<sup>3</sup> UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LABORATORIO DE QUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES.

<sup>4</sup> UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. FACULTAD DE VETERINARIA.

hace. Las pruebas estadísticas consideran  $p = < 0,05$  en todos los casos. Se propone una fórmula más simple, pero más segura para este caso, eliminando la medición de referencia que usualmente se elegía entre 630 a 690 nm de longitud de onda.

**Palabras clave:** técnica XTT, pigmentos vegetales clorofila, betacaroteno, *Bidens pilosa*, expansión celular, células madre mesenquimales humanas

## ABSTRACT

Studies investigating the antitumor effects are increasing significantly since the discovery of paclitaxel (taxol), an active ingredient from the plant *Taxus brevifolia* and approved by the Food and Drug Administration for the treatment of various types of cancer. A prominent contribution in this search was provided by the techniques that use derivatives of the tetrazolium salts, particularly the XTT technique that we are dealing with in this methodological study. The problem lies in certain inaccuracies and sometimes uncertain results that its application presents particularly when this occurs with medicinal plants consisting of pigments mainly chlorophyll and beta-carotene. The objectives of this experimental work were to determine if the methanol extract of *Bidens pilosa* was a better stimulant than fetal bovine serum as a stimulant of the growth of human mesenchymal stem cells, and at the same time to improve the XTT technique to overcome, in a simple way, the problems discussed above. After extracting the samples with methanol at 40 °C, their proliferative effect on the mesenchymal stem cells was verified using the established procedures for the effect and quantifying the results using the XTT colorimetric technique. In the experimental design, the tests with the extracts were prepared in increasing concentrations, from 0,625µg/mL to 160µg/mL and

the comparative tests considered the control tests, one for each concentration, with all the elements that made up the experimental tests but without stem cells. For the positive control, 10% Fetal Bovine Serum was used. Based on our results we concluded that the methanol extract of *Bidens pilosa* did not stimulate the growth of human mesenchymal stem cells, unlike the Bovine Fetal Serum, which it did. The statistical tests considered  $p = < 0,05$  in all cases. A simpler but safer formula is proposed for this case, eliminating the reference measurement that was usually chosen between 630 and 690 nm of wavelength.

**Keywords:** XTT technique, chlorophyll, beta carotene, vegetable pigments, *Bidens pilosa*, cell growth, human mesenchymal stem cells.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de principios activos anti-tumorales en las plantas medicinales adquirió gran importancia desde que fue descubierto el paclitaxel, conocido comercialmente como taxol, después de estudiar cerca de 30 000 plantas diferentes en los Estados Unidos de América. Este principio activo fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1994 para el tratamiento de cáncer ovárico, gracias a sus efectos quimioterápicos notables y, luego, en 1997, para tratar el cáncer de mama. Posteriormente, se le buscaron otras aplicaciones (1, 2).

Desde entonces, se han incrementado significativamente las investigaciones que indagan por el efecto citotóxico de muchas plantas oriundas de diversos países del mundo.

Un destacado aporte en esta búsqueda fue proporcionado por las técnicas MTT y XTT, sencillas, de bajo costo y más seguras que aquellas que utilizan técnicas basadas en el uso de radioisótopos (3),

las cuales presentan mayor complejidad, son más exigentes y requieren medidas de protección radiológica (4).

Estas técnicas se fundamentan en la actividad enzimática de succinato-desidrogenasa de las mitocondrias celulares que, mientras las células están vivas, emiten enzimas capaces de reducir las sales de tetrazolium a compuestos de formazán. Al morir las células, dejan de emitir aquellas enzimas. Naturalmente, esta prueba servirá también para detectar y cuantificar el crecimiento celular, cuando se busca expansión celular.

Las sales de tetrazolium utilizadas en los ensayos XTT, inicialmente, son incoloras o de color ligeramente amarillo, y cuando se transforman en sales de formazán viran a un color naranja nítido que puede leerse espectrofotométricamente en una longitud de onda que va de 450 a 500 nanómetros (5).

La prueba MTT, para su lectura, debe disolver el compuesto de formazán obtenido, insoluble en agua, con solventes apropiados (6). En cambio, en la prueba XTT, el producto final es líquido, de fácil lectura.

Nuestro equipo, desde un inicio, eligió la XTT, bajo un modelo de experimentación muy difundido como el de Cui et al. (7), aunque con algunas diferencias, pues este utilizó la técnica MTT y el cultivo tridimensional. Particularmente, nos interesamos en la búsqueda de un sustituto del suero fetal bovino (SFB) como estimulante del crecimiento celular, porque podría afectar a las células madre en su proceso de cultivo, ya que estas células son muy sensibles y con gran tendencia a mutar (8), sobre todo por su gran similitud con el genoma de los mamíferos. Por este motivo, se consideró apropiada la búsqueda de estimulantes de la expansión celular en las plantas medicinales.

Después de varias publicaciones referidas a la expansión o inhibición celular, efectuamos un autometaanálisis (9), es decir, un análisis de resultados comparativos de nuestras propias experiencias que habíamos publicado en más de una revista.

El resultado fue sorprendente. No pudimos aplicar estadística a estos resultados por los sucesivos e importantes cambios realizados y oportunamente publicados, en los que el objetivo era encontrar extractos de plantas medicinales con capacidad de inhibir o estimular el crecimiento celular. Sin embargo, fue muy útil este estudio porque con él concluimos que era necesario perfeccionar la técnica XTT, pues tal como la estábamos aplicando, probablemente, conducía a errores. Sospechamos de los pigmentos cuya existencia en las plantas sería captada de los diferentes solventes utilizados y, al final, ofrecería dudosos resultados, tal vez erróneos. Estudios experimentales posteriores confirmaron nuestra hipótesis.

Se tenía que utilizar como prueba en blanco una que, como era lógico, no debería contener la variable independiente (VI) —la variable causa— y, por tanto, excluir los extractos que la contienen. Efectuábamos la medición del crecimiento estimulado por los extractos que contenían la variable dependiente (VD), pero incluían las variables interferentes (también llamadas de confusión): los pigmentos clorofila,  $\beta$ -caroteno, antocianina y, tal vez, otros (10).

En este trabajo, realizamos las correcciones necesarias para superar el problema, las cuales se detallan en la sección "Materiales y métodos". Estas modificaciones se aplicaron fundamentalmente en el blanco, sin necesidad de efectuar pruebas adicionales de separaciones químicas, cromatográficas u otras técnicas que también hemos efectuado y

publicado anteriormente (11, 12, 13, 14), pero que esperamos corregir y simplificar para disminuir costos. Lo que se busca es efectuar muchas pruebas sencillas en la fase inicial del *screening* y así llegar con menos operaciones y más directamente al principio activo, la molécula química que anhelamos conocer y aplicar.

El objetivo principal de este trabajo es verificar si el extracto metanólico de *Bidens pilosa* es mejor estimulante de la expansión de células madre mesenquimales humanas que el suero fetal bovino. También se propone innovar la técnica XTT, para facilitar en una gran medida su aplicación en la búsqueda de principios activos medicamentosos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRA

La muestra de la planta *Bidens pilosa* (amor seco) utilizada en esta experiencia es la misma del trabajo publicado anteriormente (11), que fue recolectada el 18 de febrero de 2015 y se conservó hasta octubre del mismo año, cuando se inició el presente trabajo. Se repite en esta ocasión la descripción de la tarea realizada, con las naturales diferencias surgidas en esta experiencia.

La muestra se recolectó en el distrito de Cieneguilla, ubicado en el valle de Lurín, departamento de Lima, a una altura de 360 metros sobre el nivel del mar, cuya temperatura promedio es de 25 °C y su humedad, del 87%.

Se envió la muestra para su estudio taxonómico al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde se ratificó su género y especie.

### EXTRACCIÓN METANÓLICA

Las hojas se secaron a la sombra, entre 22 y 25 °C; luego fueron molidas y pasadas por un tamiz. Se obtuvo un polvo marrón verdoso del cual se tomaron 300 g, los cuales se extrajeron con 1500 mL de metanol y se colocaron en baño María durante 24 horas a una temperatura de 40 °C. Después de filtrar el extracto, se repitió este proceso otras seis veces, hasta el agotamiento.

Finalmente, se concentró a una temperatura de 39 °C en el rotavapor, a una presión de 200 mbar, y se obtuvo 40 g de extracto metanólico, cuyo rendimiento es del 13,33%

Se conservó el extracto metanólico de *B. pilosa* en frascos de vidrio bien cerrados, a temperatura ambiente, pero al abrigo de la luz.

### EFEECTO PROLIFERATIVO

Vista la placa de forma horizontal, cada fila consta de 12 pocillos, que suman en total 96, porque son ocho filas. Para realizar la prueba experimental, en cada uno de los 10 pocillos internos se colocaron  $5 \times 10^3$  células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (ADSC); por tanto, solo se usaron 80 pocillos y los 16 restantes, los externos, contuvieron pruebas referenciales de menor importancia. Se añadieron a continuación el medio de cultivo celular DMEM-F12 y, después, los extractos de *B. pilosa*, en concentraciones que aumentaron progresivamente. Para preparar los controles, en vez de los extractos, en el caso del positivo se agregó SFB al 10% y para la prueba en blanco se incluyeron los extractos de *B. pilosa*, pero no las células madre.

Todo este conjunto se colocó en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5% y alta humedad a 37 °C durante 2 horas, con

el fin de lograr su adherencia; luego se incubó a 24 y 48 horas, en las mismas condiciones precisadas. Previamente, se preparó una placa con las características y agregados anteriores, pero que se procesó a las cero horas, antes de las 2 horas indicadas.

## ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO

Para observar las curvas espectrofotométricas de diluciones del extracto metanólico de *B. pilosa*, se analizaron 4 diluciones en un rango que va desde los 200 a los 700 nm, en concentraciones de 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL, y 1,6 mg/mL. Para tal efecto, se utilizó un espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300.

## TÉCNICA DE COLORIMETRÍA XTT

Se ha utilizado la técnica XTT, cuyo reactivo principal son las sales de tetrazolium, las cuales son reducidas por las enzimas mitocondriales que emiten las células metabólicamente activas, y pasan a compuestos de formazán de color naranja que son leídas en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Como lecturas referenciales se registró la absorción a 650 y 665 nm en todas las pruebas realizadas. El lector de absorbancia de microplacas utilizado fue un equipo Biotek modelo ELx808.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

El método consistió en realizar pruebas de muestras de extractos metanólicos de *Bidens pilosa* (amor seco) preparadas a dosis crecientes y compararlas con una que, en vez de los extractos, contenía suero fetal bovino (SFB) al 10%. Se eligió la *B. pilosa* porque en trabajos anteriores

mostró una muy alta absorbancia (DO de 3 a más).

En el diseño experimental, las pruebas fueron:

### 1. Pruebas de la experiencia

Extractos metanólicos en concentraciones crecientes de 0,625 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, 160 µg/mL. En total, 9 lecturas.

### 2. Pruebas comparativas

- a. Pruebas en blanco (PB). A cada prueba experimental, para cada concentración, correspondía un control en blanco que consistía en incluir todos los elementos que conformaban la prueba, menos las células madre:

Medio de cultivo DMEM-F12 más un 1% de estreptomycin/penicilina, más extracto metanólico de *B. pilosa* a la concentración correspondiente.

- b. Control positivo (CP). En este caso, se usó SFB al 10% como forma de comparación con los extractos:

SFB al 10% + medio de cultivo DMEM-F12 + 1% de estreptomycin/penicilina + células madre mesenquimales (ADSC) derivadas de tejido adiposo humano.

## RESULTADOS

En el análisis espectrofotométrico, las concentraciones que evidenciaron más claramente los picos en el rango UV y visible fueron las de 0,2 mg/mL y 1,6 mg/mL (figuras 1 y 2, respectivamente).

En el espectrograma correspondiente a la concentración de 0,2 mg/mL se observan picos definidos a las longitudes de 226 nm, 268 nm, 288 nm, 307 nm y 325 nm,

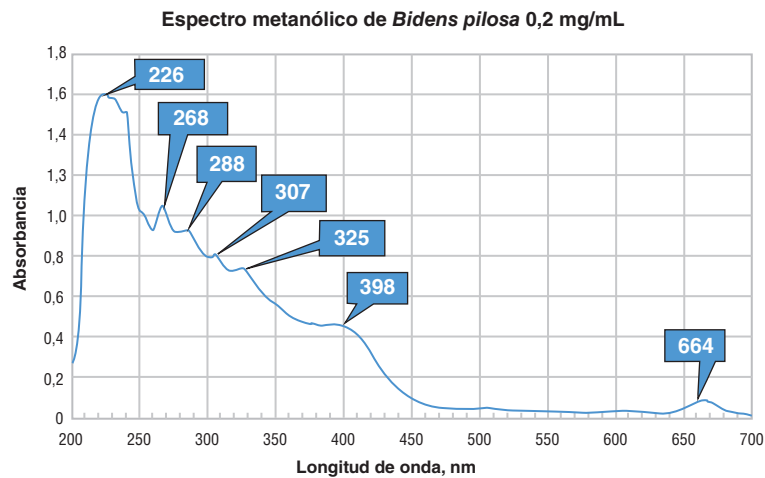


FIGURA 1. ESPECTRO UV VISIBLE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *B. PILOSA* A UNA CONCENTRACIÓN DE 0,2 mg/mL.

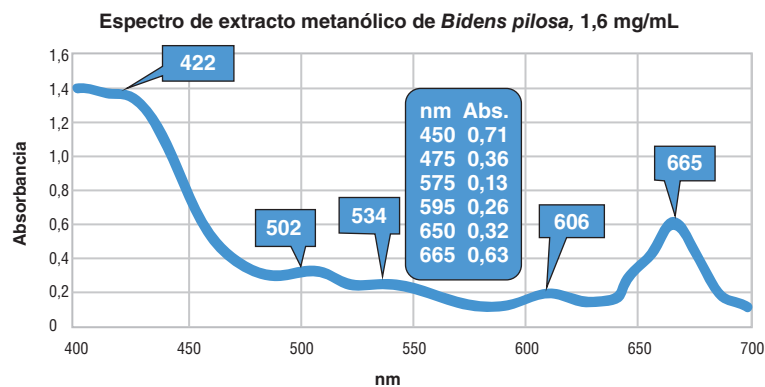


FIGURA 2. ESPECTROGRAMA VISIBLE DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *B. PILOSA* A UNA CONCENTRACIÓN DE 1,6 mg/mL.

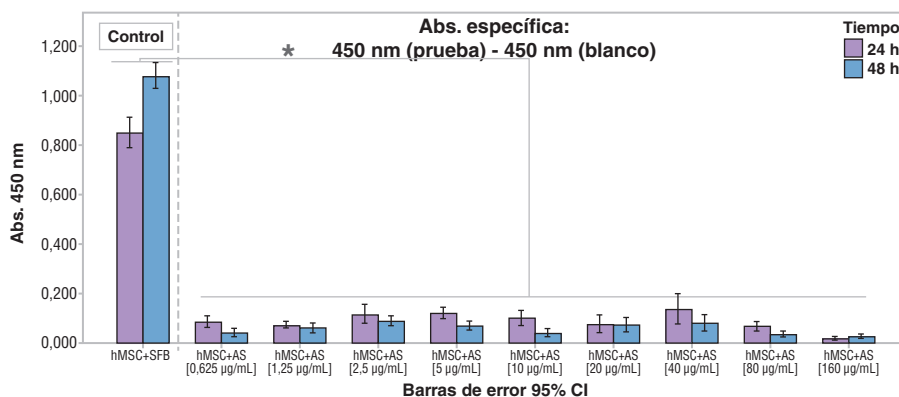
que pueden tratarse de compuestos flavónicos. Además, se evidencia un pico de 664 nm, el cual podría tratarse de la clorofila.

En el espectrograma correspondiente a la concentración de 1,6 mg/mL, se observa de manera muy notoria el pico correspondiente a la longitud 665 nm, el cual corrobora que se trata de la clorofila presente en el extracto metanólico de *Bidens pilosa*.

Semuestran los datos de viabilidad celular, medidos por absorbancia a 450 nm,

de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) que fueron tratadas con diferentes concentraciones (0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 µg/mL) de extracto metanólico de *Bidens pilosa* "Amor seco" (AS) y fueron procesadas para el análisis estadístico correspondiente, cuyas estadísticas descriptivas se resumen en el anexo II, tabla 3, para las 24 y 48 horas, respectivamente.

Se observa que hay una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) del grupo control hMSC con suero fetal bovino al 10% (hMSC+SFB) con respecto a los otros



**FIGURA 3.** GRÁFICO DE BARRAS DE LA EVALUACIÓN A 24 Y 48 HORAS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS (hMSC) QUE FUERON TRATADAS CON EXTRACTO DE AS A DIFERENTES CONCENTRACIONES (0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 Y 160  $\mu$ g/mL). LA ABSORBANCIA INDICA VIABILIDAD. (\*)  $P < 0,05$ .

grupos que fueron tratados con diferentes concentraciones del extracto, tanto para las 24 como para las 48 horas. Dichos resultados estadísticos, con un intervalo de confianza del 95%, se muestran en la figura 3.

En las figuras 4a y 4b, se comparan las fórmulas de las pruebas de absorción específica (A E) de la prueba a 450 nm, menos el blanco a la misma longitud de onda:

$$AE1 = 450 \text{ NM (PRUEBA)} - 450 \text{ NM (BLANCO)}$$

Con la fórmula recomendada por los proveedores, en las que, además de lo consignado en la fórmula anterior, se resta del valor obtenido a 650 nm, el cual, según algunos autores, corresponde a lecturas inespecíficas (fondo):

$$AE2 = 450 \text{ NM (PRUEBA)} - 450 \text{ NM (BLANCO)} - 650 \text{ NM (PRUEBA)}$$

## DISCUSIÓN

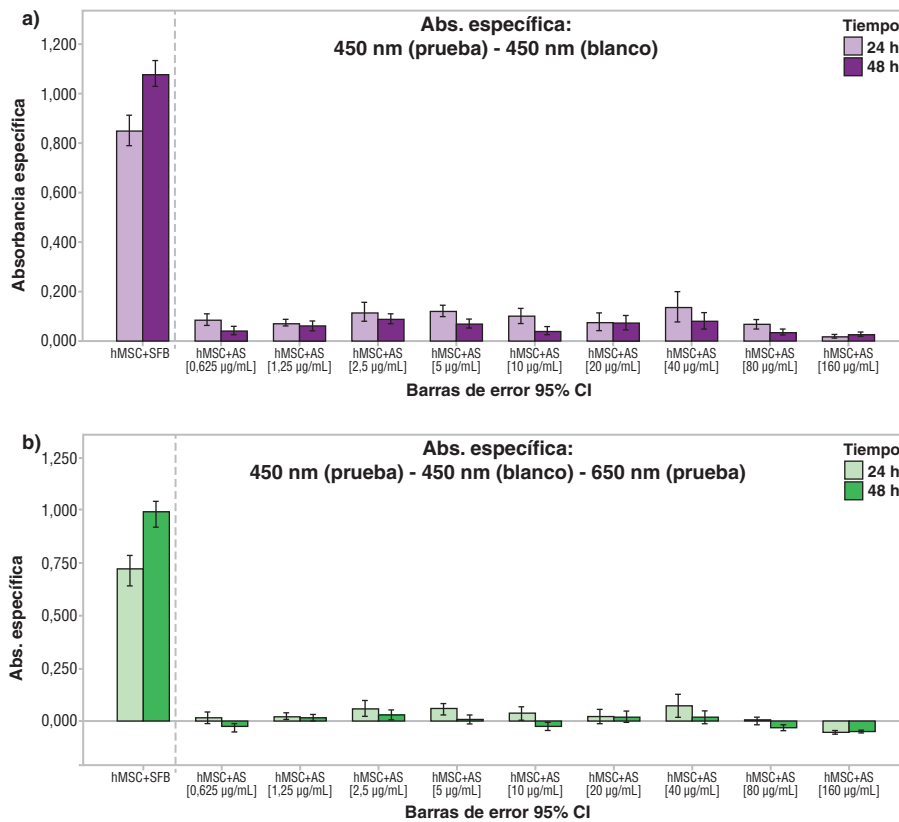
Los espectros UV de *B. pilosa* (Fig. 1 y 2) muestran un pico a 288 nm, que coincide con picos representativos a 285 nm encontrados para *B. gardneri*, lo que, probablemente, indique la abundancia

de compuestos fenólicos, tales como flavanonas (Silva, 2013) (15). Entre los flavonoides aislados del género *Bidens*, se han encontrado chalconas, flavanoles y auronas. Los flavonoides de *Bidens* han mostrado actividades biológicas con propiedades antivirales, estimulación de la expresión de IFN y antioxidantes (Venkateswarlu et al., 2004) (16).

A partir de los resultados obtenidos (Fig. 3), se observa que existe una diferencia significativa entre el grupo hMSC + SFB con respecto a los otros grupos que fueron tratados a diferentes concentraciones de extracto; esto nos indica que el extracto metanólico de hojas de *Bidens pilosa* no tiene un efecto estimulante en el crecimiento celular.

La prueba XTT es una prueba colorimétrica cuantitativa que, al determinar crecimiento o inhibición celular, permite verificar este proceso y aplicarlo en la búsqueda de quimioterápicos para el cáncer o de elementos de expansión de células madre.

Como muchas otras técnicas, su etapa final de detección es la medición de la intensidad de un color determinado que puede resultar de un proceso lumínico, fotocolorimétrico o fluorométrico. Esto



**FIGURA 4.** GRÁFICO COMPARATIVO DE BARRAS ESTADÍSTICAS CON RESPECTO A LAS ABSORBANCIAS ESPECÍFICAS (AE) DEL MISMO ENSAYO DE LA FIGURA 1 A) AE1 = 450 nm (PRUEBA) – 450 nm (BLANCO). B) AE2 = 450 nm (PRUEBA) – 450 nm (BLANCO) – 650 nm (PRUEBA).

**FIGURA 4A.** SON LOS MISMOS VALORES EN ABSORBANCIA DE LA PRUEBA ANTERIOR, CON UNAS DO QUE NO LLEGAN A 0,200, MUCHO MENORES QUE LAS DEL CONTROL POSITIVO.

**FIGURA 4B.** VALORES DE ABSORBANCIA QUE RESULTAN DE LA APLICACIÓN DE LA FÓRMULA ANTERIOR MENUS LA DO OBTENIDA A 650 nm Y QUE, NATURALMENTE, TIENEN QUE SER MENORES A LOS DE LA FIG. 4 A), PERO MUY LIGERAMENTE. SI ELEGIMOS UN VALOR ENTRE 630 Y 690 nm DE LONGITUD DE ONDA (EL DE 665 nm CORRESPONDE EL PROMINENTE PICO DE LA CLOROFILA), LOS RESULTADOS SERÁN NEGATIVOS Y OFRECERÁN UN FALSO TENOR DE EFECTO CITOTÓXICO.

posibilita la participación de diversas variables intervinientes que alteran los resultados esperados; en nuestro caso, en los estudios con plantas medicinales que poseen pigmentos vegetales como clorofila, betacaroteno, antocianinas, etc., los que al presentar valores en el área de la absorbancia del color naranja afectan los resultados reales y constituyen variables de confusión.

En los resultados obtenidos en esta prueba (Fig. 4a y 4b), las diferencias que

se observan en las recomendaciones de los proveedores (4, 5, 6) y las limitaciones reportadas por algunos investigadores (17) ratifican la necesidad de adecuar la técnica, mediante la modificación de las recomendaciones de los proveedores y su ajuste en cada caso específico.

Weina Jiang et al. adaptaron con buenos resultados la técnica XTT para el estudio de algas efectuando los ajustes necesarios (18), precisando las innovaciones requeridas, lo que exige muchas



experiencias confirmativas. Dzitko et al. indican que “cada caso requiere la estandarización de las condiciones experimentales al referirse a su estudio para determinar la influencia de los agentes extracelulares seleccionados para taquizoitos de *Toxoplasma gondii*” (19).

Bonilla et al., en su trabajo “Modificación de un método colorimétrico que usa XTT para la determinación de linfoproliferación,” comentan que “Denizot et al. y luego Hansel et al. modificaron y mejoraron la técnica originalmente descrita por Mossman,” la técnica MTT, y destacan la afirmación de algunos autores acerca de que el alto grado de variación que presenta este método se debe a problemas técnicos (20). Se refieren al método MTT que, aunque presenta algunos lineamientos similares al método XTT, no es exactamente el mismo.

Vallejo comparó la aplicación de la técnica INT y la XTT en un estudio de estimación de la densidad de microorganismos degradadores que se utilizan para la comparación de las dos sales. Estos contribuyeron a la mejora de la técnica, para esta experiencia, con un aumento en la concentración de XTT 0,5 mM a 2 mM, y el tiempo de incubación necesario para lograr un efecto inhibitorio favorable (21).

Goodwin et al. comparan dos sales de tetrazolio, XTT y MTS, que generan formazan soluble, a diferencia de MTT, por lo que no requieren una etapa adicional. Entre ambas técnicas, se inclinan por la MTS (3).

Se han estudiado otros colorantes de tetrazolio además de XTT y MTT, entre ellos el MTS y los WST (6). Además, se deben ensayar técnicas diferentes como la de resazurina, de color azul, que es reducida a resofurina de color rosado, altamente fluorescente, que se puede

leer en una absorbancia de 570 nm o fluorescencia en 530 nm<sub>cx</sub> 590 nm<sub>cm</sub>. Escobar et al. (22) indican que el colorante obtenido, la resofurina, es poco tóxico para las células en estudio, por lo que puede continuarse el trabajo con las mismas células. Los autores mencionados la comparan con la técnica MTT y concluyen que ambas permiten verificar la citotoxicidad cuando se aplican a células tumorales.

En cuanto al diseño de la técnica XTT y las modificaciones que hemos realizado en su ejecución, debemos destacar la utilización apropiada del blanco, que nos ha permitido cambiar el procedimiento matemático recomendado por los proveedores para absorbancia específica y modificar la fórmula por aplicar. La fórmula original, para evitar lecturas inespecíficas provocadas por las variables intervinientes, incorpora la disminución del valor obtenido en una longitud de onda que va de 630 a 690 nm. Nosotros, en cambio, proponemos sustituir esta fórmula por la simple y clásica expresión del valor de absorbancia obtenido a 450 nm, menos el de la de prueba en blanco (PB). Ver aplicación de la fórmula propuesta en el anexo I, tabla 1 y su diferencia con la fórmula original de la tabla 2.

Es un retorno a las fórmulas tradicionales que, para el caso de plantas medicinales como *B. pilosa*, se ha mostrado eficiente, mejor precisada y más simple que la señalada en las recomendaciones de los proveedores. Mejor precisada porque, en las fórmulas propuestas por los proveedores, se indica una lectura en una longitud de onda variable que va de 450 nm a 500 nm, a elegir por el experimentador; e igualmente para el valor referencial de 630 a 690 nm. Sobre la primera, algunos ya han hecho una precisión: 475 nm (la media entre 450 y 500 nm), y acerca de la segunda, la referencial, que va entre los 630 y 690 nm, generalmente no hay precisiones.

En nuestro estudio se han realizado mediciones a 650 y 665 nm de longitud de onda, que están entre los 630 y 690 nm recomendados. Los resultados obtenidos con una y otra son diferentes y en la segunda, con 665 nm, inaceptables, como lo muestran las pruebas estadísticas aplicadas. En cambio, sí podría utilizarse el de 650 nm con resultados significativamente menores. También podrá ser útil cualquier otro que se ubique entre 630 y 650 nm, o el de 690 nm que algunas veces es sugerido. No cabe duda de que, con la disminución del valor de absorbancia de la PB, se obtienen, en este caso, resultados con menor posibilidad de errores de gran magnitud. En la fórmula que proponemos, se definen perfectamente las longitudes de onda a utilizar.

Naturalmente, este estudio requiere más trabajos similares que confirmen la propuesta, y no solo con muchas otras plantas, también con la propia *B. pilosa* en diferentes condiciones (lugar de toma de la muestra, cambio de solventes por otros menos polares, diferentes procesos químicos de aislamiento de los principios activos, etc.).

Son deseables, además, trabajos comparativos con la técnica fluorométrica de la resazurina y la del citómetro de flujo. Ya se ha realizado un estudio comparativo del reactivo resazurina con la técnica MTT, que presentó resultados similares (22).

En conclusión, se ha demostrado, mediante la aplicación de la técnica XTT modificada, que el extracto metanólico de *Bidens pilosa* no estimula la expansión de las células madre mesenquimales derivadas de las células adiposas humanas, como sí lo hace el suero fetal bovino.

Se han propuesto en este estudio innovaciones específicas para la técnica XTT, cuando se aplica a plantas medicinales, que permitirán realizarla de manera más sencilla, precisa y con menor costo.

Se recomienda continuar el estudio experimental de la técnica XTT, por sus características de simplicidad, economía y rapidez. Esto permitirá, como parte importante e inicial del *screening*, investigar la enorme flora amazónica, cuyos miles de plantas, con diferentes expresiones fenotípicas y genotípicas, pueden aportar más de una solución a los problemas de salud y terapéuticos, lo que resulta tan necesario para la medicina regenerativa, la experimental y la salud pública.

La búsqueda incesante para extraer los secretos de las plantas en beneficio del hombre debe realizarse sin pausa. No se debe descansar en cuanto a la mejora de métodos y técnicas para este objetivo, ni aletargar su inventiva, que permitirá continuar creando nuevos instrumentos y desarrollos tecnológicos que contribuyan a ese fin.

## ANEXO I

TABLA 1. Abs. ESPECÍFICA = 450 NM (PRUEBA) – 450 NM (BLANCO)

	24 h	48 h		24 h	48 h		24 h	48 h		24 h	48 h
hMSC+AS 160 µg/mL	0,037	0,019	hMSC+AS 20 µg/mL	0,201	0,154	hMSC+AS 2,5 µg/mL	0,151	0,103	hMSC + SFB	0,925	1,317
	0,017	0,037		0,088	0,077		0,136	0,087		0,854	1,311
	0,011	0,022		0,054	0,078		0,2	0,058		0,788	1,051
	0,016	0,02		0,051	0,013		0,088	0,055		0,752	1,077
	0,01	0,021		0,042	0,042		0,06	0,056		0,699	1
	0,026	0,031		0,056	0,035		0,074	0,08		0,934	1,019
	0,001	0,03		0,036	0,05		0,086	0,096		0,759	0,983
	0,026	0,035		0,052	0,075		0,096	0,125		0,697	1,452
	0,015	0,044		0,078	0,088		0,066	0,101		0,87	1,196
	0,014	0,013		0,115	0,121		0,208	0,135		0,836	1,289
hMSC+AS 80 µg/mL	0,14	0,062	hMSC+AS 10 µg/mL	0,14	0,032	hMSC+AS 1,25 µg/mL	0,102	0,105	hMSC + SFB	1,152	1,166
	0,054	0,042		0,081	0,036		0,079	0,087		0,78	1,158
	0,057	0,039		0,079	0,039		0,065	0,071		1,123	1,001
	0,074	0,028		0,062	0,03		0,045	0,039		0,857	1,037
	0,057	0,042		0,07	0,026		0,079	0,033		0,933	0,996
	0,067	0,005		0,07	0,02		0,059	0,043		0,662	0,911
	0,051	0,038		0,091	0,021		0,07	0,033		0,752	0,896
	0,065	0,024		0,072	0,049		0,072	0,048		1,103	0,982
	0,048	0,028		0,156	0,047		0,088	0,064		1,004	1,017
	0,058	0,042		0,184	0,102		0,063	0,084		0,825	1,119
hMSC+AS 40 µg/mL	0,167	0,174	hMSC+AS 5 µg/mL	0,185	0,092	hMSC+AS 0,625 µg/mL	0,16	0,074	hMSC + SFB	0,343	1,137
	0,144	0,102		0,127	0,101		0,073	0,045		1,055	1,069
	0,103	0,053		0,114	0,072		0,066	0,052		0,974	1,048
	0,077	0,052		0,103	0,04		0,055	0,022		0,719	0,991
	0,074	0,059		0,11	0,039		0,072	0,03		1,079	0,963
	0,078	0,032		0,093	0,032		0,081	0,03		0,748	0,823
	0,055	0,058		0,095	0,044		0,065	0,018		0,746	1,068
	0,148	0,06		0,093	0,085		0,07	0,029		0,805	0,974
	0,344	0,075		0,121	0,087		0,072	0,032		0,815	1,141
	0,165	0,145		0,167	0,099		0,129	0,078		0,866	1,154

TABLA 2. ABS. ESPECÍFICA = 450 NM (PRUEBA) – 450 NM (BLANCO) – 650 NM (PRUEBA)

	24 h	48 h		24 h	48 h		24 h	48 h		24 h	48 h
hMSC + AS 160 µg/mL	-0,04	-0,055	hMSC + AS 20 µg/mL	0,142	0,099	hMSC + AS 2,5 µg/mL	0,091	0,045	hMSC + SFB	0,848	1,239
	-0,048	-0,043		0,033	0,026		0,077	0,025		0,766	1,23
	-0,057	-0,054		0	0,026		0,141	-0,004		0,709	0,966
	-0,051	-0,057		-0,007	-0,038		0,031	-0,006		0,666	0,989
	-0,056	-0,057		-0,012	-0,012		0,002	-0,007		0,603	0,915
	-0,048	-0,05		0	-0,019		0,016	0,017		0,832	0,934
	-0,068	-0,051		-0,018	-0,001		0,028	0,031		0,67	0,896
	-0,049	-0,037		-0,003	0,02		0,038	0,063		0,361	1,368
	-0,062	-0,032		0,023	0,034		0,01	0,041		0,772	1,105
	-0,066	-0,055		0,056	0,064		0,143	0,069		0,741	1,206
hMSC + AS 80 µg/mL	0,073	-0,009	hMSC + AS 10 µg/mL	0,082	-0,03	hMSC + AS 1,25 µg/mL	0,054	0,058	hMSC + SFB	1,073	1,085
	-0,006	-0,023		0,021	-0,025		0,03	0,038		0,695	1,076
	-0,005	-0,029		0,013	-0,026		0,019	0,021		0,845	0,92
	0,008	-0,045		-0,001	-0,036		-0,008	-0,009		0,772	0,954
	-0,009	-0,024		0,007	-0,041		0,029	-0,015		0,586	0,912
	-0,004	-0,063		0,007	-0,045		0	-0,006		0,574	0,817
	-0,015	-0,032		0,026	-0,046		0,018	-0,013		0,663	0,793
	-0,006	-0,038		0,008	-0,018		0,02	0,001		0,769	0,902
	-0,018	-0,035		0,089	-0,016		0,037	0,016		0,887	0,935
	-0,008	-0,022		0,115	0,036		0	0,037		0,74	1,034
hMSC + AS 40 µg/mL	0,105	0,101	hMSC + AS 5 µg/mL	0,125	0,032	hMSC + AS 0,625 µg/mL	0,097	0,008	hMSC + SFB	0,252	1,038
	0,085	0,034		0,066	0,038		0,014	-0,021		0,967	0,985
	0,04	-0,012		0,052	0,009		0	-0,017		0,841	0,961
	0,015	-0,012		0,039	-0,023		-0,009	-0,047		0,629	0,891
	0,011	-0,006		0,045	-0,023		0,002	-0,042		0,971	0,872
	0,016	-0,029		0,03	-0,032		0,007	-0,04		0,645	0,716
	-0,007	-0,01		0,031	-0,021		-0,005	-0,052		0,648	0,978
	0,081	-0,006		0,028	0,02		-0,001	-0,04		0,718	0,883
	0,265	0,013		0,063	0,022		0,004	-0,034		0,728	1,056
	0,098	0,082		0,102	0,037		0,061	0,012		0,77	1,067

## ANEXO II

TABLA 3. RESUMEN DE ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DE DATOS ANALIZADOS PARA ABS. ESPECÍFICA 450 NM (PRUEBA) – 450 NM (BLANCO)

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
Abs. 450 24 horas	hMSC + SFB	30	,84850	,166175	,030339	,78645	,91055	,343	1,152
	hMSC + AS [160 µg/mL]	10	,01730	,010089	,003190	,01008	,02452	,001	,037
	hMSC + AS [80 µg/mL]	10	,06710	,026768	,008465	,04795	,08625	,048	,140
	hMSC + AS [40 µg/mL]	10	,13550	,084070	,026585	,07536	,19564	,055	,344
	hMSC + AS [20 µg/mL]	10	,07730	,049574	,015677	,04184	,11276	,036	,201
	hMSC + AS [10 µg/mL]	10	,10050	,043077	,013622	,06968	,13132	,062	,184
	hMSC + AS [5 µg/mL]	10	,12080	,031597	,009992	,09820	,14340	,093	,185
	hMSC + AS [2,5 µg/mL]	10	,11650	,054392	,017200	,07759	,15541	,060	,208
	hMSC + AS [1,25 µg/mL]	10	,07220	,015936	,005039	,06080	,08360	,045	,102
	hMSC + AS [0,625 µg/mL]	10	,08430	,033233	,010509	,06053	,10807	,055	,160
	Total	120	,27808	,343910	,031395	,21592	,34025	,001	1,152
Abs. 450 48 horas	hMSC + SFB	30	1,07820	,136975	,025008	1,02705	1,12935	,823	1,452
	hMSC + AS [160 µg/mL]	10	,02720	,009705	,003069	,02026	,03414	,013	,044
	hMSC + AS [80 µg/mL]	10	,03500	,014981	,004738	,02428	,04572	,005	,062
	hMSC + AS [40 µg/mL]	10	,08100	,045585	,014415	,04839	,11361	,032	,174
	hMSC + AS [20 µg/mL]	10	,07330	,041724	,013194	,04345	,10315	,013	,154
	hMSC + AS [10 µg/mL]	10	,04020	,023832	,007536	,02315	,05725	,020	,102
	hMSC + AS [5 µg/mL]	10	,06910	,027441	,008677	,04947	,08873	,032	,101
	hMSC + AS [2,5 µg/mL]	10	,08960	,028064	,008875	,06952	,10968	,055	,135
	hMSC + AS [1,25 µg/mL]	10	,06070	,025373	,008024	,04255	,07885	,033	,105
	hMSC + AS [0,625 µg/mL]	10	,04100	,020955	,006627	,02601	,05599	,018	,078
	Total	120	,31264	,449958	,041075	,23131	,39397	,005	1,452

TABLA 4. COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA ABS. ESPECÍFICA 450 NM (PRUEBA) – 450 NM (BLANCO), PARA LAS 24 Y 48 HORAS

Variable dependiente (I) Extr_AS	(J) Extr_AS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Abs. 450 24 horas	Games- Howell  hMSC + SFB	hMSC + AS [160 µg/mL]	,831200*	,030507	,000	,72704	,93536
		hMSC + AS [80 µg/mL]	,781400*	,031498	,000	,67469	,88811
		hMSC + AS [40 µg/mL]	,713000*	,040339	,000	,57581	,85019
		hMSC + AS [20 µg/mL]	,771200*	,034150	,000	,65651	,88589
		hMSC + AS [10 µg/mL]	,748000*	,033257	,000	,63616	,85984
		hMSC + AS [5 µg/mL]	,727700*	,031942	,000	,61976	,83564
		hMSC + AS [2,5 µg/mL]	,732000*	,034876	,000	,61489	,84911
		hMSC + AS [1,25 µg/mL]	,776300*	,030755	,000	,67153	,88107
	hMSC + AS [0,625 µg/mL]	,764200*	,032108	,000	,65579	,87261	

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Variable dependiente (I) Extr_AS	(J) Extr_AS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Abs. 450 48 horas	Games- Howell  hMSC + SFB	hMSC + AS [160 µg/mL]	1,051000*	,025196	,000	,96502	1,13698
		hMSC + AS [80 µg/mL]	1,043200*	,025453	,000	,95658	1,12982
		hMSC + AS [40 µg/mL]	,997200*	,028865	,000	,90027	1,09413
		MSC + AS [20 µg/mL]	1,004900*	,028275	,000	,90995	1,09985
		hMSC + AS [10 µg/mL]	1,038000*	,026119	,000	,94962	1,12638
		hMSC + AS [5 µg/mL]	1,009100*	,026471	,000	,91973	1,09847
		hMSC + AS [2,5 µg/mL]	,988600*	,026536	,000	,89904	1,07816
		hMSC + AS [1,25 µg/mL]	1,017500*	,026264	,000	,92872	1,10628
		hMSC + AS [0,625 µg/mL]	1,037200*	,025871	,000	,94949	1,12491

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

**TABLA 5.** PRUEBA T ENTRE LOS GRUPOS DE AE1 [450 NM (PRUEBA) – 450 NM (BLANCO)] Y AE2 [450 NM (PRUEBA) – 450 NM (BLANCO) – 650 NM (PRUEBA)], PARA LAS 24 Y 48 HORAS

24 horas	prueba t para la igualdad de medias							
	AE1	AE2	Dif. de medias	Dif. de error estándar	t	gl	Valor p	Dif. sig.
hMSC + AS [160 µg/mL]	,01730	-,05450	,071800	,004259	16,858	18	,000	SÍ
hMSC + AS [80 µg/mL]	,06710	,00100	,066100	,011850	5,578	18	,000	SÍ
hMSC + AS [40 µg/mL]	,13550	,07090	,064600	,036550	1,767	18	,094	NO
hMSC + AS [20 µg/mL]	,07730	,02140	,055900	,021854	2,558	18	,020	SÍ
hMSC + AS [10 µg/mL]	,10050	,03670	,063800	,019018	3,355	18	,004	SÍ
hMSC + AS [5 µg/mL]	,12080	,05810	,062700	,014329	4,376	18	,000	SÍ
hMSC + AS [2,5 µg/mL]	,11650	,05770	,058800	,023903	2,460	18	,024	SÍ
hMSC + AS [1,25 µg/mL]	,07220	,01990	,052300	,007818	6,690	18	,000	SÍ
hMSC + AS [0,625 µg/mL]	,08430	,01700	,067300	,015111	4,454	18	,000	SÍ

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

48 horas	prueba t para la igualdad de medias							
	AE1	AE2	Dif. de medias	Dif. de error estándar	t	gl	Valor p	Dif. sig.
hMSC + AS [160 µg/mL]	,02720	-,04910	,076300	,004145	18,406	18	,000	SÍ
hMSC + AS [80 µg/mL]	,03500	-,03200	,067000	,006648	10,078	18	,000	SÍ
hMSC + AS [40 µg/mL]	,08100	,01550	,065500	,019958	3,282	18	,004	SÍ
hMSC + AS [20 µg/mL]	,07330	,01990	,053400	,018398	2,903	18	,009	SÍ
hMSC + AS [10 µg/mL]	,04020	-,02470	,064900	,010649	6,095	18	,000	SÍ
hMSC + AS [5 µg/mL]	,06910	,00590	,063200	,012362	5,112	18	,000	SÍ
hMSC + AS [2,5 µg/mL]	,08960	,02740	,062200	,012469	4,988	18	,000	SÍ
hMSC + AS [1,25 µg/mL]	,06070	,01280	,047900	,011324	4,230	18	,001	SÍ
hMSC + AS [0,625 µg/mL]	,04100	-,02730	,068300	,009701	7,040	18	,000	SÍ

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saville MW, Lietzau J, Pluda JM, Feuerstein I, Odom J, Wilson WH et al. Treatment of HIV-associated Kaposi's sarcoma with paclitaxel. *Lancet*. 1995; 346 (8966): 26-8.
2. Heldman AW, Cheng L, Jenkins GM, Heller PF, Kim DW, Ware M et al. Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis. *Circulation*. 2001; 103: 2289-95.
3. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods*. 1995; 179 (1): 95-103.
4. Provost & Wallert Research. Investigating the Biochemistry & Cellular Physiology of NHE1 EST. MTT Proliferation Assay Protocol. 1998. Disponible en <http://home.sandiego.edu/~josephprovost/MTT%20Proliferation%20Assay%20Protocol.pdf>
5. ATCC. XTT Cell Proliferation Assay Kit. Instruction Manual. 2011. Disponible en <https://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>
6. Castro de Pardo C. Práctica IV.2. Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del mtt. 2006. Disponible en [https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-IV-2.pdf](https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf)
7. 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 hepatocellular carcinoma cell line HepG2 in three dimensional culture. *World J Gastroenterol*. 2007; 3 (41): 5432-9.
8. Amiel Pérez J, Enciso N, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Domínguez F, Enciso J. Plantas medicinales peruanas con efectos antitumorales y estimulantes de la expansión de células madre. *Paradigmas* 2013; 11 (18): 61-8.
9. Amiel Pérez J, Enciso N, Fukusaki A, Amiel Sáenz J. Metaanálisis de experiencias o inhibición celular intentada con extractos de plantas y verificada mediante la técnica XTT. *Científica*. 2014; 11(3): 207-16.
10. Enciso J, Amiel-Pérez J, Guija-Poma E, Fukusaki A, Reátegui O, Amiel-Peña 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 (3/4): 164-76.
11. Fukusaki A, Amiel Pérez J, Enciso N, Marcelo A, Altamirano C, Amiel R, Marín Sánchez O, Enciso J. Técnica XTT: pigmentos interferentes en fracciones de extracto metanólico de *Bidens pilosa*. *Científica*. 2015; 12 (3): 182-204.



12. Enciso N, Amiel Pérez 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 mesenquimales. *Científica*. 2011; 8 (2): 89-97.
13. Markaverich BM, Roberts RR; Alejandro MA, Jonhson GA, Middleditch BS and Clark JH. Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition. *J Steroid Biochem*. 1988, 30: 71-8.
14. Enciso J, Amiel J, Guija E, Fukusaki A, Reátegui O, Amiel D, Enciso N, Valdivia E, Rodríguez R, Neyra K. Efectos sobre la proliferación de fibroblastos y actividad antioxidante del extracto histoalcohólico de plantas medicinales peruanas. *Científica*. 2008; 5 (3/4): 164-76.
15. Silva DB. Flavanone glycosides from *Bidens gardneri* Bak. (Asteraceae). *Phytochemistry*. 2013; 96: 418-22.
16. Venkateswarlu S, Panchagnula GK, Subbaraju GV. Synthesis and antioxidative activity of 30,40,6,7-tetrahydroxyaurone, a metabolite of *Bidens frondosa*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004; 68, 2183-5.
17. Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. *Toxicol In Vitro*. 2011; 25 (8): 2147-51.
18. Jiang W, Akagi T, Suzuki H, Takimoto A, Nagai H. A new diatom growth inhibition assay using the XTT colorimetric method. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2016; 185-186: 13-9.
19. Dzitko K, Dudzińska D, Grzybowski M, Długońska H. The utility of MTT and XTT colorimetric tests in the studies conducted in vitro with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Wiad Parazytol*. 2010; 56 (2): 145-52.
20. Bonilla JA, Mesen MG, Cartín W. Modificación de un método colorimétrico que usa XTT para la determinación de linfoproliferación. *Rev. Costarric. Cienc. Med*. 1993; 14 (1/2): 19-25.
21. Vallejo V, Yanine H, Roldán F. Aplicación de sales de tetrazolio de nueva generación (XTT) para la estimación de la densidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos empleando la técnica del número más probable. *Acta Biol Colomb*. 2010; 15 (3): 75-90.
22. Escobar L, Rivera A, Aristizábal F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*. 2010; 17 (1): 67-74.

RECIBIDO: 05/01/2017

ACEPTADO: 23/03/2017

AUTOR: JOSÉ AMIEL-PÉREZ

CORRESPONDENCIA: jamielp@cientifica.edu.pe