

Temas Originales

Potencial antiproliferativo del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. (Aguaymanto) y sus efectos sobre la apoptosis en cultivos de líneas celulares con leucemia mieloide crónica

Dalia Violeta Churampi Mancilla^{1,5}, Eva Andrea Dueñas Villavicencio²,
Alberto Ernesto López Sotomayor³, María Angélica Siles Vallejos⁴

Resumen

Physalis peruviana L. "Aguaymanto" es una planta oriunda del Perú con presuntas propiedades anticancerígenas. El objetivo del estudio fue evaluar el potencial antiproliferativo del aguaymanto sobre líneas celulares de leucemia mieloide crónica (K562) y fibroblastos de riñón de mono (VERO). A los cultivos se les añadieron los tratamientos de aguaymanto (50, 100, 200 y 400 µg/ml) y cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml). Se analizó el poder antiproliferativo mediante viabilidad celular (conteo celular y ensayo MTT, Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) y la apoptosis con genotoxicidad celular mediante el promedio de núcleos dañados (ensayo cometa, ANOVA, $p < 0.05$). Los resultados mostraron que el potencial antiproliferativo y genotóxico fueron dosis-dependientes a la concentración del tratamiento y que el aguaymanto mostró mayor efecto (menor viabilidad celular y más núcleos dañados) en la línea K562 que en la VERO. La concentración inhibitoria media (IC50) del aguaymanto para las líneas VERO y K562 fueron de 302.857 y 239.571 µg/ml respectivamente y el índice de selectividad fue 1.264. Esto nos sugiere que el aguaymanto tiene mayor potencial antiproliferativo sobre la línea K562 que sobre VERO. Los resultados son satisfactorios y nos sugieren continuar estudios sobre las bondades medicinales del aguaymanto como fuente potencial de compuestos bioactivos terapéuticos.

Palabras clave: *Physalis peruviana* L., cisplatino, potencial antiproliferativo, genotoxicidad.

Abstract

Physalis peruviana L. "Aguaymanto" is a native plant of Peru with presumed anticancer properties. The aim of the study was evaluate the antiproliferative potential of aguaymanto on chronic myeloid leukemia cell lines (K562) and monkey kidney fibroblasts (VERO). The treatments of aguaymanto (50, 100, 200 and 400 µg/ml) and cisplatin (0.3, 0.6, 1.25 and 2.5 µg/ml) were added to the cultures. The antiproliferative power was analyzed by cell viability (cell count and MTT assay, Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) and apoptosis with cellular genotoxicity by the average of damaged nuclei (comet assay, ANOVA, $p < 0.05$). The results showed that the antiproliferative and genotoxic potential were dose-dependent to the concentration of the treatment and that the aguaymanto showed greater effect (low cell viability and more damaged nuclei) on the K562 line than on the VERO line. The mean inhibitory concentration (IC50) of aguaymanto for the VERO and K562 lines were 302,857 and 239,571 µg/ml respectively and the selectivity index was 1,264. This would indicate that the aguaymanto has a greater antiproliferative potential on the K562 line than on the VERO line. The results are satisfactory and suggests us continue studies on the medicinal benefits of aguaymanto as a potential source of therapeutic bioactive compounds.

Keywords: *Physalis peruviana* L., cisplatin, antiproliferative potential, cellular genotoxicity.

1. Introducción

En la medicina tradicional las plantas han sido utilizadas durante muchos siglos de forma intuitiva y empírica por sus presuntos beneficios, sin embargo poco es el interés que

se muestra por realizar investigaciones científicas que puedan comprobar sus propiedades naturales⁽¹⁾. Los extractos vegetales se utilizan debido a que aparentemente poseen estructuras capaces de producir un efecto fisiológico que tendría más de un mecanismo de acción⁽²⁾. Por todo lo expuesto sería muy

^{1,2} Laboratorio de Genética Humana - Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM. ^{3,4} Laboratorio de Genética - Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM. ⁵ dalia_1718@hotmail.com

necesario investigar y aislar los principios activos vegetales responsables de tales efectos con el objetivo de poder crear nuevos fármacos hechos en base a extractos vegetales⁽³⁾.

El Perú posee numerosas plantas con propiedades medicinales que en su mayoría no han sido estudiadas científicamente, una de estas es la *Physalis peruviana* L., especie nativa conocida como capulí y aguaymanto perteneciente a la familia Solanaceae^(4,5). El aguaymanto es usado empíricamente para tratar el cáncer y otras enfermedades, como hepatitis, asma, malaria y dermatitis^(6,7) por sus presuntas propiedades antibacterianas, antimicóticas, antipiréticas y quimioterapéuticas.

Uno de los usos más comunes del aguaymanto es por su aparente potencial anticancerígeno, aunque existen muchos avances en el conocimiento, tratamiento y prevención de la patología, hasta ahora se continúa buscando el anticancerígeno ideal⁽⁸⁾. Los agentes anticancerígenos sintéticos presentan múltiples efectos secundarios lo que es un problema constante en la terapia contra el cáncer, su limitación principal se encuentra en la toxicidad que presentan para células cancerígenas y no cancerígenas, en diferentes tipos de tejidos u órganos⁽⁹⁾. Por todo lo antes expuesto, es necesario el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos contra este conjunto de enfermedades que afectan a tanta población⁽¹⁰⁾; los recursos naturales (algas, plantas, hongos, etc) siempre han jugado un papel importante en la obtención de fármacos, por ejemplo las plantas son una fuente importante de sustancias anticancerígenas^(11,12).

Actualmente, a nivel mundial la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, cuenta con muchos fármacos anticancerígenos de los cuales aproximadamente el 62-67 % son de origen natural (semisintéticos o naturales)^(12,13). Entonces podemos sugerir que las plantas medicinales son fuentes importantes de agentes quimioterapéuticos (vinblastina y el paclitaxel obtenidos a partir *Catharanthus roseus* y *Taxus brevifolia*)^(7,13,14). Además, los compuestos naturales presentan una gran diversidad de estructuras químicas, a diferencia de las pocas moléculas sintéticas⁽¹⁵⁾.

En diversos estudios al analizar químicamente el extracto del fruto de aguaymanto se obtuvieron diversos componentes como el 28-hidroxiwitanolido, physalinas, phygrina, kaempferol y glicósidos de quercetina^(16,17), la mayoría presenta una fuerte actividad antioxidante^(18,19,20).

El bioactivo mayoritario de *Physalis peruviana* L. son las **physalinas** (A, B, D y F) a las que se les ha atribuido efecto anticancerígeno sobre líneas celulares HA-22T (carcinoma hepatocelular), HeLa (adenocarcinoma de cérvix), APM1840 (Leucemia linfocítica aguda T), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), KG-1 (leucemia mieloide aguda), CTV1 (leucemia monocítica aguda) y KB-16 (cáncer nasofaríngeo); y los **glicósidos** los cuales han demostrado tener una actividad anticancerígena en líneas de leucemias, hepatomas, cáncer de

cerviz y nasofaríngeos⁽²¹⁻²³⁾. Se postula que el extracto acuoso del fruto de aguaymanto es un potente agente antiproliferativo, y según Mendoza *et al.*⁽²⁴⁾ actúa por medio de la inducción de “apoptosis”, esto se puede evaluar mediante daños en el ADN.

Las rupturas y daños en la cadena del ADN a nivel celular pueden ser evidenciadas por el Ensayo Cometa⁽²⁵⁾. El objetivo de la investigación fue medir el grado de antiproliferación de los metabolitos que se encuentran en el extracto acuoso del fruto de *Physalis peruviana* L. “Aguaymanto” mediante el ensayo de viabilidad celular y el Ensayo Cometa.

2. Formulación de Objetivo

Objetivo general

- Evaluar el potencial antiproliferativo del extracto acuoso del fruto de *Physalis peruviana* L. a diferentes concentraciones sobre la línea K562 y VERO mediante la viabilidad celular y el promedio de núcleos dañados.

3. Material y Métodos

3.1 Material Biológico

El presente trabajo fue del tipo experimental con corte longitudinal. Se trabajó como modelo biológico aguaymanto (extracto acuoso vegetal), seres humanos (Línea celular de leucemia mieloide crónica “K562”) y mono (Línea celular de fibroblastos de riñón de mono “VERO”).

3.2 Preparación del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L.

Los frutos de *Physalis peruviana* L. fueron recolectados en la provincia de Carhuaz-Ancash, y utilizados para obtener un extracto acuoso, este procedimiento de extracción se realizó de acuerdo a la metodología de MSc. Rosa Lorenza Oriundo Gates y del MSc. Rubén Lázaro Valdivieso Izquierdo en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (comunicación personal). El extracto puro acuoso se utilizó para preparar cuatro concentraciones del extracto: 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml según Areiza-Mazo⁽²⁶⁾.

3.3 Controles

3.3.1 Control Positivo

Se utilizó el antineoplásico cisplatino como control debido a su amplio uso en el tratamiento contra diversos tipos de cáncer, a 4 diluciones (0.3 µg/ml, 0.6 µg/ml, 1.25 µg/ml, 2.5 µg/ml).

Las dosis fueron preparadas de acuerdo a Quispe-Mauricio⁽²⁷⁾.

3.3.2 Control Negativo

Se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 (Línea K562) y D-MEM (Línea VERO).

3.4 Líneas celulares K562 y VERO

Las líneas celulares K562 y VERO fueron donadas gentilmente por el Dr. Abraham Jaime Vaisberg Wolach encargado del Laboratorio de Biología Celular y Virología de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Se trasladaron en frascos de cultivo celular al laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM para subcultivar en un plazo no mayor a 2 horas.

3.5 Cultivo celular

La línea celular K562 se resuspendió en 5ml de medio de cultivo RPMI-1640 en un frasco plano para su monitoreo en el microscopio invertido hasta que alcanzaron confluencia luego de 72 h. La línea VERO tuvo una manipulación diferente, al ser una línea que crece en monocapa necesitó realizar un recambio de medio de cultivo cada vez que alcanzaba confluencia (aprox. 72 h) mediante lavados con solución de Hanks y tripsina. El cultivo y mantenimiento celular se realizó en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM de forma interdiaria hasta que finalizó el proyecto. Para ambas líneas celulares se aislaron 2 ml del cultivo celular y se repartió equitativamente en 9 crioviales, y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda, 95% de aire y 5% de CO₂ para los posteriores ensayos.

3.6 Conteo celular

Para la evaluación de Viabilidad Celular mediante conteo celular se adicionó a los crioviales 200 µl de las diluciones del extracto acuoso de aguaymanto, del cisplatino y de medio de cultivo RPMI-1640 y se incubó por 48 horas (Tabla 1). Luego de 48 h de incubación se procedió a realizar un conteo celular con azul de tripano en la cámara de Neubauer para evidenciar células viables.

Diluciones de extracto de frutos y cisplatino	
Extracto acuoso de <i>Physalis peruviana</i> L. (µg/mL)	Control positivo Cisplatino (µg/mL)
400	2.5
200	1.2
100	0.6
50	0.3

3.7 Ensayo colorimétrico con MTT

Para la evaluación de Viabilidad Celular mediante ensayo MTT se adicionó a los crioviales 200 µl de las diluciones del extracto acuoso de aguaymanto, del cisplatino y de medio de cultivo RPMI-1640 y se incubó por 48 horas (Tabla 1). El ensayo colorimétrico con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), mide la función metabólica celular cuando MTT es reducido a formazán por la enzima vital mitocondrial succinato deshidrogenasa. Se adicionó 5 mg/mL de MTT por criovial (4 h, 37°C, en oscuridad), se centrifugó cada criovial a 1500 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante rápidamente por inversión.

En seguida, se adicionó DMSO (dimetil sulfóxido) para disolver los cristales de formazán. La cantidad de formazán-MTT es directamente proporcional al número de células viables y fue determinado usando la densidad óptica (OD) a 590 nm mediante el lector de ELISA. Con estos datos, mediante el análisis de regresión lineal, se obtuvo la concentración inhibitoria del crecimiento 50 (Ic50).

3.8 Ensayo Cometa

Para la evaluación de Genotoxicidad Celular mediante el ensayo Cometa versión alcalina, se utilizó como solución de tinción el nitrato de plata con algunas variaciones^(28,29). Para el ensayo Cometa se adicionó a los crioviales 200 µl de las diluciones del extracto acuoso de aguaymanto, del cisplatino y de medio de cultivo RPMI-1640 y se incubó por 48 horas (Tabla 1).

Las láminas fueron preparadas con una suspensión de células precipitadas por centrifugación de los cultivos ya mencionados que fueron mezclados con 225 µl de agarosa LMP al 1% (bajo punto de fusión), luego se colocó 75 µl de esta mezcla en una lámina que contenía agarosa NMP al 1% (normal punto de fusión), se cubrió inmediatamente con un cubreobjetos y se refrigeraron por 5 minutos. Luego se retiró el cubreobjetos de la lámina y se colocó 80 µl de agarosa LMP al 1%, se cubrió nuevamente con un cubreobjetos y se refrigeró por 5 minutos adicionales.

Posterior a ello se colocaron las láminas en solución de lisis (10% de DMSO, 1% de tritón X-100, 2.5 M NaCl, 10 mM de Trizma base, 0.2 M NaOH y 100 mM de EDTA) durante 20 a 22h. Posteriormente se realizó una electroforesis horizontal y se dejó reposar las láminas hasta cubrir las completamente en el buffer de electroforesis (1 mM EDTA-300 mM de NaOH) a pH=13 por 20 min. Luego de 20 minutos se inició la electroforesis (25 V, 300 mA y 20 min).

Terminado el tiempo las láminas fueron sometidas al buffer de neutralización pH 7.5 (0.4 M tris) por 5 minutos (2 lavados), se deshidrataron las láminas con etanol al 70% (10 minutos). Finalmente para la tinción las láminas fueron lavadas con agua desionizada por 10 minutos antes de sumergirlas en la solución con Nitrato de plata; 34 ml de **solución B** (0.2% w/v nitrato de amonio, 0.2% w/v nitrato de plata, 0.15% v/v

formaldehído y 5% w/v carbonato de sodio) y 66 ml de **solución A** (5% carbonato de sodio) durante 20 minutos, posteriormente fueron observadas en un microscopio óptico con un aumento de 10X, la migración del ADN se evaluó contabilizando el número de cometas por cada tratamiento y midiendo la longitud de su cola. Se prepararon 6 láminas por cada individuo y luego se contabilizaron 300 núcleos para su posterior análisis estadístico.

Terminado el tiempo las láminas fueron sometidas al buffer de neutralización pH 7.5 (0,4 M tris) por 5 minutos (2 lavados), se deshidrataron las láminas con etanol al 70% (10 minutos). Finalmente para la tinción las láminas fueron lavadas con agua desionizada por 10 minutos antes de sumergirlas en la solución con Nitrato de plata; 34 ml de **solución B** (0.2% w/v nitrato de amonio, 0.2% w/v nitrato de plata, 0.15% v/v formaldehído y 5% w/v carbonato de sodio) y 66 ml de **solución A** (5% carbonato de sodio) durante 20 minutos, posteriormente fueron observadas en un microscopio óptico con un aumento de 10X, la migración del ADN se evaluó contabilizando el número de cometas por cada tratamiento y midiendo la longitud de su cola. Se prepararon 6 láminas por cada individuo y luego se contabilizaron 300 núcleos para su posterior análisis estadístico.

3.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos del ensayo de Viabilidad Celular y MTT se utilizó el test Kruskal-Wallis y para los datos del ensayo Cometa se aplicó el test ANOVA.

4. Resultados

4.1 Evaluación de la Viabilidad Celular de la línea K562

4.1.1 Mediante Conteo Celular con azul de tripano

El conteo celular nos sirvió para determinar el promedio de células viables en cada tratamiento, utilizando azul de tripano para distinguir las células viables (Figura 1).

La tabla 2 nos muestra los resultados obtenidos luego del tratamiento de la línea K562 a la acción antiproliferativa de la solución acuosa del aguaymanto a diferentes concentraciones, al cisplatino y al control negativo (todos los datos se expresaron multiplicadas con 10^6 células por 1 ml de suspensión).

Los resultados muestran el número de células viables de diez réplicas de la línea K562. Se realizó un análisis estadístico del Error estándar de la media entre los 10 casos a un nivel del 5 %, $p < 0.05$, se halló que no habían diferencias significativas por lo que se pudieron obtener datos promedio representativos.

Con los datos de la tabla 2 se obtuvo la figura 2 donde se observa la variación de la viabilidad representada en

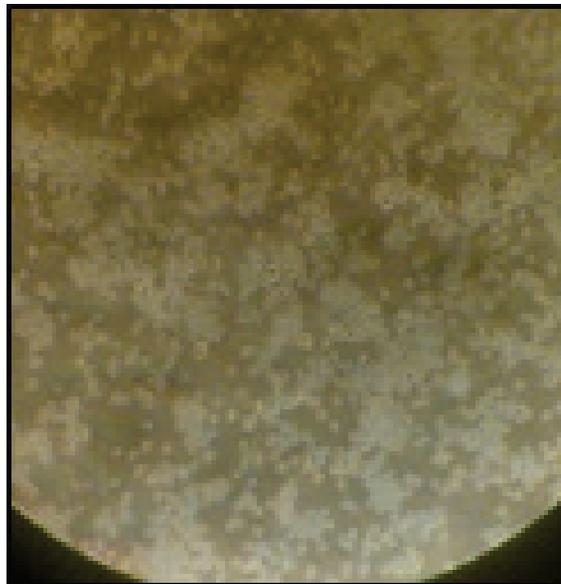


Figura 1. Línea K562 y VERO observadas a 40X en microscopio invertido. Células de la línea K562 (superior) y VERO (inferior).

porcentajes del promedio de células de la línea K562 expuesto a cada tratamiento de las diferentes dosis del extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. así como de los controles positivo y negativo.

En la gráfica (Fig. 2) se aprecia que el extracto acuoso de aguaymanto (50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$) y el cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$) indujeron efecto antiproliferativo en la línea K562 y a medida que se aumenta la concentración para ambos el poder inhibitorio aumenta, por lo tanto se puede deducir que la viabilidad celular muestra un carácter dosis-dependiente de acuerdo a la concentración del tratamiento al que se sometió a la línea celular.

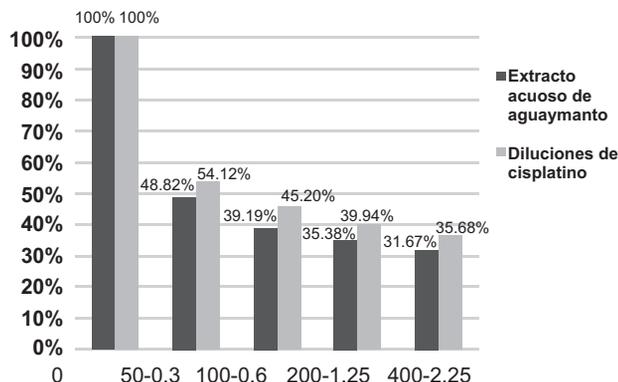


Figura 2. Viabilidad celular de la línea K562 sometida a los tratamientos en el Conteo celular. Las barras representan el porcentaje del promedio de células viables de la línea K562 obtenido de 10 réplicas con las diferentes dosis de extracto acuoso de aguaymanto a 50, 100, 200 y 400 µg/ml y cisplatino a 0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml, Kruskal-Wallis, $p < 0.05$.

4.1.2 Mediante el ensayo MTT

La Viabilidad Celular se determinó de forma indirecta con la absorbancia obtenida en el Lector de ELISA, los datos obtenidos se muestran en la tabla 3 por cada repetición del cultivo de la línea K562 sometido a los diferentes tratamientos.

En la tabla 3 se muestra como varía el porcentaje de viabilidad obtenido con el lector de ELISA, a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto y cisplatino. Cuando hay un valor alto existe mayor viabilidad celular, la misma que fue disminuyendo a medida que se aumentó la concentración en los tratamientos.

Se observa que las siguientes dosis de aguaymanto (400 µg/ml) y cisplatino (2.5 µg/ml), se obtuvieron los valores menores de Densidad Óptica (D.O.).

Se realizó un análisis estadístico del Error estándar de la media entre las 10 repeticiones a un nivel del 5%, $p < 0.05$, y mostró que no hay diferencias significativas entre cada réplica, por lo que se pudo obtener datos promedio. Con los datos de la tabla 3 se obtuvo la figura 3 donde se observa el crecimiento del promedio en porcentajes de los valores de densidad óptica a 490 nm.

En la gráfica (Fig. 3) se aprecia que el extracto acuoso de aguaymanto (50, 100, 200 y 400 µg/ml) y el cisplatino (0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml) tienen carácter antiproliferativo en la línea K562 y a medida que se aumenta la concentración para ambos el poder inhibitorio aumenta. Es decir, a medida que se aumenta la concentración del tratamiento el valor de la D.O. disminuye, por lo tanto se puede deducir que la Viabilidad Celular muestra un carácter dosis-dependiente de acuerdo a la concentración del tratamiento al que se sometió a la línea celular.

4.1.1.1 Concentración Inhibitoria Media (IC50)

Con los datos de la tabla 3 se halló la concentración inhibitoria media (IC50) del extracto acuoso de aguaymanto en

la línea K562, se aplicó el análisis de regresión lineal, con el que se obtiene una ecuación de la recta de $Y = -0.0014X + 0.8354$; donde al reemplazar $Y = 0.5$ se obtiene el valor X (IC50) que fue de 239.571 µg/ml y para la línea VERO (datos no mostrados) con ecuación de la recta $Y = -0.0014X + 0.924$ el IC50 fue de

Conteo celular en la cámara de Neubauer:					
Conteo celular de la línea K562 en la cámara de Neubauer sometido a aguaymanto (valor x 10 ⁶ células):					
Concentración	400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	Sin Tratamiento
Réplica 1	1.45	1.66	1.9	2.3	4.6
Réplica 2	1.32	1.68	1.88	2.35	4.66
Réplica 3	1.29	1.7	1.87	2.1	4.76
Réplica 4	1.44	1.8	1.86	2.4	4.75
Réplica 5	1.5	1.65	1.85	2.23	4.7
Réplica 6	1.6	1.63	1.8	2.34	4.78
Réplica 7	1.7	1.6	1.82	2.35	4.77
Réplica 8	1.53	1.58	1.79	2.28	4.74
Réplica 9	1.55	1.67	1.77	2.27	4.69
Réplica 10	1.49	1.64	1.86	2.3	4.5
Promedio total	1.487	1.661	1.84	2.292	4.695
Promedio en porcentaje	31.67%	35.38%	39.19%	48.82%	100.00%
Conteo celular de la línea K562 en la cámara de Neubauer sometido a cisplatino (valor x 10 ⁶ células):					
Concentración	2.5 µg/ml	1.2 µg/ml	0.6 µg/ml	0.3 µg/ml	Sin Tratamiento
Réplica 1	1.72	1.9	2.18	2.55	4.6
Réplica 2	1.75	1.89	2.15	2.53	4.66
Réplica 3	1.69	1.87	2.1	2.56	4.76
Réplica 4	1.73	1.8	2.16	2.52	4.75
Réplica 5	1.74	1.88	2.2	2.5	4.7
Réplica 6	1.7	1.91	2.21	2.6	4.78
Réplica 7	1.76	1.86	2.19	2.51	4.77
Réplica 8	1.69	1.87	2.18	2.55	4.74
Réplica 9	1.68	1.88	2.15	2.54	4.69
Réplica 10	1.76	1.89	2.17	2.55	4.5
Promedio total	1.72	1.88	2.17	2.54	4.7
Promedio en porcentaje	36.68%	39.94%	46.20%	54.12%	100.00%

Tabla 3					
Valores de densidad óptica en el ensayo MIT					
Densidad óptica de la línea K562 sometido a aguaymanto en el ensayo MTT:					
Concentración	400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	Sin Tratamiento
Réplica 1	0.80	1.10	1.40	1.65	2.37
Réplica 2	0.90	1.20	1.41	1.66	2.35
Réplica 3	0.88	1.15	1.44	1.66	2.37
Réplica 4	0.78	1.16	1.39	1.60	2.37
Réplica 5	0.76	1.10	1.42	1.67	2.36
Réplica 6	0.70	1.20	1.41	1.65	2.30
Réplica 7	0.80	1.15	1.42	1.66	2.35
Réplica 8	0.85	1.01	1.43	1.68	2.36
Réplica 9	0.80	1.03	1.40	1.70	2.37
Réplica 10	0.80	1.10	1.42	1.63	2.37
Promedio total	0.81	1.12	1.41	1.66	2.36
Promedio en porcentaje	34.24%	47.52%	59.99%	70.26%	100.00%
Densidad óptica de la línea K562 sometido a cisplatino en el ensayo MTT:					
Concentración	2.5 µg/ml	1.2 µg/ml	0.6 µg/ml	0.3 µg/ml	Sin Tratamiento
Réplica 1	1.15	1.44	1.86	1.97	1.15
Réplica 2	1.12	1.40	1.87	1.90	1.12
Réplica 3	1.12	1.45	1.86	1.90	1.12
Réplica 4	1.15	1.46	1.88	1.98	1.15
Réplica 5	1.13	1.40	1.80	1.96	1.13
Réplica 6	1.10	1.43	1.85	1.89	1.10
Réplica 7	1.13	1.44	1.85	1.95	1.13
Réplica 8	1.14	1.45	1.86	1.95	1.14
Réplica 9	1.10	1.45	1.84	1.98	1.10
Réplica 10	1.14	1.43	1.88	1.96	1.14
Promedio total	1.13	1.44	1.86	1.94	1.13
Promedio en porcentaje	47.86%	60.88%	78.70%	82.48%	47.86%

302.857 µg/ml. Como un dato adicional también se halló el IC50 del cisplatino para la línea VERO y K562 que fueron de 1.35 y 2.17 µg/ml respectivamente (Tabla 3). Para este análisis, se utilizó Microsoft Office Excel 2010.

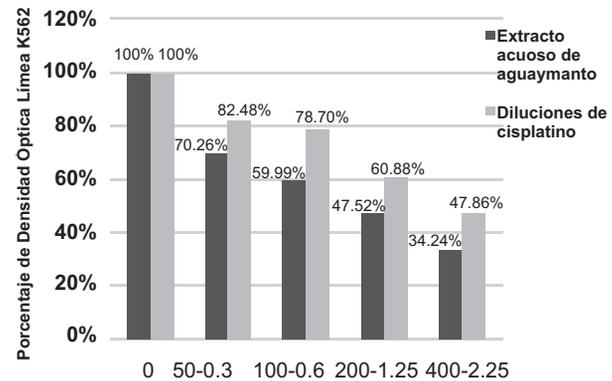


Figura 3. Viabilidad Celular de la línea K562 sometida a los tratamientos en el ensayo MTT. Las barras muestran el nivel de densidad óptica (D.O.) promedio en porcentaje a 490 nm, medida por el lector de ELISA y que nos representan la Viabilidad Celular de la línea K562 obtenida de 10 réplicas con las diferentes dosis de extracto acuoso de aguaymanto a 50, 100, 200 y 400 µg/ml y cisplatino a 0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml, Kruskal-Wallis, p<0.05.

4.1.1.2 Índice de Selectividad (IS)

El Índice de Selectividad (IS) del aguaymanto se halló utilizando los valores de IC50_{No cancerígena (VERO)} = 302.857 µg/ml) e IC50_{Cancerígena (K562)} = 239.571 µg/ml, el resultado de la división de estos parámetros fue el IS = 1.264; como resultado mayor que 1 nos indica que el extracto acuoso de aguaymanto presenta un efecto antiproliferativo superior en células tumorales humanas de leucemia (K562) que en células no transformadas (VERO). El IS del cisplatino resultó 0.622 (Microsoft Office Excel 2010).

4.1.3 Mediante el ensayo Cometa

Para evaluar la genotoxicidad celular se contabilizaron los promedios de los núcleos dañados de las células de la línea K562 sometidas a los diferentes tratamientos (extracto acuoso de aguaymanto, cisplatino y control negativo).

El patrón de clasificación consideró 5 niveles (Collins *et al.* en 1995): Grado 0 o células no dañadas sin cola, (Fig. 4A); grado 1 o células ligeramente dañadas, con cola menor al tamaño de la cabeza (Fig. 4B), grado 2 o células dañadas, con cola igual al tamaño de la cabeza (Fig. 4C), grado 3 o células fuertemente dañadas, con cola mayor al tamaño de la cabeza (Fig. 4D), y grado 4 o células en apoptosis (Fig. 4E). En la tabla 4, se muestra el porcentaje de núcleos dañados, a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto, cisplatino y control negativo.

Los núcleos dañados van aumentando a medida que se aumentó la concentración en los tratamientos. Se realizó un análisis estadístico del Error estándar de la media entre las 5 repeticiones a un nivel del 5%, p<0.05, y mostró que no hay diferencias significativas, por lo cual se pudieron obtener datos promedio. Los resultados muestran además que existe genotoxicidad dosis-dependiente medida por la migración de la cola del cometa en el extracto acuoso de aguaymanto.

Con los datos de la tabla 4 se obtuvo el promedio de los núcleos dañados (Fig. 5). En la gráfica se observó que el extracto acuoso de aguaymanto y el cisplatino a las diferentes concentraciones tienen carácter genotóxico. A medida que se incrementó la concentración, aumentó el promedio de núcleos dañados; es decir el daño genotóxico tiene un carácter dosis-dependiente a la concentración de los tratamientos.

En la tabla 4 se aprecia el grado de daño por cada tratamiento tanto para aguaymanto y cisplatino. Con los datos de la tabla 5, se obtuvieron las figuras 6 y 7 que muestran el patrón de núcleos dañados para el aguaymanto y cisplatino, para ambos se observaron núcleos dañados del nivel 3 y 4.

Los datos muestran que existen diferencias significativas en el número de núcleos dañados entre las concentraciones del extracto acuoso, cisplatino y del control negativo (test paramétrico ANOVA, $p < 0.05$).

5. Discusión

La medicina tradicional siempre ha usado a las plantas por sus presuntas propiedades quimioterapéuticas, antibióticas, antipiréticas, inmunomoduladoras, antifúngicas, etc^(7,30). Incluso los recursos naturales han sido usados en la obtención de fármacos tales como el taxol, la camptotecina, vincristina,

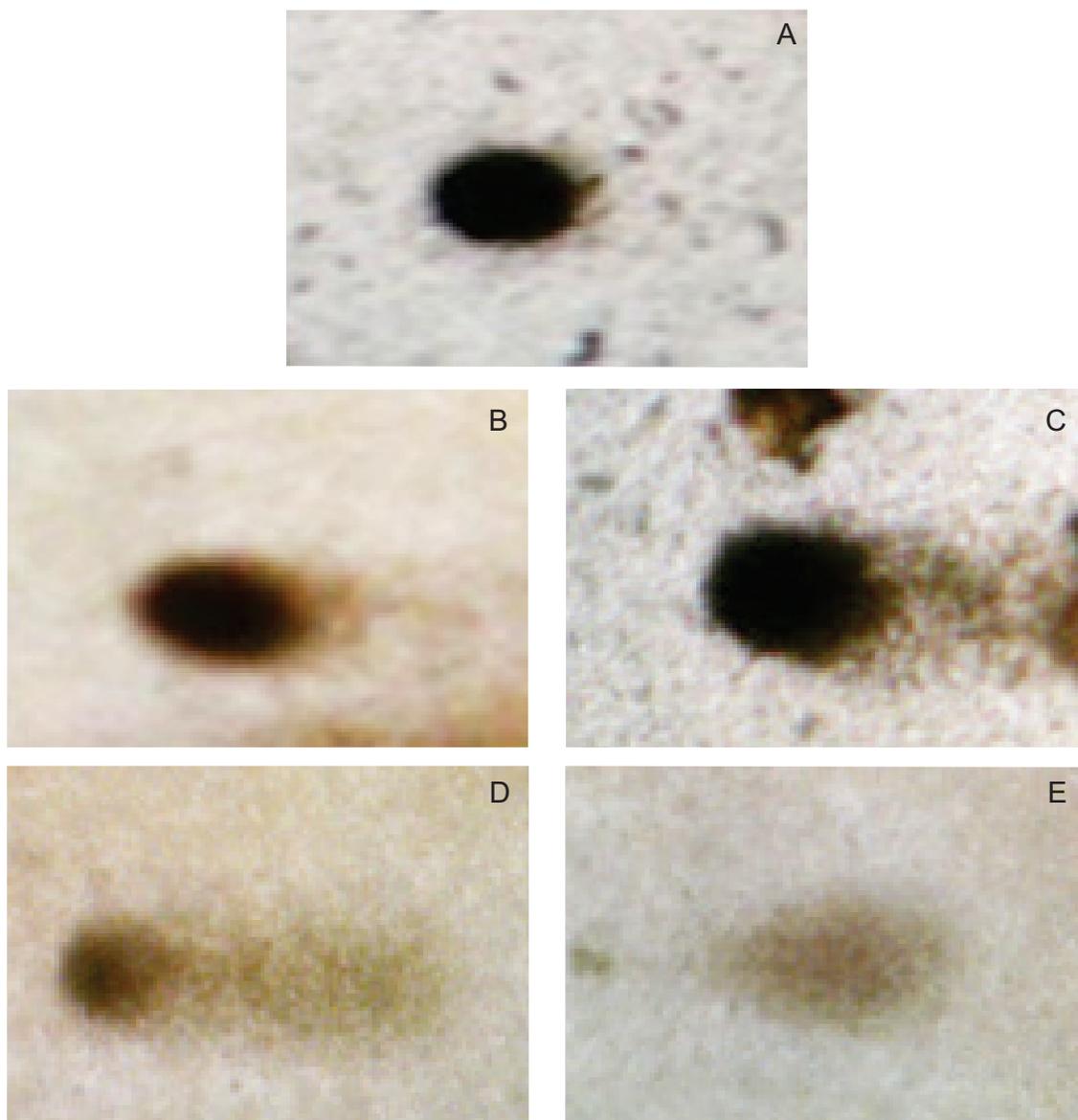


Figura 4. Patrón de clasificación de daño genotóxico para el ensayo Cometa. **4A.** Célula sin cola (grado 0). **4B.** Célula con daño leve 100 µg/ml (grado 1). **4C.** Células con daño 400 µg/ml (grado 2). **4D.** Célula fuertemente dañada 400 µg/ml (grado 3). **4E.** Célula en apoptosis (grado 4).

paclitaxel y vinblastina, que son fármacos quimioterapéuticos derivados principalmente a partir de plantas superiores^(8,13).

En el presente estudio se evaluó el potencial antiproliferativo del extracto acuoso de frutos de *Physalis*

Tabla 4					
Promedio de núcleos dañados					
Promedio de núcleos dañados de la línea K562 sometidos a aguaymanto en el ensayo Cometa:					
Concentración	400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	Sin Tratamiento
Réplica 1	200	150	100	80	30
Réplica 2	180	148	112	75	35
Réplica 3	177	154	105	70	40
Réplica 4	199	150	110	85	38
Réplica 5	190	145	108	70	32
Promedio de núcleos dañados de la línea K562 sometidos a cisplatino en el ensayo Cometa:					
Concentración	0.3 µg/ml	0.6 µg/ml	1.25 µg/ml	2.5 µg/ml	Sin Tratamiento
Réplica 1	180	140	86	70	30
Réplica 2	185	145	87	68	35
Réplica 3	183	150	85	67	40
Réplica 4	180	143	80	66	38
Réplica 5	179	140	87	66	30
Promedio Total	181	144	85	67	35
Promedio en porcentaje	45.25%	36.00%	21.25%	16.75%	9%

Tabla 5						
Clasificación de los núcleos dañados						
Clasificación de los núcleos dañados de la línea K562 en el ensayo Cometa:						
Extracto acuoso de aguaymanto	Sin daño	Con daño				Total
	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	
400 µg/ml	111	0	70	85	34	300
200 µg/ml	151	12	60	77	0	300
100 µg/ml	193	55	40	12	0	300
50 µg/ml	224	50	26	0	0	300
0 µg/ml	265	35	0	0	0	300
Promedio de núcleos dañados de la línea K562 sometidos a aguaymanto en el ensayo Cometa (300/campo):						
Extracto acuoso de aguaymanto	Sin daño	Con daño				Total
	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	
2.5 µg/ml	119	0	66	82	33	300
1.25 µg/ml	156	9	61	74	0	300
0.6 µg/ml	215	44	33	8	0	300
0.3 µg/ml	233	45	22	0	0	300
0 µg/ml	265	35	0	0	0	300

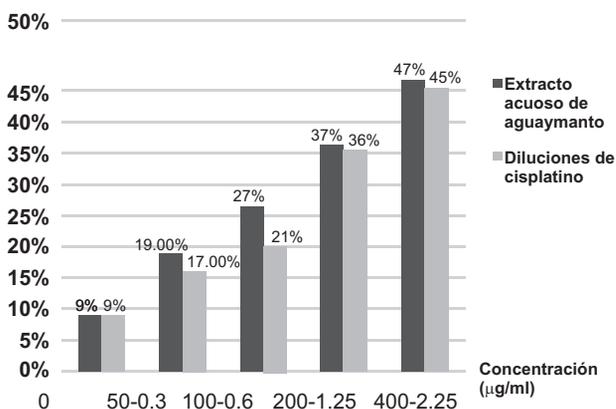


Figura 5. Núcleos dañados en células de la línea K562 sometida a los tratamientos en el ensayo Cometa. Las barras muestran el porcentaje del promedio de núcleos dañados para los diferentes tratamientos, los núcleos dañados representan el daño genotóxico de la línea K562 obtenida de 5 réplicas con las diferentes dosis de extracto acuoso de aguaymanto a 50, 100, 200 y 400 µg/ml y cisplatino a 0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 µg/ml, Kruskal-Wallis, $p < 0.05$.

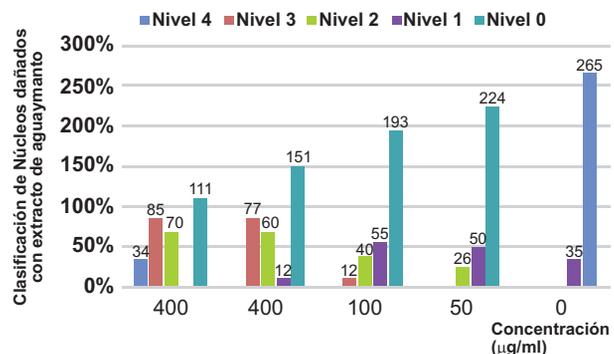


Figura 6. Clasificación de daño genotóxico de la línea K562 sometida a aguaymanto en el ensayo Cometa. Se aprecian diferentes grados de daño genotóxico para las diferentes concentraciones del extracto acuoso de aguaymanto, siendo la dosis 50 µg/ml la concentración del extracto con daño más leve (Niveles 0, 1 y 2) mientras que las demás dosis superiores 100, 200 y 400 presentan daños más severos (Niveles 3 y 4).

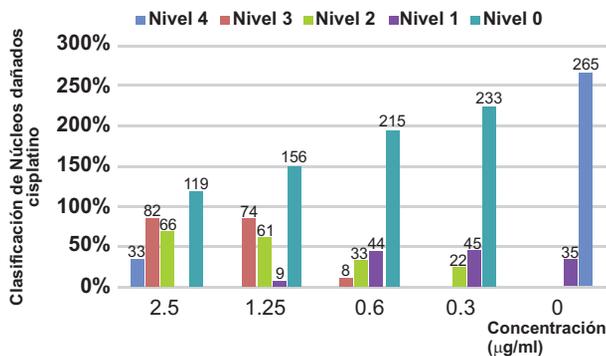


Figura 7. Clasificación de daño genotóxico de la línea K562 sometida al cisplatino en el ensayo Cometa. Se aprecian diferentes grados de daño genotóxico para las diferentes diluciones del cisplatino, siendo la dosis 0.3 µg/ml la concentración con daño más leve (Niveles 0, 1 y 2) mientras que las demás dosis superiores 0.6, 1.25 y 2.5 presentan daños más severos (Niveles 3 y 4).

peruviana L. para inhibir el porcentaje de crecimiento celular en líneas de leucemia mieloide crónica (K562), sugiriendo la presencia de compuestos bioactivos anticancerígenos, como los encontrados por Chiang *et al.* (1992) en varios extractos acuosos, alcohólicos, etanólicos y esteroides vegetales de especies del género *Physalis*, todos demostraron tener actividad antiproliferativa *in vivo* contra numerosos tipos de células cancerosas, incluyendo: leucemia, pulmón, colon, cuello uterino, hepatoma, melanomas y células no cancerosas incluyendo líneas de fibroblastos de ratón y células de riñón de mono⁽²¹⁻²³⁾.

5.1 Viabilidad Celular

Según los resultados obtenidos se determinó que la línea K562 fue la más sensible a las cuatro concentraciones de los extractos de aguaymanto comparada con la línea VERO. Para la dosis menor del extracto de aguaymanto (50 µg/ml) los resultados de viabilidad celular fueron los valores más altos y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (400 µg/ml) los valores menores. La línea K562 se comportó de forma muy similar en el ensayo MTT donde la viabilidad celular fue calculada en datos de densidad óptica (490 nm), para la dosis menor del extracto de aguaymanto (50 µg/ml) los datos obtenidos de densidad óptica fueron los más altos y a medida que se aumentó la concentración los valores de viabilidad celular fueron disminuyendo, siendo para la dosis mayor (400 µg/ml) los valores menores. Estos hallazgos coinciden con Areiza-Mazo *et al.*, (2013)⁽²⁶⁾ quienes trabajaron con extracto acuoso del fruto de aguaymanto sobre cáncer de colon, sus resultados mostraron que el efecto antiproliferativo se incrementó en forma dependiente de la dosis del extracto (25, 50, 100, 200 y 400 µg/ml) con viabilidad de 41, 51, 62.5, 86 y 95 %.

Los resultados obtenidos por el ensayo MTT también mostraron comportamientos similares a los de Areiza-Mazo⁽²⁶⁾, la D.O. (540 nm) varió para las dosis de 25-400 µg/ml en un rango de 1.2 y 0.25, disminuyendo el valor de la D.O. cuando se

aumentó la concentración del extracto. Al igual que Areiza-Mazo⁽²⁶⁾, el efecto antiproliferativo es dosis-dependiente a la concentración del extracto, otra concordancia es que los grados de mayor efecto antiproliferativo fueron las concentraciones de 200 y 400 µg/ml y que mostraron los valores más bajos de viabilidad celular y D.O. en el conteo celular y en el ensayo MTT. En otro estudio realizado por Quispe-Mauricio *et al.*, (2009)⁽²⁷⁾ con extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto los porcentajes de viabilidad celular en la línea K562 se reducen al aumentar la concentración, de 41.3 % (0.98 µg/ml), 3 % (3.91 µg/ml), 1 % (15.63 µg/ml), -24.6 % (62.5 µg/ml).

En el estudio de Zavala *et al.*, (2006)⁽⁷⁾, que usaron extractos etanólicos de tallos y hojas de aguaymanto sobre la línea K562, se mostró viabilidad celular de 87.36 % (0.5 µg/ml), 47 % (2 µg/ml), 23 % (7.8 µg/ml), -3 % (31.3 µg/ml) y -11.91 % (125 µg/ml). Se describe un comportamiento dosis-dependiente del efecto antiproliferativo del aguaymanto con respecto a la concentración al igual que en nuestros resultados.

El cisplatino es un fármaco utilizado ampliamente contra diversos tipos de cáncer, en los resultados obtenidos mostró un efecto antiproliferativo dependiente a la concentración (0.3-2.5 µg/ml) y tuvo mayor efecto antiproliferativo en la línea VERO comparado con la línea K562. Estos hallazgos coinciden con Quispe-Mauricio *et al.*, (2009)⁽²⁷⁾ cuyos resultados mostraron que el efecto antiproliferativo del cisplatino se incrementó en forma dependiente de la concentración (0.04-2.5 µg/ml), otra concordancia es que la dilución con mayor efecto fue de 2.5 µg/ml. Estos resultados también concuerdan con los reportados por Zavala *et al.*, en el 2006⁽⁷⁾ y Areiza-Mazo *et al.*, (2013)⁽²⁶⁾, cuyas investigaciones usan como controles positivos antineoplásicos comerciales que indujeron mayor efecto en células no cancerígenas que en cancerígenas.

En investigaciones que utilizan extractos vegetales se acostumbra obtener el IC50, que es la concentración a la cual una sustancia puede inhibir el 50 % de la población celular, con estos valores se puede hallar un parámetro más que es el Índice de selectividad (IS) que nos indica si la sustancia estudiada podría tener preferencia en algún nivel de antiproliferación sobre células cancerígenas⁽³³⁾. Debido a que el cisplatino provoca notables efectos adversos sobre las personas que padecen cáncer, resulta necesaria la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con propiedades antitumorales que no sean tan nocivos con las células no cancerígenas. Hay diversos estudios que evidencian que *Physalis peruviana* L. posee un carácter selectivo hacia células cancerígenas y podría ser una fuente de compuestos bioactivos capaces de inhibir o detener la proliferación celular mediante inducción de apoptosis, esta propiedad podría brindarnos un posible nuevo agente quimioterapéutico y quimiopreventivo para el tratamiento del cáncer humano^(7,26,27). Los valores de Concentración Inhibitoria Media (IC50) del extracto acuoso de aguaymanto encontrados en la investigación sobre la línea VERO y en la línea K562 fueron de 302.857 y de 239.571 µg/ml respectivamente. El Índice de Selectividad (IS) fue de 1.264 (mayor que 1), los

valores concuerdan con los descritos previamente por otros autores para los extractos de aguaymanto sobre líneas cancerígenas y sobre células no cancerígenas^(7,26).

En un estudio realizado por Zavala et al. (2006)⁽⁷⁾ los resultados mostraron que para células no cancerígenas (fibroblastos de ratón) los extractos de tallos y hojas presentaron IC50 de 2.67 y 4.59 µg/ml respectivamente y para las células de la línea K562 fueron 2.1 y 2.42 µg/ml respectivamente; al igual que en el presente estudio, el IC50 para la línea K562 fue menor que en células no cancerígenas (VERO). Con estos valores los IS (Índice de selectividad) de los extractos de tallos y hojas alcanzaron valores de 1.1 y 2.18 y en nuestros resultados de 1.74 coincidiendo en superar la unidad para ambos casos y en estar dentro del rango de la referencia⁽⁷⁾. Otro estudio realizado por Quispe-Mauricio et al.,⁽²⁷⁾ mostraron que los valores de IC50 de los extractos de tallos y hojas en la línea K562 fueron de 0.02 y 0.03 µg/ml respectivamente, y los IC50 de los extractos de tallos y hojas en células no cancerígenas (epitelio de riñón) fueron de 4.9 y 6.2 µg/ml respectivamente; al igual que en el presente estudio para la línea K562 el IC50 fue mucho menor que en las células no cancerígenas. Con estos valores los IS (Índice de selectividad) de aguaymanto alcanzaron valores de 206 y 246 respectivamente en la línea K562 y en nuestros resultados de 1.74 coincidiendo en superar la unidad para ambos casos.

Los valores de Concentración Inhibitoria Media (IC50) del cisplatino mostrados en la investigación sobre las líneas VERO y K562 fueron de 1.35 y 2.17 µg/ml respectivamente, el Índice de Selectividad (IS) fue de 0.622.

Ambos valores concuerdan con los valores descritos previamente por otros autores para el cisplatino sobre líneas cancerígenas y sobre células no cancerígenas, ya que al ser menor de la unidad (IS) no presenta una selectividad marcada y dañaría por igual o más a células normales comparadas con células de cáncer. Estos resultados coinciden con Zavala *et al.*, (2006)⁽⁷⁾ que utilizó el antineoplásico 5-FU contra líneas K562 y obtuvo un IS de 0.032. Otra investigación nos proporciona un IS para cisplatino de 7.3⁽²⁷⁾. En todos los casos mencionados el IS del control positivo es menor que el del aguaymanto al igual que en nuestros resultados. Esto demostraría, el buen perfil antitumoral de los extractos de aguaymanto, superando ampliamente a los antineoplásicos mencionados, los cuales, forman parte de estudios, manejo y tratamiento de carcinomas en el mercado mundial. Los extractos acuosos del aguaymanto exhibieron un efecto mayor sobre la línea K562 comparado al de la línea VERO, estos resultados son consistentes, con la presencia de sustancias presentes mayormente polares, ya que las fracciones sólidas aisladas mostraron solubilidad en los solventes usados⁽⁷⁾.

Los resultados de las pruebas de viabilidad celular mostraron que los extractos acuosos de aguaymanto inhiben de alguna forma la progresión del ciclo celular, siendo la línea K562, la más sensible a su efecto antiproliferativo, contrariamente para el cisplatino la más sensible fue la línea VERO. Esto explicaría los efectos adversos que mayormente

ejerce en las personas que lo consumen, la razón por la que el aguaymanto y el cisplatino han presentado esos efectos podría ser por las diferencias estructurales presentadas en su composición química al ser el cisplatino un fármaco sintético presenta mayores efectos adversos^(9,27,34).

Aunque estas observaciones deben repetirse, los datos preliminares nos permiten especular que el aguaymanto tendría componentes que causarían la detención del ciclo celular, lo cual es muy interesante teniendo en cuenta que las moléculas candidatas a fármacos anticancerígenos deben presentar un bajo índice de efectos adversos en células no transformadas. Con la prueba Kruskal-Wallis se compararon los resultados de la línea VERO con la línea K562 para cada tratamiento, los resultados nos indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos (aguaymanto) y el control (cisplatino); en ambos linajes.

5.2 Genotoxicidad celular

En la actualidad la capacidad de ciertas sustancias de origen vegetal con potencial genotóxico han tenido gran impacto en la comunidad científica; muchos autores han demostrado que esta propiedad en las plantas es capaz de detener la proliferación celular mediante inducción de apoptosis^(35,36).

Desde 1993 se publicaron los primeros estudios empleando ensayos para la detección de apoptosis cuantificando las células altamente dañadas, el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales o Cometa⁽³⁷⁾ es una prueba que muestra hasta el 85 % del ADN migrado cuando ocurre un daño⁽²⁵⁾.

En el presente estudio, para evidenciar el daño genotóxico, se utilizó el ensayo Cometa para observar si es que existiera migración del ADN cuando es fragmentado (fenómeno solo ocurre en necrosis o apoptosis)⁽²⁵⁾.

Entre las ventajas del ensayo Cometa, incluye la aplicabilidad a varios tejidos y/o tipos de células especiales, la alta sensibilidad en la detección de niveles bajos de daño al ADN, y el requerimiento de un número pequeño de células por muestra, entre otros⁽³⁸⁾. Los resultados obtenidos mediante el ensayo Cometa al exponer a las células al extracto acuoso de *Physalis peruviana* L. y cisplatino indican tanto de forma cualitativa como cuantitativa que existen diferencias significativas con el control negativo; es así que, al clasificar el daño en cuatro niveles: leve, moderado, medio y alto, se observó que el promedio de núcleos de nivel alto se incrementó a medida que aumentaban las dosis del extracto y del cisplatino (Figura 6 y 7).

En esta investigación, mediante el ensayo Cometa versión alcalina descrita por Singh *et al.*⁽⁴⁰⁾ en 1998, se demuestra claramente que la línea K562 sometida a una alta concentración de extracto acuoso de aguaymanto (400 µg/ml) y cisplatino (2.5 µg/ml) sufre quiebres en las hebras de ADN,

encontrándose un 23.11 % con daño severo (tipo 3 y 4) sometidas a aguaymanto y 21.89 % con daño severo (tipo 3 y 4) sometidas a cisplatino, sin embargo las células sometidas a una concentración de 100 µg/ml no presentaron daño severo solo 31.67% de daño basal muy leve (tipo 1 y 2) y 52% de células sin daño (tipo 0).

Esto podría deberse a unas glicoproteínas denominadas physalinas (physalina F) o esteroides del tipo witanólidos presentes en el aguaymanto, que se han reportado con actividad antiproliferativa^(21,22), ambos componentes producirían la activación de la apoptosis mediante los receptores TRAIL-DR4/-DR5 y la caspasa-3⁽²⁶⁾ y detendría el ciclo celular en la fase G2/M que conducirían a la desestabilización celular, así como el desenrollado del ADN, lo que podría ser un posible mecanismo que provocaría su genotoxicidad^(39,40).

Los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos por Yen *et al.*, 2010⁽⁴¹⁾ que utilizó a hidro- witanólidos purificado de *Physalis peruviana* L. sobre hepatocarcinoma y evaluándolo para evidenciar la inducción de apoptosis mediante ensayo Cometa. De igual forma al aumentar la concentración se aumentó el nivel de daño en los núcleos de las

células. En otra investigación⁽³⁹⁾ con *Physalis angulata*, se usó extracto de raíces sobre linfocitos humanos, de la misma forma la genotoxicidad mostró carácter dosis dependiente aunque a bajas concentraciones solo provocó daños leves.

Los resultados obtenidos son promisorios y resaltan el potencial medicinal de este fruto incaico, será necesario continuar estudios sobre los diferentes beneficios y propiedades anticancerígenas de *Physalis peruviana* L. a fin de aislar sus componentes principales (physalinas, witanólidos, etc.) como una fuente potencial con aplicación quimiopreventiva y quimioprotectora en cáncer humano.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Instituto Hipólito Unanue, a la Dra. Mariela Flores Fachin del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, a la Mg. Susana Mónica Gutiérrez Moreno, al Mg. Fernando Merino Rafael, a la MSc. Olga Hilda Bracamonte Guevara, al Dr. Misael Guevara Paredes de la Facultad de Ciencias Biológicas y a Dilmer Armando Quincho Rosales de la Facultad de Odontología.

Referencias bibliográficas

- Bermudez A, Oliveira-Miranda M, Velázquez D. La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. INCI. 2005;30 (8):453-459.
- Farnsworth N, Akerele O, Bingel A, Soejarto D, Guo Z. Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organ. 1985; 63(6):965-981.
- Barbosa H de J, Guerrero CA, Arias D. Aplicación de una metodología. Rev colomb ciencias quim farm. 1995;(24):12-18.
- Caicedo A, Andrés M. Estudio de la cadena productiva de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la sierra norte del Ecuador. 2010 [citado 16 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/950>. Acceso 16/12/14.
- Fischer G, Almanza-Merchán P, Miranda D. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Brasileira de Fruticultura. 2014; 36(1):01-15.
- Franco-Ospina L, Matiz-Melo G, Pájaro-Bolívar I, Gómez-Estrada H. Actividad Antibacteriana *in vitro* de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 2013;12(3): 230-237.
- Zavala D, Quispe A, Posso M, Rojas J, Vaisberg A. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* L. (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. An Fac med. 2006; 67(4):283-289.
- Amiel D, Amiel J. Metodologías utilizadas en la investigación de plantas antitumorales: Descripción y comentarios. Científica. 2013; 4 (5): 19-25. Disponible en: <https://issuu.com/bibliotecacientifica/docs/cientifica-v4n5>. [Acceso 17/02/2014]
- Isnard-Bagnis C, Moulin B, Launay-Vacher V, Izzedine H, Tostivint I, Deray G. Anticancer drug-induced nephrotoxicity. Nephrol Ther. 2005;1(2):101-114.
- Cortés-Funes H. El médico ante las enfermedades mortales: el caso del cáncer. Educ. méd. 2006;9(1):32-38.
- Hartwell J. Plants used against cancer. Lloydia. 1971;34(4):386-425.
- Vega-Ávila E, Velasco-Lezama R, Jiménez-Estrada M. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Bioquímica. 2006;31(3):97-111.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod 2003;66:1022-1037.
- Cragg GM, Newman DJ. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. Cancer Invest. 1999; 17(2):153-163.
- Gonzales G, Valerio, L. Medicinal plants from Peru: A review of Plants as potencial agents against cancer. Anticancer Agents Med. Chem. 2006;6(5):429-444.
- Elliger CA, Eash JA, Waiss ACJ. Kaempferol and quercetin di- and triglycosides from *Physalis peruviana* leaves. (en línea). Biochemical Systematics and Ecology (United Kingdom). 1992 [Citado 16 de diciembre del 2014]. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9405796>. Acceso 16/12/14.
- Dinan LN, Sarker SD, Šik V. 28-Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana*. Phytochemistry. 1997;44(3):509-512.
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. Eur J Cancer. 1999; 35(10):1517-25.
- Watson DG, Oliveira EJ. Solid-phase extraction and gas-

- chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of Ginkgo biloba tablets. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 723(1-2):203-210.
20. **Aristizábal Montoya AM.** Percepción del paciente oncológico sobre su calidad de vida y apoyo social en el "Hospital Santa Rosa". [Tesis Título de Especialista en Alimentación y Nutrición]. Ana María Restrepo Duque. Antioquia: Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ingenierías Especialización en Alimentación y Nutrición. 2013.
 21. **Chiang H C, SMJ.** Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells *in vitro*. *Anticancer research.* 1992 a;12(4):1155-1162.
 22. **Chiang H C, SMJ.** Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer research.* 1992b;12(3):837-843.
 23. **Ismail N, Alam M.** A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia.* 2001;72(6):676-679.
 24. **Mendoza J, Rodríguez A, Millán P.** Caracterización físico química de la uchuva (*Physalis peruviana*) en la región de Silvia Cauca. *Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 2012; 10 (2):188-196.
 25. **Arencibia D, Rosario L, Curveco D.** Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología en línea.* 2003;49-52.
 26. **Areiza-Mazo N, Maldonado ME, Rojano B.** Aqueous extract of golden berry (*Physalis peruviana*): antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities. *Perspectivas en Nutrición Humana.* junio de 2013; 15(1):41-55.
 27. **Quispe-Mauricio A, Callacondo D, Rojas J, Zavala D, Posso M, Vaisberg A.** Actividad citotóxica de *Physalis peruviana* (aguaymanto) en cultivos celulares de adenocarcinoma colorectal, próstata y leucemia mieloide crónica. *Revista de Gastroenterología del Perú.* 2009;29(3):239-246.
 28. **Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR.** A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *J Histochem Cytochem.* 1 de septiembre de 2001;49(9):1183-6.
 29. **Sotil G, Alvis R, Francia JC, Shiga B.** Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Rev peru biol.* 2006;13(3):249-253.
 30. **Osorio, E.** Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín (Colombia). 2009.
 31. **Cragg GM, Newman DJ, Snader KM.** Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 1997;60:52-60.
 32. **Laza D, Rodríguez I, Sardina G.** Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev Cubana PlantMed.* 2003 [citado el 12 de noviembre de 2014.]; 8(3). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S102847962003000300012&script=sci_arttext&tlng=es>. Acceso 15/03/15.
 33. **Patel NA, Song SS, Cooper DR.** PKC delta alternatively spliced isoforms modulate cellular apoptosis in retinoic acid-induced differentiation of human NT2 cells and mouse embryonic stem cells. *Gene Expr.* 2006; 13(2):73-84.
 34. **Díaz Ledesma C.R.** Percepción del paciente oncológico sobre su calidad de vida y apoyo social en el "Hospital Santa Rosa". [Tesis Título de Especialista en Enfermería en Salud Pública]. Juana Elena Durand Barreto. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina; 2013.
 35. **Lin Y, Chiang H, Kan W, Hone E, Shih S, Won M.** Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata*. *Amer J Chin Med.* 1992; 20(3-4):233-43.
 36. **Liu J, Shen H, Ong C.** *Salvia Miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Lett.* 2000;153(1-2):85-93.
 37. **Ansoar-Rodríguez Y, Fontanetti C, Christofolletti C, Díaz-Llera S.** Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.* 2015; 46(1):51-62.
 38. **Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki Y.F.** Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2000;35(3):206-221.
 39. **Dos Santos R, Cabral T, Cabral I, Gregg L, et al.** Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated *in vitro*. *BIOCELL.* 2008;32(2):195-200.
 40. **Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-191.
 41. **Yen C, Chiu C, Chang F, Chen J, et al.** 4beta-Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana* (golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G2/M arrest. *BMC Cancer.* 2010;10(46):1-8.



ALAFARPE
ASOCIACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS FARMACÉUTICOS
Innovación, Calidad y Ética

CORREO ELECTRÓNICO:
alafarpe@alafarpe.org.pe

WEB:
www.alafarpe.org.pe