

Universidad de Costa Rica.

Facultad de Microbiología.

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en
Microbiología y Química Clínica

**Identificación de actividades anti-tumorales y quimiopreventivas
en compuestos polifenólicos y sus conjugados
nanoestructurados en un modelo de leucemia linfoblástica tipo T.**

Margarita Alvarado Salazar A90314

Tutor: Dr. Rodrigo Mora Rodríguez.

Enero 2015

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación:



Dr Rodrigo Mora Rodríguez.

Tutor



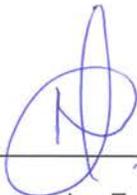
Dr. Steve Quirós Barrantes.

Lector



Dr. Gilbert David Loria Masis.

Lector



Melissa Granados Zamora.

Presidenta del Tribunal.



Cynthia Arroyo Portilla

Profesora designada

Índice

Resumen.....	4
Antecedentes.....	6
Cáncer.....	6
Resistencia a quimioterapia.....	7
Quimioprevención.....	9
Uso del rambután (<i>Nephelium lappaceum</i>) como fuente de compuestos activos.....	10
Polifenoles y conjugados poliméricos.....	11
Extracción y cuantificación de los polifenoles empleados.....	15
Justificación.....	16
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos específicos.....	20
Materiales y Métodos.....	21
Estandarización del ensayo de tamizaje de la actividad antioxidante.....	21
Tamizaje de actividad antioxidante con DCFDA.....	22
Estandarización del ensayo de Sulforodamina B.....	23
Tamizaje de citotoxicidad por el ensayo de Sulforodamina B.....	26
Ensayos de Ciclo Celular.....	28
Ensayos de Etidio homodímero-1 y Calceína.....	29
Ensayos de AnexinaV.....	30
Ensayo de autofagia con Naranja de Acridina.....	31
Ensayo de Inhibición de la autofagia.....	32
Pruebas estadísticas.....	33
Resultados.....	34
Estandarización del tamizaje para la cuantificación de la actividad antioxidante.....	34
Tamizaje por actividad antioxidante.....	35
Estandarización de prueba de Sulforodamina B, para el tamizaje de la citotoxicidad....	39
Tamizaje de citotoxicidad por el ensayo de Sulforodamina B.....	40
Calceína etidio homodimero-1.....	45

Determinación de apoptosis	47
Ciclo celular	49
Evaluación de la autofagia	50
Inhibición de la autofagia.....	51
Discusión	53
Conclusiones	60
Agradecimientos	61
Referencias	62

Resumen.

El cáncer es un conjunto de enfermedades extremadamente complejas con opciones de tratamiento limitadas debido a resistencia por lo que la investigación sobre la combinación sinérgica de la quimioterapia con otras drogas para sobrepasarla ha tenido mucho auge. Se ha propuesto el uso de metabolitos secundarios de plantas como polifenoles (Eid *et al.*, 2012) conjugados con polímeros formando sistemas nanoparticulados (Hu & Zhang, 2012).

Con el fin de evaluar distintos extractos polifenólicos de *Nephelium lappaceum* se desarrolló una plataforma de tamizaje de actividad citotóxica, antiproliferativa y antioxidante basada en una serie de ensayos de tamizaje y confirmación. Para estudiar las interacciones sinérgicas este tamizaje se realiza en presencia y ausencia de doxorubicina (DOX) a concentraciones clínicamente relevantes, lo que permite la evaluación de sinergismo con múltiples mecanismos de acción ya que la DOX tiene un efecto celular altamente pleiotrópico, además dadas sus múltiples actividades, se ha demostrado que la resistencia a DOX es predice multiresistencia a otras quimioterapias.

Se estandarizó un ensayo de Sulforodamina B (SRB) para tamizar una posible actividad citotóxica y antiproliferativa de compuestos sobre la línea celular linfoblastoide CCRF-CEM, y la línea celular CEM/ADR5000. Así mismo, se estandarizó un ensayo basado en Calceína AM y Etidio homodímero-1, un ensayo de ciclo celular de las células y un ensayo con Naranja de Acridina para la confirmación de la actividad citotóxica de la DOX y los compuestos de prueba.

Por otro lado, se ha estandarizado un ensayo de fluorimetría en formato de 96 hoyos con las células CCRF-CEM para tamizar la actividad antioxidante de los compuestos de prueba basada en los cambios de la sonda DCFDA ante el estrés oxidativo inducido por TBHP.

Antecedentes.

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades mecánicamente complejas y variables con una gran cantidad de causas subyacentes (Fernald & Kurokawa, 2013), una forma sencilla de definirlo es como tejidos complejos compuestos de múltiples tipos de células distintas que participan en interacciones heterotípicas entre sí (Hanahan & Weinberg, 2011).

Hanahan y Weinberg propusieron una serie de características del cáncer, las cuales en conjunto constituyen un principio de organización que proporciona un marco para la comprensión de la gran diversidad de enfermedades neoplásicas, estas propiedades son: sostener señales de proliferación, evadir los supresores de proliferación celular, invasión y metástasis activa, potencial de replicación ilimitado, inducir angiogénesis, resistencia a los mecanismos de muerte celular, evasión el sistema inmune, promoción de la inflamación, inestabilidad en el genoma y mutaciones, y desregulación de la energía celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

La capacidad proliferativa ilimitada es esencial para el desarrollo de la masa tumoral, durante la progresión del tumor las células oncogénicas superan el número de divisiones celulares normales y continúan proliferando (El-Gebali *et al*, 2013). Mantienen las señales de proliferación a través de distintos mecanismos: pueden generar proliferación autocrina, estimular las células no cancerígenas

dentro del estroma asociado al tumor, para que les suministren diversos factores de crecimiento (Cheng *et al*, 2008; Taddei *et al*, 2013), además producen interrupciones de mecanismos de retroalimentación negativa que atenúan la señalización proliferativa (Hanahan & Weinberg, 2011).

Además de la inducción general de señales de proliferación, las células tumorales también suprimen inhibidores de la proliferación, esto se logra mediante mutaciones en genes supresores de tumores (Rebucci & Michiels, 2013).

Las células cancerosas son capaces de modular las vías de apoptosis, mediante la supresión de la expresión de proteínas proapoptóticas, inducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas, destruyendo proteínas pro-apoptóticas o alterando la de función de la proteína (Fernald & Kurokawa, 2013).

Resistencia a quimioterapia

Un aspecto a resaltar en la clínica del cáncer es la resistencia a los medicamentos, la cual se debe a mutaciones que se adquirieron de forma espontánea por el tumor con el tiempo, que conduce a una acumulación de clones resistentes a la quimioterapia (Kuczynski *et al.*, 2013). Las variantes resistentes en un tumor heterogéneo se pueden seleccionar en un proceso de evolución darwiniana (Greaves & Maley, 2012), o una subpoblación de reposo de las células madre cancerosas resistentes a los fármacos intrínseca podría causar el nuevo crecimiento o propagación del tumor en progresión (Frank *et al*, 2010)

Además un tumor que ha progresado en la terapia supone ha cambiado de forma permanente, lo que exige un plan de tratamiento diferente (Kuczynski *et al*,

2013). Por lo anterior las opciones de tratamiento en cuanto a cáncer son limitada por lo que la investigación sobre la combinación sinérgica de la quimioterapia con otras drogas para superar la resistencia ha tenido mucho auge (Ghavami *et al.*, 2011).

Con el fin de desarrollar nuevos fármacos que superasen la resistencia a la quimioterapia, el NCI-60 DTP (Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos) ha creado una plataforma de tamizaje cuyo objetivo es identificar compuestos con efectos inhibidores del crecimiento o tóxicos sobre 60 líneas celulares de tumores humanos, a partir de la misma se ha estudiado la actividad antiproliferativa/citotóxica de miles de compuestos, pero también se han encontrado patrones relativos de sensibilidad y resistencia generada a drogas anticancerígenas, para reflejar los mecanismos de acción de los fármacos (Shoemaker, 2006; Barretina *et al.*, 2012).

Sin embargo esta plataforma presenta limitaciones prácticas, tales como la falta de evaluación de interacciones sinérgicas con quimioterapia a concentraciones clínicamente relevantes o del potencial quimiopreventivo.

Debido a ello en este estudio proponemos el empleo de DOX a concentraciones clínicamente relevantes para evaluar las interacciones sinérgicas, lo cual permite examinar sinergismo con múltiples mecanismos de acción ya que la DOX tiene un efecto celular altamente pleiotrópico. La actividad antitumoral de DOX se atribuye a su capacidad para intercalarse en la doble hélice de ADN bloqueando la actividad topoisomerasa II causando rupturas de cadena doble

(Filyak *et al.*, 2008), la cual está implicada en la transcripción y replicación del ADN, lo que conduce finalmente a la muerte celular a través de la inhibición de la síntesis de proteínas, ARN y ADN (Geng *et al.*, 2013). Además DOX produce daño oxidativo del ADN por la inducción de radicales (L'Ecuyer *et al.*, 2006), especialmente H_2O_2 a través de activación de PARP y NAD(P)H oxidasa que conlleva a la posterior activación de la caspasa 3 induciendo apoptosis (Mizutani *et al.*, 2005). También origina desalojo de histonas y atenuamiento de mecanismos de reparación del ADN (Pang *et al.*, 2013), e interacciona con las membranas plasmática, nuclear, mitocondria y nucléolo (Mhawi, 2009). Dadas estas múltiples actividades, se ha demostrado que la resistencia a DOX es predictora de multiresistencia a quimioterapia (Efferth *et al.*, 2008).

Quimioprevención

Por causa del incremento constante en la incidencia mundial del cáncer, aunado a la morbilidad y mortalidad asociada, junto con los costos de salud cada vez mayores del tratamiento, hay un creciente interés en las estrategias de prevención. Un enfoque con un enorme potencial es la quimioprevención, que se define como el uso de agentes naturales, sintéticos o biológicos para revertir, suprimir o prevenir cualquiera de las fases iniciales de la carcinogénesis o la progresión de células premalignas a la enfermedad invasiva (Sporn & Liby, 2005; Steward & Brown, 2013).

En la etapa de iniciación del cáncer la protección puede lograrse disminuyendo la captación celular y la activación metabólica de los procarcinógenos, aumentando la desintoxicación de electrófilos reactivos y la

eliminación de radicales libres, así como la inducción de las vías de reparación, la regulación a la baja de las respuestas inflamatorias crónicas y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otros procesos de protección (Yu & Kong, 2007; Valko *et al.*, 2007). Los agentes que actúan a nivel de la etapa de iniciación se conocen como agentes de bloqueo (Steward & Brown, 2013).

Una vez que se ha producido la iniciación, los agentes quimiopreventivos pueden influir en la promoción y progresión de las células iniciadas; tales compuestos a menudo se denominan agentes de supresión, en este punto los mecanismos principales reportados implican la inhibición de las vías de transducción de señales para perturbar los efectos promotores tumorales, que de otro modo conducirían a la proliferación celular (Steward & Brown, 2013).

Uso del rambután (*Nephelium lappaceum*) como fuente de compuestos activos

Nephelium lappaceum comúnmente conocido como rambután, o bien en nuestro país como mamón chino, es un árbol nativo de Malasia e Indonesia, perteneciente a la familia Sapindaceae (Palanisamy *et al.*, 2008).

El rambután es un fruto con elevada capacidad para ser utilizado como nutraceutico, principalmente su exocarpio, en el cual se ha determinado que posee altos niveles de polifenoles totales, los cuales proporcionan elevada capacidad antioxidante. En un estudio realizado por el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional, se evaluó 17 frutas cultivadas en Costa Rica, de este estudio el rambután fue la fruta que originó mayores resultados, su contenido de

polifenoles totales fue de 346.5 ± 9.9 mg equivalentes de ácido gálico/g (Madrigal *et al.*, 2010).

Posee siete variedades distintas, estas variedades son: Amarillo, Criollo, Rongrein, R-134, R-167, Jetlee, R-162. Estos frutos fueron evaluados como parte de una tesis realizada para optar por el grado de licenciatura en Química Industrial de la Universidad Nacional de Costa Rica, siendo la variedad amarilla la de mayor contenido de polifenoles totales (Álvarez, 2011).

Además en este trabajo se empleó un extracto polifenólico de Borojó, la cual corresponde a una planta perteneciente a la familia Rubiaceae, originaria de América (Díaz *et al.*, 2012).

Polifenoles y conjugados poliméricos

Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas, se caracterizan por poseer más de una unidad de fenol en su estructura, se pueden dividir en varias clases de acuerdo con el número de anillos de fenol que contienen y los elementos estructurales que se unen a estos anillos (Stevenson & Hurst, 2007).

En las plantas los polifenoles cumplen funciones como las de protección contra del estrés fotosintético, de especies reactivas de oxígeno, y del consumo de los herbívoros, en la dieta de los humanos la más importante función es de quimioprevención de enfermedades, entre ellas el cáncer, a partir de ello se ha empleado el uso farmacológico de agentes naturales para impedir o revertir la carcinogénesis a etapas tempranas (Sporn & Suh, 2002).

Los compuestos polifenólicos, poseen actividades antioxidantes debido a su alto potencial redox. Recientes estudios han demostrado que los compuestos polifenólicos neutralizan de un modo más eficiente los radicales libres que la vitamina C y la E (Palanisamy *et al.*, 2008). Por esta razón es que se han destacado como importantes agentes quimiopreventivos primarios (Lotito & Frei, 2006). Además exhiben un amplio rango de actividades biológicas: actividad antimicrobial, actividad antitumoral y antiproliferativa; muchas de estas actividades puedan atribuirse a su alto potencial antioxidante (Thitilertdech *et al.*, 2007). Sin embargo, su aplicación clínica presenta limitaciones respecto a la forma de administración *in vivo*, por lo que se están considerando opciones nanotecnológicas.

La nanotecnología farmacéutica se enfoca al desarrollo de formulaciones de agentes terapéuticos en nano-complejos biocompatibles entre los que se cuentan las nanopartículas, las nano-cápsulas, sistemas micelares, dendrímeros, fulerenos o nanoestructuras de carbono, huella cuántica, nanocomponentes derivados de la bioimitación o biomimética y los productos conjugados derivados de los anteriores. (Florence, 2007) La importancia de la misma para la terapia con fármacos reside en la posibilidad de suministrar tanto fármacos de bajo peso molecular así como macromoléculas como los péptidos, proteínas y genes, de manera localizada o dirigida, hacia un cierto tejido de interés.

Los conjugados poliméricos están basados en la unión física de dos compuestos, uno de los dos farmacológicamente activo y el otro una matriz polimérica de naturaleza hidrófila o hidrófoba, que pueden ser macromoléculas

lineales, ramificadas o entrecruzadas. En este tipo de formulaciones, el fármaco se encuentra impregnado en la matriz que actúa como soporte o celda de almacenamiento y dosificación (Escobar *et al.*, 2002).

La segunda variante consiste en la preparación y utilización de sistemas en los que el principio farmacológicamente activo es la propia macromolécula, o está unido a ella químicamente. En este caso, es necesario que la unión covalente entre el fármaco y la matriz polimérica o entre las diferentes unidades del principio activo polimerizado, sea fácilmente hidrolizable permitiendo la fácil ruptura del enlace covalente (Escobar *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista de los conjugados poliméricos se distinguen dos grupos: conjugados polímero-proteína y conjugados polímero-fármaco. Aunque los conjugados polímero-proteína y polímero-fármaco posean una gran similitud, el objetivo o razón biológica perseguida en cada caso es diferente. En el conjugado polímero-proteína se busca el favorecer una mayor estabilidad en suero y una disminución en inmunogenicidad, mientras en el conjugado polímero-fármaco se quiere incidir en la farmacocinética del mecanismo de internalización celular, mejorando la especificidad celular del fármaco de bajo peso molecular, su mecanismo de internalización y liberación óptima al alcanzar la diana molecular propuesta. (Madrugal, 2007). Estas diferencias se deben a que el conjugado polímero-proteína forma micelas en las que el fármaco se une covalentemente, encapsulando el fármaco lo que favorece su estabilidad (Duncan *et al.*, 2005) y en el caso del conjugado polímero-fármaco se mejora la especificidad de la droga porque las uniones del fármaco con el polímero son lábiles a ciertas proteasas

intracelulares y/o pH ácido, lo que promueve su liberación únicamente cuando es internalizado por fagocitosis o endocitosis (Vilar *et al.*, 2010).

Dentro de este marco se elaboran los primeros conjugados polímero-proteína antitumorales en el mercado, y el número creciente de conjugados polímero-fármaco en fase clínica con una clara posibilidad de alcanzar el mercado en los próximos años, los conjugados se establecen como agentes terapéuticos efectivos para la prevención/tratamiento de los trastornos que más afectan a la sociedad en el sector salud.

No obstante, todavía existen muchos retos a solucionar. Se requiere del desarrollo de mejores portadores poliméricos, biodegradables con alto peso molecular para así poder explotar en mayor medida el efecto de acción prolongada e idealmente, que además posean una arquitectura definida y las características naturales adecuadas que les permitan, una vez demostrada su bioactividad, ser incorporados como agentes nutricionales en la dieta cotidiana de los grupos de poblacionales que les requiera.

Una posible aproximación para solucionar estos retos se fundamenta en el uso de nanopreparados a base de quitosano, un polímero natural biodegradable con un gran potencial para aplicaciones farmacéuticas debido a su gran biocompatibilidad, alta densidad, ausencia de toxicidad y mucoadhesión (Sinha *et al.*, 2004). Se ha demostrado que al conjugar fármacos con quitosano, se mejora la disolución de los fármacos poco solubles (Sinha *et al.*, 2004). Debido a dichas características numerosos estudios han empleado eficazmente microesferas de

quitosano como vehículo para el transporte no solo de fármacos sino también de genes (Sinha *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010).

Extracción y cuantificación de los polifenoles empleados.

La extracción de los polifenoles probados en este estudio se efectuó utilizando varias mezclas de metanol:agua: 70:30 % (v/v) o de acetona:agua 70:30 % (v/v). La separación a partir de disoluciones extractivas se consigue mediante precipitación por adición de un solvente orgánico miscible, como etanol o acetona (Chia-Jui & Gow-Chin, 2012). La eliminación de impurezas de bajo peso molecular se realizó por cromatografía de exclusión por tamaño molecular.

Para cuantificar el contenido de polifenoles se empleó el método de Folin-Ciocalteu, que es uno de los métodos más antiguos y exactos para determinar el contenido de fenoles totales, consiste en mezclar el extracto polifenólico con tungstato y molibdato en un medio altamente básico (Na_2CO_3 al 10-20 % m/m). Los polifenoles que son fácilmente oxidables en medio básico reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno (II), el cual puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía visible debido a que absorbe a una longitud de 750 nm. El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico, ácido tánico o algún otro compuesto polifenólico (Singleton *et al.*, 2005).

Justificación.

De acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada 4 segundos muere una persona de cáncer, cada 11 segundos una de SIDA y cada 86 segundos una de Alzheimer (WHO, 2013). Se prevé que las muertes por cáncer a nivel mundial seguirán aumentando: en 2030 serán, según las previsiones, unos 12 millones (WHO, 2013).

Según el Registro Nacional de Tumores del Ministerio de Salud en el año 2004 murieron 3.555 personas en nuestro país, a causa de tumores malignos (cada 3 horas muere una persona en nuestro país por cáncer) (Ministerio de Salud, 2013). Los cánceres que producen más muertes y de los que diagnostican más casos en Costa Rica son el linfoma, el cáncer de piel, estomago, pulmón, colon e hígado, en hombres específicamente el cáncer de próstata, mientras que en mujeres tienen mayor incidencia el cáncer de mama y el de cuello uterino (ICCC, 2009). Aunque la mortalidad haya descendido debido a los avances médicos, no se observa un paso definitivo hacia la erradicación del mal, ni un incremento en la calidad de vida de los enfermos.

Aunado a la cantidad de casos nuevos que se reportan de canceres, la resistencia de las células del cáncer a la quimioterapia sigue siendo una pesada carga que impide el tratamiento de los pacientes (Rebucci & Michiels, 2013), un alternativa para sobrepasar la resistencia es el empleo de nuevos fármacos, que

se utilicen en conjunto con las quimioterapias actuales, en busca del desarrollo de sinergismo entre ambas drogas.

Actualmente, el desarrollo de nuevas terapias que logren sobrepasar la resistencia a la quimioterapia, se aborda desde dos aproximaciones diferentes. Por un lado, la investigación en genómica y proteómica está posibilitando la identificación de nuevas dianas moleculares específicas de tumor (Weber *et al.*, 2008). La segunda aproximación, en muchos sentidos complementaria a la anterior, es el diseño de sistemas innovadores de transporte (Kratz & Warnecke, 2012; Kumar *et al.*, 2013), desarrollados para guiar el agente bioactivo de forma más precisa a la célula tumoral.

La nanociencia y nanotecnología son la base de nuevas técnicas para el transporte de fármacos con beneficios potenciales para el paciente y ha dado paso a naciendo mercados para la industria; el desarrollo de sistemas de transporte y liberación controlada de moléculas con actividad terapéutica es en la actualidad tema de debate estratégico en las grandes firmas farmacéuticas. En la última década, se ha observado un crecimiento exponencial tanto en el desarrollo como en la aprobación por autoridades reguladoras de nanosistemas terapéuticos híbridos y de transporte de fármacos con aplicación en clínica (Duncan, 2003; Harris & Chess, 2003; Torchilin, 2005; Hunter *et al.*, 2012). La mayoría son terapias anticancerígenas, en ellos se encuentran por ejemplo: liposomas (Harris & Chess 2003), anticuerpos monoclonales e inmunoconjugados (Sharkey & Goldenberg, 2008), nanopartículas (Che-Ming & Liangfang, 2012) o polímeros terapéuticos como fármacos poliméricos (conjugados polímero-proteína) (Duncan,

2003). Estas nanoconstrucciones, a menudo multicomponentes, pueden ser definidas como las primeras nanomedicinas con demostrado beneficio clínico.

El diseño, desarrollo y aplicación de polímeros terapéuticos ofrece enormes posibilidades en el nuevo campo de la “nanomedicina”, pues ya no solo considera sistemas de aplicación, dirección y liberación controlada de componentes bioactivos, sino que además presentan propiedades muy interesantes que abren nuevas vías de aplicación. Así, la naturaleza polimérica o macromolecular de los “polímeros terapéuticos”, permite preparar sistemas nanoparticulados que puedan ser aplicados con facilidad en la corriente plasmática, y que dependiendo de su composición van a presentar un comportamiento singular, en general con una muy notable reducción de la toxicidad inherente a la dosis del fármaco original (Che-Ming & Liangfang, 2012). Por otra parte, los sistemas terapéuticos basados en sistemas conjugados con polímeros naturales, permiten aprovechar las propiedades de estas macromoléculas (biocompatibilidad, flexibilidad, estabilidad, formación de película e incluso su comportamiento biodegradativo) en combinación con el efecto terapéutico asociado al componente bioactivo (polifenoles o proteínas) incorporado a los sistemas poliméricos específicos.

Hipótesis.

Los extractos polifenólicos de *Nephelium lappaceum* poseen actividades antitumorales y/o quimiopreventivas en la línea celular CCRF-CEM, a concentraciones clínicamente relevantes, las cuales se incrementan al conjugarlos con polímeros nanoestructurados.

Objetivos.

Objetivo General.

Caracterizar las actividades antitumorales y/o actividades quimiopreventivas de distintos extractos polifenólicos de *Nephelium lappaceum* y sus conjugados nanoestructurados, para identificar aquellos con un potencial terapéutico.

Objetivos específicos.

1. Estandarizar técnicas de medición de estrés oxidativo para tamizar la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos de *Nephelium lappaceum*.
2. Tamizar la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos de *Nephelium lappaceum* para identificar aquellos con potencial quimiopreventor.
3. Estandarizar técnicas de cuantificación de la inhibición del crecimiento tumoral, para tamizar la actividad antitumoral de los extractos polifenólicos de *Nephelium lappaceum* y sus conjugados nanoestructurados.
4. Tamizar la actividad anti tumoral de los extractos polifenólicos de *Nephelium lappaceum* y sus conjugados nanoestructurados, para identificar aquellos con potencial terapéutico.
5. Caracterizar las subrutinas de muerte celular inducidas por compuestos polifenólicos citotóxicos para esclarecer el mecanismo de acción de estos compuestos y su posible aplicación como terapia complementaria en combinación con quimioterapia.

Materiales y Métodos.

Células:

Se utilizó las líneas celulares CCRF-CEM, la cual es una línea celular linfoblastoide tipo T, derivada de leucemia linfoblástica aguda humana y CEM/ADR5000 derivada de la anterior, ambas mantenidas en RPMI al 10% SFB e incubadas a 37°C, 5% CO₂, 95% de O₂ y 100% de humedad relativa, para los experimentos las células se encontraron entre el segundo y el octavo pasaje.

Preparación de los extractos polifenólicos:

Para cada experimento los polifenoles se pesaron, diluyeron en RPMI al 10% SFB, y en caso de ser necesario se utilizaron distintos procesos para solubilizarlos tales como ultrasonicar y el empleo de baño maría a 37 °C. Luego de haberlos solubilizado, se filtraron con filtros de 22 µm y se realizaron diluciones para llevar a la concentración de 200 y 300 µg/mL, a partir de estas concentración se efectuaron diluciones seriadas con factor de dilución 1:10 originando las concentraciones de 20, 2, 0,2 y 0,02 µg/mL y 30, 3, 0,3 y 0,03 µg/mL; respectivamente.

Estandarización del ensayo de tamizaje de la actividad antioxidante.

Se trabajó en placas de 96 pozos en las que se realizaron ensayos de las concentraciones de DCFDA: 0, 2,5, 5, 10, 20 y 40 µM contra 0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 µM de TBPH, evaluando cada condición por triplicado.

Para lo anterior, a cada pozo se le agregaron 50 μL de células a 8×10^5 células/mL y 50 μL de RPMI al 10%, se incubó por dos horas a 37 °C, 5% CO_2 , 95% de O_2 y 100% de humedad relativa.

Trascurrido este lapso se añadió 50 μL la sonda DCFDA a concentración final de 0, 2,5, 5, 10, 20 y 40 μM y se incubó por 30 minutos. Se agregó 50 μL de TBHP a concentraciones finales de 0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 μM y se incubó 90 minutos.

Se cuantificó la fluorescencia a 485 nm como longitud de excitación y 528 nm como longitud de emisión.

Tamizaje de actividad antioxidante con DCFDA.

Se evaluó en presencia y ausencia de TBHP para lo cual se dividieron placas de 96 hoyos en cuatro cuadrículas de cinco columnas por cuatro filas, sobrando dos columnas de la placa en las que se colocaron los controles de: células, TBHP, células con sonda y medio; cada control se hizo por cuadruplicado. Las dos cuadrículas superiores (filas A, B, C y D de la placa) se emplearon para evaluar un extracto polifenólico y las inferiores (filas E, F, G y H) para evaluar otro extracto.

A cada una de las dos cuadrículas superiores se le agregaron por cuadruplicado 50 μL del extracto polifenólico a analizar en las concentraciones de 200, 20, 2, 0,2 y 0,02 $\mu\text{g/mL}$ y 50 μL de células a 8×10^5 células/mL y se incubó por dos horas a 37 °C, 5% CO_2 , 95% de O_2 y 100% de humedad relativa. Obteniendo concentraciones finales del extracto polifenólico de 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 $\mu\text{g/mL}$.

Posterior a la incubación se añadió 50 μL de DCFDA (D6883-50MG Sigma Aldrich) a una concentración de 7,5 μM , para una concentración final de 2,5 μM de la sonda en cada pozo, exceptuando los controles de medio y células. Y se incubó por 30 minutos, en las mismas condiciones que la incubación anterior.

A continuación a una de las dos cuadrículas se le agregó 50 μL de TBHP (458139-25ML Sigma Aldrich) a 200 μM , alcanzando una concentración final de 50 μM de TBHP, y a la otra cuadrícula se le agrega 50 μL de RPMI 10% SFB. Y se incubó por 90 minutos.

Se efectuó el mismo procedimiento para otro extracto polifenólico, en las cuadrículas inferiores de la placa.

Al finalizar la incubación se realizaron las mediciones de la fluorescencia a 485 nm como longitud de excitación y 528 nm como longitud de emisión.

Y se Calculó los niveles de estrés oxidativo basales, en presencia de los extractos polifenólicos, y en presencia y ausencia de TBH.

Estandarización del ensayo de Sulforodamina B

Se tomó una placa de 96 hoyos y se inoculó 50 μL con las células en las columnas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, trabajándose por triplicado, con las siguientes densidades de inóculo: 40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250 y 625 células, posteriormente se les agregó 50 μL de RPMI al 10% SFB, y el resto de la placa se llenó con 100 μL de PBS.

Se fijaron los pozos de la placa que contenían células, agregándole 40 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 50% (Sigma-Aldrich T5288), e incubando a 4 $^{\circ}\text{C}$

durante una hora, transcurrido este lapso de tiempo, se lavó la placa tres veces con agua destilada, se secó con una secadora CONAIR.

Se agregaron 40 μL de sulforodamina B (Sigma-Aldrich S2902) en cada pozo, pasados 30 minutos se retiró la sulforodamina B realizando tres lavados con ácido acético al 1% (Sigma-Aldrich A8915) y se secó con una secadora CONAIR.

Se le agregó a cada hoyo 100 μL de Tris 10 mM (T5413), se mantuvieron las placas en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Y se procedió a realizar la medición espectrofotométricamente de la absorbancia a una longitud de onda de 490, 530, 565, 630 y 690 nm.

Se disolvió 1 mg de DOX (Sigma-Aldrich 44583) en 0,5 mL de agua ultra pura (Gibco10977) a partir de esta solución madre de DOX 2,00 mg/mL se hizo una dilución 1:1000 en RPMI con 5% SFB, obteniéndose una solución de DOX de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las restantes concentraciones de DOX se prepararon mediante diluciones seriadas con factor de dilución 1:2, empleando como disolvente RPMI al 10% SFB

Se agregaron 50 μL de las distintas concentraciones de DOX a 18 hoyos de una placa de 96 hoyos de la siguiente manera: se trabajó por triplicado las filas B, C y D de las columnas 3, 4, 5, 6, 7 y 8 de la placa y se les adicionaron las concentraciones de 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

Los hoyos propios de la columna 2 se tomaron como controles de crecimiento celular, agregándoles 50 μL de RPMI al 5% SFB.

Se inocularon los 21 hoyos con una densidad de 40000 células en 50 μ L. Los pozos E2, F2, G2, E3, F3 y G3 se les adiciono únicamente 100 μ L de RPMI al 5% SFB. Los hoyos sobrantes se les adicionaron 100 μ L de PBS estéril. Y se incubó por 96 horas a 37°C y 5% CO₂.

Cumplidas las 96 horas se fijaron los pozos con TCA al 50% (Sigma-Aldrich T5288), del mismo modo que se indicó previamente.

A las dos placas se le añadieron 40 μ L de sulforodamina B (Sigma-Aldrich S2902) en cada pozo, pasados 30 minutos se retiró la sulforodamina B realizando lavados con ácido acético al 1% (Sigma-Aldrich A8915) y se secó con una secadora CONAIR.

Se le agregó a cada hoyo 100 μ L de Tris 10 mM (T5413), se mantuvieron las placas en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Y se procedió a realizar la medición espectrofotométricamente de la absorbancia a una longitud de onda de 490, 530, 565, 630 y 690 nm.

Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento total (TGI, por sus siglas en inglés Total Growth Inhibition):

Las absorbancias obtenidas a 530 nm o 565 nm en los pozos con células y doxorrubicina, así como los pozos con controles de medio y crecimiento celular, se les resta el valor de las absorbancias de los mismos pozos a 690 nm (valores corregidos por background).

Subsiguiente se toma los valores corregidos por background de las absorbancias de los pozos con células y doxorubicina y se les resta el promedio de las absorbancias corregidas por background de los controles de medio (valores corregidos por background y medio). Del mismo modo se corrigen los datos del control de crecimiento celular.

Las absorbancias a 530 nm o 565 nm de los pozos de células fijadas al tiempo cero, se corrigen por background, y se les resta el promedio de las absorbancias de medio a tiempo cero corregido por background; estos resultados se promedian.

Se calcula el TGI mediante la fórmula $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$, donde Tz corresponde al valor de la absorbancia en el tiempo cero corregido por background y medio, C el control de crecimiento corregido por background y medio y Ti son los valores del ensayo a las distintas concentraciones de doxorubicina corregidas por background y medio.

Por tanto el valor 0 en el eje “y” de gráficos obtenidos a partir del cálculo del TGI corresponde a una inhibición del crecimiento equivalente a mantener la biomasa en el rango del control de células a tiempo cero, mientras que el valor de 100 en el eje “y” equivale a que el compuesto analizado no muestra diferencias significativas con el control de células a las 96 horas.

Tamizaje de citotoxicidad por el ensayo de Sulforodamina B.

Se evaluó en presencia y ausencia de doxorubicina para lo cual se dividieron placas negras de 96 hoyos en cuatro cuadrículas de cinco columnas por

cuatro filas, sobrando dos columnas de la placa en las que se colocaron los controles de crecimiento celular, medio y doxorubicina. Las dos cuadrículas superiores (filas A, B, C y D de la placa) se emplearon para evaluar un extracto polifenólico y las inferiores (filas E, F, G y H) para evaluar otro extracto polifenólico.

A cada una de las dos cuadrículas superiores se le añadió por cuadruplicado 50 μ L del extracto polifenólico a analizar en las concentraciones de 300, 30, 3, 0,3 y 0,03 μ g/mL, 50 μ L de células a 8×10^5 células/mL. A una de las 2 cuadrículas se le agregó 50 μ L por pozo de RPMI al 10% SFB y a la otra 50 μ L por pozo de doxorubicina a 0,0936 μ g/mL. Obteniendo así una concentración final de doxorubicina de 0,0312 μ g/mL, y concentraciones finales del extracto polifenólico de 100, 10, 1, 0,1 y 0,01 μ g/mL.

Se procedió del mismo modo con las dos cuadrículas inferiores, analizando en estas un extracto polifenólico distinto, se agregaron seis controles de doxorubicina que correspondían a 50 μ L de doxorubicina a 0,0936 μ g/mL, 50 μ L de células a 8×10^5 células/mL y 50 μ L de RPMI al 10% SFB por pozo; seis controles de crecimiento celular que consistían en 50 μ L de células a 8×10^5 células/mL y 100 μ L de RPMI al 10% SFB; y cuatro controles de medio (150 μ L de RPMI al 10% SFB).

Esta placa se incubó por 96 horas a 37 °C y 5% CO₂, 95% de O₂ y 100% de humedad relativa.

Adicionalmente en otra placa negra de 96 hoyos se realizó por cuadruplicado controles al tiempo cero, de medio y células, para lo cual se agregó en el control de células 50 μL de células a 8×10^5 células/mL y 100 μL de RPMI al 10% SFB y el control del medio 150 μL de RPMI al 10% SFB. Estos controles se fijaron con TCA. Trascurridas las 96 horas se fijaron los pozos con TCA al 50% del mismo modo en que se efectuó para los controles al tiempo cero.

Se añadió 40 μL de sulforodamina B (Sigma-Aldrich S2902) a cada pozo empleado para el experimento (en ambas placas), pasados 30 minutos se retiró la sulforodamina B realizando tres lavados con ácido acético al 1% (Sigma-Aldrich A8915) y secado con secadora.

Se resuspende cada hoyo en 100 μL de Tris 10 mM (Sigma-Aldrich T5413), se mantienen las placas en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias de las placas a 530, 565 y 690 nm.

Ensayos de Ciclo Celular

Se utilizaron placas de 24 pozos, con un volumen final de 500 μL /pozo para una cantidad de 200 000 células/pozo. Se emplearon cuatro condiciones experimentales: células cultivadas en medio RPMI 10% (250 μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 250 μL de medio RPMI), células cultivadas con el compuesto (a la concentración determinada en el ensayo de SRB), células cultivadas con DOX 0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250 μL de suspensión celular a 1×10^6 células/mL + 125 μL de DOX 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en RPMI 10% + 125 μL de RPMI al 10% SFB) y células cultivadas con el compuesto y con DOX 0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250 μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 125 μL de DOX 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en

RPMI 10% + 125 μ L del compuesto a 4X de la concentración fijada en el ensayo de SRB). Cada condición se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 horas, para lo cual se incubó a 37°C, 5% CO₂, 95% de O₂ y 100% de humedad relativa.

Luego se trasladó el volumen de cada pozo a un Eppendorf de 2 mL, se centrifugó a 400g por 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Las muestras se fijan con 1 mL de etanol 70% frío y se incuban a 4°C por mínimo 30 minutos. Posteriormente, se centrifugan las muestras por 5 minutos a 400g y se hace un lavado con PBS 1x. Se agregan 250 μ L de Propidium Iodide/RNasaA Solution (Invitrogen, KHO1001 APO-BRDU) y se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Este volumen se traspasa a los tubos correspondientes para la lectura por citometría de flujo y se lleva a un volumen final de 500 μ L con PBS 1x.

Y se leyó con citometria de FACS (Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia, por sus siglas en inglés).

Ensayos de Etidio homodímero-1 y Calceína.

Se utilizaron placas de 24 pozos, con un volumen final de 500 μ L/pozo para una cantidad de 200 000 células/pozo. Se emplearon cuatro condiciones experimentales: células cultivadas en medio RPMI 10% (250 μ L de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 250 μ L de medio RPMI), células cultivadas con el compuesto (a la concentración determinada en el ensayo de SRB), células cultivadas con DOX 0.03125 μ g/mL (250 μ L de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 125 μ L de DOX 0.125 μ g/mL en RPMI 10% + 125 μ L de RPMI al 10% SFB) y células cultivadas con el compuesto y con DOX 0.03125 μ g/mL (250

μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 125 μL de DOX 0.125 $\mu\text{g/mL}$ en RPMI 10% + 125 μL del compuesto a 4X de la concentración fijada en el ensayo de SRB). Cada condición se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 horas, para lo cual se incubó a 37°C, 5% CO_2 , 95% de O_2 y 100% de humedad relativa.

Para ambas condiciones, se agregara Calceína AM a una concentración final de 0.025 μM y Etidio homodímero-1 a concentración final de 4 μM (Molecular Probes, L3224 LIVE/DEAD), se incubó con los fluorocromos por 45 min.

Luego se pasó a Eppendorf y se lavó una vez con RPMI 0% (1 mL) y se resuspendió en 400 μL de RPMI 0% y se leyó con citometría de FACS.

Ensayos de AnexinaV.

Se utilizaron placas de 24 pozos, con un volumen final de 500 μL /pozo para una cantidad de 200 000 células/pozo. Se emplearon cuatro condiciones experimentales: células cultivadas en medio RPMI 10% (250 μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 250 μL de medio RPMI), células cultivadas con el compuesto (a la concentración determinada en el ensayo de SRB), células cultivadas con DOX 0.03125 $\mu\text{g/mL}$ (250 μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 125 μL de DOX 0.125 $\mu\text{g/mL}$ en RPMI 10% + 125 μL de RPMI al 10% SFB) y células cultivadas con el compuesto y con DOX 0.03125 $\mu\text{g/mL}$ (250 μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 125 μL de DOX 0.125 $\mu\text{g/mL}$ en RPMI 10% + 125 μL del compuesto a 4X de la concentración fijada en el ensayo de SRB). Cada condición se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 horas, para lo cual se incubó a 37°C, 5% CO_2 , 95% de O_2 y 100% de humedad relativa.

Finalizada cada incubación se preparó el buffer de unión a anexina, con las siguientes concentraciones: 10 mM de HEPES, 140 mM de NaCl, y 2,5 mM de CaCl_2 , pH 7,4. Y se le realizó una dilución 1:5.

Se trasladó el volumen de cada pozo a un Eppendorf de 2 mL, se centrifugó a 400g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, y se realizó un lavado con un tampón de solución salina y fosfatos (PBS), se desechó el sobrenadante y se resuspendió las células en 200 μL de tampón de unión a anexina.

Se añadió 2 μL de la anexina V conjugada a cada pozo y 1 μL de yoduro de propidio (PI) por cada 100 μL de suspensión celular. Se incubaron las células a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Después del período de incubación, se agregaron 200 μL de tampón de unión a anexina, se mezcló suavemente, se mantuvieron las muestras en hielo y se realizó la lectura por citometría de FACS.

Ensayo de autofagia con Naranja de Acridina

Se utilizaron placas de 24 pozos, con un volumen final de 500 μL /pozo para una cantidad de 200 000 células/pozo. Se emplearon tres condiciones experimentales: células cultivadas en medio RPMI 10% (250 μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 250 μL de medio RPMI), células cultivadas con el compuesto (a la concentración determinada en el ensayo de SRB), células cultivadas con DOX 0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250 μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 125 μL de DOX 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en RPMI 10% + 125 μL de RPMI al 10% SFB) y células cultivadas con el compuesto y con DOX 0.03125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250

μL de suspensión celular a 8×10^5 células/mL + 125 μL de DOX 0.125 $\mu\text{g/mL}$ en RPMI 10% + 125 μL del compuesto a 4X de la concentración fijada en el ensayo de SRB). Cada condición se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 horas, para lo cual se incubó a 37°C, 5% CO_2 , 95% de O_2 y 100% de humedad relativa.

Al finalizar el periodo de incubación, se trasladó el volumen de cada pozo a un Eppendorf de 2 mL, se le agregó 5 μL de Acridine Orange (Paris Anticorps 930.01) y se incubó por media hora a 37°C, 5% CO_2 , 95% de O_2 y 100% de humedad relativa.

Se centrifugó a 400g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, y se realizó un lavado con un tampón de solución salina y fosfatos (PBS), se desechó el sobrenadante y se resuspendió las células en 200 μL de RPMI al 1% SFB y se realizó la lectura por citometría de FACS.

Ensayo de Inhibición de la autofagia

Se utilizaron placas de 24 pozos, con un volumen final de 500 μL /pozo para una cantidad de 200 000 células/pozo. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: células cultivadas en medio RPMI 10% (125 μL de suspensión celular a $1,6 \times 10^6$ células/mL + 375 μL de medio RPMI), células cultivadas con el compuesto (125 μL de suspensión celular a $1,6 \times 10^6$ células/mL + 125 μL del compuesto a 4X de la concentración fijada en el ensayo de SRB + 250 μL de RPMI 10% SFB), células cultivadas con DOX 0.03125 $\mu\text{g/mL}$ (125 μL de suspensión celular a $1,6 \times 10^6$ células/mL + 125 μL de DOX 0.125 $\mu\text{g/mL}$ en RPMI 10% + 250 μL de RPMI al 10% SFB), células cultivadas con el compuesto y con DOX 0.03125 $\mu\text{g/mL}$ (125 μL de suspensión celular a $1,6 \times 10^6$ células/mL + 125 μL de DOX 0.125

$\mu\text{g/mL}$ en RPMI 10% + 125 μL del compuesto a 4X de la concentración fijada en el ensayo de SRB + 125 μL de RPMI al 10% SFB), y estas mismas cuatro condiciones pero en presencia de 3-Metil Adenina (3-MA) al 3 mM, (para lo cual se sustituyó 125 μL de RPMI de cada condición por 125 μL de 3-MA al 12 mM). La placa se incubó a 37°C, 5% CO₂, 95% de O₂ y 100% de humedad relativa por 72 horas.

Transcurrida la incubación se procedió a trasladar el volumen de cada pozo a un Eppendorf de 2 mL, se añadió 5 μL de Acridine Orange (Paris Anticorps 930.01) y se incubó por media hora a 37°C, 5% CO₂, 95% de O₂ y 100% de humedad relativa.

Se centrifugó a 400g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, y se realizó un lavado con un tampón de solución salina y fosfatos (PBS), se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 μL de RPMI al 1% SFB y se leyó por citometría de flujo.

Pruebas estadísticas

Todos los experimentos realizados se analizaron con las pruebas estadísticas T de student y análisis de Fisher para evaluar homogeneidad de las varianzas.

Resultados

Estandarización del tamizaje para la cuantificación de la actividad antioxidante.

Se determinó la fluorescencia para cada una de las concentraciones de DCFDA contra las concentraciones de TBHP, tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 2. Fluorescencia a 485 nm de las concentraciones de DCFA contra concentraciones de TBHP.

DCFDA (μM)	TBHP (μM)						
	0	3,125	6,25	12,5	25	50	100
0	255	6	11	7	19	8	63
2,5	263	2191	3754	3816	5486	8318	8988
5	509	2244	3259	7424	8076	13734	12604
10	803	4413	8991	11667	16543	21615	23489
20	1642	8143	16391	31353	25941	32518	37531
40	4046	17728	25257	33507	40593	46112	53653

A partir de dichos valores se obtuvo la relación entre la fluorescencia de cada variable de DCFDA y, TBHP, contra la misma variable de DCFDA pero TBHP 0 μM , y las razones obtenidas se graficaron como se presenta en la Figura 1.

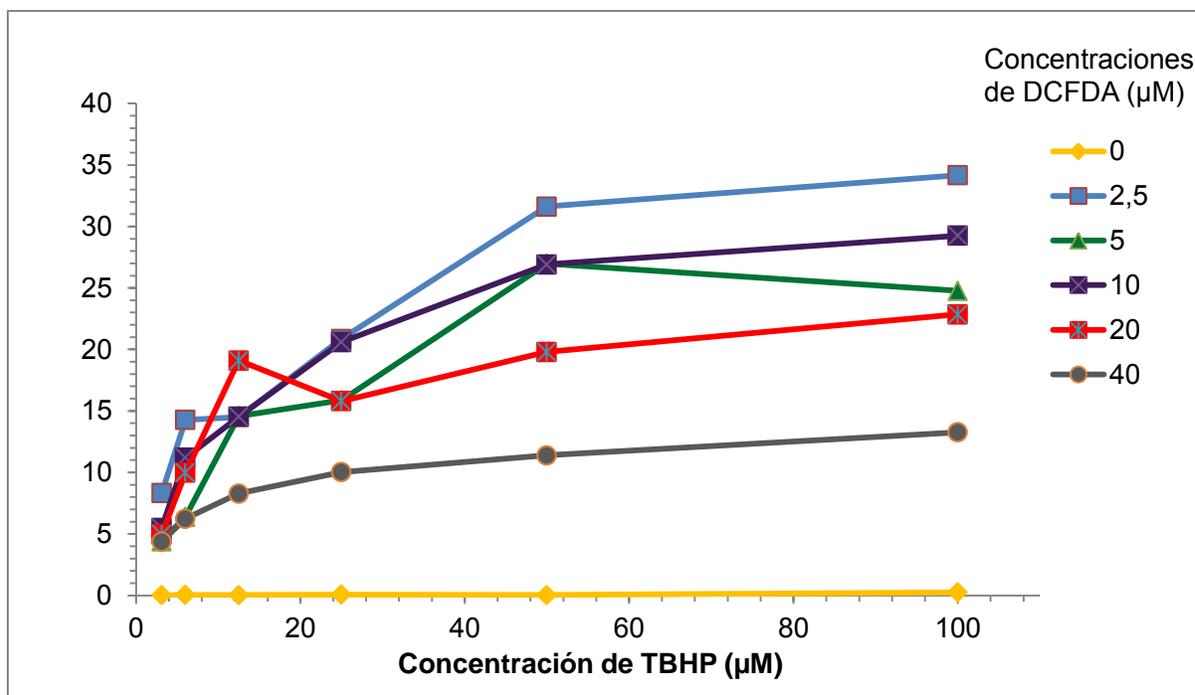


Figura 1. Razón de DCFDA entre DCFDA TBHP 0 μM , empleando la línea celular CCRF-CEM.

Con estos resultados se determinaron las condiciones óptimas para el tamizaje por actividad antioxidante de los extractos polifenólicos, fijando las concentraciones de DCFDA a 2,5 μM y TBHP a 50 μM .

Tamizaje por actividad antioxidante.

Una vez estandarizada la técnica para la determinación de la actividad antioxidante, se tamizó dicha actividad en los extractos polifenólicos de las variedades de *Nephelium lappaceum*: Amarillo, Criollo, Rongrein, R-134, R-167, Jetlee, y R-162, y de un extracto polifenólico de Borjón.

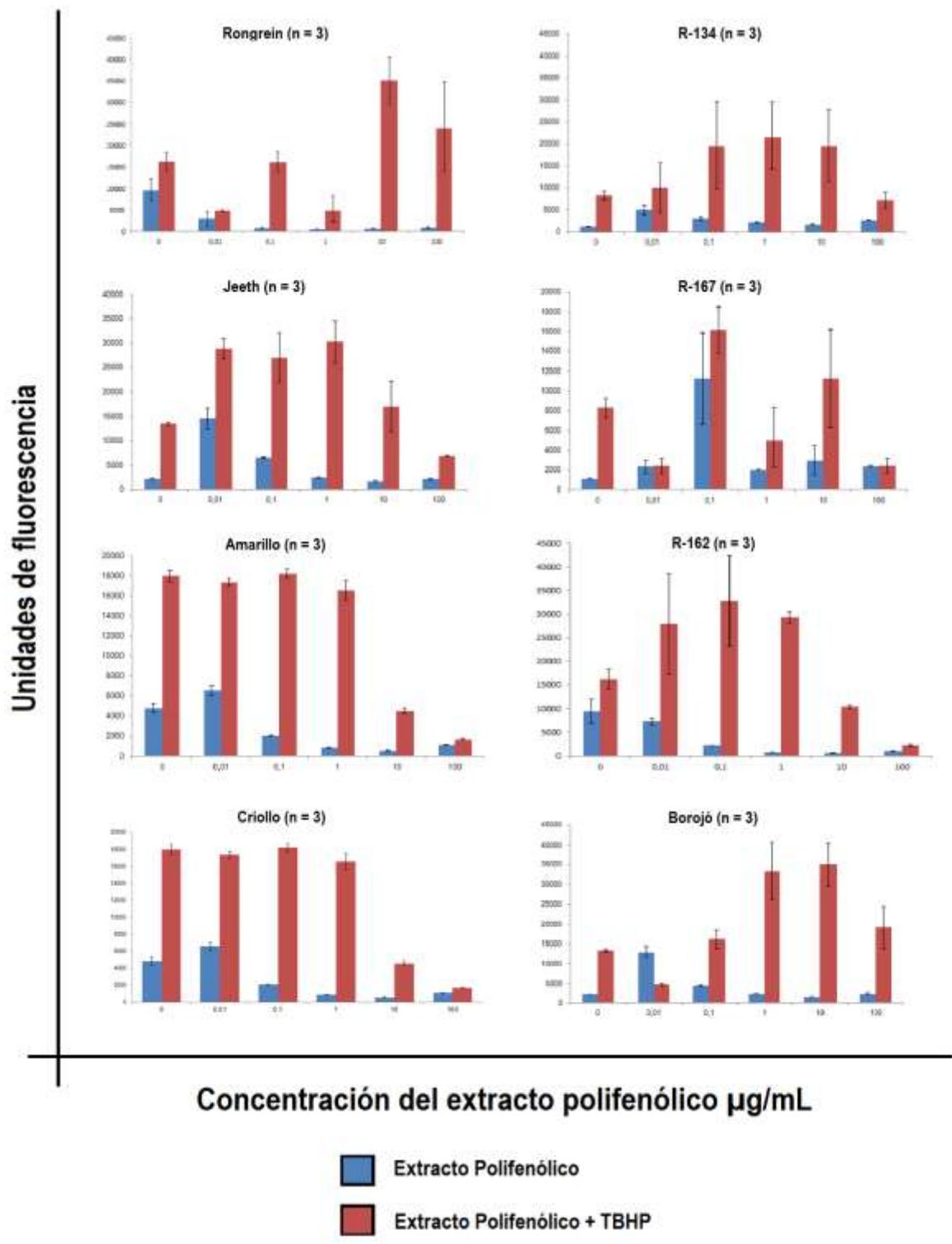


Figura 2. Fluorescencia de la sonda DCFDA al exponerse a los extractos polifenólicos o a los extractos polifenólicos junto con TBHP.

Partiendo de la fluorescencia de la sonda DCFDA en presencia de cada extracto polifenólico (Figura 2), se calculó el porcentaje de neutralización del estrés oxidativo.

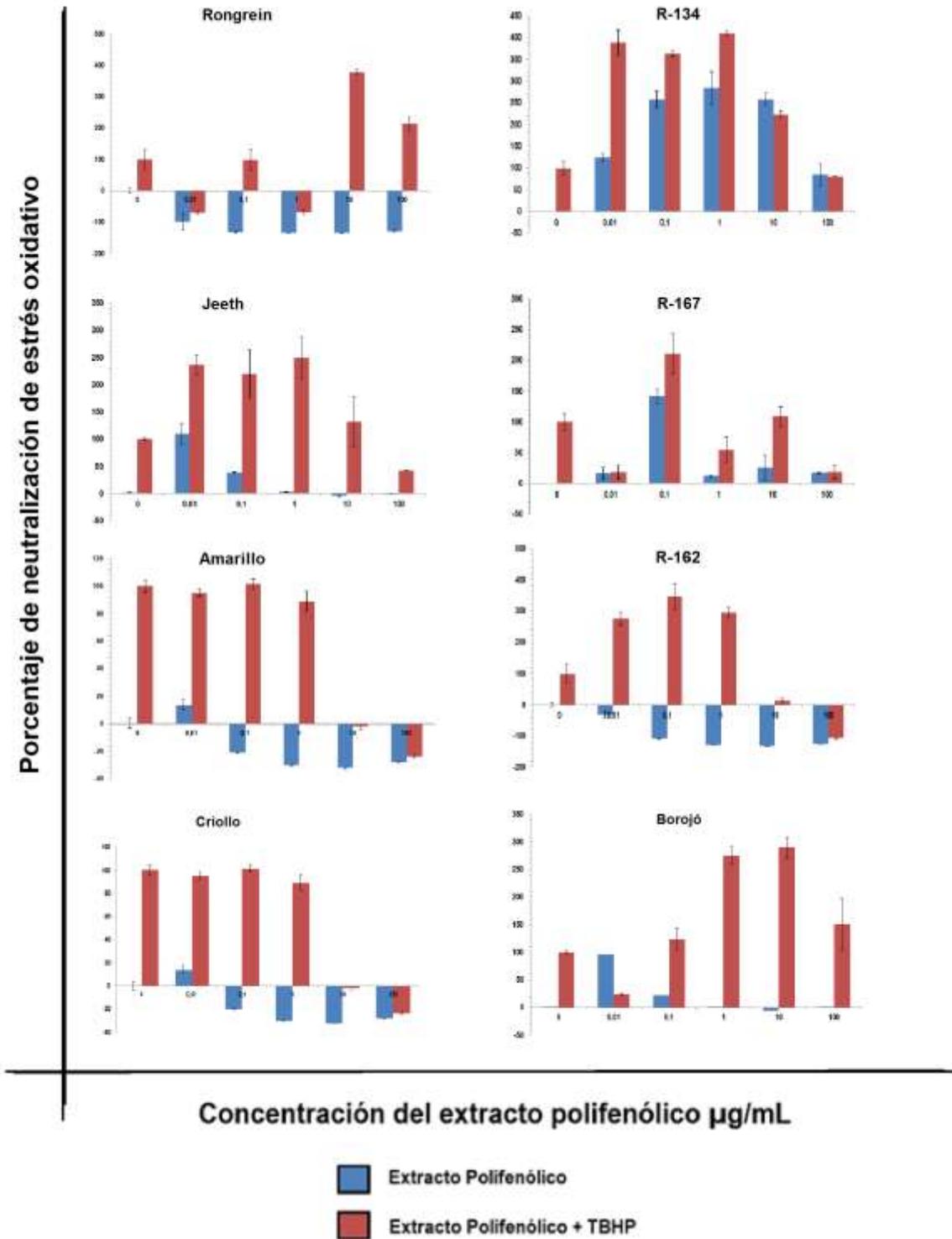


Figura 3. Neutralización del estrés oxidativo para cada uno de los extractos polifenólicos de las variedades de *Nephelium lappaceum*, y Borojó.

Estandarización de prueba de Sulforodamina B, para el tamizaje de la citotoxicidad.

Al cuantificar la absorbancia a distintas longitudes de onda, se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 4. La segunda placa se tomó los promedios de los valores de la absorbancia a 565 nm, con lo que se calculó el TGI (Total Growth Inhibition) mediante la fórmula $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$, tal como se muestra en la Figura 5

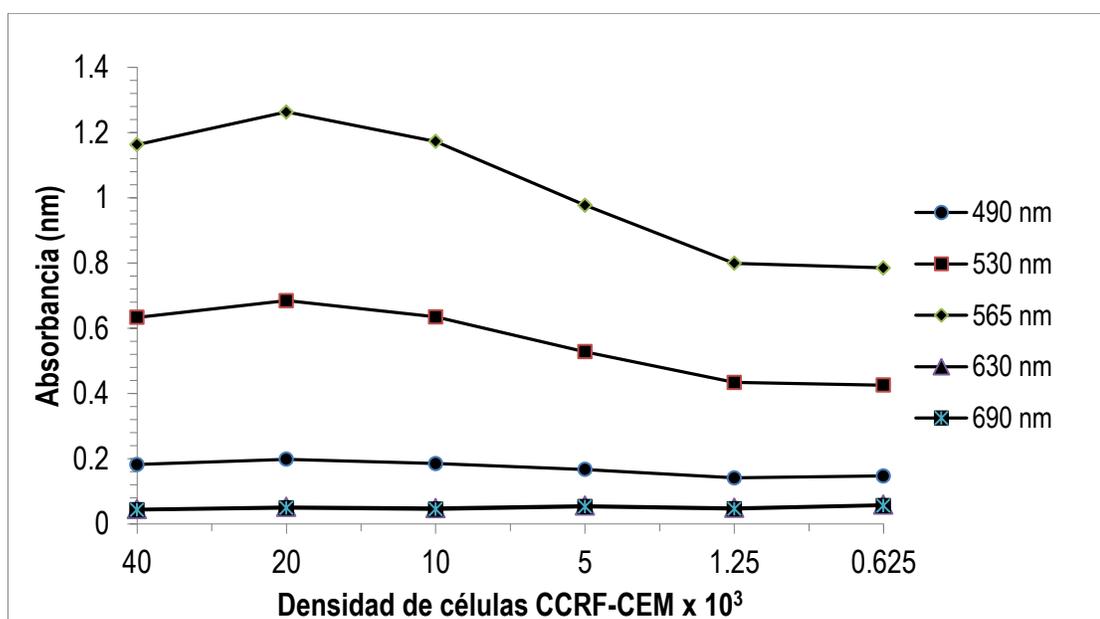


Figura 4. Absorbancia (nm) de distintas densidades de las células CCRF-CEM tratadas con el protocolo de Sulforodamina B.

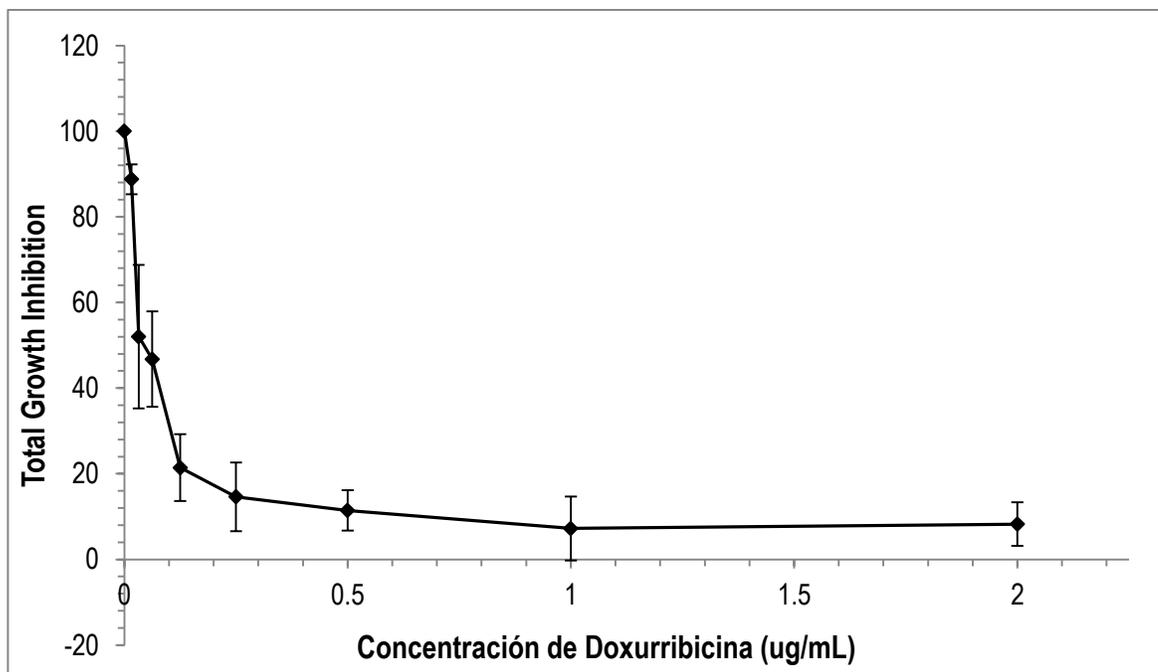


Figura 5. Efecto a las 96 horas de exposición a DOX en la línea celular CCRF-CEM crecidas en RPIM al 10% SFB, determinado mediante el ensayo de Sulforodamina B, con un n de 3.

Con los resultados mostrados en las figuras 4 y 5 se estandarizó el ensayo de Sulforodamina B, de tal modo que se definieron 565 y 690 nm como las longitudes de onda óptimas para los tamizajes de la actividad citotóxica de los polifenoles a evaluar, se determinó emplear como densidad celular $50 \mu\text{L}$ a 8×10^5 células/ μL y $0,0312 \mu\text{g/mL}$ como la concentración de DOX que se emplearía para determinar sinergismo con dichos compuestos.

Tamizaje de citotoxicidad por el ensayo de Sulforodamina B

Se analizó la actividad citotóxica de los extractos polifenólicos de las variedades de *Nephelium lappaceum*: Amarillo, Criollo, Rongrein, R-134, R-167, Jetlee, y R-162, y el extracto polifenólico de Borojón, en ausencia y presencia de DOX.

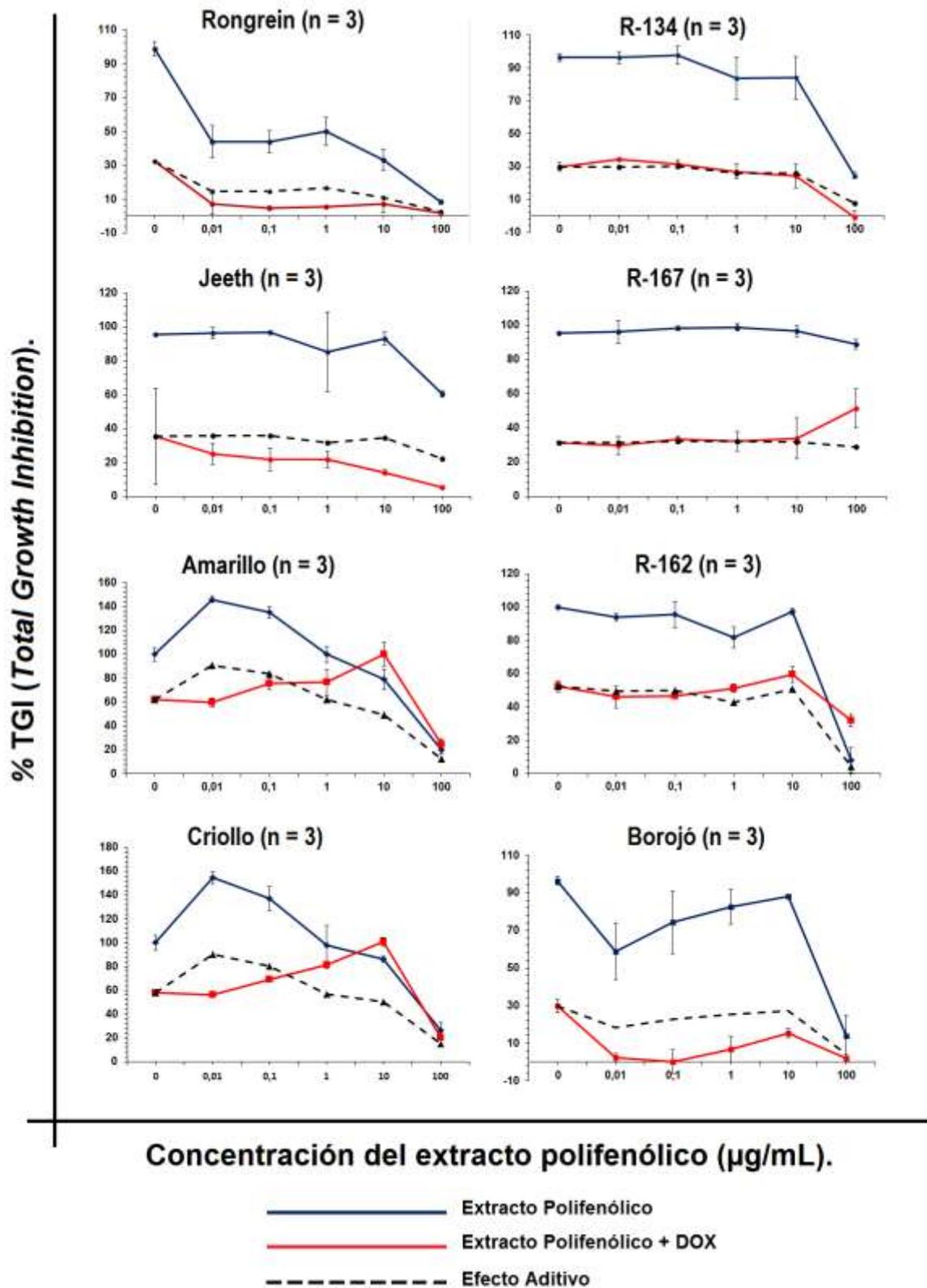


Figura 6. Total Growth Inhibition a las 96 horas de exposici6n a los extractos polifen6licos

de las ocho variedades de *Nephelium lappaceum*, analizados en ausencia y presencia de DOX, empleando la línea celular CCRF-CEM.

Los resultados anteriores (Figura 6) mostraron que el extracto polifenólico de Rongrein, obtuvo la mayor inhibición del crecimiento de las células CCRF-CEM, la combinación de Rongrein y DOX sobrepasó el efecto aditivo, por lo que se su efecto en conjunto es sinérgico.

Los extractos polifenólicos Amarillo, Criollo, R-134, R-162 y R-167 en este tamizaje no mostraron inhibición del crecimiento celular a concentraciones inferiores a 10 $\mu\text{g/mL}$, en algunos de estos extractos la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ mostró una inhibición en el crecimiento celular aceptable, sin embargo al ser una concentración tan alta, el resultado observado puede atribuirse al efecto de los polifenoles sobre la osmolaridad de las células. Por otra parte la combinación de estos extractos con DOX no sobrepasó el efecto aditivo.

En el caso de los extractos polifenólicos de Borojó y Jeeth, aunque presentaron sinergismo al emplearse en conjunto con DOX, individualmente no exhibieron inhibición en el crecimiento celular. Por lo anterior se determinó proseguir los experimentos únicamente con el extracto polifenólico de Rongrein.

La Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica, fraccionó el extracto polifenólico de Rongrein empleando cromatografía de exclusión por tamaño molecular, obteniendo cuatro fracciones, las cuales fueron tamizadas por el ensayo de SRB, como control en este mismo experimento se tamizó nuevamente el extracto polifenólico de Rongrein y un extracto polifenólico de Rongrein obtenido por cromatografía empleando una columna C18.

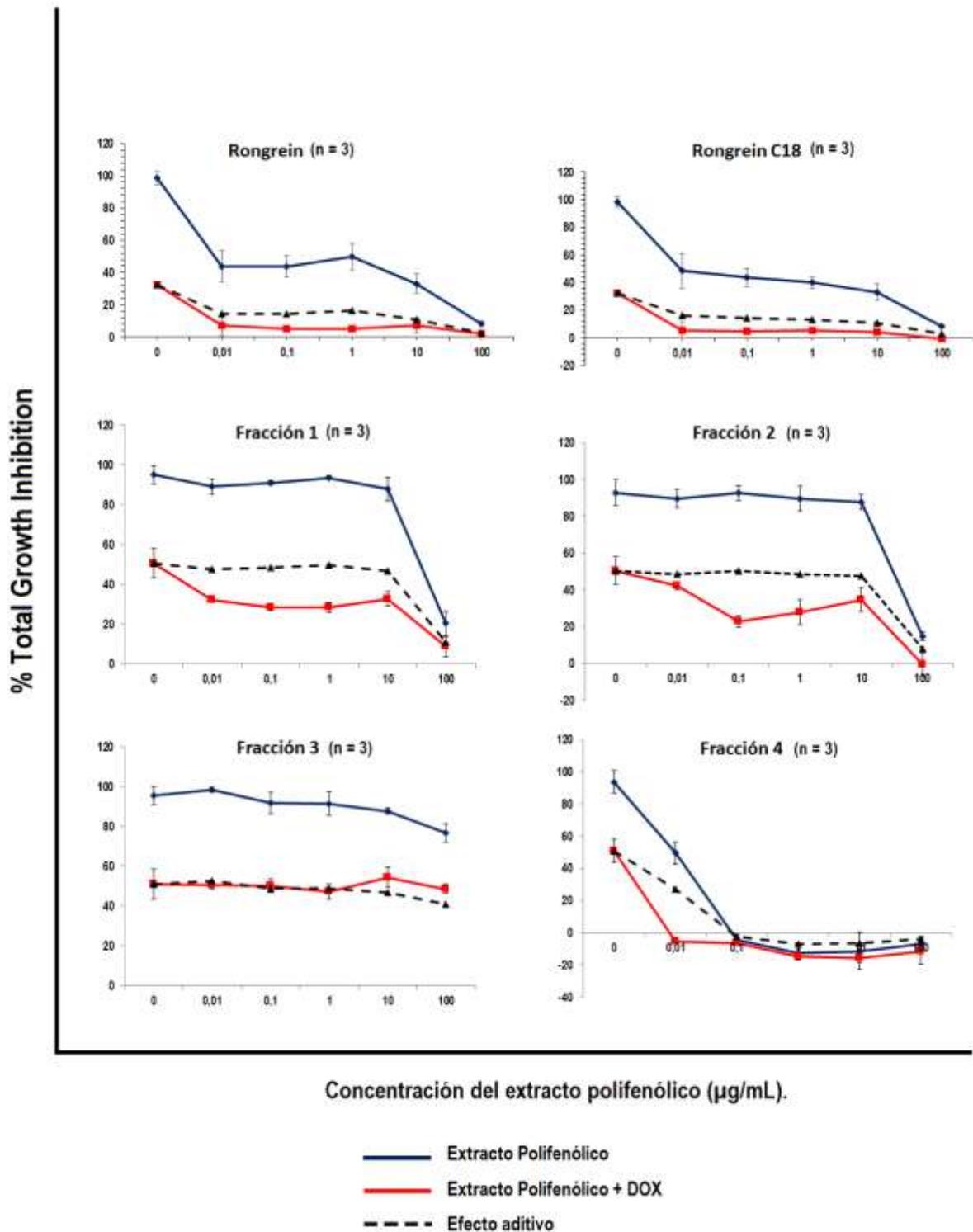


Figura 7. TIG a las 96 horas de las cuatro fracciones del extracto polifenólico Rongrein, analizados, en ausencia y presencia de DOX, empleando la línea celular CCRF-CEM.

La cuarta fracción del extracto polifenólico de Rongrein obtuvo los resultados más promitentes (Figura 7), la inhibición de crecimiento celular de dicha fracción fue aún mayor que la del extracto polifenólico de Rongrein, lo que evidencia que al fraccionarlo se concentró la actividad citotóxica.

Tanto el extracto polifenólico de Rongrein junto con DOX, como la cuarta fracción del mismo en presencia y ausencia de DOX, en el tamizaje exhiben actividades citotóxicas capaces de inhibir en su totalidad el crecimiento de la línea celular CCRF-CEM. No obstante al no obtener valores inferiores a 0 en las gráficas de TIG, los resultados son sugestivos de la capacidad del extracto polifenólico de Rongrein de frenar el crecimiento pero su actividad no logra eliminar las células.

Se informó a la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica los resultados obtenidos, quienes conjugaron con polímeros de quitosano, la fracción cuatro del extracto polifenólico de Rongrein.

Se tamizó la citotoxicidad de este conjugado mediante el ensayo de Sulforodamina B, empleando como control la fracción cuatro del extracto polifenólico de Rongrein sin conjugar, los resultados se muestran en la Figura 8.

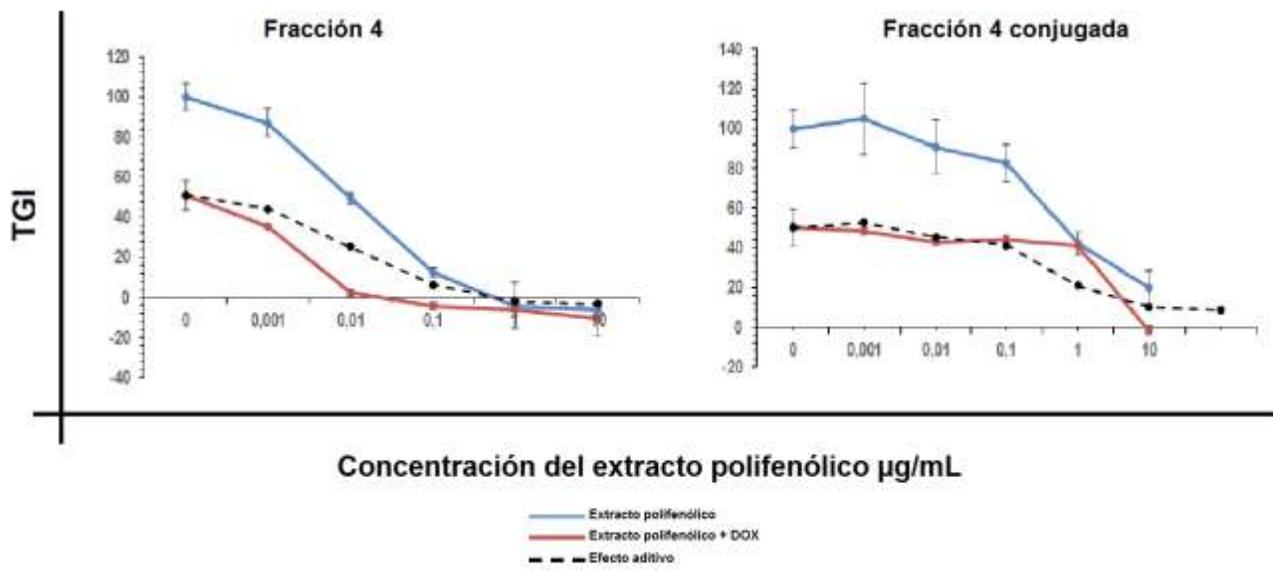


Figura 8. TIG a las 96 horas de la fracción cuatro del extracto polifenólico Rongrein, y su conjugado nanoestructurado, en ausencia y presencia de DOX, empleando la línea celular CCRF-CEM.

Al obtenerse con la cuarta fracción del extracto polifenólico de Rongrein los mejores resultados en el tamizaje de citotoxicidad, se decidió proseguir los experimentos únicamente con este compuesto, para dilucidar la vía de muerte celular que induce el mismo. Para lo cual se decidió emplear las concentraciones de 0,01 y 0,1 µg/mL de la fracción 4 del extracto polifenólico de Rongrein.

Calceina etidio homodimero-1

Por citometría de flujo se midió la fluorescencia de las sondas de Calceina AM y Etidio homodimero-1 en células sometidas a las seis condiciones planteadas para este experimento por 24, 48, 72 y 96 horas.

A partir del software FloJo se analizaron los datos adquiridos y se realizaron Dot Plots de los mismos, estos se muestran en la Figura 8.

Tiempo de exposición a la Fracción 4 del extracto polifenólico de Rongrein y/o DOX

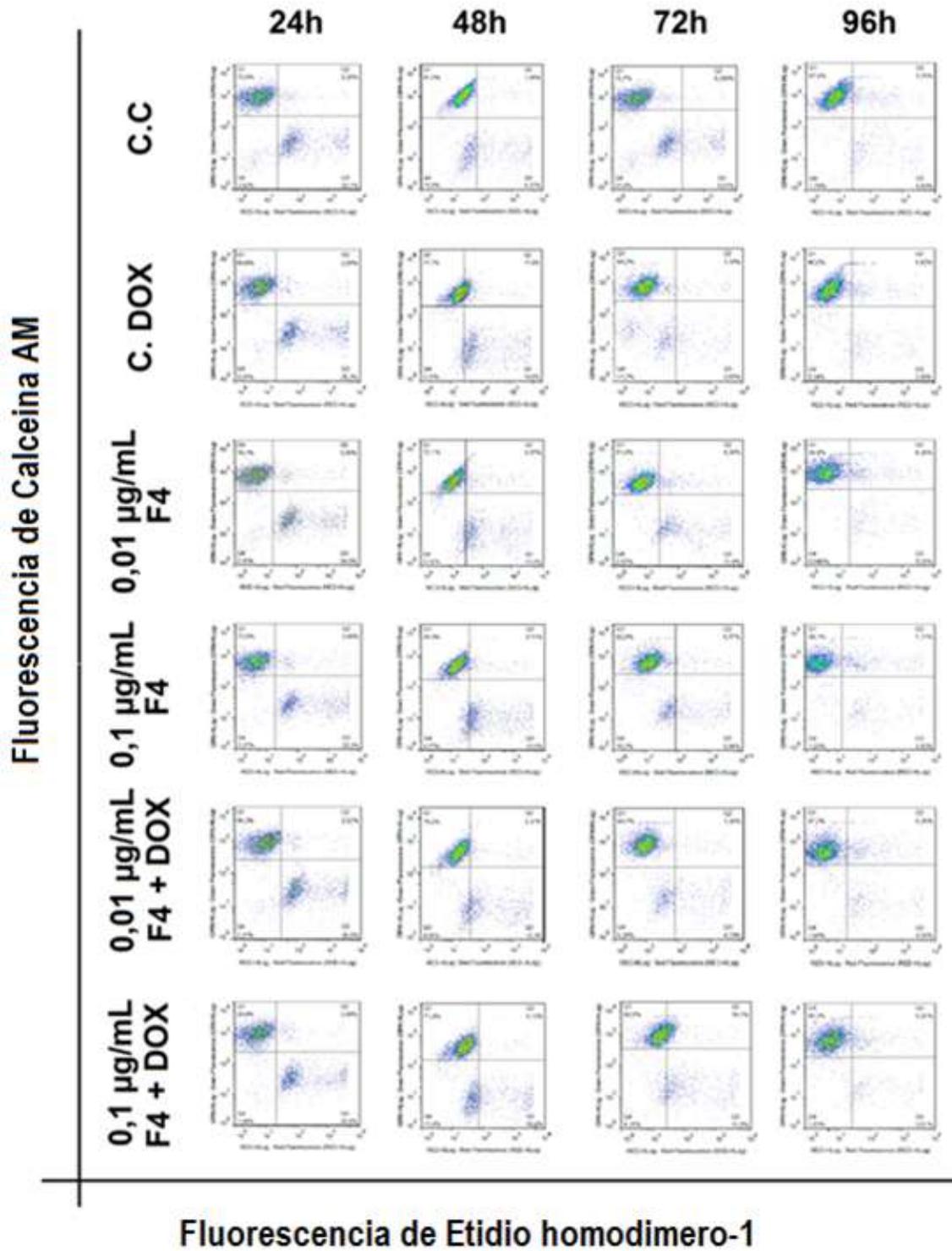


Figura 8. Dot Plots de la fluorescencia de Etidio homodimero-1 y Calceína AM, en células de la línea celular CCRF-CEM tratadas con la fracción 4 de extracto polifenólico de

Rongrein en presencia y ausencia de DOX, controles de DOX (C. DOX) y controles de células (C. C).

En todos los Dot Plots el porcentaje de células más alto se encontró en el cuadrante superior izquierdo que corresponde en la Figura 8 al Q1 de cada histograma, no hubo una diferencia significativa entre el valor del Q1 de los controles y las células expuestas a la fracción 4 de extracto polifenólico de Rongrein en ninguna de las dos concentraciones, ni en conjunto con DOX.

Determinación de apoptosis.

Mediante citometría de flujo se cuantificó la fluorescencia de la sonda de Anexina V en células sometidas a las seis condiciones establecidas para este experimento por 24, 48, 72 y 96 horas, utilizando como extracto polifenólico a experimentar la fracción 4 del Rongrein.

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando el software FlowJo mediante el cual se realizaron Dot Plots presentados en la Figura 9.

Para todos los Dot Plots el porcentaje de células más alto se ubicó en el cuadrante inferior izquierdo, el cual es nombrado en la Figura 9 de cada histograma como Q4, no hubo una diferencia significativa entre el valor del Q4 de los controles y las células expuestas a la fracción 4 de extracto polifenólico de Rongrein en ninguna de las dos concentraciones, tanto en ausencia como en presencia de DOX.

Tiempo de exposición a la Fracción 4 del extracto polifenólico de Rongrein y/o DOX

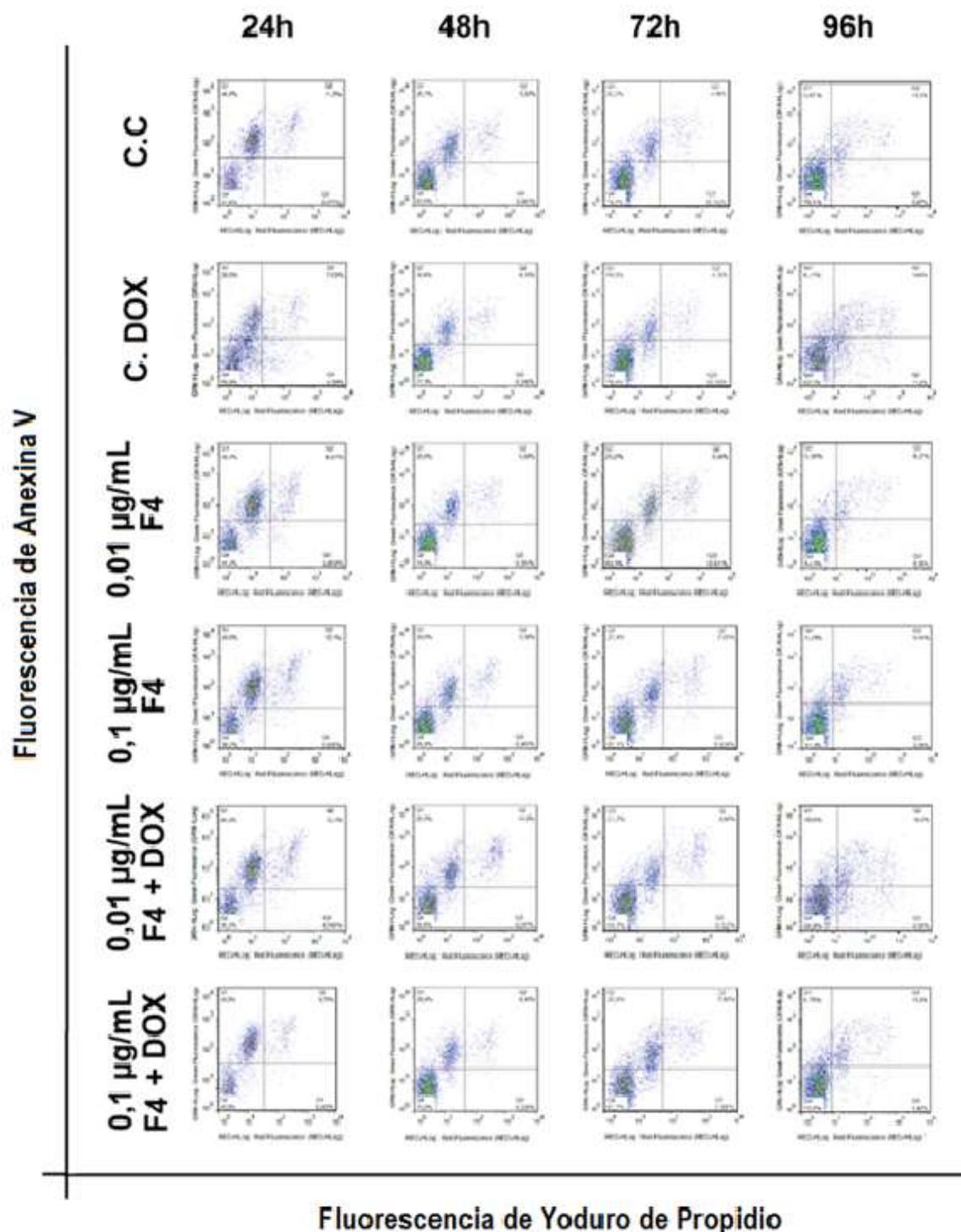


Figura 9. Dot Plot de la fluorescencia de Anexina V, en células de la línea celular CCRF-CEM tratadas con la fracción 4 de extracto polifenólico de Rongrein en presencia y ausencia de DOX, controles de DOX (C. DOX) y controles de células (C. C)

Ciclo celular.

Se cuantifico la fluorescencia de las células marcadas con yoduro de propidio, expuesta a cada una de las variables experimentales. Haciendo uso del software FlowJo con los datos adquiridos se elaboraron modelos del ciclo celular, estos modelos permitieron obtener la frecuencia de las fases del ciclo celular G1, S y G2 a las 24, 48, 72 y 96 horas de exponerse a la fracción 4 del extracto polifenólico de Rongrein y/o DOX. Debido a las variaciones de las escalas de los modelos de ciclo celular, para poder comparar cada resultado se graficaron las frecuencias de G1, S y G2, dichos gráficos están contenidos en la Figura 10.

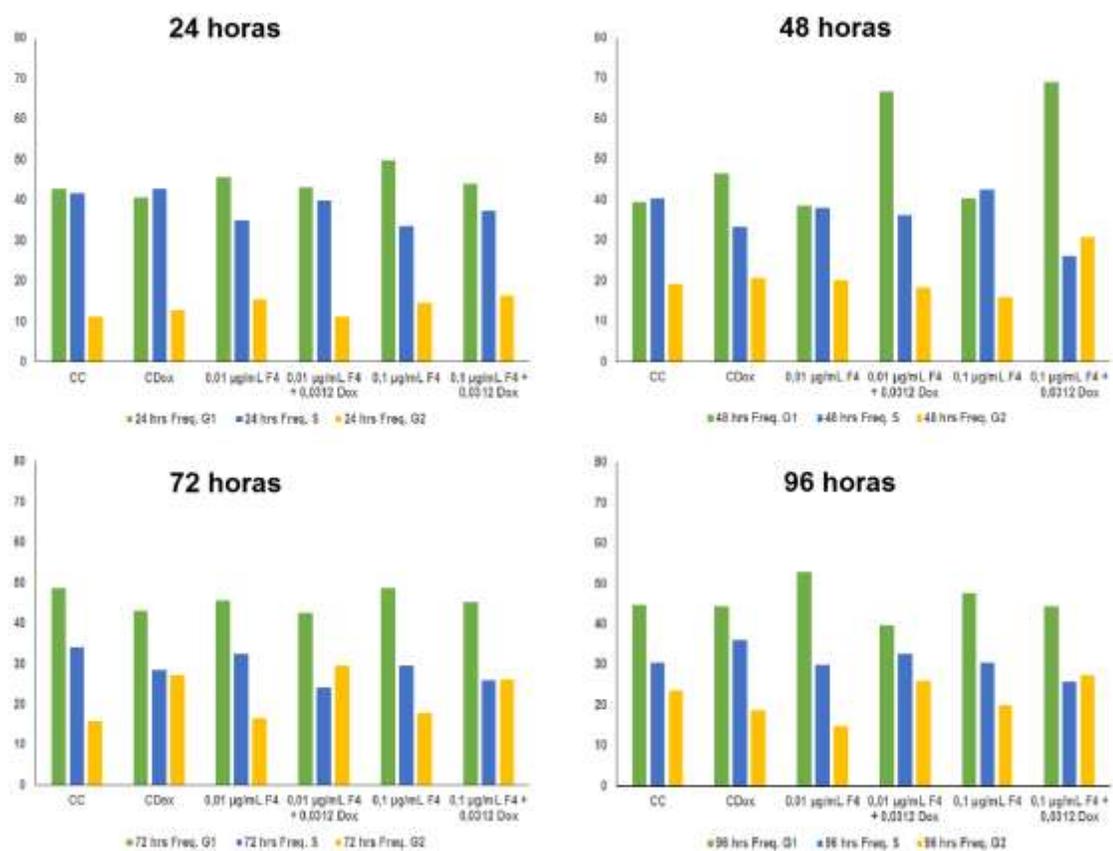


Figura 10. Gráficos de las frecuencias de G1, S y G2, obtenidos a partir de los modelos de ciclo celular en células de la línea celular CCRF-CEM tratadas con la fracción 4 de

extracto polifenólico de Rongrein en presencia y ausencia de DOX, controles de DOX (C. DOX) y controles de células (C. C).

Estos gráficos mostraron un importante aumento en la frecuencia de G1 a las 48 horas al exponerse a 0,01 µg/mL de la fracción 4 en conjunto con DOX y a 0,1 µg/mL de la fracción 4 en conjunto con DOX.

Evaluación de la autofagia.

Se midió la fluorescencia de las células marcadas con naranja de acridina, expuesta a cada una de las variables experimentales. Mediante el software FlowJo se elaboraron histogramas a las 24, 48, 72 y 96 horas de exponerse a la fracción 4 del extracto polifenólico de Rongrein y/o DOX, los valores del Geom Mean de cada histograma se recopilaron en la Tabla 3.

Tabla 3. Geom Mean de los histogramas obtenidos a partir de la fluorescencia de naranja de acridina en células de la línea celular CCRF-CEM tratadas con la fracción 4 del extracto polifenólico de Rongrein en presencia y ausencia de DOX, controles de DOX (C. DOX) y controles de células (C. C).

Horas de incubación	C. C	C. DOX	0,01 µg/mL F4	0,1 µg/mL F4	0,01 µg/mL F4 + DOX	0,01 µg/mL F4 + DOX
24	102	114	131	157	125	102
48	106	118,6	121	195	116	111
72	108	116	126	137	168	232
96	102	113	160	148	208	201

En la Tabla 3 se aprecia un aumento con respecto a los controles en el Geom Mean a las 24 y 48 horas de haberse agregado 0,1 µg/mL de la fracción 4 en ausencia de DOX, mientras que las células que se expusieron a ambas

concentraciones de la fracción 4 de Rongrein y DOX muestran un aumento en el Geom Mean a las 72 y 96 horas.

Inhibición de la autofagia

Partiendo de los resultados anteriores se determinó emplear el inhibidor de autofagia 3-Metil Adenina (3-MA) junto con la concentración de 0,1 µg/mL de la fracción 4 del extracto polifenólico de Rongrein en ausencia y presencia de DOX, y cuantificar la autofagia y el ciclo celular a las 24, 48, 72 y 96 horas de exponerse a dichas condiciones.

Tabla 4. Geom Mean de la fluorescencia de naranja de acridina en células de la línea celular CCRF-CEM tratadas con la fracción cuatro del extracto polifenólico de Rongrein en presencia y ausencia de 3-MA y DOX, controles de DOX (C. DOX) y controles de células (C. C).

Horas de incubación	C. C	C. C + 3-MA	C. DOX	C. DOX + 3-MA	0,1 µg/mL F4	0,1 µg/mL F4 + 3-MA	0,1 µg/mL F4 + DOX	0,1 µg/mL F4 + DOX + 3-MA
24	126	117	136	96,6	74,8	84,3	101	86,1
48	115	97,4	120	113	107	110	120	106
72	98	116	142	129	153	59,4	152	102
96	109	92,8	151	123	164	44	216	87,1

La Tabla 4 muestra un aumento en el Geom Mean de las células que fueron expuestas al extracto polifenólico tanto en ausencia como en presencia de DOX, en comparación con las mismas condiciones pero en presencia de 3-MA, los resultados donde esta diferencia se encontró más marcada se dieron a las 72 y 96 horas de incubación.

Por su parte, al cuantificar el ciclo celular, como se muestra en la Figura 11 se mantuvo la tendencia de los resultados de la Figura 10, donde al agregar la fracción cuatro del extracto polifenólico de Rongrein en conjunto con DOX se aumentó la frecuencia de G1 con respecto a los controles. Pero en presencia de 3-MA, fue mayor el aumento de dicha frecuencia, principalmente a las 24 y 48 horas de incubación.

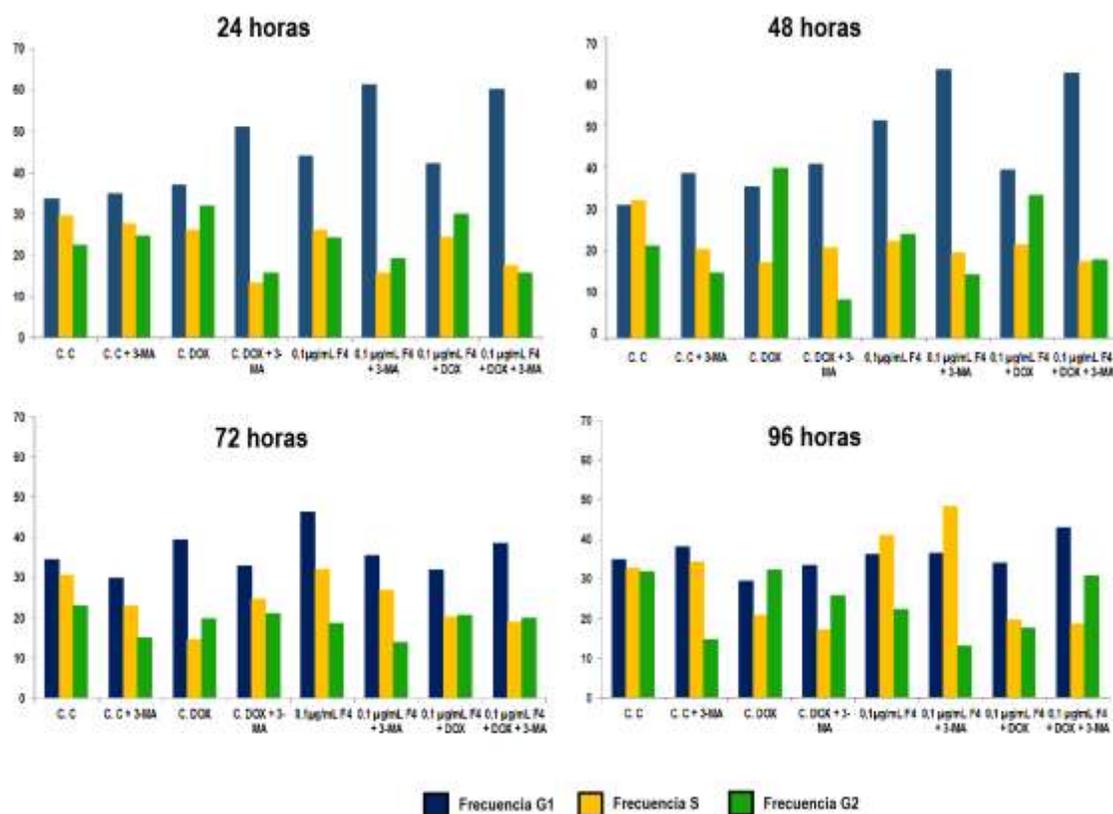


Figura 11. Gráficos de las frecuencias de G1, S y G2, obtenidos a partir de los modelos de ciclo celular en células de la línea celular CCRF-CEM tratadas con la fracción 4 de extracto polifenólico de Rongrein en presencia y ausencia de DOX y 3-AM controles de DOX (C. DOX) y controles de células (C. C.).

Discusión

En esta investigación se tamizó la actividad antioxidante de diversos extractos de *Nephelium lappaceum*, obteniéndose resultados que evidencian la neutralización del estrés oxidativo, tanto en presencia como en ausencia de TBHP, al grado que las células tratadas con los extractos polifenólicos llegaron a disminuir el grado de estrés oxidativo a porcentajes inferiores que los controles de células a las que no se les indujo ningún tipo de estrés.

Anteriores estudios han reportado la actividad antioxidante de extractos polifenólicos de la cascara de *Nephelium lappaceum*, por ejemplo las investigaciones efectuadas por Okonogi y colaboradores reporto una alta actividad antioxidante de extractos polifenólicos de la cascara en células Caco-2 que corresponde a una línea celular derivada de un adenoma de colon humano y una actividad no toxica en PBMC (Okonogi *et al*, 2007).

Otros estudios tales como los realizados por Khonkarn y colaboradores al igual que los efectuados por Isabelle y colaboradores atribuyen a los polifenoles de la cascara y la pulpa de la fruta del rambután una fuerte actividad de eliminación de radicales y la capacidad de conjugar el Fe^{2+} (Khonkarn *et al*, 2010; Isabelle *et al*, 2010)

La estructura de los polifenoles es ideal para la eliminación de radicales libres debido a que poseen grupos hidroxilo fenólicos que son propensos a donar un átomo de hidrógeno o un electrón a un radical libre y presentan un extenso

sistema aromático conjugado que deslocaliza electrones no apareados (Dai & Mumper, 2010).

Por otro lado la capacidad de conjugar el Fe^{2+} se encuentra en polifenoles que presentan grupos dihidroxi, esto evita que el metal interactúe con el peróxido de hidrogeno formando radicales hidroxilo (Dai & Mumper, 2010).

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos polifenólicos, se trataba de un objetivo de menor peso, por lo que únicamente se probó en células cancerígenas, no obstante un abordaje óptimo debería agregar la cuantificación de la actividad citotóxica en células humanas no alteradas de cultivos celulares primarios, tales como PBMC que conservan sus mecanismos de detoxificación sin alteraciones, de este modo se podría verificar que el compuesto además de producir un efecto antioxidante sobre las células transformadas, no produce citotoxicidad (Okonogi *et al*, 2007).

Para el tamizaje de la actividad citotóxica se empleó el ensayo de Sulforodamina B, el principio de este ensayo consiste en la unión del colorante a aminoácidos alcalinos de las proteínas celulares y mediante a una determinación colorimétrica se obtiene una estimación de la masa de proteínas presentes, lo cual se correlaciona con el número de células presentes (Papazisis *et al*, 1997).

Empleando el ensayo de Sulforodamina B, se tamizó la actividad citotóxica de los extractos polifenólicos de *Nephelium lappaceum*, de las variedades: Amarillo, Criollo, Rongrein, R-134, R-167, Jetlee y R-162, en ausencia y presencia de DOX a concentración de 0,0312 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Solamente el extracto polifenólico de Rongrein mostró actividad citotóxica, además de presentar sinergismo con DOX, por tanto este extracto fue fraccionado empleando cromatografía, la fracción cuatro fue la única en presentar actividad citotóxica, según estudios realizados por parte de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica esta fracción corresponde a las proantocianidinas.

Dicha fracción fue conjugada con polímeros de quitosano, y se tamizó con el ensayo de SRB, pero no mostró suficiente actividad citotóxica, esto se puede atribuir a que en los sistemas de nanopartículas conjugadas la liberación de los componentes es mucho más lenta, debido a que se da de un modo más controlado (Duncan, 2003).

Investigaciones con proantocianidinas obtenidas de otras frutas, han evidenciado la capacidad de las mismas de causar inhibición en el crecimiento y apoptosis en líneas celulares cancerígenas (Chung *et al*, 2009).

La inducción de la apoptosis en células de cáncer, por parte de las proantocianidinas de otras frutas, se ha correlacionado con la inactivación de la vía PI3-quinasa/PKB (Engelbrecht *et al*, 2007).

Otras investigaciones han mostrado que las proantocianidinas producen en líneas celulares de carcinoma epidermoide humano regulación a la baja de la expresión de Bcl-2 y un aumento de la expresión de Bax y los niveles de caspasa-3, lo cual juega un importante papel en la apoptosis (Nandakumar *et al*, 2008).

Sin embargo tanto los ensayos con Anexina V, como los ensayos con Calceína AM y Etidio homodimero-1, no mostraron resultados indicativos de que la fracción 4 de Rongrein a las concentraciones probadas, causara apoptosis o necrosis en la línea celular CCRF-CEM, esto tanto en ausencia como en presencia de DOX.

Tampoco con los controles de DOX se obtuvieron resultados sugestivos de apoptosis o necrosis. A concentraciones similares a las empleadas para estos ensayos no se ha reportado que DOX pueda causar apoptosis.

Se ha reportado anteriormente la capacidad de DOX de causar apoptosis en la línea celular CCRF-CEM (Szwed *et al*, 2014), así como en otras líneas celulares, pero en concentraciones muy elevadas en comparación a la empleada en esta investigación, por ejemplo los estudios realizados por Lüpertz y colaboradores muestran que a concentraciones de 5 μ M DOX causa apoptosis en HCT-116 que corresponde a una línea celular de carcinoma de colon humano (Lüpertz *et al*, 2010).

Para esta investigación se empleó una concentración de DOX bastante baja debido a que se deseaba evaluar sinergismo con los compuestos polifenólicos a probar, como se muestra en los resultados de la estandarización del ensayo de SRB, la concentración de 0,0312 μ g/mL de DOX ocasiona un TGI de aproximadamente 50%, si se utilizaban concentraciones más altas se corría el riesgo de que el efecto de la DOX enmascarara la actividad de los extractos polifenólicos.

Además el trabajo de Lüpertz y colaboradores sugiere que la DOX es capaz de inducir muerte celular por apoptosis solamente en condiciones particulares de dosis y tratamiento (Lüpertz *et al*, 2010).

De mismo modo en que para este experimento la baja concentración de DOX impide que se refleje su acción apoptótica sobre la línea celular CCRF-CEM, que si se ha reportado a concentraciones más elevadas, el no encontrar resultados sugestivos de apoptosis por parte de la fracción cuatro de extracto polifenólico de Rongrein, se puede deber a las bajas concentraciones probadas. En futuras investigaciones es necesario evaluar por los ensayos de Anexina V y Calceína Etideo homodimero-1 a concentraciones superiores de la cuarta fracción del extracto polifenólico de la cascara de Rongrein.

Los experimentos de ciclo celular mostraron que las células tratadas con las dos concentraciones de la fracción 4 de Rongrein en conjunto con DOX sufrieron un arresto a las 48 horas en la fase G1.

Lo anterior coincide con otros estudios donde proantocianidinas derivadas de extractos polifenólicos de otras frutas, causan arresto celular en la fase G1, en líneas celulares cancerígenas, estos resultados han sido atribuidos a la inhibición en la actividad de la quinasa CDK (Nandakumar *et al*, 2008).

Los resultados de la de la cuantificación de la autofagia muestran un aumento en el Geom Mean de las células tratadas con la fracción cuatro del extracto polifenólico de Rongrein, con respecto al control de células, este aumento se dio en ausencia de DOX a las 24 y 48 horas, y posteriormente a las 72 y 96

horas de incubación se apreció un aumento en el Geom Mean del extracto polifenólico en combinación con DOX.

Al agregar el inhibidor de la autofagia 3-MA, se dio una disminución en el Geom Mean, pero el arresto en la fase G1 del ciclo celular fue mayor. Por lo tanto el aumento de la autofagia que presentan las células CCRF-CEM cuando se exponen a la fracción cuatro del extracto polifenólico de Rongrein, es sugestivo de la acción de la autofagia en defensa de las células contra el arresto celular que están sufriendo.

La inducción de la autofagia como respuesta a agentes contra el cáncer representa principalmente un mecanismo de supervivencia activado para contrarrestar los efectos letales del estrés metabólico endógeno y posiblemente también el tratamiento en las células tumorales (Karantza-Wadsworth *et al*, 2007). Por otro lado, cuando la autofagia procede a la finalización, la muerte celular sobreviene aumentando la posibilidad de que la autofagia excesiva inducida por fármacos potencialmente puede resultar en la eliminación de células tumorales (Chen & Karantza-Wadsworth, 2009).

Para futuras investigaciones es necesario ahondar en el efecto sobre la autofagia que producen las proantocianidinas derivadas de los extractos polifenólicos del Rongrein, para lo cual sería recomendable cuantificar el flujo autofágico que causa dicho compuesto en la línea celular CCRF-CEM.

Además en futuros estudios es importante analizar los extractos polifenólicos tanto en la línea celular CCRF-CEM, como en la CEM/ADR5000 la cual se trata de

una línea celular derivada de la CCRF-CEM, pero altamente resistente a quimioterapia por varios mecanismos incluyendo la sobreexpresión de los genes MDR-1 de multiresistencia a drogas (Efferth *et al.*, 2008). Dicho gen codifica para la glicoproteína-P que es una bomba de eflujo dependiente de ATP, cuya función es proteger a los organismos de sustancias tóxicas mediante el transporte activo de compuestos fuera de las células (Su *et al.*, 2009).

Conclusiones

Los extractos polifenólicos provenientes de las cascaras de *Nephelium lappaceum* de las variedades Criollo, Amarillo, R-162 y Rongrein, presentan una fuerte actividad antioxidante. Sin embargo se deben realizar más estudios para descartar la citotoxicidad de los mismos en líneas celulares humanas no malignas.

La cuarta fracción del extracto polifenólico de la cascara de *Nephelium lappaceum* de la variedad Rongrein, produce citotoxicidad en la línea celular CCRF-CEM, dicha acción se puede asociar al arresto en el ciclo celular en la fase G1 y al aumento de los niveles de autofagia causados por el extracto.

El extracto polifenólico conjugado no mostró un incremento de la actividad citotóxica del extracto polifenólico, pese a ello no se puede descartar dicha hipótesis, es necesario realizar más experimentos en modelos diferentes al empleado.

Para futuras investigaciones es recomendable utilizar además de la línea celular CCRF-CEM, la línea celular CCRF-ADR, que es altamente resistente a quimioterapia, de este modo se tendría un modelo de sensibilidad-resistencia. Además se debe profundizar en el análisis de la autofagia empleando ensayos de flujo autofágico.

Agradecimientos

Primero agradezco el apoyo y amor incondicional que durante mis estudios universitarios he recibido de mi familia y mi novio.

Especialmente deseo agradecer a el Dr Rodrigo Mora y el Dr Steve Quiros por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa, pero sobre todo por la motivación y el respaldo recibido a lo largo de estos años. Y al equipo de estudiantes que ambos profesores lideran, por su gran apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra Eugenia Corrales y Francisco Vega, miembros del Departamento de Virología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, por contribuir con el desarrollo de esta investigación y con mi formación profesional.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Costa Rica, principalmente a la Dra Elvira Salas por colaborar en las citometrías realizadas en este trabajo.

Al personal de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, que con su trabajo ayudaron a la extracción, purificación y al conjugado de los polifenoles empleados para esta investigación.

Referencias

Álvarez, V (2011). Evaluación del potencial nutracéutico de siete variedades de rambután, mamón chino, (*Nephelium lappaceum* L.), cultivadas en Costa Rica, como fuente potencial de antioxidantes. Licenciatura, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Anagnostopoulos, A., Vougas, K., Kolialexi, A., Mavrou, A., Fountoulakis, M. & Tsangaris, G. (2005). The Protein Profile of the Human Immature T-cell Line CCRF-CEM. *Cancer genomics & proteomics*. 2: 271-300.

Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A., Kim, S. *et al.* (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 483: 603-607.

Che-Ming J. H. & Liangfang Z. (2012). Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical Pharmacology*. 83(8): 1104-1111.

Chen, N. & Karantza-Wadsworth, V (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1793: 1516-1523.

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A. & Moses, H. L. (2008). TGF- β signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*. 6(10): 1521-1533.

Chia-Jui, W. & Gow-Chin, Y. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Review*. 38 (1): 76-87.

Chung, W. G., Miranda, C. L., Stevens, J. F. & Maier, C. S. (2009). Hop proanthocyanidins induce apoptosis, protein carbonylation, and cytoskeleton disorganization in human colorectal adenocarcinoma cells via reactive oxygen species. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 827-836.

- Dai, J. & Mumper R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15: 7313-7352.
- Díaz, R., García, L., Franco, J. & Vallejo, C. (2012). Caracterización bromatológica, fisicoquímica, microbiológica y reológica de la pulpa de borjón (*Borojoa patinoi* Cuatrecasas). *Ciencia y Tecnología*. 5(1): 17-24.
- Duncan, R. (2003). The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2: 347-360.
- Duncan, R., Vicent, M. J., Greco, F. & Nicholson, R. I. (2005). Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 12: 189-199.
- Efferth, T., Konkimalla, V., Wang, Y., Sauerbrey, A., Meinhardt, S., Zintl, F., Mattern, J. & Volm, M. (2008). Prediction of Broad Spectrum Resistance of Tumors towards Anticancer Drugs. *Clinical Cancer Research*. 14 (8): 2405-2412.
- Eid, S., El-Readi, M. & Wink, M. (2012). Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. *Phytomedicine*. 19: 1288-1297.
- El-Gebali, S., Bentz, S., Hediger, M. & Anderle, P. (2013). Solute carriers (SLCs) in cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 34: 719-734.
- Engelbrecht, A. M., Mattheyse, M., Ellis, B., Loos, B., Thomas, M. *et al.* (2007). Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Letters*. 258:144-153.
- Escobar, J. L., García, D.M., Zaldivar, D. & Katime, I. (2002). Hidrogeles, principales características en el diseño de Sistemas de liberación controlada. *Rev Iberoamer Polim*. 3: 1-25.
- Fernald, K. & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*. 1-14.
- Frank, N. Y., Schatton, T. & Frank, M. H. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*. 120: 41-50.

- Florence, A. (2007). Pharmaceutical nanotechnology: More than size, Ten topics for research. *International Journal of Pharmaceutics*. 339: 1-2.
- Geng, S., Cui, Y., Liu, Q., Cui, F. & Zhang, G. (2013). Spectroscopic and molecular modeling study on the interaction of ctDNA with 3'-deoxy-3'-azido doxorubicin. *Journal of Luminescence*. 144-149.
- Ghavami, G., Sardari, S. & Shokrgozar, M. (2011). Cheminformatics-based selection and synergism of herbal extracts with anticancer agents on drug resistance tumor cells—ACHN and A2780/CP cell lines. *Computers in Biology and Medicine*. 41: 665-674.
- Greaves, M. & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*. 481: 306-313.
- Hanahan, & D. Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144: 646-674.
- Harris, J. M. & Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2: 214-221.
- Hu, C. & Zhang, L. (2012). Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical Pharmacology*. 83: 1104-1111.
- Hunter, A. C., Elsom, J., Wibroe, P. P. & Moghimi, S. M. (2012). Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: a pathophysiological perspective. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 8: 5-20.
- Instituto Costarricense Contra el Cáncer (2013). Recuperado el 01 de Noviembre de 2013, de <http://www.iccc.sa.cr>
- Isabelle, M., Lee, B. L., Lim, M. T., Koh, W. P., Huang, D. & Ong, C. N. (2010). Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chemistry*. 123: 77-84.
- Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R. *et al.* (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*. 21: 1621-1635.

- Khonkarn, R., Okonogi, S., Ampasavate, C. & Anuchapreeda, S. (2010). Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2122-2129.
- Kratz, F. & Warnecke, A. (2012). Finding the optimal balance: Challenges of improving conventional cancer chemotherapy using suitable combinations with nano-sized drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 164: 221-235.
- Kuczynski, E., Sargen, D., Grothe, A. & Kerbel, R. (2013). Drug rechallenge and treatment beyond progression-implications for drug resistance. *Nat Rev Clin Oncol*. 10: 571-587.
- Kumar, A., Zhang, X. & Liang, X. J. (2013). Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system. *Biotechnology Advances*. 31: 593-606.
- Lotito, S. B. & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon. *Free Radic Biol Med* 41: 1727-1746.
- Lüpertz, R., Wätjen, W., Kahl, R. & Chovolou, Y. (2010). Dose- and time dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*. 271: 115-121.
- Madrigal, S., Porras, G., Esquivel, M., Sabaja, M., Vega, J., Tamborero, S. & Vicent, M. J. (2007). Conjugados poliméricos y su utilización como nanomedicinas anticancerígenas. *Rev Iberoamer Polim*. 8(5): 374-390
- Madrigal, S., Rodriguez, G., Krueger, G. & Reed, D. (2010). Evaluation of Costa Rican Traditional Fruits as Potential Sources of Natural Polyphenolic Antioxidants and Antimicrobials, *Inventi Journals*. Article ID- " Inventi:nc/39/10 ", 2010 [cited 2013 Nov 01] Available From <http://www.inventi.in/Article/nc/39/10.aspx>
- Mhawi, A. (2009). Interaction of doxorubicin with the subcellular structures of the sensitive and Bcl-xL-overexpressing MCF-7 cell line: Confocal and low-energy-loss transmission electron microscopy. *Micron*. 40: 702-712.

Ministerio de Salud. (2013). Recuperado el 01 de Noviembre de 2013, de http://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/sobre-ministerio-marco-orientador-sevri-ms/cat_view/121-vigilancia-de-la-salud/122-consulta-a-bases-de-datos/344-estadisticas/483-estadistica-de-cancer.

Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M. & Kawanishi, S. (2005). Mechanism of apoptosis induced by through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sciences*. 76(13): 1439-1453.

Nandakumar, V., Singh, T., Katiyar, S. K. (2008). Multi-targeted prevention and therapy of cáncer by proanthocyanidins. *Cancer Letters*. 269: 378–387.

Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S. & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*. 103: 839-846.

Palanisamy, U., Ming, C., Masilaman, T., Subramaniam, T., Teng, L. & Radhakrishnan, A. (2008). Rind of the rambutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of natural antioxidants. *Food Chemistry*. 109: 54-63.

Pang, B., Qiao, X., Janssen, L., Velds, A., Groothuis, T., Kerkhoven, R., Nieuwland, M., *et al.* (2013). Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nature communications*. 4(May), 1908. doi:10.1038/ncomms2921.

Papazisis, K. T., Geromichalos, G. D., Dimitriadis, K. A., Kortsaris, A. H. (1997). Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*. 208: 151-158.

Rebucci, N. & Michiels, C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*. 85: 1219-1226.

Sharkey, R. M. & Goldenberg, D. M. (2008). Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 1407-142.

Shoemaker, R. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*. 6: 813-823.

Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela, R. M. (2005) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.

Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 274 (2): 1-33.

Sporn, M. B. & Liby, K. T. (2005). Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2(10): 518-525.

Sporn, M. B. & Suh, N. (2002). Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer*. 537.

Stevenson, D. E. & Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals - Just antioxidants or much more. *Cell Mol Life Sci*. 64: 2900-2916.

Steward, W. P. & Brown, K. (2013). Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *British Journal of Cancer*. 109: 1-7.

Su, L., Cheng, C. Y. & Mruk, D. D. (2009). Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an integrated component of the mammalian blood–testis barrier. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41: 2578–2587.

Szwed, M., Laroche-Clary, A., Robert, J. & Jozwiak, Z. (2014). Induction of apoptosis by doxorubicin–transferrin conjugate compared to free doxorubicin in the human leukemia cell lines. *Chemico-Biological Interactions*. 220: 140–148.

Taddei, M., Giannon, E., Comito, G. & Chiarugi, P. (2013). Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out. *Cancer Letters*. 341: 80-96.

Thitilertdecha, N., Teerawutgulrag, A. & Rakariyatham, N. (2008). Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *Food Science and Technology*. 41: 2029-2035.

Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*. 4: 145-160.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 44–84.

Vilar, G., Tulla-Puche, J. & Albericio, F. (2012). Polymers and Drug Delivery Systems. *Current Drug Delivery.* 9 (4): 1-28.

Weber, W. A., Czernin, J., Phelps, M. E. & Herschman, H. R. (2008). Technology Insight: novel imaging of molecular targets is an emerging area crucial to the development of targeted drugs. *Nature Clinical Practice Oncology.* 5 (1): 44-54.

Wang, J., Tao, X., Zhang, Y., Wei, D. & Ren, Y. (2010). Reversion of multidrug resistance by tumor targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotides in hydroxypropyl-chitosan nanoparticles. *Biomaterials.* 31 (15): 4426-4433.

World Health Organization, mortality database http://www.who.int/healthinfo/statistics/mortality_rawdata/en/index.html (accessed on 07/05/2013).

Yu, S. & Kong A-NT. (2007). Targeting carcinogen metabolism by dietary cancer preventive compounds. *Curr Cancer Drug Targets.* 7: 416-424.