

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DE SAPONINAS Y SAPOGENINAS PROVENIENTES DE RESIDUOS DE *Chenopodium quinoa* *Willd.* SOBRE LINEAS CELULARES *SH-SY5H*, *HeLa*, *A549* y *HepG2*

Tesis presentada por las Bachilleres:

Carpio Paucar, Génesis Nicole

Palo Cárdenas, Andrea Isawelle

para optar el título profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

Mgter. Carpio Carpio, Jose Miguel

Arequipa - Perú

2020

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N° 20180000053076

N° Trámite en Fac. 429-2018
Fecha Recep. Fac. 08-04-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

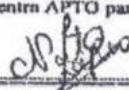
DE: **CARPIO PAUCAR, Génesis Nicole**
PALO CARDENAS, Andrea Isawelle

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"CITOTOXICIDAD DE SAPINONAS *Chenopodium quinoa* Willd. SOBRE CELULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS DE CANCER"

DICTAMINADORES: **Dra. Karin Vera López** 2) **Mgter. Natalia López Álvarez**

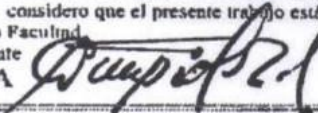
DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis presentado por la recurrente, cumplimos con informar que se ha revisado, formulado las observaciones y corregido, sugiriendo cambiar el título a: **"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA Y APOPTOTICA DE RESIDUOS DE *Chenopodium quinoa* Willd. SOBRE CELULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS DE CANCER"** luego de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMAS:  

FECHA **05/08/18**

ASESOR: **Mgter. José Carpio Carpio**

DICTAMEN ASESORIA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por los recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DE SAPONINAS Y SAPOGENINAS PROVENIENTES DE RESIDUOS DE *Chenopodium quinoa* Willd. SOBRE LINEAS CELULARES SH-SY5H, HeLa, A549 y HepG2"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

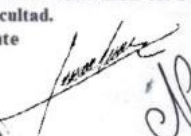
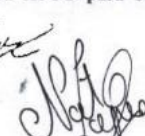
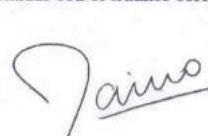
Atentamente
FIRMA 

FECHA **02/07/20**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. Jaime Cárdenas García**
- 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**
- 3) **Mgter. Natalia López Álvarez**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiéndose revisado el presente Borrador de Tesis presentado por la recurrente y realizadas las correcciones indicadas; consideramos que el trabajo de Investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite correspondiente, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente
FIRMA   

FECHA **3 Septiembre 2020**

JURADOS: PRESIDENTE **Dr. Jaime Cárdenas García**
VOCAL **Mag. Jaime Barreda del Carpio**
SECRETARIO **Mag. Natalia López Álvarez**

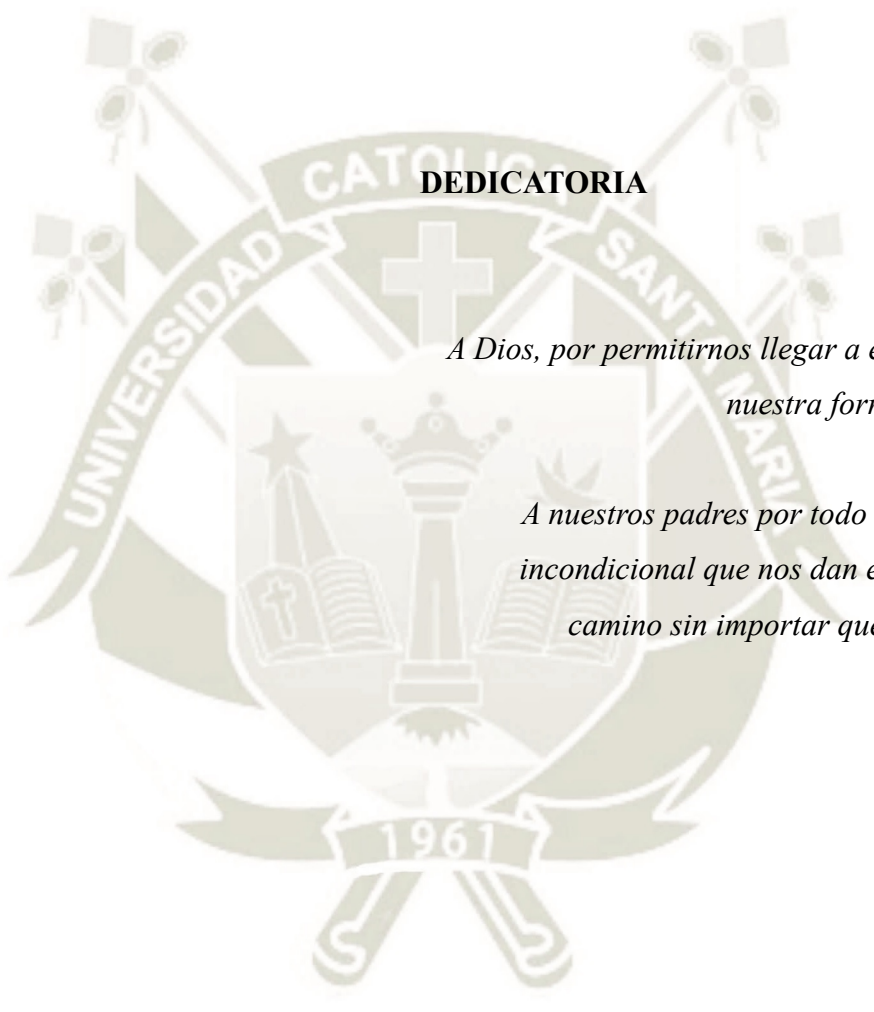
FECHA

HORA

LOCAL

FIRMA DEL DECANO

FECHA



DEDICATORIA

*A Dios, por permitirnos llegar a este momento de
nuestra formación personal*

*A nuestros padres por todo el amor y apoyo
incondicional que nos dan en cada paso del
camino sin importar que tan duro fuese.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Villanueva Salas por aceptar dirigirnos en este proyecto y brindarnos su apoyo, conocimientos y confianza, convirtiéndose en un soporte invaluable, no sólo en el desarrollo de esta tesis, sino también en nuestra formación como investigadoras.

A la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Science, en especial al Dr. Alejandro Pino Figueroa por la oportunidad que nos dio al acceder una pasantía en Boston, asimismo de estar pendiente para que nuestra estadía fuera cómoda. Al Mgter. Alejandro Rondón Ortiz por su amistad, paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su amplio conocimiento.

A nuestros familiares y amigos que creyeron profundamente en nosotras y nos alentaron en los momentos de angustia y desasosiego.

A Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María por haber hecho posible este trabajo de tesis mediante el financiamiento y la gestión del mismo

RESUMEN

Actualmente el cáncer es considerado la segunda causa de muerte a nivel mundial habiendo un aumento drástico en su incidencia, las estadísticas indican que hoy en día se diagnostican 10 millones de nuevos casos por año en todo el mundo, y al menos que se prevenga de forma efectiva, se estima que el número aumentará a 20 millones en 17 años.

Los tratamientos como; la cirugía, radiación, quimioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapias aplicadas por separado o en combinación se usan comúnmente para tratar esta enfermedad, sin embargo, estos pueden causar severos efectos secundarios; es por ello que se necesita encontrar nuevos métodos que sean eficaces y que los pacientes tengan una mejor tolerancia al tratamiento. Las recientes investigaciones están enfocadas en mejorar el uso potencial de compuestos naturales para el tratamiento de esta patología, se sabe por estudios que la quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) es una planta con altos valores proteicos que soluciona problemas como nutrición; sin embargo dentro de su composición contiene antinutrientes como los saponósidos, también conocidos como saponinas, que son glucósidos naturales compuestos por una sapogenina triterpenoide unida a un monosacárido, tanto la saponina como su aglicón poseen una amplia gama de propiedades biológicas, incluida la actividad citotóxica sobre la cual no se encuentra suficiente evidencia acerca de su efectividad clínica.

Nuestro objetivo fue determinar la actividad citotóxica producida por los extractos etanólicos de *Chenopodium quinoa Willd* (roja y blanca) y los estándares de Ácido Oleanólico, Ácido Ursólico y Hederagenina en células A549, SH-SY5Y, HepG2 y HeLa, así como conocer la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los mismos, además, se evaluó si la citotoxicidad inducida por las sapogeninas activa la vía apoptótica a través de Caspasa 3 (enzima efectora de la apoptosis), asimismo se valoró la presencia de la proteína PARP-1 (proteína reparadora de ADN) ejecutando *Western Blot*, la determinación cualitativa de las saponinas y sapogeninas se realizó mediante

cromatografía en capa fina (TLC) usando el revelador *Liebermann- Burchard*, por último se determinó cuantitativamente la presencia de saponinas en ambas quinuas, empleando cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Los resultados obtenidos de IC_{50} en Acido Ursólico fueron 21.9 μM para *A549*, 11.2 μM en *HeLa*, 104.2 μM en *HepG2* y 6.2 μM para *SH-SY5Y*, en el caso de Acido Oleanólico las concentraciones fueron de 98.9 μM para *A549*, 83.6 μM en *HeLa*, 408.3 μM en *HepG2* y 34.1 μM para *SH-SY5Y*, con Hederagenina se detectó 78.4 μM , 56.4 μM , 40.4 μM y 12.3 μM en *A549*, *HeLa*, *HepG2*, *SH-SY5Y* respectivamente. En relación ensayo realizado con Caspasa 3, se determinó que la línea celular *HeLa* mostró un mayor incremento de actividad caspasa con respecto a las otras líneas celulares, es por ello que se continuó con esta línea para señalar el incremento de las proteínas PARP escindidas frente a Acido Oleanólico, Acido Ursólico y Hederagenina, afirmando que dichas saponinas inducen mecanismo de muerte celular mediante apoptosis, se pudo afirmar que entre todos los tratamientos con los 3 diferentes estándares, la concentración que causó una mayor escisión de la proteína PARP fue 100 μM de Hederagenina, por lo que se puede decir que a esta concentración esta saponina puede causar muerte celular tipo 1 mediante la vía de las caspasas.

Asimismo, los resultados del HPLC mostraron que hay 2.805 mg/g de Acido Oleanólico y 4.715 mg/g de Hederagenina por cada gramo de polvo de Quinoa Blanca y 2.65 mg/g de Acido Oleanólico y 7.22 mg/g de Hederagenina por cada gramo de polvo de Quinoa Roja.

PALABRAS CLAVE: *Chenopodium quinoa Willd.*, Saponinas, Efecto citotóxico, Western Blot, Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía Líquida de Alta Performance

ABSTRACT

Cancer is currently considered the second cause of death worldwide, with a drastic increase in its incidence, statistics indicate that today 10 million new cases are diagnosed every year worldwide, and unless it is prevented effectively, it is estimated that the number will increase to 20 million in 17 years.

Treatments like; Surgery, radiation, chemotherapy, targeted therapies, and immunotherapies applied separately or in combination are commonly used to treat this disease, however these can cause severe side effects; that is why new methods need to be found that are effective and that patients have a better tolerance to treatment. Recent research is focused on improving the potential use of natural compounds for the treatment of this pathology. It is known from studies that quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) Is a plant with high protein values that solves problems such as nutrition; However, within its composition it contains antinutrients such as saponosides, also known as saponins, which are natural glycosides composed of a triterpenoid sapogenin bound to a monosaccharide, both saponin and its aglycone possess a wide range of biological properties, including cytotoxic activity on which is not enough evidence about its clinical effectiveness.

Our objective was to determine the cytotoxic activity produced by the ethanolic extracts of *Chenopodium quinoa Willd.* (red and white) and the standards of Oleanolic Acid, Ursolic Acid and Hederagenin in A549, SH-SY5Y, HepG2 and HeLa cells, as well as knowing the inhibitory concentration mean (IC₅₀) of the same, in addition, it was evaluated if the cytotoxicity induced by sapogenins activates the apoptotic pathway through Caspase 3 (apoptosis effector enzyme), the presence of PARP-1 protein (repair protein) was also assessed of DNA) by executing *Western Blot*, the qualitative determination of saponins and sapogenins was performed by thin layer chromatography (TLC) using the developer *Liebermann-Burchard*, finally, the

presence of saponins in both quinoas was quantitatively determined, using high-performance liquid chromatography. performance (HPLC).

The results obtained from IC_{50} in Ursolic Acid were 21.9 μM for *A549*, 11.2 μM in *HeLa*, 104.2 μM in *HepG2* and 6.2 μM for *SH-SY5Y*, in the case of Oleanolic Acid the concentrations were 98.9 μM for *A549*, 83.6 μM in *HeLa*, 408.3 μM in *HepG2* and 34.1 μM for *SH-SY5Y*, with Hederagenin 78.4 μM , 56.4 μM , 40.4 μM and 12.3 μM were detected in *A549*, *HeLa*, *HepG2*, *SH-SY5Y* respectively. In relation to the trial carried out with Caspase 3, it was determined that the *HeLa* cell line showed a greater increase in caspase activity with respect to the other cell lines, which is why this line was continued to indicate the increase in PARP proteins cleaved against Oleanolic Acid, Ursolic Acid and Hederagenin, affirming that these saponins induce a cell death mechanism by means of apoptosis, it could be affirmed that among all the treatments with the 3 different standards, the concentration that caused a greater cleavage of the PARP protein was 100 μM of Hederagenin Therefore, it can be said that at this concentration this saponin can cause type 1 cell death through the caspase pathway.

Likewise, the HPLC results showed that there are 2,805 mg/g of Oleanolic Acid and 4,715 mg/g of Hederagenin for each gram of White Quinoa powder and 2.65 mg/g of Oleanolic Acid and 7.22 mg/g of Hederagenin for each gram of Red Quinoa powder.

KEY WORDS: *Chenopodium quinoa Willd.*, Saponins, Cytotoxic effect, Western Blot, Thin Layer Chromatography, High Performance Liquid Chromatography

INDICE

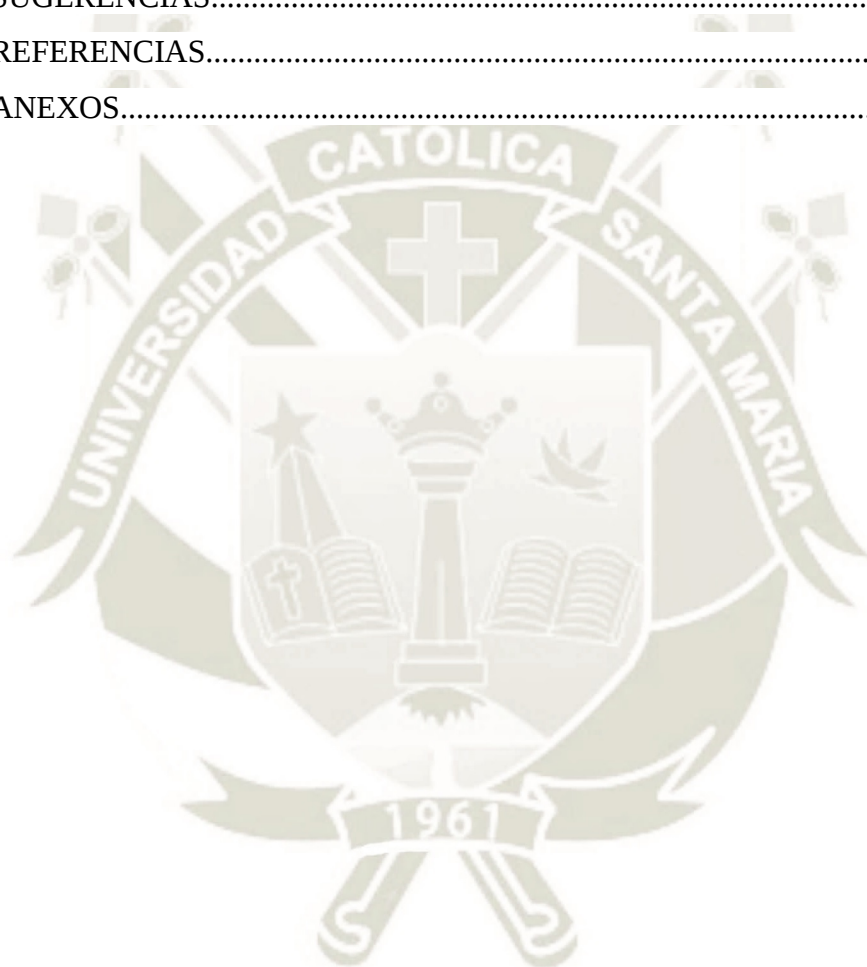
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
INDICE DE TABLAS.....	xvii
INTRODUCCION.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
HIPOTESIS.....	xxiv
OBJETIVOS.....	xxv
CAPITULO I.....	1
1. MARCO TEORICO.....	2
1.1. QUINUA.....	2
1.1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.....	2
1.1.2. CARACTERISTICAS.....	2
1.1.3. PROPIEDADES.....	4
1.1.4. COMPOSICION QUIMICA.....	4
1.2. SAPOGENINAS Y SAPONINAS.....	6
1.2.1. SAPOGENINAS.....	6
1.2.2. SAPONINAS.....	7
1.2.2.1. COMPOSICION QUIMICA.....	8
1.2.3. PROPIEDADES INDUSTRIALES.....	9
1.2.4. PROPIEDADES BIOLOGICAS.....	10
1.2.4.1. ACTIVIDAD CITOTOXICA.....	12
1.3. CULTIVOS CELULARES.....	12
1.3.1. LINEA CELULAR <i>HeLa</i>	12
1.3.2. LINEA CELULAR <i>SH-SY5Y</i>	13
1.3.3. LINEA CELULAR <i>HepG2</i>	13
1.3.4. LINEA CELULAR <i>A549</i>	14
1.4. CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR.....	14
1.4.1. AZUL DE TRIPAN.....	14

1.4.2. MTS.....	15
1.5. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR.....	16
1.5.1. APOPTOSIS.....	16
1.5.1.1. ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3.....	19
1.5.2. AUTOFAGIA.....	20
1.5.3. NECROSIS.....	22
1.5.3.1. NETosis.....	23
1.6. PROTEINA PARP-1.....	24
1.7. METODOS DE CUANTIFICACION.....	26
1.7.1. CROMATOGRAFIA.....	26
1.7.1.1. TLC.....	26
1.7.1.2. HPLC.....	28
CAPITULO II.....	30
2. MATERIALES Y METODOS.....	31
2.1. MATERIALES.....	31
2.1.1. MATERIAL BIOLOGICO.....	31
2.1.2. ESTANDARES.....	31
2.1.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	32
2.1.4. MATERIAL DE VIDRIO.....	32
2.1.5. MATERIAL DE LABORATORIO.....	32
2.1.6. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	34
2.1.7. REACTIVOS.....	35
2.1.8. OTROS.....	37
2.2. METODOS.....	38
2.2.1. OBTENCION DE SAPONINAS.....	38
2.2.1.1. RECOLECCION DE LOS RESIDUOS DEL ESPECIMEN VEGETAL.....	38
2.2.1.2. EXTRACCION POR PERCOLACION.....	38
2.2.1.3. CONCENTRACION.....	39
2.2.2. CULTIVO CELULAR.....	39
2.2.2.1. MEDIOS DE CULTIVO.....	39
2.2.2.2. PASAJE CELULAR (SUBCULTIVO CELULAR).....	40

2.2.2.3. CONTEO CELULAR.....	41
2.2.3. EFECTO CITOTOXICO.....	41
2.2.4. DETERMINACION DE LA IC50.....	43
2.2.5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3.....	43
2.2.5.1. LISIS CELULAR.....	44
2.2.5.2. CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN LISADOS CELULARES.....	45
2.2.5.3. KIT DE CASPASA 3.....	45
2.2.6. WESTERN BLOT.....	46
2.2.6.1. LISIS CELULAR.....	46
2.2.6.2. CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN LISADOS CELULARES.....	48
2.2.6.3. PROTEINAS ESPECIFICAS EN LISADOS CELULARES (WESTERN BLOT).....	48
2.2.6.4. DETERMINACION DE LOS BIOMARCADORES (<i>Cleaved</i> PARP-1, PARP-1 Y β -Actina) Y REVELADO DE PROTEINAS.....	49
2.2.7. PURIFICACION Y CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS Y SAPONINAS.....	50
2.2.7.1. OBTENCION DE SAPONINAS MEDIANTE EXTRACCION LIQUIDO – LIQUIDO.....	50
2.2.7.2. OBTENCION DE SAPOGENINAS (HIDROLISIS ACIDA).....	51
2.2.7.3. CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS MEDIANTE HPLC.....	52
2.2.7.3.1. PREPARACION DE PATRONES CROMATOGRAFICOS.....	52
2.2.7.3.2. PREPARACION DE FASE MOVIL Y DESGASIFICACION.....	52
2.2.7.3.3. PREPARACION DEL EQUIPO DE HPLC.....	52
2.2.7.3.4. CUANTIFICACION DE LAS MUESTRAS.....	53
2.3. ANALISIS ESTADISTICO.....	53
CAPITULO III.....	55
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	56
3.1. OBTENCION DE SAPONINAS.....	56
3.1.1. RECOLECCION DE LOS RESIDUOS DEL ESPECIMEN VEGETAL... ..	56
3.1.2. EXTRACCION POR PERCOLACION.....	57
3.1.3. CONCENTRACION.....	57

3.2. DETERMINACION DEL IC50 EN DIFERENTES LINEAS CELULARES.....	58
3.2.1. CULTIVO CELULAR.....	58
3.2.2 EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD DE DMSO EN LAS LINEAS CELULARES A549, <i>HeLa</i> , <i>HepG2</i> y <i>SH-SY5Y</i>	58
3.2.3. VIABILIDAD CELULAR DE LAS LINEAS <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> , <i>SH-SY5Y</i> y <i>A549</i> AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON EXTRACTOS ETANOLICOS (QUINUA ROJA Y QUINUA BLANCA).....	60
3.2.4. RESULTADOS DEL IC50 OBTENIDOS AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON ESTANDARES DE SAPOGENINA (ACIDO URSOLICO) EN LINEAS CELULARES <i>A549</i> , <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> , y <i>SH-SY5Y</i>	62
3.2.5. RESULTADOS DEL IC50 OBTENIDOS AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON ESTANDAR DE SAPOGENINA (ACIDO OLEANOLICO) EN LINEAS CELULARES <i>A549</i> , <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> , y <i>SH-SY5Y</i>	65
3.2.6. RESULTADOS DEL IC50 OBTENIDOS AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON ESTANDAR DE SAPOGENINAS (HEDERAGENINA) EN LINEAS CELULARES <i>A549</i> , <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> , y <i>SH-SY5Y</i>	68
3.3. ACTIVIDAD DE CASPASA 3.....	71
3.3.1. PROTEINAS TOTALES (LISADO CELULAR).....	71
3.3.2. ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LINEAS CELULARES <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> , <i>SH-SY5Y</i> y <i>A549</i> COMPARADO CON STS.....	72
3.3.3. DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LINEA CELULAR <i>Hela</i>	73
3.4. HIDROLISIS DE PARP-1 EN CELULAS <i>HeLa</i> (WESTERN BLOT).....	76
3.4.1. PROTEINAS TOTALES.....	76
3.4.2. DETECCION DE LA PROTEINA <i>Cleaved</i> PARP-1, PARP-1 Y β -Actina EN LINEA CELULAR <i>HeLa</i> TRATADA CON ESTANDARES DE SAPOGENINA POR 5 HORAS.....	78
3.4.3. DETECCION DE LA PROTEINA <i>Cleaved</i> PARP- 1, PARP-1, Y β -Actina EN LINEA CELULAR <i>HeLa</i> TRATADA CON ESTANDARES DE SAPOGENINA POR 24 HORAS.....	82

3.5. PURIFICACION Y CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS Y SAPONINAS.....	85
3.5.1. OBTENCION DE SAPONINAS.....	85
3.5.2. OBTENCION DE SAPOGENINAS.....	87
3.5.3. CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS MEDIANTE HPLC.....	90
CONCLUSIONES.....	97
SUGERENCIAS.....	98
REFERENCIAS.....	99
ANEXOS.....	111



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Cultivo de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.....	3
Figura 1.2. Usos del grano de la quinua.....	5
Figura 1.3. Aglicones de saponinas triterpénicas de <i>Chenopodium quinoa</i> reportadas.....	7
Figura 1.4. Estructura general de una saponina, se indica el enlace glucosídico entre la aglicona y un glucósido.....	8
Figura 1.5. Vía intrínseca de la apoptosis.....	17
Figura 1.6. Vía extrínseca de la apoptosis.....	19
Figura 2.1. Vista exterior de la empresa industrial JIWRA.....	38
Figura 2.2. Esquema del percolador.....	39
Figura 2.3. Distribución del tratamiento de <i>Western Blot</i> en platos de 6 pocillos.....	47
Figura 2.4. Armado de “sándwich” en <i>Western Blot</i>	49
Figura 3.1. Polvillo fino de la cáscara de Quinua Roja y Quinua Blanca.....	57
Figura 3.2. Extracto etanólico obtenido por percolación.....	57
Figura 3.3. Porcentajes de viabilidad celular de <i>A549</i> (A), <i>HeLa</i> (B), <i>HepG2</i> (C), <i>SH-SY5Y</i> (D) vs Concentración % de DMSO (0 %-10%).....	60
Figura 3.4. Porcentajes de viabilidad celular de <i>A549</i> (A), <i>HeLa</i> (B), <i>HepG2</i> (C), <i>SH-SY5Y</i> (D) vs Concentración ppm de extracto etanólico de Quinua Blanca (0 ppm–100 ppm).....	61
Figura 3.5. Porcentajes de viabilidad celular de <i>A549</i> (A), <i>HeLa</i> (B), <i>HepG2</i> (C), <i>SH-SY5Y</i> (D) vs Concentración ppm de extracto etanólico de Quinua Roja (0 ppm–100 ppm).....	62
Figura 3.6. Porcentajes de viabilidad celular de <i>A549</i> (A), <i>HeLa</i> (B), <i>HepG2</i> (C), <i>SH-SY5Y</i> (D) vs Concentración μ M de Acido Ursólico (0 μ M-300 μ M).....	64
Figura 3.7. Porcentajes de viabilidad celular y Obtención de IC ₅₀ de Acido Ursólico sobre las líneas celulares <i>A549</i> , <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> y <i>SH-SY5Y</i> a escala logarítmica.....	65
Figura 3.8. Porcentajes de viabilidad celular de <i>A549</i> (A), <i>HeLa</i> (B), <i>HepG2</i> (C), <i>SH-SY5Y</i> (D) vs Concentración μ M de Acido Oleanólico (0 μ M-300 μ M).....	66

Figura 3.9. Porcentajes de viabilidad celular y Obtención de IC ₅₀ de Acido Oleanólico sobre las líneas celulares <i>A549</i> , <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> y <i>SH-SY5Y</i> a escala logarítmica.....	67
Figura 3.10. Porcentajes de viabilidad celular de <i>A549</i> (A), <i>HeLa</i> (B), <i>HepG2</i> (C), <i>SH-SY5Y</i> (D) vs Concentración μ M de Hederagenina (0 μ M-300 μ M).....	69
Figura 3.11. Porcentajes de viabilidad celular y Obtención de IC ₅₀ de Hederagenina sobre las líneas celulares <i>A549</i> , <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> y <i>SH-SY5Y</i> a escala logarítmica.....	70
Figura 3.12. Curva de calibración para determinar proteínas totales en lisados celulares realizando ensayo Caspasa 3.....	72
Figura 3.13. Actividad de la Caspasa 3 presente en las líneas celulares <i>SH-SY5Y</i> , <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> y <i>A549</i> utilizando el IC ₅₀ de sapogeninas.....	73
Figura 3.14. Actividad de Caspasa 3 presente en <i>Hela</i> utilizando diferentes concentraciones de sapogeninas.....	74
Figura 3.15. Actividad de Caspasa 3 en <i>HeLa</i> comparando control negativo (células sin tratar) frente a STS (A), Acido Oleanólico (B), Acido Ursólico (C) y Hederagenina (D).....	76
Figura 3.16. Curva de calibración para determinar proteínas totales a usarse en <i>Western Blot</i>	77
Figura 3.17. Análisis cualitativo de proteínas con Rojo Ponceau.....	80
Figura 3.18. Bandas de <i>Cleaved</i> PARP-1, PARP-1 Y β -Actina obtenidas a partir de <i>Western blot</i> en células <i>HeLa</i> , donde A es Acido Ursólico (100 μ M), B es Acido Oleanólico (100 μ M), C es Acido Oleanólico (300 μ M), D es Hederagenina (50 μ M), E es Hederagenina (100 μ M) y F es Hederagenina (300 μ M) en tratamiento de 5 horas.....	80
Figura 3.19. Efecto de las Sapogeninas Acido Ursólico, Acido Oleanólico y Hederagenina en la hidrólisis de PARP-1 sobre células <i>HeLa</i> por 5 horas, a través del método <i>Western Blot</i>	82
Figura 3.20. Bandas de <i>Cleaved</i> PARP-1, PARP-1 Y β -Actina obtenidas a partir de <i>Western blot</i> en células <i>HeLa</i> , donde A es Acido Ursólico (100 μ M), B es Acido Oleanólico (100 μ M), C es Acido Oleanólico (300 μ M) y D es Hederagenina (50 μ M) en tratamiento de 24 horas.....	83

Figura 3.21. Efecto de las Sapogeninas Acido Ursólico, Acido Oleanólico y Hederagenina en la hidrólisis de PARP-1 sobre células <i>HeLa</i> por 24 horas, a través del método <i>Western Blot</i>	84
Figura 3.22. Saponinas extraídas provenientes de Quinoa Blanca y Quinoa Roja a partir del método de extracción líquido-líquido.....	85
Figura 3.23. Placas de cromatografía en capa fina (TLC) comparando las muestras de saponina provenientes de Quinoa Blanca y Quinoa Roja, al ser reveladas con reactivo <i>Liebermann – Burchard</i> (A), visualizadas bajo luz ultravioleta a 254 nm (B) y bajo luz ultravioleta a 366 nm (C).....	87
Figura 3.24. Sapogeninas extraídas provenientes de Quinoa Blanca y Quinoa Roja a partir del método de la hidrólisis ácida.....	88
Figura 3.25. Placa de cromatografía en capa fina (TLC) comparando los estándares de (A) Acido Ursólico, (B) Hederagenina, (C) Acido Oleanólico vs las muestras de sapogenina provenientes de (D) Quinoa Roja y (E) Quinoa Blanca, en el respectivo orden, luego de aplicar el revelador <i>Liebermann – Burchard</i>	89
Figura 3.26. Curva de calibración para evaluar las concentraciones de Sapogeninas Hederagenina (A) y Acido Oleanólico (B), presentes en la Quinoa Blanca y Quinoa Roja.....	95
Figura 3.27. Comparación entre las concentraciones (ppm) de Acido Oleanólico y Hederagenina en Quinoa Blanca y Quinoa Roja.....	96

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Concentraciones usadas de los estándares para el ensayo de Caspasa 3 en cada una de las líneas celulares.....	42
Tabla 3.1. Solubilidad en DMSO de los estándares de sapogeninas y de los concentrados de Quinoa Blanca y Quinoa Roja.....	59
Tabla 3.2. Resumen de los valores crudos de IC ₅₀ obtenidos luego del análisis con el programa <i>GraphPad Prism 6</i>	70
Tabla 3.3. Concentraciones derivadas del IC ₅₀ , usadas para el ensayo de Caspasa 3 en cada una de las líneas celulares.....	70
Tabla 3.4. Absorbancias de diversas concentraciones del estándar de BCA.....	71
Tabla 3.5. Absorbancias de diversas concentraciones del estándar de BCA.....	76
Tabla 3.6. Volúmenes de muestra y SDS-4x obtenidos de las concentraciones para realizar ensayo de <i>Western Blot</i>	78
Tabla 3.7. Concentraciones de los estándares.....	90
Tabla 3.8. Condiciones del método usado en HPLC.....	91
Tabla 3.9. Resumen de las tres repeticiones de tiempo de retención y área de Hederagenina.....	93
Tabla 3.10. Resumen de las tres repeticiones de tiempo de retención y área de Acido Oleanólico.....	93
Tabla 3.11. Resumen de las tres repeticiones de área y las concentraciones derivadas de sapogeninas (ppm) en Quinoa Blanca y Quinoa Roja.....	94
Tabla 3.12. Resumen de las tres repeticiones de área y las concentraciones derivadas de sapogeninas (ppm) en Quinoa Roja.....	94
Tabla anexa 1. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de % DMSO sobre las células A549 a través del método MTS.....	113
Tabla anexa 2. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de % DMSO sobre las células HeLa a través del método MTS.....	113
Tabla anexa 3. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de % DMSO sobre las células HepG2 a través del método MTS.....	113

Tabla anexa 4. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de % DMSO sobre las células <i>SH-SY5Y</i> a través del método MTS.....	114
Tabla anexa 5. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Blanca sobre las células <i>A549</i> a través del método MTS.....	114
Tabla anexa 6. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Blanca sobre las células <i>HeLa</i> a través del método MTS.....	115
Tabla anexa 7. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Blanca sobre las células <i>HepG2</i> a través del método MTS.....	115
Tabla anexa 8. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Blanca sobre las células <i>SH-SY5Y</i> a través del método MTS.....	116
Tabla anexa 9. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Roja sobre las células <i>A549</i> a través del método MTS.....	116
Tabla anexa 10. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Roja sobre las células <i>HeLa</i> a través del método MTS.....	117
Tabla anexa 11. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Roja sobre las células <i>HepG2</i> a través del método MTS.....	118
Tabla anexa 12. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Roja sobre las células <i>SH-SY5Y</i> a través del método MTS.....	118
Tabla anexa 13. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Ursólico sobre las células <i>A549</i> a través del método MTS.....	119
Tabla anexa 14. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Ursólico sobre las células <i>HeLa</i> a través del método MTS.....	119
Tabla anexa 15. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Ursólico sobre las células <i>HepG2</i> a través del método MTS.....	120
Tabla anexa 16. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Ursólico sobre las células <i>SH-SY5Y</i> a través del método MTS.....	120
Tabla anexa 17. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Oleanólico sobre las células <i>A549</i> a través del método MTS.....	121
Tabla anexa 18. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Oleanólico sobre las células <i>HeLa</i> a través del método MTS.....	121
Tabla anexa 19. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Oleanólico sobre las células <i>HepG2</i> a través del método MTS.....	122

Tabla anexa 20. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Oleanólico sobre las células <i>SH-SY5Y</i> a través del método MTS.....	122
Tabla anexa 21. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Hederagenina sobre las células <i>A549</i> a través del método MTS.....	123
Tabla anexa 22. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Hederagenina sobre las células <i>HeLa</i> a través del método MTS.....	123
Tabla anexa 23. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Hederagenina sobre las células <i>HepG2</i> a través del método MTS.....	123
Tabla anexa 24. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Hederagenina sobre las células <i>SH-SY5Y</i> a través del método MTS.....	124
Tabla anexa 25. Data cruda de absorbancias obtenidas al realizar ensayo Caspasa 3 en las líneas celulares <i>SH-SY5Y</i> , <i>Hela</i> , <i>HepG2</i> y <i>A549</i>	124
Tabla anexa 26. Data cruda de absorbancias obtenidas al realizar ensayo Caspasa 3 en la línea celular <i>Hela</i> con diversas concentraciones de Acido Oleanólico, Acido Ursólico y Hederagenina.....	125
Tabla anexa 27. Data cruda de absorbancias obtenidas al realizar ensayo BCA en la línea celular <i>Hela</i> para determinar proteínas totales obtenidas a aplicar en ensayo Caspasa 3.....	126
Tabla anexa 28. Concentraciones reales obtenidas mediante análisis en <i>Microsoft Excel 2013</i> y μL de muestra y buffer de lisis a tomar para realizar ensayo de Caspasa 3 en línea celular <i>HeLa</i>	127
Tabla anexa 29. Data cruda de absorbancias obtenidas al realizar ensayo BCA en la línea celular <i>Hela</i> para determinar proteínas totales obtenidas a aplicar en ensayo <i>Western Blot</i>	128
Tabla anexa 30. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Hederagenina.....	129
Tabla anexa 31. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Acido Oleanólico.....	129
Tabla anexa 32. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Hederagenina en Quinoa Blanca.....	130

Tabla anexa 33. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Acido Oleanólico en Quinua Blanca.....	130
Tabla anexa 34. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Hederagenina en Quinua Roja.....	130
Tabla anexa 35. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Acido Oleanólico en Quinua Roja.....	131



INTRODUCCION

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento incontrolado y la propagación de células anormales, aunque las causas del cáncer no se entienden completamente, se conoce que numerosos factores aumentan la aparición de la enfermedad, incluidos muchos que son modificables (por ejemplo, el consumo de tabaco y el exceso de peso corporal) y aquellos que no lo son (por ejemplo, mutaciones genéticas hereditarias y afecciones inmunes), estos pueden actuar simultáneamente o en secuencia para comenzar y/o promover dicha enfermedad, las tasas de mortalidad e incidencia varía según sea el tipo de cáncer⁽¹⁾.

Existen terapias y agentes quimioterapéuticos para los diagnosticados con esta enfermedad, pero muchos de estas alternativas provocan a los pacientes náuseas, vómitos, alopecia y fatiga, la gravedad de estos efectos secundarios influye en la capacidad para completar tareas domésticas, disfrutar las comidas, incluso pasar tiempo con su familia y amigos⁽²⁾. Dado que las modalidades convencionales para el tratamiento del cáncer son invasivas y costosas, se han venido generando nuevas alternativas, de modo que se ha demostrado interés en investigaciones con plantas medicinales como posibles fuentes para la obtención de sustancias que posean alguna actividad anticancerígena.

En nuestro país existe diversidad de plantas, una de las cuales que cuenta con mayor cultivo y presenta grandes beneficios para la salud es la quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*), grano que posee grandes características donde destaca su calidad nutritiva, representada por su composición de aminoácidos esenciales tanto en calidad como en cantidad, constituyéndose en un alimento funcional e ideal para el organismo⁽³⁾, para el consumo es necesario quitar la cáscara que la rodea la cual contiene saponinas, sustancia antinutriente, siendo esta la que confiere un sabor amargo, debe ser eliminada mediante procesos generando gran impacto ambiental debido a que la cáscara producida no es reutilizada y por lo tanto es desechada en ríos. La comunidad científica ha venido realizando ciertos estudios, donde afirman que las saponinas producen

apoptosis a células cancerígenas, de esta forma proponemos evaluar el efecto citotóxico de saponinas y sapogeninas provenientes de *Chenopodium quinoa Willd.* contra diversas líneas celulares cancerosas, con la finalidad de adquirir nuevos conocimientos y así proporcionar información para desarrollar nuevas terapias contra el cáncer empleando estas sustancias.



LISTA DE ABREVIATURAS

AO: Acido Oleanólico

AU: Acido Ursólico

APAF1: Factor 1 de la Proteasa Activadora de Apoptosis

BCA: Acido Bicinconínico

BSA: Albumina de suero bovino

CAD: DNasa activada por caspasa

CARD: Dominio de Reclutamiento de Caspasa

DISC: Complejo de Señalización Inductor de Muerte

DMSO: Dimetilsulfóxido

FADD: Dominio de Muerte Asociado a Fas

FBS: Suero bovino fetal

HED: Hederagenina

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

IAP: Inhibidores de las Proteínas de Apoptosis

IC₅₀: Concentración inhibitoria media

M-PER: Reactivo de extracción de proteínas de mamíferos

MTS:3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

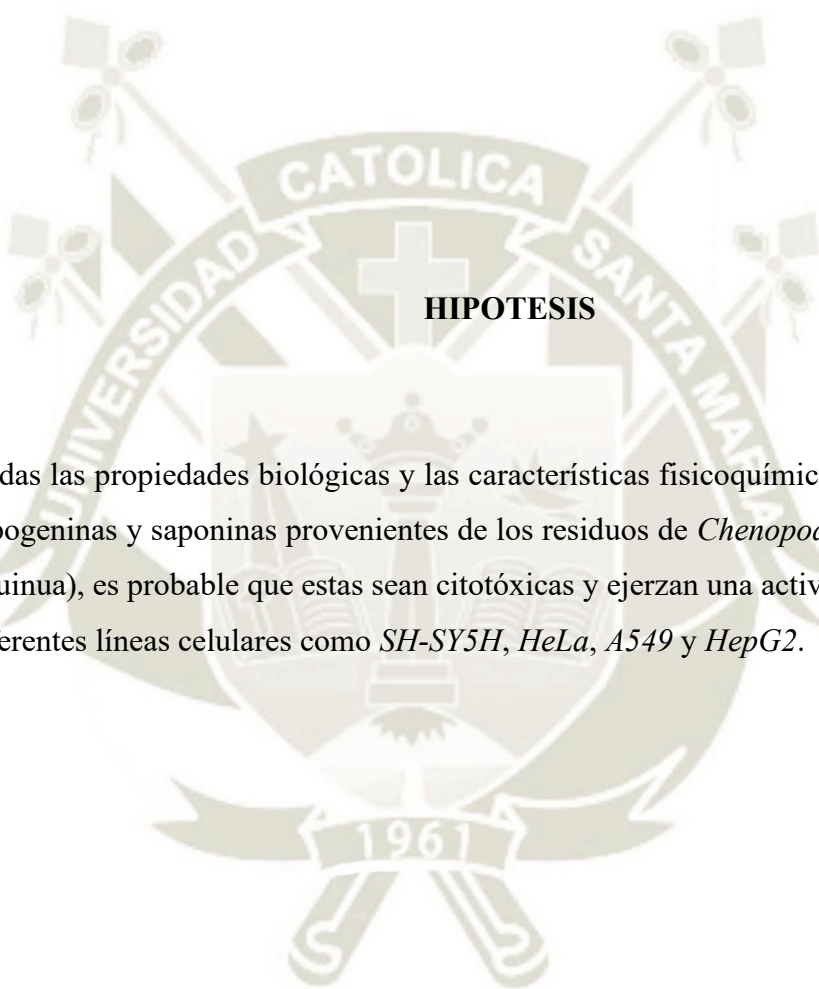
PARP-1: Poli ADP ribosapolimerasa, isoforma 1

PBS: Buffer fosfato salino

STS: Staurosporina

TBS-T: Buffer Tris salino – Tween

TLC: Cromatografía en Capa Fina



HIPOTESIS

Dadas las propiedades biológicas y las características fisicoquímicas presentes en las sapogeninas y saponinas provenientes de los residuos de *Chenopodium quinoa Willd.* (Quinoa), es probable que estas sean citotóxicas y ejerzan una actividad apoptótica en diferentes líneas celulares como *SH-SY5H*, *HeLa*, *A549* y *HepG2*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial citotóxico de saponinas y sapogeninas provenientes de residuos de *Chenopodium quinoa Willd.* (Quinoa) sobre las líneas celulares *SH-SY5H*, *HeLa*, *A549* y *HepG2*.

Objetivos específicos

1. Extraer, purificar e hidrolizar saponinas de los residuos de *Chenopodium quinoa Willd.*
2. Evaluar la citotoxicidad y determinar la concentración necesaria de los estándares de saponinas y sapogeninas para producir la muerte de la mitad de una población de células (IC₅₀) de *SH-SY5H*, *HeLa*, *A549* y *HepG2*.
3. Evaluar si las saponinas y sapogeninas de residuos de *Chenopodium quinoa Willd.* inducen apoptosis sobre las líneas celulares *SH-SY5H*, *HeLa*, *A549* y *HepG2*.
4. Caracterizar y cuantificar sapogeninas por TLC y HPLC.



CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. QUINUA (*Chenopodium quinoa Willd.*)

1.1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS

Chenopodium quinoa Willd., es un grano originario de los Andes que fue crucial en la dieta de los Incas⁽⁴⁾ y ocupó un lugar importante en el imperio al lado del maíz⁽⁵⁾. Debido al alto contenido de proteínas y aminoácidos esenciales que posee, los pobladores la consumían como una planta sagrada. Mientras que en los idiomas locales se usan diferentes nombres, como *supha*, *suba*, *jupha* y *dahue* para referirse a la quinua, actualmente es comúnmente conocida como quinua o quinua⁽⁶⁾.

Los restos arqueológicos de quinua más antiguos datan de 5000 a.C⁽⁶⁾, asimismo, la historia de su consumo humano se remonta hace 5000 años atrás⁽⁷⁾. Este pseudocereal fue domesticado principalmente por personas que vivían en el territorio andino, desde la parte sur de Colombia pasando por el Ecuador, Perú, Bolivia y la parte norte de Chile⁽⁸⁾. Su marginación y reemplazo se inició con la conquista y con la introducción de cereales como la cebada y el trigo, sin embargo la costumbre de consumir este grano jamás se perdió entre los pobladores andinos, sino que pasaba desapercibida entre los pobladores urbanos de la región por razones, sobre todo, económicas y sociales⁽³⁾.

La quinua es tradicionalmente cultivada en Bolivia y Perú en donde se destacan zonas como Cajamarca, el Callejón de Huayllas, Valle del Mantaro, Andahuayllas, Cusco y Puno (Altiplano)⁽³⁾, seguida de Ecuador, Argentina, Chile y Colombia, sin embargo en los últimos años, se ha introducido en Europa, América del Norte y África.

1.1.2. CARACTERISTICAS

Chenopodium quinoa Willd., oriunda de Latinoamérica, es una planta herbácea anual que se autofertiliza y puede alcanzar una altura desde 0,2 a 3 metros (Figura 1.1), cuenta con raíces profundas y penetrantes⁽⁵⁾, la forma del tallo principal depende del ecotipo de raza y de las condiciones de cultivo, generalmente es de sección circular en

la zona cercana a la raíz y va transformándose en angular a la altura de las ramas y hojas. La quinua cuenta con hojas polimórficas y su color varía según su naturaleza y la importancia de los pigmentos, la inflorescencia es racimosa, sin embargo, se denomina panoja por tener un eje principal más desarrollado, asimismo las flores de esta planta son llamativas, pequeñas y densas que permanecen abiertas por un periodo de 7 días⁽³⁾. El fruto es seco y contiene un grano que varía de color de blanco a gris y negro, o amarillo y rojo, tiene un largo de 2,5 mm a 1,0 mm de diámetro dependiendo de la raza, siendo esta la parte comestibles de la quinua⁽⁵⁾.

Debido a que la planta posee una amplia diversidad genética exhibe un alto nivel de resistencia a varios efectos adversos que otras plantas no podrían afrontar⁽⁷⁾, puede crecer sin problema alguno en diferentes altitudes desde el nivel del mar hasta la altura de la meseta boliviana del Altiplano (altitud de 3800 m s.n.m.), también puede adaptarse a diferentes condiciones climáticas y desarrollarse en tierras heladas (temperaturas promedio de 12 °C) y áridas (350 mm de precipitación promedio)⁽³⁾, muestra tolerancia a la salinidad, enfermedades, plagas, heladas y tiene la capacidad de crecer en suelos marginales⁽⁵⁾.



Figura 1.1. Cultivo de *Chenopodium quinoa* Willd.⁽⁹⁾

1.1.3. PROPIEDADES

La quinua pertenece al género *Chenopodium spp.* que comprende alrededor de 250 especies⁽⁵⁾, es una rica fuente de flavonoides, ácidos fenólicos y terpenoides⁽¹⁰⁾, fue cultivada durante siglos como alimento para humanos y animales, esto debido a su alto contenido proteínico (~14%) y su gran digestibilidad (92%), la calidad nutricional del grano es importante por su contenido y calidad proteica, siendo rico en los aminoácidos lisina y azufrados, la excepcional riqueza de estos mismos que tiene la quinua le confiere propiedades terapéuticas muy interesantes, como mejorar la función inmunitaria al colaborar en la formación de anticuerpos, favorecer la función gástrica, colaborar en la reparación celular, participar en el metabolismo de los ácidos grasos, ayudar al transporte y absorción del calcio, entre otras⁽³⁾. La parte más importante de la planta son las semillas, ya que al consumirlas se obtienen una alta cantidad de carbohidratos, proteínas, aminoácidos esenciales, minerales, antioxidantes que protegen contra una variedad de enfermedades inflamatorias, cáncer, alergias, e incluso es capaz de reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares⁽¹¹⁾, asimismo, ya que es un producto rico en fibra actúa como depurador, eliminando toxinas que puedan dañar el organismo y debido a que absorbe agua esta puede mantenerse más tiempo en el estómago provocando una sensación de saciedad. Gracias a su alto valor nutricional la quinua es considerada como el único alimento del reino vegetal que provee todos los aminoácidos esenciales, que se encuentran extremadamente cerca de los estándares de nutrición humana establecidos por la FAO, además la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación ha clasificado a este cereal como uno de los cultivos que podrían contribuir a la seguridad alimentaria en el Siglo XXI⁽³⁾, en la Figura 1.2 se pueden observar algunos de los usos de la saponina.

1.1.4. COMPOSICION QUIMICA

El grano de la quinua contiene 18% de proteína, cuenta con un alto y equilibrado porcentaje de lisina y otros aminoácidos esenciales, es una rica fuente de fibra y minerales, como calcio, potasio, magnesio, fósforo, zinc, manganeso, hierro y pequeñas cantidades de cobre y litio^(3,7,12,13), es libre de gluten, rico en antioxidantes

como los polifenoles⁽⁷⁾, tiene un importante contenido de fitoestrógenos tales como daidzeína y cenisteína⁽³⁾, asimismo el grano de quinua contiene vitamina A, B2, C, E, tiamina, ácido fólico, riboflavina y caroteno^(3,5). Los ácidos grasos presentes en la quinua son omega 6, omega 9, omega 3, el ácido palmítico y en pequeñas proporciones ácido esteárico y eicosapentaenoico, en cuanto a los carbohidratos, la quinua contiene entre un 58 y 68% de almidón y un 5% de azúcares⁽³⁾.

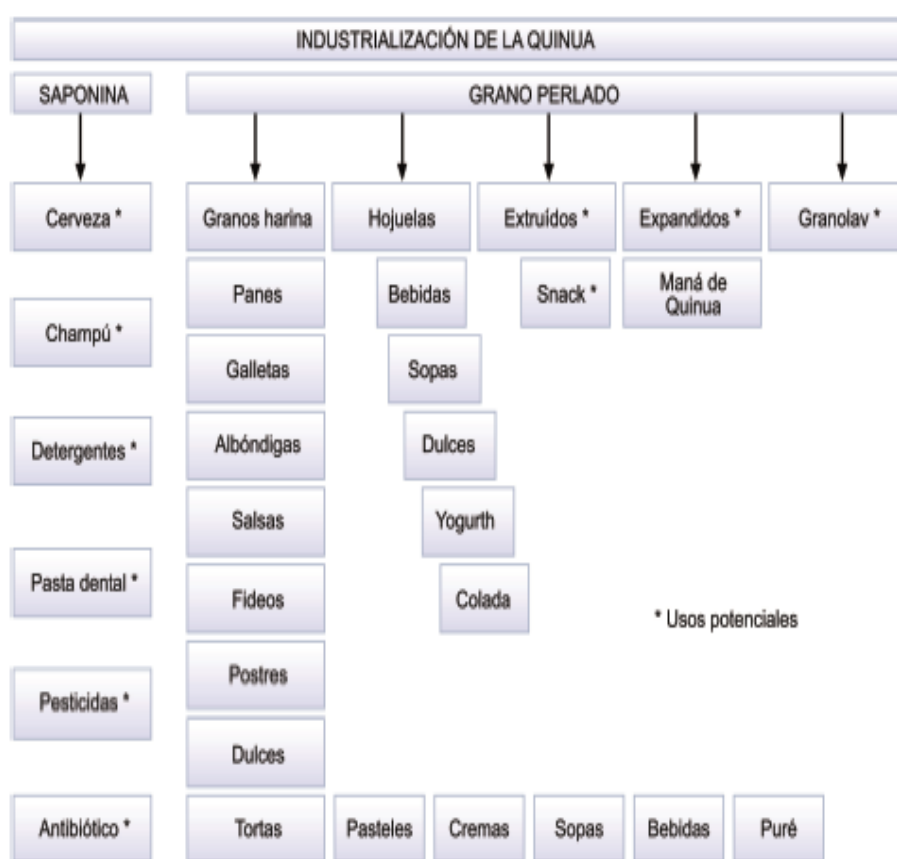


Figura 1.2. Usos del grano de la quinua⁽³⁾.

Por otro lado, estudios demuestran que hay compuestos en la quinua cuya presencia disminuye su valor nutricional, tales como los fitatos, taninos, inhibidores de tripsina y saponinas⁽⁸⁾. Entre estos, son las saponinas, ubicadas en su mayoría en el pericarpio de las semillas, las que se encuentran en niveles significativos y son utilizados por la planta para protegerse contra aves, insectos y hongos debido a que son un compuesto intensamente amargo y potencialmente tóxico si se ingiere en grandes cantidades⁽¹⁴⁾. A la fecha se sabe que la quinua contiene al menos 30 diferentes tipos de saponinas,

derivados de la Hederagenina, Acido Oleanólico, Acido Serjánico y Acido Fitolacagénico^(4,8,14).

1.2. SAPOGENINAS Y SAPONINAS

1.2.1. SAPOGENINAS

Las sapogeninas son agliconas que forman parte de las saponinas (Figura 1.3), en la quinua las sapogeninas poseen un esqueleto de cinco anillos y se biosintetizan a partir de β -amirina⁽¹⁵⁾, la más común encontrada en las semillas es Acido Oleanólico, por otro lado, Hederagenina es la principal aglicona encontrada en las hojas⁽¹⁶⁾, algunas sapogeninas son:

Acido Oleanólico (AO): Presente principalmente en el salvado de quinua, esta sapogenina posee múltiples propiedades biológicas ya que puede actuar como antimicrobiano, anti-VIH, antiinflamatorios, antioxidante, antifertilidad, antitumoral o anticancerígeno, entre otros⁽¹⁵⁾.

Hederagenina (HED): En una reciente investigación se indicó que esta sapogenina podría ser un candidato terapéutico prometedor para la prevención y tratamiento del cáncer de colon. Presenta una fuerte actividad hemolítica, molusquicida, citotóxica, antifúngica, antiinflamatoria entre otros⁽¹⁵⁾.

Acido Ursólico (AU): Es un triterpenoide pentacíclico que posee 30 átomos de carbono, presenta actividades antiinflamatorias, antiulcerosas, hepatoprotectoras, antidiabéticas, fungicidas y antiparasitarias⁽¹⁷⁾.

Acido Serjánico: Es una sapogenina presente en la quinua, se han identificado aproximadamente 5 análogos de este ácido en la planta⁽¹⁵⁾.

Acido Fitolacagénico: Mediante procesos enzimáticos oxidativos, el Acido Fitolacagénico puede formarse a partir del Acido Serjánico, siendo una de las

principales sapogeninas presentes en la quinua, se han encontrado alrededor de 10 análogos en esta planta⁽¹⁵⁾.

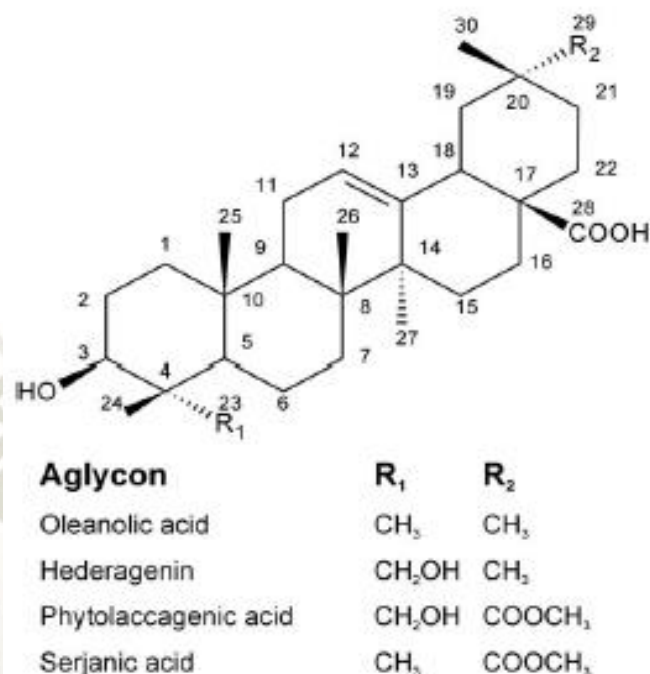


Figura 1.3. Aglicones de saponinas triterpénicas de *Chenopodium quinoa* reportadas⁽¹⁸⁾.

1.2.2. SAPONINAS

Las saponinas están ampliamente distribuidas en casi 100 familias del reino vegetal, sin embargo también se encuentran presentes en algunos animales marinos inferiores como el pez estrella o el pepino de mar⁽¹⁹⁾, están compuestas por una estructura con forma de anillo llamada aglicona y una o más cadenas de azúcar unidas a este mediante enlaces glucosídicos⁽⁴⁾, son solubles en agua, no son resistentes a cambios bruscos de pH, valores muy ácidos o muy básicos pues estas condiciones generan la ruptura de los enlaces O-glucosídicos⁽⁸⁾.

Las saponinas son considerados metabolitos secundarios, reducen el valor nutricional de la quinua, son las responsables de su sabor amargo y están mayormente ubicadas en las capas externas de la semilla⁽²⁰⁾, hojas de la planta y en menor proporción en

flores y frutos⁽²¹⁾, también sirven como protección contra el ataque de patógenos y herbívoros⁽⁸⁾. El contenido de estos glucósidos depende de la variedad de quinua, sus diferentes etapas de crecimiento y la falta de agua en el suelo⁽⁵⁾. Asimismo, la quinua puede clasificarse de acuerdo al contenido de saponinas, teniendo la dulce $< 0.11\%$ de saponinas y la amarga $> 0.11\%$ de saponinas⁽¹⁴⁾. Hay alrededor de 30 saponinas derivadas de la Hederagenina y de los Ácidos Oleanólico, Fitolacagénico, Serjánico en la planta⁽⁸⁾.

1.2.2.1 COMPOSICION QUIMICA

Químicamente las saponinas están formadas por un núcleo hidrofóbico, también llamado sapogenina o aglicón, que puede estar unido mediante un enlace glucosídico a una o más cadenas de azúcar de naturaleza hidrófila⁽²²⁾, estos oligosacáridos principalmente son pentosas, hexosas o ácidos urónicos, como la glucosa, galactosa, xilosa, ácido glucurónico, ramnosa entre otros⁽⁸⁾.

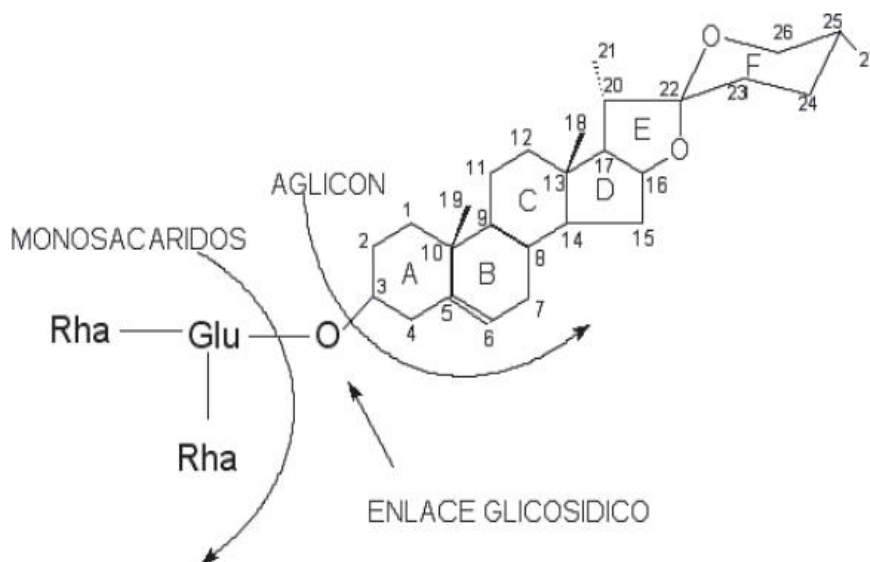


Figura 1.4. Estructura general de una saponina, se indica el enlace glucosídico entre la aglicona y un glucósido⁽²³⁾.

Las saponinas se pueden clasificar en dos clases principales dependiendo de la estructura química de la sapogenina: las saponinas esteroidales poseen un aglicón

esteroidal y un esqueleto de 27 carbonos que generalmente posee una estructura de seis anillos, en cambio las saponinas triterpenoides consisten en una aglicona triterpenoide con un esqueleto 30 carbonos y una estructura pentacíclica^(22,24). Los compuestos esteroideos son menos comunes mientras que las saponinas triterpenoides están más ampliamente distribuidas⁽²⁵⁾. Asimismo las saponinas también se pueden caracterizar por el número y la naturaleza del azúcar unido al aglicón, siendo las saponinas monodesmosídicas aquellas que tienen un oligosacárido unido al carbono 3, las saponinas bidesmosídicas tienen dos cadenas de carbohidratos, uno de ellos unido mediante un enlace éter al carbono 3 y el otro unido a través de un enlace éster al carbono 28^(8,22) y las saponinas tridesmosídicas contienen tres cadenas de azúcares⁽⁸⁾.

Las saponinas de la quinua están compuestas por un aglicón triterpenoide derivado de Acido Oleanólico, Hederagenina, Acido Fitolacagénico y Acido Serjánico, los carbohidratos principales unidos al aglicón son arabinosa, glucosa y galactosa; mientras que el Acido Glucurónico y la Xilosa son menos comunes⁽¹³⁾. Se ha determinado la existencia de 4 saponinas monodesmosídicas y 22 bidesmosídicas triterpénicas en la planta⁽²²⁾.

1.2.3. PROPIEDADES INDUSTRIALES

Las saponinas poseen una vasta variedad de opciones a nivel industrial⁽⁵⁾ es por ello que se han explotado con éxito en una serie de aplicaciones comerciales en alimentos, cosméticos, productos agrícolas y en el sector farmacéutico, las tendencias del mercado hacia el uso de ingredientes naturales y la creciente evidencia de la actividad biológica han aumentado la demanda de saponinas en los últimos años.

Debido a sus propiedades tensioactivas no iónicas únicas, las saponinas se utilizan ampliamente para fines industriales, por ejemplo, las saponinas se usan comercialmente como productores de espuma en formulaciones de extintores de incendios⁽²⁶⁾, en el sector de cuidado de limpieza personal se usan como geles de ducha, champús, acondicionadores, lociones para el cabello, detergentes para baño/ducha, jabones líquidos, productos para el cuidado de bebés, enjuagues bucales y pastas

dentales, asimismo las saponinas y sapogeninas también se comercializan como ingredientes bioactivos en formulaciones cosméticas con pretensiones de retrasar el proceso de envejecimiento de la piel y prevenir el acné⁽²⁷⁾.

Adicionalmente tienen amplias aplicaciones en la producción de cerveza, confitería y productos lácteos bajos en colesterol⁽²⁸⁾, como en el caso del aceite de mantequilla donde se han utilizado para eliminar el lípido mencionado anteriormente⁽²⁷⁾, el interés en la capacidad de las saponinas para inhibir la absorción de colesterol también ha sido demostrado por varias grandes compañías farmacéuticas y biomédicas/alimentarias, que están llevando a cabo investigaciones sobre "saponinas de diseño" semisintéticas patentadas destinadas a optimizar actividad hipocolesterolemica⁽²⁶⁾, otra aplicación importante de las saponinas es su uso como adyuvantes en la producción de vacunas⁽²⁵⁾.

En el área agrícola, particularmente las saponinas de la quinua han mostrado un efecto inhibitorio de hongos y actividad molusquicida, habiéndose registrado un biopesticida en base a dichas saponinas⁽²⁹⁾, también han sido probadas como biosurfactantes para eliminar contaminantes en el suelo⁽¹⁹⁾. Tienen uso en alimentos y bebidas como surfactante natural y sirven como conservantes para controlar el deterioro microbiano de los alimentos, debido a su característica similar a la espuma natural, la aplicación de saponinas como un bio-tensioactivo natural para mejorar las propiedades superficiales de los alimentos se ha estudiado intensamente⁽³⁰⁾, los supuestos beneficios para la salud del Acido Oleanólico (sapogenina) condujeron al desarrollo de métodos para fortificar productos alimenticios (por ejemplo: aceite de oliva), las aplicaciones propuestas para el Acido Oleanólico lo incluyen como agente saborizante para modificar el sabor del edulcorante artificial⁽²⁷⁾. Sin duda, otras fuentes botánicas potencialmente interesantes de saponinas utilizables industrialmente quedan por descubrir y desarrollar comercialmente⁽²⁶⁾.

1.2.4. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Se sabe que las saponinas poseen una amplia gama de propiedades biológicas entre las que resaltan su capacidad hemolítica, antiinflamatoria, antifúngica, molusquicida,

insecticida, citotóxica entre otras⁽²⁸⁾. La actividad hemolítica se debe a la interacción entre las saponinas y la membrana eritrocitaria⁽²⁴⁾, la aglicona posee una inclinación hacia la región lipídica de la membrana celular, mientras que los azúcares la presentan con los glucolípidos y glicoproteínas, provocando así un aumento en la permeabilidad de la membrana y una pérdida de hemoglobina. El nivel de la actividad hemolítica depende del tipo de sapogenina y la presencia de cadenas laterales de azúcar⁽⁸⁾. Por otro lado, se ha probado que las sapogeninas tienen la capacidad de disminuir e incluso inhibir la producción de mediadores inflamatorios, demostrando su capacidad antiinflamatoria, la cual es más notoria en saponinas triterpénicas derivadas de Hederagenina, Acido Oleanólico y Serjánico^(8,24).

La presencia de saponinas en plantas sanas se ha relacionado como un método de protección que las mismas utilizan en contra del ataque de hongos, se ha determinado que el aglicón es el que confiere la actividad antifúngica, asimismo la actividad máxima puede lograrse con una sapogenina monodesmósida con cuatro o cinco monosacáridos⁽²²⁾, las saponinas de la quinua derivadas de Hederagenina, Acido Oleanólico y Fitolacagénico pueden inhibir el crecimiento de hongos como *Candida albicans*⁽⁸⁾. De igual modo las saponinas triterpenoides derivadas de Hederagenina han demostrado tener efectos molusquicidas en contra de caracoles como el *Pomacea canaliculata* comúnmente conocido como caracol manzana⁽⁸⁾, estudios demostraron que las saponinas con tres restos de azúcar presentan una mayor actividad molusquicida que las saponinas triterpénicas con un solo resto de azúcar⁽²⁴⁾.

La actividad insecticida de las saponinas ha demostrado una gran capacidad contra pulgones, escarabajos, gorgojos, gusanos y polillas⁽³¹⁾, en la actualidad esta propiedad en particular está siendo bien recibida ya que no genera efectos adversos en el hombre o en animales grandes, tiene un gran potencial para el uso en programas integrados de control de plagas y el uso de un bioinsecticida derivado de las saponinas de la quinua fue probado con éxito en Bolivia⁽¹¹⁾. Igualmente las saponinas pueden ser empleadas como punto de partida para la semisíntesis de fármacos esteroides en la industria farmacéutica⁽³⁰⁾, presentan la capacidad de inducir cambios en la permeabilidad intestinal, lo que ayuda a la absorción de medicamentos particulares, pueden reducir

los niveles de colesterol en la sangre⁽⁵⁾, son consideradas adyuvantes^(4,14), antibacterianas, antioxidantes, antidiabéticas, antiobesidad y antiparasitaria⁽³⁰⁾.

1.2.4.1. ACTIVIDAD CITOTOXICA

Una de las aplicaciones más estudiadas de las saponinas es la actividad citotóxica, la inducción de apoptosis o la estimulación de la muerte celular autofágica son algunos de los diferentes mecanismos de acción que pueden llevar al mismo efecto, la muerte celular⁽²⁵⁾. Numerosos trabajos han estudiado la relación entre la estructura de las saponinas y esta actividad biológica, se sabe qué factores como la cadena del azúcar, los sitios de enlace interglucosídicos y la sapogenina son los que inducen esta propiedad, sin embargo, otros estudios sugieren que el factor esencial para la citotoxicidad es la presencia del ácido carboxílico libre en el carbono 28^(8,32) o los glucósidos unidos al carbono 3 de la aglicona⁽²⁴⁾.

Diferentes líneas celulares han sido evaluadas contra la actividad citotóxica de las sapogeninas, *SGC-7901*, *HepG2*, *HL-60* y *U251MG*⁽³²⁾, tres líneas celulares de cáncer de colon, *HCT-116*, *KM12* y *HT-29*, de leucemia *CCRF-CEM*, *K562*, *MOLT*, una línea de cáncer del SNC *SNB-75*, línea de melanoma *M14*, línea de cáncer renal *CAKI-1*, de cáncer de próstata *DU-145*, células de hepatoma *BEL-7402*⁽³³⁾, línea de cáncer de mama *MDA-MB-435*⁽²⁵⁾ y muchas otras. Asimismo las saponinas esteroides fueron evaluadas contra múltiples líneas celulares por ejemplo: línea celular de leucemia humana *HL-60*⁽³³⁾, contra células del carcinoma de células escamosas orales humanas (*HSC-2*), contra las líneas celulares *A375-S2*, *L929* y *HeLa*, probando su potencial citotóxico⁽²⁴⁾.

1.3. CULTIVOS CELULARES

1.3.1. LINEA CELULAR *HeLa*

En 1951 el Doctor en Medicina, George Gey director del Laboratorio de cultivo de tejidos en el Departamento de Cirugía del Hospital Johns Hopkins deseaba aislar y

mantener tejidos normales y malignos como organoides temporales o estables o como cepas celulares derivadas. Para este propósito, se utilizó la técnica de “*roller-tube*” en aproximadamente 30 muestras de cáncer cervical sin obtener buenos resultados⁽³⁴⁾, hasta que una muestra de cáncer proveniente del cuello uterino de una joven de color llamada Henrietta Lacks de 30 años de edad⁽³⁵⁾ creció de manera robusta, convirtiéndose en la primera línea celular de cáncer humano inmortalizada en cultivo de tejidos⁽³⁴⁾. En pocos años, las células *HeLa* se habían distribuido en todo el mundo y se convirtieron en el modelo de laboratorio de célula cancerosa que se utilizaría para gran parte de la investigación del cáncer, pero no solo se usarían para este motivo también tienen aplicación para estudiar las vías bioquímicas del tejido normal y enfermo en las células humanas como parte de investigación biomédica. Aunque se han establecido miles de líneas celulares continuas de casi todos los tipos de cáncer humano, *HeLa* sigue siendo la línea celular de cáncer más utilizada⁽³⁵⁾.

1.3.2. LINEA CELULAR *SH-SY5Y*

Las células *SH-SY5Y* se originaron a partir de la línea celular de neuroblastoma *SK-N-SH*, que se generó en 1970 a partir de una biopsia de tumor óseo metastásico de una niña de 4 años que padecía neuroblastoma, un raro cáncer de células nerviosas⁽³⁶⁾. Las células *SH-SY5Y* tienen un cariotipo estable que consta de 47 cromosomas⁽³⁷⁾, sus cultivos incluyen células adherentes y flotantes además tienden a crecer en grupos formándolos a medida que las células crecen una encima de la otra⁽³⁸⁾. Son muy útiles en el campo de neurobiología, en investigaciones relacionadas a la función y el desarrollo del cerebro, la neurotoxicología, los trastornos como la depresión⁽³⁶⁾ y de distintas enfermedades neurológicas como Parkinson, Alzheimer y la patogenia de la infección viral, como el Poliovirus, Enterovirus, Varicela-Zoster virus (VZV), Citomegalovirus Humano y Virus Herpes Simplex⁽³⁷⁾.

1.3.3. LINEA CELULAR *HepG2*

La línea celular *HepG2* es una línea celular de cáncer de hígado humano derivada del tejido hepático de un varón argentino caucásico con 15 años de edad que padecía de

un carcinoma hepatocelular, cuenta con 55 pares de cromosomas, responde a la estimulación con hormona de crecimiento humano y se caracterizan por ser células adherentes que crecen como monocapas⁽³⁹⁾. Asimismo, son células no tumorigénicas con alta tasa de proliferación, poseen una vida útil ilimitada, un fenotipo estable, alta disponibilidad y son de fácil manejo⁽⁴⁰⁾. Se utilizan como modelos de referencia celular en productos farmacéuticos o en estudios que pretende desarrollar nuevos medicamentos, obtener información sobre el metabolismo de este⁽⁴¹⁾ y para estudiar enfermedades hepáticas humanas⁽³⁹⁾.

1.3.4. LINEA CELULAR A549

La línea celular A549 se aisló en 1973 de un adenocarcinoma pulmonar en un estudio para intentar establecer líneas celulares continuas de 200 tumores diferentes⁽⁴²⁾, el origen de la muestra fue de un varón caucásico de 58 años, las células A549 son células epiteliales basales alveolares hipotriploides, esta línea celular adenocarcinómica se clasifica como un carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que tiende a ser menos agresivo y se propaga con menos rapidez que el carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC), pero demuestra ser más común, representando 85-88% de todos los casos de cáncer de pulmón. Las células A549 se usan habitualmente como modelos in vitro e in vivo, se conoce que estas células son de naturaleza escamosa y son responsables de la difusión de sustancias como el agua y los electrolitos a través de los alvéolos de los pulmones, asimismo son células epiteliales basales alveolares humanas que crecen adherentemente como una monocapa in vitro y sirven como adecuados hospedadores de transfección⁽⁴³⁾.

1.4. CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

1.4.1. AZUL DE TRIPAN

Esta prueba de exclusión de colorante se usa para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular se basa en el principio de que las células

vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, como el azul de tripan, la eosina o el propidio, mientras que las células muertas no⁽⁴⁴⁾.

El azul de tripan es un colorante diazoico que se ha utilizado ampliamente para colorear selectivamente tejidos o células muertas, el mecanismo se basa en que el tinte se encuentra cargado negativamente y no interactúa con las células al menos que la membrana esté dañada. Por lo tanto, todas las células que excluyen el tinte se consideran viables, es por ello que las células con membranas dañadas se tiñen en un color azul distintivo que se observa fácilmente con un microscopio. De esta forma el azul de tripan se describe como una mancha vital que permite la discriminación entre células viables y células con membranas dañadas que generalmente se consideran células muertas⁽⁴⁵⁾.

1.4.2. MTS

MTS es una prueba colorimétrica usada para evaluar el número celular, la viabilidad celular y la citotoxicidad en respuesta a estímulos externos como citosinas, reactivos citotóxicos, factores de crecimiento y tratamientos farmacológicos⁽⁴⁶⁾, este ensayo es considerado una versión mejorada y modificada del ensayo MTT⁽⁴⁷⁾, así como simple, rentable⁽⁴⁴⁾, con facilidad de uso, preciso y de rápida indicación de toxicidad⁽⁴⁸⁾.

Se basa en la conversión de una sal de tetrazolio en un producto de formazán coloreado, que es soluble en los medios de cultivo celular por la actividad de enzimas deshidrogenasa dependiente de NAD en las células viables a 37°C. La cantidad de formazán producida es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo, la reacción produce un aumento significativo en la intensidad del color que puede medirse a 492 nm^(46,47).

Debido a que el nivel de la absorbancia a medir está influenciada por el tiempo de incubación, se recomienda evitar las incubaciones prolongadas más allá de cuatro horas⁽⁴⁹⁾, otros factores que pueden influenciar el nivel de absorbancia son el tipo de

célula, el número de células y la relación de reactivos de detección de MTS a células en cultivo⁽⁴⁸⁾.

1.5. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

1.5.1. APOPTOSIS

La apoptosis es un importante tipo de muerte celular programada, mediada por caspasa⁽⁵⁰⁾, se caracteriza por ser un proceso que es controlado genéticamente y está altamente conservado dentro de los organismos multicelulares, las células que sufren apoptosis pasan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos dependientes de enzima, en donde dejan de crecer y dividirse entrando en un proceso en el cual son eliminadas sin comprometer o derramar su contenido a tejidos circundantes⁽⁵¹⁾.

La importancia de la apoptosis es indiscutible, pues tiene cabida en varios procesos del desarrollo humano, se utiliza como un mecanismo de defensa pues es necesaria para liberar al cuerpo de células invadidas por patógenos, es un componente vital en la curación de heridas, la apoptosis también es necesaria para eliminar las células inmunes activadas o auto agresivas, ya sea durante la maduración en los órganos linfoides centrales (médula ósea y timo) o en los tejidos periféricos, asimismo es fundamental para la remodelación en el adulto, como en la involución de la glándula mamaria después del destete, además, a medida que los órganos envejecen, algunas células comienzan a deteriorarse a un ritmo más rápido y deben ser eliminados por apoptosis⁽⁵²⁾, sin embargo si este proceso no está bien regulado puede provocar diversas enfermedades⁽⁵¹⁾, que incluyen defectos del desarrollo, enfermedades autoinmunes, neurodegeneración o cáncer⁽⁵²⁾.

Se estima que para mantener el equilibrio entre las células que sufren apoptosis y las células viables se produce alrededor de 10 mil millones de células por día, para que de este modo la homeostasis en el cuerpo humano adulto se mantenga⁽⁵²⁾. Las enzimas que regulan este proceso son un grupo de cisteína proteasas llamadas caspasas, estas se expresan en forma de proenzimas inactivas en la mayoría de las células, sin embargo

una vez que las caspasas se activan, la muerte celular parece ser irreversible. Las caspasas han sido clasificadas de acuerdo a su función; caspasas iniciadoras (Caspasa 2, 8, 9, 10), efectores o verdugos (Caspasa 3, 6, 7) y caspasas inflamatorias (Caspasa 1, 4, 5)⁽⁵²⁾.

Según múltiples estudio, existen dos vías por las cuales el proceso de la apoptosis puede iniciarse, la vía extrínseca o del receptor de muerte y la vía intrínseca o vía mitocondrial^(52,53), ambas vías funcionan de forma sinérgica para garantizar que los organismos multicelulares permanezcan sanos y las células defectuosas se eliminen del cuerpo⁽⁵¹⁾.

La vía intrínseca (Figura 1.5) también llamada vía mitocondrial tiene ese nombre porque depende de los factores liberados por las mitocondrias, puede ser activada por señales negativas, como la ausencia de citosinas, hormonas y factores de crecimiento en el entorno inmediato de la célula, varios inductores de estrés o daño del ADN⁽⁵⁰⁾ o por una señal positiva como la presencia de hipoxia, toxinas, radiación, especies reactivas de oxígeno, virus y una variedad de agentes tóxicos⁽⁵²⁾.

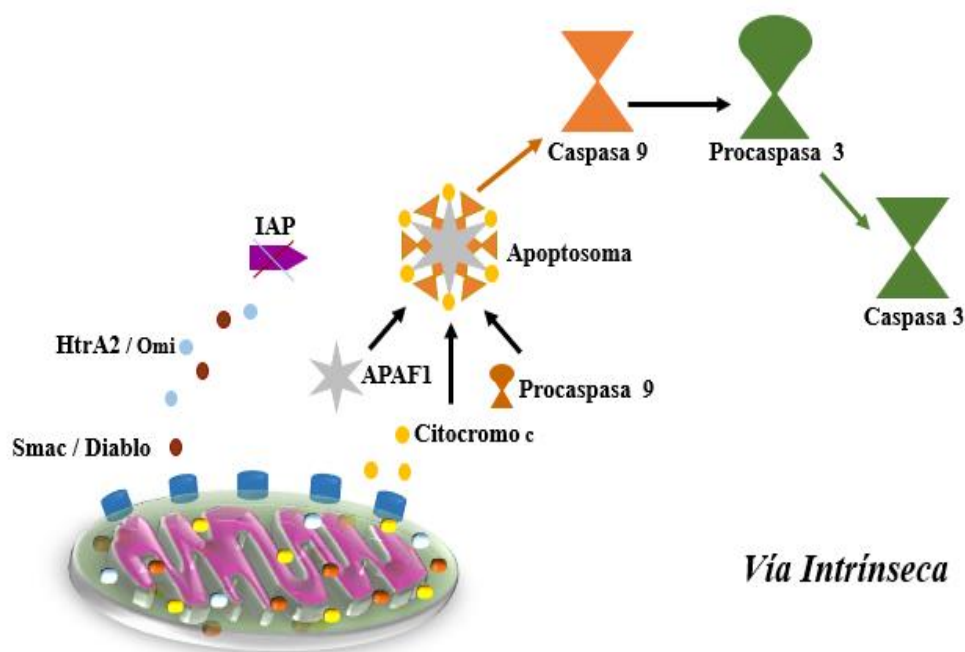


Figura 1.5. Vía intrínseca de la apoptosis.

Es regulada por la familia de proteínas Bcl-2⁽⁵³⁾, pues esta se encarga de regular la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y de la liberación de Citocromo c^(50,52). Una vez que la apoptosis se activa por estímulos positivos o negativos, la membrana mitocondrial sufre cambios que provocan la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), luego de que el poro este abierto las proteínas pro-apoptóticas como Citocromo c, Smac/Diablo y HtrA2/Omi son capaces de filtrarse desde la parte interna de la mitocondria hacia el citoplasma. El Citocromo c cumple un importante rol en la activación de la vía intrínseca, ya que es capaz de unirse al Factor 1 de la Proteasa Activadora de Apoptosis o APAF1 generando en esta proteína un cambio conformacional que expone su dominio de reclutamiento de Caspasa o CARD permitiendo así que varios APAF1 se ensamblen en un complejo conocido como apoptosoma, debido a que este complejo contiene varios dominios CARD, es capaz de reclutar y activar varias proteínas procaspasa 9 que promoverán la activación de Caspasa 9. Esta enzima es capaz de activar el ejecutor procaspasa 3, que en forma de Caspasa 3 activa puede inducir completamente la apoptosis, por otro lado las proteínas Smac/Diablo y HtrA2/Omi ayudan en el proceso bloqueando los inhibidores de las proteínas de apoptosis (IAP) sin embargo sin la liberación del Citocromo c la apoptosis no podría iniciarse⁽⁵¹⁾.

La vía de apoptosis mediada por el receptor de muerte o comúnmente llamada vía extrínseca inicia en la superficie celular, donde células natural killer o macrófagos producen ligandos de muerte⁽⁵¹⁾ tales como TNF, TRAIL o Fas-L⁽⁵⁰⁾, estos ligandos son dominios extracelulares ricos en citoína y poseen un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos llamado "dominio de muerte", este dominio de muerte juega un papel crítico en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie celular a las vías de señalización intracelular, los ligandos se unen a sus respectivos receptores, hasta la fecha, los ligandos mejor caracterizados y los receptores de muerte correspondientes incluyen Fas/Fas-L, TNF/TNFR1 y TRAIL/TRAILR⁽⁵²⁾.

Tras la unión, proteínas adaptadoras citoplasmáticas son reclutadas y se unen a los receptores a través de sus dominios de muerte, así, cuando el ligando Fas se une a su receptor, la proteína adaptadora conocida como dominio de muerte asociado a Fas o

FADD, es reclutada, luego FADD se asocia con procaspasa 8 formando el complejo de señalización inductor de muerte o DISC⁽⁵²⁾, el reclutamiento de varios monómeros de procaspasa 8 en el DISC da como resultado su activación⁽⁵¹⁾, posteriormente Caspasa 8 se activa transduciendo la señal de apoptosis mediante la activación de Caspasa 3⁽⁵⁰⁾, en la Figura 1.6 se puede observar la vía extrínseca como mecanismo de muerte celular. Estudios han demostrado que las saponinas son potenciales agentes anticancerígenos^(25,54) ya que presentan propiedades como inhibir la proliferación en numerosos tipos de células cancerosas humanas e inducir la detención del ciclo celular y la apoptosis. Se sabe que sus efectos citotóxicos pueden deberse a la inducción de apoptosis o la estimulación de la muerte celular no apoptótica⁽²⁵⁾.

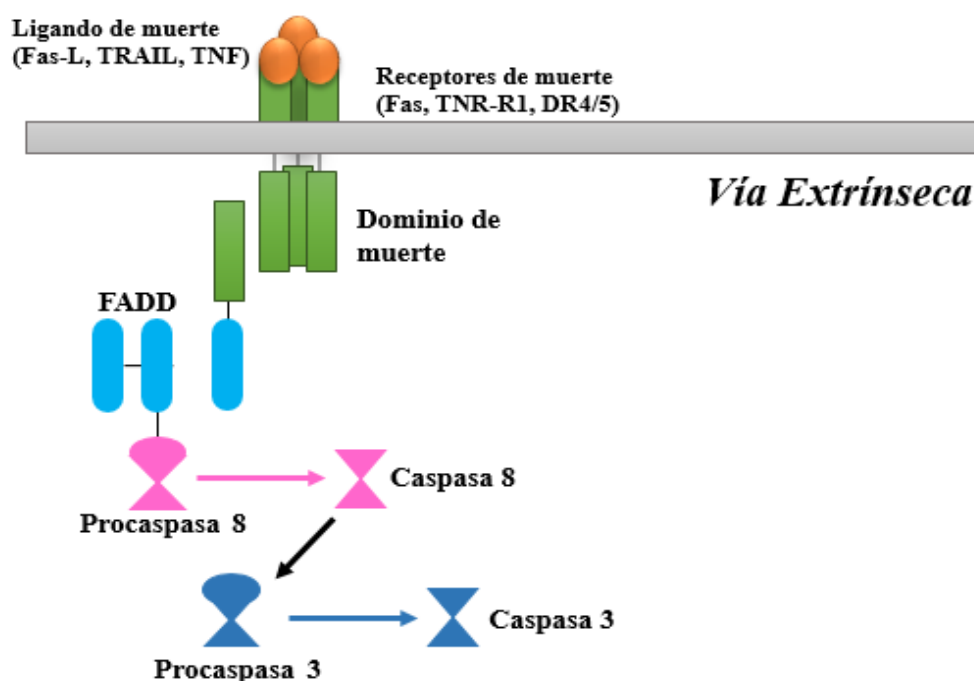


Figura 1.6. Vía extrínseca de la apoptosis.

1.5.1.1 ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3

La apoptosis es considerada uno de los procesos más importantes en la regulación del desarrollo de tejidos y la homeostasis⁽²⁵⁾. Es un proceso que involucra una cascada de señalización compleja que está estrictamente regulada en múltiples puntos⁽⁵²⁾, uno de los principales integrantes de la apoptosis son las caspasas pues son mediadoras en el

proceso⁽⁵⁵⁾. A la fecha se han encontrado más de 13 caspasas en humanos, 10 de ellas pueden agruparse en tres subfamilias, las caspasas del grupo I (Caspasas 1, 4 y 5) que juegan un papel principal en la inflamación, los miembros del grupo II (Caspasas 2, 3 y 7) y el grupo III (Caspasas 6, 8, 9 y 10) que están implicados principalmente en la apoptosis⁽⁵⁶⁾, por otro lado en otros estudios las caspasas son clasificadas de otra manera, las caspasas iniciadoras (Caspasa 2, 8, 9, 10), efectores o verdugos (Caspasa 3, 6, 7) y caspasas inflamatorias (Caspasa 1, 4, 5)⁽⁵²⁾. Sin embargo si de apoptosis hablamos, la Caspasa 3 es de una de la más importantes en el proceso, es una proteasa activada con frecuencia, que cataliza la escisión específica de muchas proteínas celulares clave en células de mamíferos, su activación depende de la liberación de Citocromo c mitocondrial y la función de Caspasa 9⁽⁵⁵⁾. Si bien la apoptosis puede ejecutarse mediante dos vías diferentes, extrínseca e intrínseca, ambas terminan en la misma fase que es considerada la vía final de la apoptosis, al activarse la Caspasa 3, que es la encargada de escindir ICAD para liberar la endonucleasa CAD o DNasa activada por caspasa, que en células en proliferación está bloqueada por su inhibidor ICAD, luego CAD se encarga de degradar el ADN cromosómico dentro de los núcleos y provocar la condensación de cromatina. Asimismo la Caspasa 3 induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos al escindir la gelsolina, una proteína de unión a la actina, los fragmentos cortados de gelsolina, escindirán los filamentos de actina que da como resultado la interrupción del citoesqueleto, el transporte intracelular, la división celular y la transducción de señales, finalmente la captación fagocítica de las células apoptóticas es el último componente de la apoptosis⁽⁵⁵⁾. La caspasa de ejecución CAS3 activa la endonucleasa citoplasmática, que degrada el material nuclear, y las proteasas que degradan las proteínas nucleares y citoesqueléticas, entre otros, que finalmente causan la morfología y los cambios bioquímicos observados en las células apoptóticas⁽⁵²⁾.

1.5.2. AUTOFAGIA

La autofagia es conocida por actuar como un mecanismo pro-supervivencia, ya que representa un mecanismo adaptativo importante que intenta rescatar células de la muerte⁽⁵²⁾, sin embargo también puede inducir la muerte celular⁽⁵⁰⁾. La muerte celular

autofágica, también conocida como "macroautofagia" o "muerte celular autofágica tipo II", ocurre en todas las células eucariotas⁽⁵²⁾ y es descrita como un proceso en el que los componentes celulares, como las macroproteínas u orgánulos enteros son secuestrados por lisosomas para su degradación^(51,57). Esta vía se caracteriza por ser el principal mecanismo regulador de las células para degradar proteínas de larga vida y la única vía conocida para degradar orgánulos⁽⁵⁸⁾, cabe destacar que de entre todos los tipos de muerte celular como necrosis o apoptosis, la autofagia tiene la mayor probabilidad de supervivencia⁽⁵⁰⁾, presenta una degradación temprana de los orgánulos pero preserva los elementos del citoesqueleto hasta las etapas tardías y no genera una respuesta inflamatoria⁽⁵⁸⁾, asimismo es un proceso genéticamente programado por genes llamados Atg, tanto el mecanismo como la morfología de la autofagia son conservados evolutivamente e incluso se mantienen similares entre organismos tan diversos como animales, plantas y levaduras⁽⁵²⁾ y se pueden activar por estímulos extracelulares como la inanición de nutrientes, hipoxia, alta temperatura, condiciones intracelulares alteradas⁽⁵⁸⁾, daño a los orgánulos, presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el tratamiento con medicamentos⁽⁵⁰⁾.

Algunas características de este proceso son: la vacuolización, degradación del contenido citoplasmático y ligera condensación de cromatina. En general la vía autofágica implica cuatro pasos clave: iniciación o inducción, nucleación, fusión de autofagosoma y descomposición y reciclaje del cuerpo autofágico^(50,52). El proceso comienza con el secuestro del material citoplasmático dañado por autofagosomas también llamadas vacuolas autofágicas, este proceso está bajo el control de GTPasas y fosfatidilinositol quinasas, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma (en células de mamífero) o la vacuola (en levaduras y plantas)⁽⁵⁸⁾ en un proceso que es dependiente de microtúbulos⁽⁵⁷⁾, es entonces cuando estos empiezan a digerir las macromoléculas o los orgánulos celulares como mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosoma, etc., con el objetivo de reciclarse y así crear nuevas estructuras celulares y/u orgánulos, asimismo pueden procesarse y utilizarse como fuente de energía con la generación de ATP⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. Hay 3 formas distintas de autofagia; macroautofagia comúnmente conocida como autofagia⁽⁵⁹⁾, microautofagia y autofagia selectiva, la forma más conocida es la macroautofagia que se describe como un proceso

en donde regiones enteras de la célula están encerradas en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas que se convierten en autofagolisosomas al fusionarse con lisosomas, las proteasas que se encuentran presentes en estos son las encargadas de degradar el contenido de las células. La microautofagia es más específica que la macroautofagia ya que los lisosomas interactúan sólo con orgánulos o regiones del citosol dañados, dependiendo de que organelo es el objetivo, la vesícula autofágica resultante se denomina con un nombre específico, siendo mitofagia si es una mitocondria o peroxofagia si es un peroxisoma. Por último en la autofagia selectiva, también llamada autofagia mediada por chaperona, una chaperona citosólica dirige la fusión entre el lisosoma y las proteínas dentro del citoplasma^(51,59).

1.5.3. NECROSIS

La necrosis es considerada como un tipo de muerte celular no controlada, es un proceso pasivo pues no requiere una nueva síntesis de proteínas⁽⁶⁰⁾, generalmente afecta grandes campos de células ya que resulta en el derrame del contenido de la célula en los tejidos circundantes y está mediada por dos mecanismos principales; la interferencia del suministro de energía en la célula y el daño directo a las membranas celulares⁽⁵²⁾. Algunas de los signos que la necrosis puede incluir son la disfunción mitocondrial, generación de especies reactivas de oxígeno, agotamiento de ATP, proteólisis, ruptura temprana de la membrana plasmática⁽⁶¹⁾ y las respuestas inflamatorias posteriores causadas por la liberación de los contenidos intracelulares⁽⁵⁰⁾. La necrosis se da cuando la célula se daña severamente por un choque repentino de radiación, calor, productos químicos, hipoxia (falta de oxígeno)⁽⁵¹⁾, choque osmótico, estrés mecánico, congelación, descongelación, alta concentraciones de peróxido de hidrógeno⁽⁵⁹⁾, isquemia (suministro restringido de sangre), hipoglucemia, exposición a toxinas⁽⁶⁰⁾, presencia de patógenos⁽⁵⁹⁾, etc., en otras palabras por inductores de estrés inespecíficos o no fisiológicos⁽⁵⁰⁾.

Los principales cambios morfológicos que ocurren en células que sufren necrosis incluyen, expansión de los orgánulos celulares⁽⁵⁰⁾, inflamación celular, formación de vacuolas citoplasmáticas, retículo endoplásmico distendido, formación de ampollas

citoplasmáticas, mitocondrias condensadas, hinchadas o rotas, desprendimiento de ribosomas, lisosomas hinchados y rotos, condensación de cromatina, un patrón irregular de degradación del ADN⁽⁶⁰⁾ y eventualmente disrupción de la membrana celular⁽⁵²⁾.

La muerte celular necrótica empieza con las membranas citoplasmáticas y los orgánulos membranosos dilatados, sigue con el aumento de la inflamación celular que provoca la ruptura de la membrana plasmática, y que posteriormente libera el contenido citoplasmático en el espacio extracelular, lo que conduce a un daño celular masivo que afecta a las células vecinas⁽⁶⁰⁾. A nivel bioquímico, en condiciones patológicas, las mitocondrias producen más moléculas reactivas de oxígeno y los niveles de calcio intracelular aumentan, por consiguiente al romper el equilibrio del entorno intercelular la permeabilidad de la membrana celular se altera y un desequilibrio entre diferentes iones, como potasio, sodio y calcio se presenta. Al aumentar los niveles de calcio las diversas funciones mitocondriales se ven afectadas, lo que logra interrumpir la integridad de la membrana interna mitocondrial, provocando la pérdida de la capacidad de generar ATP, asimismo los niveles alterados de calcio citosólico pueden activar diferentes tipos de proteasas, incluidas las calpaínas que provoca la desestabilización de la membrana y que finalmente hace que la célula pierda sus membranas de modo que los contenidos celulares se liberen en el espacio extracelular⁽⁵⁹⁾. La necrosis está implicada en varios síndromes y enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y la epilepsia⁽⁶⁰⁾. Recientes estudios han reportado varios tipos de necrosis programada, incluyendo necroptosis, ferroptosis, pyroptosis, parthanatos, y NETosis⁽⁵⁰⁾.

1.5.3.1. NETosis

Los neutrófilos son células fagocíticas con núcleo lobulado que forman parte de la primera línea de defensa de inmunidad celular innata, constituyen aproximadamente 70% de los glóbulos blancos^(62,63), son células con una vida útil de 12 a 15 horas que después de este período de tiempo sufren apoptosis: esta vida útil puede extenderse

después de la exposición a varias sustancias como las citosinas⁽⁶²⁾. Al ser células fagocíticas profesionales, los neutrófilos tienen una gran variedad de receptores que les permiten reconocer microorganismos opsonizados y no opsonizados y facilitar su captación⁽⁶³⁾.

En 2004, Brinkmann et al. describieron que la activación del neutrófilo no sólo puede desencadenar la fagocitosis de los microorganismos infectantes sino también la liberación de estructuras extracelulares similares a una red llamadas “trampas extracelulares de neutrófilos” o NET (de neutrophil extracellular traps). Estas redes están constituidas por la cromatina nuclear (ADN + histonas), proteínas de los gránulos de los neutrófilos y proteínas citoplasmáticas asociadas a interleucina 8. Las NET actuarían como una red de contención de la infección al mismo tiempo que mediarían la destrucción extracelular de los patógenos⁽⁶⁴⁾.

Se conoce que los microorganismos son los agentes más potentes que inducen NETosis, lo que sugiere la importancia de diferentes vías de activación en este proceso, en primer lugar, después de la activación, los neutrófilos presentan un aplanamiento de su estructura celular con la visualización de múltiples vacuolas citoplasmáticas. En segundo lugar, se pierde la distinción entre eucromatina y heterocromatina, así como sus lobulaciones nucleares características y se forma un espacio entre las membranas nucleares interna y externa, las membranas se pierden permitiendo que los componentes de los NET se mezclen. Todo este proceso se lleva a cabo mientras la membrana permanece intacta. En la última etapa, los neutrófilos mueren expresando indicadores de células de muerte como la fosfatidilserina⁽⁶²⁾.

1.6. PROTEINA PARP-1

Las poli (ADP-ribosa) polimerasas o mejor conocidas como proteínas PARP, son una familia de enzimas dependientes de NAD⁽⁶⁵⁾, altamente conservadas que catalizan exclusivamente la poli-ADP-ribosilación de proteínas de unión al ADN, modulando así su actividad⁽⁶⁶⁾, la poli (ADP-ribosil) acción ocurre en todas las células nucleadas de mamíferos, plantas y eucariotas inferiores, sin embargo está ausente de las

levaduras⁽⁶⁷⁾. Las proteínas PARP son cruciales en varios procesos celulares, como la modulación de la estructura de la cromatina, la transcripción, la replicación, la recombinación y la reparación del ADN. Esta familia de proteínas cuenta con al menos 18 miembros que están codificadas por diferentes genes pero comparten el mismo dominio catalítico⁽⁶⁸⁾, algunos miembros de esta familia, PARP1 y PARP2, son más conocidos por participación en los procesos de reparación de ADN.

Las células están constantemente expuestas a diversos factores que pueden provocar daños en el ADN cuya reparación es crucial para la supervivencia de la célula, hay muchos mecanismos que están encargados de detectar y reparar DNA dañado, como el reclutamiento de poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 o mejor conocido como PARP1, que participa activamente en la reparación del ADN, incluida la reparación de roturas de cadena sencilla (SSB), roturas de cadena doble (DSB), en la estabilización de horquillas de replicación de ADN y en la modificación de la estructura de la cromatina⁽⁶⁹⁾, el mantenimiento de la integridad genómica, así como la cromatindinámica y la regulación transcripcional⁽⁶⁵⁾, asimismo PARP1 esta implicado en la replicación del ADN, transcripción, recientes hallazgos sugieren que PARP-1 participa en la señalización del daño del ADN en la muerte celular y tiene un papel importante en la terapia contra el cáncer, la irradiación y la quimioterapia⁽⁶⁷⁾. PARP1 es el primer más abundante y mejor miembro caracterizado de la familia PARP⁽⁶⁸⁾, es una enzima eucariota, altamente multifuncional⁽⁶⁹⁾ de 116 kDa compuesta por 1014 aminoácidos, el gen que codifica esta proteína se encuentra en la posición q41 – q42 del cromosoma 1 y hay entre 105 y 106 copias de PARP-1 presentes en cada célula, probablemente en forma dimérica⁽⁶⁷⁾, esta enzima consta de tres dominios principales que son mediadores de la respuesta de PARP1 a diferentes tipos de daño en el ADN: el dominio de unión al ADN N-terminal (DBD), el dominio de automodificación (AMD) y el dominio catalítico C-terminal. El DBD se encuentra en el extremo N-terminal de la enzima y contiene 2 dedos de zinc que reconocen estructuras de ADN alteradas y estimulan dramáticamente la actividad de PARP-1, y dos estructuras hélice-bucle-hélice capaces de mediar interacciones fuertes entre el ADN y las proteínas, por otro lado, el dominio de automodificación se localiza en la región central y contiene residuos de ácido glutámico que están involucrados en la automodificación de PARP-

1, esta modificación posteriormente conduce a su inhibición, el último dominio, la región C-terminal está involucrada en la síntesis catalítica de polímeros de poli (ADP-ribosa) (PAR) usando NAD⁺ como sustrato y contiene una secuencia altamente conservada, la pérdida de los últimos 45 aminoácidos de este dominio, conduce a una pérdida de actividad de PARP-1^(69,70). Durante la apoptosis, PARP1 se divide en dos fragmentos por acción de las caspasas, lo que resulta en su inevitable inactivación, este proceso es considerado vital para el correcto funcionamiento de la maquinaria apoptótica cuyo objetivo es la fragmentación del ADN⁽⁶⁶⁾.

1.7. METODOS DE CUANTIFICACION

1.7.1. CROMATOGRAFIA

La cromatografía puede definirse como un conjunto de métodos utilizados para separar componentes de una mezcla, es una de las técnicas más populares usadas en el análisis de compuestos, consta de dos fases, la fase estacionaria y la fase móvil. Existen diferentes tipos de técnicas cromatográficas, la cromatografía en papel, la cromatografía de gases, la cromatografía líquida, la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de intercambio iónico y por último, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)⁽⁷¹⁾. En los últimos años las saponinas han sido material de estudio debido a que sus variadas propiedades farmacéuticas son de interés⁽³⁰⁾, sin embargo representan un desafío a la hora de querer separarlas, puesto que la mayoría son producidas en las plantas y estas son una mezcla de compuestos. Uno de los métodos cromatográficos más comunes empleados para separar saponinas son la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)^(30,72).

1.7.1.1. TLC

La cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*) es una técnica utilizada para separar mezclas y es uno de las más utilizadas pues presenta un concepto simple, las muestras generalmente requieren un pretratamiento mínimo, se puede utilizar como método analítico preliminar antes de la HPLC, consume menos tiempo y es de bajo

costo. TLC se realiza aplicando la muestra sobre la fase estacionaria (puede ser una placa de vidrio, plástico o papel de aluminio recubierta con una capa delgada de material adsorbente, generalmente gel de sílice, óxido de aluminio) y colocando dicha placa sobre la fase móvil, que es un disolvente o una mezcla de disolventes, debido a que los diferentes analitos de la muestra ascenderán en la lámina de TLC a diferentes velocidades, se logrará la separación.

La naturaleza de la muestra y el adsorbente utilizado en la placa son sólo algunos factores que deben ser tomados en cuenta al momento de elegir una fase móvil, los solventes comúnmente utilizados son éter de petróleo, tetracloruro de carbono, piridina, glicol, gliceril dietil éter, formamida, metanol, etanol, acetona y n-propanol. Por otro lado, el comportamiento de una sustancia específica dentro de una muestra se caracteriza por una cantidad conocida como R_f , este valor es una constante para cada componente de una muestra solo bajo condiciones experimentales idénticas y se calcula dividiendo la distancia que el compuesto viajó desde la posición original por la distancia que el solvente viajó desde la posición original. La cromatografía en capa fina es muy útil en el análisis de productos farmacéuticos y medicamentos, en la cosmetología, en la separación de formulaciones farmacéuticas multicomponentes, en el análisis cualitativo de alcaloides, aplicaciones relacionadas con química orgánica, entre otros⁽⁷³⁾.

De igual manera TLC, se está convirtiendo en una técnica de apoyo frecuente en el análisis de fracciones de saponinas, ya que se ha utilizado para confirmar la pureza y la identidad de estos compuestos, así como para realizar un análisis cualitativo de los mismos, generalmente las muestras son comparadas con un estándar y al finalizar la corrida, la placa es rociada con un disolvente hecho de ácido sulfúrico para revelarla⁽⁷⁴⁾, esto se realiza para evitar información engañosa ya que otros componentes de la muestra, como los esteroides y los ácidos biliares pueden presentar una reacción de color, el reactivo con base de ácido sulfúrico le proporciona a las saponinas esteroidales una reacción de color único que está libre de cualquier influencia de otros compuestos⁽⁷⁵⁾.

1.7.1.2. HPLC

HPLC conocida como Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento, es descrita como una de las técnicas analíticas más populares y avanzadas en lo que respecta a cromatografía, se puede utilizar para múltiples propósitos como separación, identificación y cuantificación de cada uno de los constituyentes de una mezcla, dicha cromatografía se realiza colocando una pequeña cantidad de muestra, normalmente un volumen en microlitos, en la fase móvil que pasa a través de la fase estacionaria con ayuda de una bomba que aplica una presión de hasta 400 atm. La fase móvil es una mezcla de solventes que pueden o no contener agua, los solventes naturales más reconocidos son el acetonitrilo y el metanol, si la fase móvil contiene una parte acuosa esta puede contener ácidos corrosivos fórmicos, fosfóricos o trifluoroacéticos o sales con el objetivo de ayudar con la separación de los componentes de la muestra, asimismo, la composición de la fase móvil puede mantenerse constante o cambiar durante la corrida, su composición y temperatura juegan un papel importante. La fase estacionaria consta de una columna cargadas con partículas que poseen ciertas características químicas, estas también son llamadas adsorbentes, los adsorbentes son regularmente un material granular hecho de partículas sólidas como sílice o polímeros de 2 μm a 50 μm de tamaño y pueden ser de naturaleza hidrófoba o polar, dependiendo de la muestra, hay varios tipos de columnas disponibles, cargadas con adsorbentes que varían en tamaño de molécula y en naturaleza química de su superficie. La muestra viaja a través de la columna en distintas velocidades, ya que cada componente interactúa de manera distinta durante la prueba cromatográfica, lo que provoca una diferencia en los caudales y finalmente conduce a la separación de los componentes, el tiempo en el que un analito específico logra salir de la columna se llama tiempo de retención y es una constante para cada compuesto en condiciones idénticas. El equipo de HPLC consta de múltiple instrumentación que hace posible el análisis, siendo los más importantes, la bomba, la columna el detector y el sistema de visualización. La bomba es la encargada de aspirar la fase móvil del depósito de disolvente y hacerla pasar a través de la columna, aplicando presión, cabe destacar que esta presión depende de las dimensiones de la columna, el tamaño de partícula, el caudal y la composición de la fase móvil, la columna que está hecha de acero inoxidable, mide alrededor de 50

mm a 300 mm de largo, el detector que está situado al final de la columna es el encargado de distinguir a los analitos a medida que eluyen de la columna cromatográfica. La cromatografía de líquida de alto rendimiento se utiliza principalmente en técnicas analíticas en los campos de farmacia, forense, medioambiental y clínico⁽⁷¹⁾. Debido a que una de sus varias ventajas es producir compuestos extremadamente puros y que es una de las técnicas de separación más versátiles⁽⁷²⁾, HPLC es una de las preferidas a la hora de analizar y cuantificar⁽³⁰⁾ saponinas triterpenoides⁽⁷⁶⁾.





CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. MATERIAL BIOLOGICO

- Cáscara de *Chenopodium quinoa* Willd. provenientes de la empresa industrial JIWRA SAC
- Células de cáncer de cuello uterino humano *HeLa* (ATCC)
- Células de cáncer de hígado humano *HepG2* (ATCC)
- Células de neuroblastoma *SH-SY5Y* (ATCC)
- Células de cáncer de pulmón humano *A549* (ATCC)
- Anticuerpo primario ab32064: Anticuerpo monoclonal de conejo contra *Cleaved* PARP-1
- Anticuerpo primario ab32138: Anticuerpo monoclonal de conejo contra PARP-1
- Anticuerpo secundario ab97051: Anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de conejo (HRP)
- Anticuerpo anti β -actina ab49900: Anticuerpo monoclonal de ratón contra β -actina (HRP)

2.1.2. ESTANDARES

- Estándar Acido Ursólico (*Selleckchem*)
- Estándar Acido Oleanólico (*Selleckchem*)
- Estándar Hederagenina (*Selleckchem*)

2.1.3. MEDIOS DE CULTIVO

- *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* con 4.5g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio (CORNING cellgro).

2.1.4. MATERIAL DE VIDRIO

- Balón esmerilado
- Probeta de 500 mL
- Pipeta volumétrica
- Sistema refrigerante o condensador
- Pera de decantación
- Pipetas volumétricas de 10 mL, 5 mL, 2 mL y 1 mL
- Fiolas de 50 mL, 5 mL y 2 mL
- Vasos de precipitados
- Viales de 2 mL para HPLC
- Bagueta

2.1.5. MATERIAL DE LABORATORIO

- Micropipetas P1000, P200, P10 y P2.5 (Eppendorf *research plus*)
- Micropipeta multicanal P200 (VWR)
- Recipientes para pipetas multicanal
- Tips P1000, P200 y P10 (VWR)
- Pipetas serológicas de 25 mL, 10 mL, 5 mL, 2 mL y 1 mL (VWR)
- Pistola volumétrica (*Brand accu-jet® pro*)

- Tubos de centrífuga de 50 ml y 15 mL (*Tornado Tubes MIDSCI™*)
- Tubos de microcentrífuga (Eppendorf™)
- Frascos de cultivo de 25 cm², 75 cm² y 175 cm² (*Greiner*)
- Placas de cultivo de 6 y 96 pocillos (*Falcon®*)
- Rascador de células S (TPP®)
- Termómetro (*Traceable®*)
- Membrana de nitrocelulosa de 0.2µm (*BioRad*)
- Rodillo
- Pipeta Pasteur
- Tips P200 para carga en gel (VWR)
- *Case Western Blot* (MTC Bio™)
- Cuba para TLC
- Placas de sílica gel (*Merck*)
- Capilares (*Marienfeld Superior™*)
- Filtros de jeringa de 0.45 µm estériles (*Merck*)
- Filtros de membrana 0.2 µm estériles (*Schelider & Schuell*)
- Columna GOLD Hypersil-5 µm (*Thermo Fisher Scientific*)
- Jeringa de vidrio
- Cintas de pH
- Soporte universal
- Propipeta
- Guantes de nitrilo (VWR)

2.1.6. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza analítica (VWR)
- Limpiador ultrasónico (*Branson*)
- Cámara de flujo laminar (ESCO clase II tipo A2)
- Fuente de Poder (*Bio-rad*)
- Rotavapor (*Buchi*)
- Bomba de vacío
- Hotplate
- Micro agitador de placas que incuba/enfría (VWR)
- Espectrofotómetro *plate reader* y Software *Gen 5™* versión 2.05 (*Biotek Synergy HT*)
- Microscopio óptico invertido (*Olympus Ckx31*)
- Incubadora de crecimiento celular 37 °C y 5% CO₂ (VWR)
- Estufa
- *Cellometer® slides*, AutoT4 contador y Software (*Nexcelom Bioscience*)
- Centrífuga (*Clay Adams™ Dynac® III*)
- Microcentrifuga (MC-24 BOECO)
- Baño termostático (*Thermo Fisher Scientific*)
- Cámara de electroforesis, fuente de poder (*BioRad PowerPac™*)
- Cámara de electrotransferencia (*BioRad Trans-Blot ® Turbo™*)
- Scanner y Software *Image Studio Digits* (*Li-Cor C-Digit*)
- Vórtex (*Thermo Fisher Scientific*)
- Plataforma agitadora rocket (VWR)

- Refrigeradoras -80, -20, 4 °C (VWR)
- Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) *Hitachi Primaide* con los siguientes módulos:
 - Organizador *Primaide*
 - Bomba *Primaide* 1110
 - Muestreador Automático *Primaide* 1210
 - Horno *Primaide* 1310
 - Detector de Arreglo de Diodos *Primaide* 1430
 - Software *Primaide*

2.1.7. REACTIVOS

- Alcohol etílico absoluto (*J.T. Baker*)
- Metanol para análisis (*Merck*)
- Éter etílico (*Merck*)
- Hidróxido de sodio (*Merck*)
- Ácido clorhídrico 36 % (*Merck*)
- Ácido sulfúrico 95-97% (*Merck*)
- Ácido acético (*Merck*)
- Cloroformo (*Merck*)
- Acetato de etilo (*Merck*)
- 1 – butanol (*Merck*)
- Ácido orto-fosfórico 85 % (*Merck*)
- Metanol grado HPLC (*Merck*)
- Agua destilada

- Agua ultrapura
- Albúmina de suero bovino BSA (*Boston BioProducts*)
- Pierce ® BCA reactivo de ensayo de proteínas A (*Thermo Fisher Scientific*)
- Pierce ® BCA reactivo de ensayo de proteínas B (*Thermo Fisher Scientific*)
- Buffer fosfato salino PBS 20X (*Boston BioProducts*)
- Suero bovino fetal FBS (ATCC)
- Penicilina/Estreptomicina (*Gibco ® by Life Technologies™*)
- PBS pH 7.2 1X (*Gibco ® by Life Technologies™*)
- Tripsina-EDTA 0.05% 1X (*Gibco ® by Life Technologies™*)
- Azul de tripan 0.4% (*Sigma-Aldrich*)
- Buffer de lisis M-PER ® (*Thermo Fisher Scientific*)
- Buffer SDS-Sample 4X reductor (*Boston BioProducts*)
- Geles de poliacrilamida 7.5% (*BioRad Mini-PROTEAN® TGX Stain Free™*)
- Marcador de peso molecular de proteínas preteñido (*PageRuler™, Thermo Fisher Scientific*)
- Buffer de electroforesis Tris-Glicina-SDS 10X (*Thermo Fisher Scientific*)
- Buffer de transferencia 1-Step™
- Solución de peróxido de hidrógeno (*SuperSignal™ West Pico PLUS, Thermo Fisher Scientific*)
- Solución de luminol/catalizador (*SuperSignal™ West Pico PLUS, Thermo Fisher Scientific*)
- Colorante rojo Ponceau
- Leche en polvo sin grasa (*Boston BioProducts*)
- Buffer TBS Tween®-20 20X (*Thermo Fisher Scientific*)

- Kit MTS (*Promega*)
- DMSO $\geq 99.5\%$ GC (*Sigma-Aldrich*)
- Tritón® X-100 (*Sigma-Aldrich*)
- Kit colorimétrico para Caspasa 3 (*BioVision K-106*)
- Staurosporina (*Abcam ab120056*)

2.1.8. OTROS

- Algodón
- Cubeta
- Hielo
- Pinza
- Espátula
- Papel aluminio
- Botella de plástico
- Equipo de venoclisis

2.2. METODOS

2.2.1. OBTENCION DE SAPONINAS

2.2.1.1. RECOLECCION DE LOS RESIDUOS DEL ESPECIMEN VEGETAL

Se obtuvieron diversas muestras de residuos de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*); cascara de quinua blanca y roja, provenientes de la empresa industrial JIWRA SAC ubicada en la región de Arequipa, la cual se encarga de ofrecer servicios de procesamiento como: limpieza, lavado y empaquetado, tanto en quinua como en otros granos⁽⁷⁷⁾.



Figura 2.1. Vista exterior de la empresa industrial JIWRA.

2.2.1.2. EXTRACCION POR PERCOLACION

Para la extracción de los compuestos activos de *Chenopodium quinoa Willd.* se usó para cada una de las quinuas un percolador casero, el arreglo experimental del mismo se muestra en la Figura 2.2, consistió en un botella cortada en la parte inferior, en la tapa de esta se realizó un orificio por donde se colocó el equipo de venoclisis, se taponeo con un poco de algodón y luego se colocó 150 gramos de la cáscara de la quinua junto con etanol 95%, se mantuvo en contacto la matriz vegetal y el solvente por 24 horas, tras el contacto, se drenó cada uno de los extractos por goteo teniendo

un flujo de 60 gotas/minuto, para que el sistema de extracción fuera continuo se agregó etanol por la parte superior varias veces hasta obtener un volumen final de 750 mL, los extractos obtenidos se llevaron a concentración.

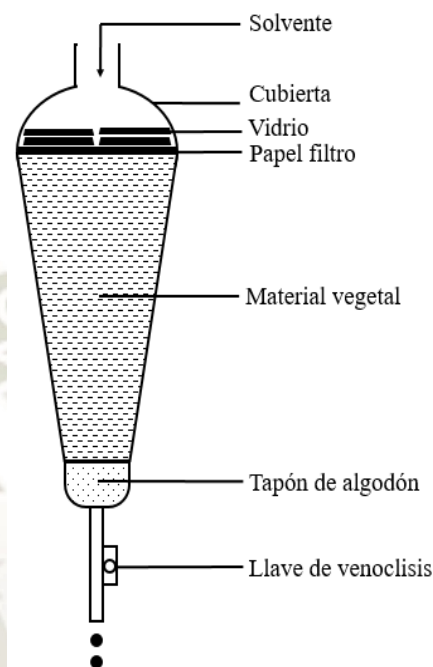


Figura 2.2. Esquema del percolador

2.2.1.3. CONCENTRACION

Los extractos fueron concentrados con ayuda de un rotavapor Buchi y una bomba al vacío, se transfirió los extractos a un balón de concentración y se procedió a evaporar el solvente de extracción hasta sequedad, los residuos fueron transferidos a tubos.

2.2.2. CULTIVO CELULAR

2.2.2.1. MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó el medio de cultivo completo DMEM, el cual es conocido por ser un medio que permite el crecimiento rápido de las células y mejor adherencia en las líneas celulares de *HeLa*, *SH-SY5Y*, *A549* y *HepG2*⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾, el medio se preparó mezclando 500 mL DMEM 1X con 50 mL de suero fetal bovino el cual proporcionó los nutrientes

para el crecimiento (10% de FBS) y 5 mL de penicilina/estreptomicina para evitar el crecimiento de microorganismos.

En los posteriores ensayos se usó medio bajo en suero, ya que el medio completo puede proteger a las células mientras están en exposición a las drogas, para la preparación de este se mezcló 500 mL de DMEM 1X con 5 mL de penicilina/estreptomicina y 5 mL de suero bovino fetal (1% FBS).

2.2.2.2. PASAJE CELULAR (SUBCULTIVO CELULAR)

Se usó el microscopio óptico invertido (10X de aumento) para observar la confluencia celular que debe ser mayor al 80%, con la finalidad de procurar la preservación de las células para futuros ensayos.

El procedimiento para realizar el subcultivo de las líneas celulares comenzaba mediante el decantamiento del medio de cultivo, posteriormente se agregó PBS para realizar un lavado con el objetivo de eliminar el medio restante (los mililitros utilizados dependían del tamaño del frasco de cultivo que se estaba utilizando), es así que para los frascos de 25 cm² se empleó 4 mL, para los de 75 cm² se utilizó 8 mL, y para los frascos de 175 cm² se usó 15 mL. Se descartó el PBS anteriormente agregado, luego se incubó con tripsina a 37 °C por 5 minutos para despegar las células, después, se inhibió la tripsina agregando medio de cultivo FBS (la misma cantidad que tripsina), la mezcla anterior se pasó desde el frasco a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos.

Por último, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 1 mL de medio de cultivo completo (el proceso de resuspensión se realizó 15 veces), luego se colocó 9 mL de medio de cultivo completo, con la suspensión de células se procedió a realizar ensayos, asimismo una fracción de esta era empleada para realizar un nuevo pasaje celular. Para el tratamiento con los extractos etanólicos y los estándares (Acido Ursólico, Acido Oleanólico y Hederagenina) se utilizó medio DMEM con 1% de penicilina y 1% de FBS.

2.2.2.3. CONTEO CELULAR

Se observó bajo el microscopio invertido si las células se encontraban confluentes, asimismo se examinó la morfología de las mismas y el tipo de crecimiento celular para garantizar el éxito del ensayo, posteriormente se procedió a trispsinar y centrifugar tal como se mencionó previamente. Luego de ello se realizó el conteo celular con el fin de colocar la misma cantidad de células en cada uno de los pozos y así evaluar el efecto que tenían cada de los extractos etánicos y estándares de sapogeninas frente a las líneas celulares.

El conteo celular se realizó colocando 50 uL de suspensión celular junto con 50 uL de azul de tripan (dilución 1:1) en un tubo de microcentrifuga, se resuspendió y 20 uL de la mezcla fueron colocados en una lámina especial, posteriormente esta se introdujo en la cámara de conteo “*cellometer*”, para la correcta lectura del aparato se enfocó la imagen mediante la opción “*Display image*” en el Software *Nexcelom*, y por último se seleccionó “*Count*”. Este proceso se realizó en ambos lados de la lámina y se obtuvo el promedio de las lecturas, para futuras diluciones se usó la ecuación 2.1:

$$V' \times C' = V'' \times C''$$

Ecuación 2.1. Dilución a partir de una suspensión de células, donde V' es el volumen a tomar de suspensión de células, C' es el promedio de las lecturas, V'' es el volumen a preparar de dilución y C'' es la concentración de células requeridas.

2.2.3. EFECTO CITOTOXICO

Se obtuvo una suspensión de células de cada línea celular y estas fueron resuspendidas en medio completo DMEM, la concentración de las mezclas fue determinadas por el método de azul tripan, se sembró 10 mil células por pozo en los platos de 96 pocillos y se dejó incubando a 37 °C y 5 % CO₂ por 24 horas, pasado el tiempo estimado se cambió el medio completo por un medio bajo en suero bovino fetal para detener el

crecimiento celular y aclimatar a este tipo ya que el tratamiento con los extractos y estándares de sapogeninas se realizan con este medio, se conservó el medio en los pocillos durante toda la noche, el procedimiento descrito se realizó con las líneas celulares *HeLa*, *A549*, *HepG2* y *SH-SY5Y*. Posteriormente se diluyeron los dos extractos etanólicos y los estándares en ≥ 0.5 % de DMSO. ya que se sabe que el dimetilsulfoxido puede ser tóxico en grandes concentraciones y puede afectar el crecimiento celular^(81,82), para demostrar lo dicho se aplicó DMSO al 0 %, 0.1 %, 0.5 %, 1 %, 5%, y 10 % de concentración a cada línea celular, por 24 horas. Para el tratamiento, las concentraciones usadas del extracto de quinua blanca y quinua roja fueron: 0/ 0.3/ 1/ 3/ 10/ 30/ 100 ppm, para el tratamiento de los estándares de las sapogeninas Hederagenina (HED), Acido Oleanólico (AO) y Acido Ursólico (AU) se usaron concentraciones de 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M, el control, en cada caso constaba de medio bajo en suero bovino fetal. Una vez terminado el tiempo de exposición del tratamiento de estándares, extractos y DMSO (24 horas), se retiró los 200 μ L de cada pocillo y se agregó el reactivo MTS el cual estaba diluido con medio bajo en suero (10 μ L de MTS/ 200 μ L de medio), cada pozo contaba con 200 μ L de la mezcla anterior y luego se incubó por 3 horas, se leyó en el espectrofotómetro ($\lambda = 490$ nm), exportando los datos para su posterior análisis estadístico.

Tabla 2.1. Concentraciones usadas para los ensayo de viabilidad celular utilizando DMSO, extractos etanólicos y estándares de sapogenina sobre las líneas celulares *A549*, *HeLa*, *HepG2*, *SH-SY5Y*.

Concentraciones para ensayo de viabilidad celular	
DMSO	0 %
	0.1 %
	0.5 %
	1 %
	5 %
	10 %
Quinua Blanca / Quinua Roja	0 ppm
	0.3 ppm

	1 ppm
	3 ppm
	10 ppm
	30 ppm
	100 ppm
	0 μ M
	1 μ M
	3 μ M
Acido Ursólico / Acido Oleanólico /	10 μ M
Hederagenina	30 μ M
	100 μ M
	300 μ M

Los resultados que se expondrán en el Capítulo 3 explicaran la razón por la que se decidió no seguir empleando los extractos etanólicos en los siguientes ensayos.

2.2.4. DETERMINACION DE LA IC₅₀

Se usó el software computacional estadístico *GraphPad Prism 6*, donde se utilizaron los datos del ensayo de viabilidad celular para construir una curva que relaciona el porcentaje de viabilidad celular con las concentraciones usadas en los diversos tratamientos, con el objetivo de obtener el IC₅₀ de cada línea celular cuando es tratada con cada uno de los estándares (Tabla 3.2), los datos obtenidos fueron redondeados, eligiendo el mayor número más cercano a la data, en la escala logarítmica (Tabla 3.3), estas concentraciones fueron las usadas para el ensayo de caspasa.

2.2.5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3

Se realizaron dos ensayos, el primero fue para tener una visión general del comportamiento de cada línea celular con respecto a la vía apoptótica y el segundo ensayo se realizó solo con la línea celular que demostró que optaba por la vía de las caspasas para realizar la muerte celular. En el primer ensayo, las cuatro líneas celulares

fueron sembrados en frascos de cultivo, para asegurarnos que las células estén confluentes, las células se incubaron por 4 días, luego recibieron tratamiento con un control positivo (Staurosporina o STS) que demuestra una clara actividad de caspasa, la línea celular que no cumple con activar esta vía, fue descartada para ensayos posteriores. Las líneas celulares en las que sí se observó un comportamiento positivo cuando se compararon el control (*HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y*) fueron sembradas en frasco de cultivo hasta llegar a la confluencia y se trataron con las concentraciones obtenidas en la determinación IC_{50} (Sección 2.2.4), en la Tabla 3.3 se puede observar el tratamiento que se les dio a cada una de estas durante 5 horas.

Utilizando el Kit de la empresa BioVision se determinó la actividad de Caspasa 3 en los frascos de cultivo, como ya se mencionó, el primer ensayo se realizó en todas las líneas celulares con la finalidad de determinar si la muerte celular que se activa en ellas es por la vía de las caspasas, ya que Caspasa 3 se encuentra presente en la cascada apoptótica, asimismo se conoce por bibliografía que Staurosporina o STS produce la activación de Caspasa 3^(83,84), por ende funciona como control positivo y nos da una visión general de que línea celular opta por la vía apoptótica y que línea celular debe ser dejada a un lado debido a que su muerte celular es activada por otro vía como la autofagia o la necrosis. El segundo ensayo se realizó sólo con *HeLa* ya que obtuvo un resultado positivo, en esta línea se aplicó un mayor número de tratamientos. Tanto en el primer como el segundo ensayo los tratamientos duraron 5 horas y se siguió el mismo protocolo, el que se explicará a continuación.

2.2.5.1. LISIS CELULAR

Pasado el tiempo de tratamiento, medio se descartó, se agregaron 600 μ L de PBS helado para lavar los frascos, se desechó y nuevamente 500 μ L PBS fueron agregados al frasco, finalmente las células fueron recolectadas con ayuda de un rascador de células. Las células obtenidas fueron transferidas a tubos Eppendorf los cuales fueron centrifugados a 300 rpm por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante fue descartado, se resuspendió el pellet con 60 μ L de buffer de lisis celular helado y se incubó en hielo por 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 4 °C por 10 minutos a 10000 rpm, el

sobrenadante fue transferido a unos nuevos tubos, estos pueden guardarse a bajas temperaturas para un posterior análisis.

2.2.5.2. CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN LISADOS CELULARES

Las proteínas obtenidas anteriormente fueron descongeladas para poder cuantificarlas usando el ensayo de BCA, para ello se debía tener diluciones del estándar suministrado por el Kit, siendo la proteína albumina, esta se diluyó con agua destilada y se preparó concentraciones de 2000 μM , 1000 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 0 μM (Blanco), asimismo se preparó reactivo de trabajo mezclando reactivo A (ácido bicinonínico) y reactivo B (sulfato cúprico al 4%), en una relación de 50:1 respectivamente. Luego se realizó una dilución de 1:4, usando 10 μL de muestra y 40 μL de PBS. En un plato de cultivo de 96 pocillos se colocó 10 μL de las muestras junto con 200 μL del reactivo de trabajo, esto se hizo por triplicado para obtener mejores resultados. De la misma manera se sembraron las diferentes concentraciones del estándar preparados anteriormente junto con la misma cantidad de reactivo de trabajo, luego la placa se llevó a un agitador de placas por 30 minutos a 37°C, al finalizar la incubación se leyó en el espectrofotómetro a 562 nm.

2.2.5.3. KIT DE CASPASA 3

Siguiendo el protocolo que proporciona BioVision, para poder continuar con la determinación de Caspasa 3, primero se halló la cantidad de muestra que se debe de tomar para ello se aplicó la ecuación 2.2. Una vez conocida los μL a tomar se los colocó en los pocillos de una microplaca, se agregó la cantidad suficiente de buffer de lisis a cada muestra para completar a 50 μL luego se añadió 50 μL de *2x Reaction Buffer* y 5 μL de sustrato *DEVD-Pna* (4mM), se incubó a 37°C por dos horas en oscuridad en un agitador de placas. Después se el tiempo mencionado, se procedió a analizar a $\lambda=405$ nm en el espectrofotómetro, exportando los datos para su posterior análisis.

$$\mu L_{\text{demuestra}} = \frac{165\mu g}{CC. Real} \times \frac{1000\mu L}{1mL}$$

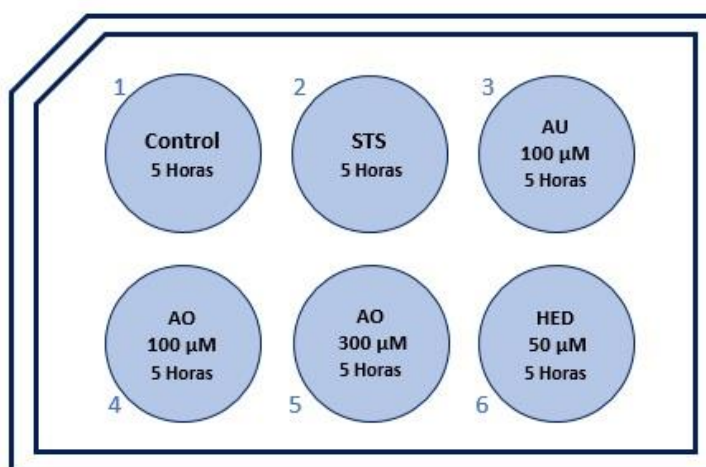
Ecuación 2.2. Proteína a tomar en cada una de las muestras donde “165 μg ” es la cantidad de proteína igualitaria a usarse en el ensayo, “CC. Real” es la concentración real hallada en $\mu g/mL$.

2.2.6. WESTERN BLOT

2.2.6.1. LISIS CELULAR

Se sembró medio millón de células *HeLa* en platos de cultivo de 6 pocillos utilizando medio completo por 24 horas, pasado el tiempo se cambió el medio por un medio bajo en suero y se procedió a su aclimatación por 24 horas. Posteriormente, se dividió en 2 grupos las células a tratar, las primeras mantuvieron el tratamiento por 5 horas y las restantes por 24 horas.

A continuación, en la Figura 2.3 muestra la distribución de los platos de 6 pocillos con el tratamiento de STS, DMSO el cual fue el control y los estándares Acido Ursólico, Acido Oleanólico y Hederagenina.



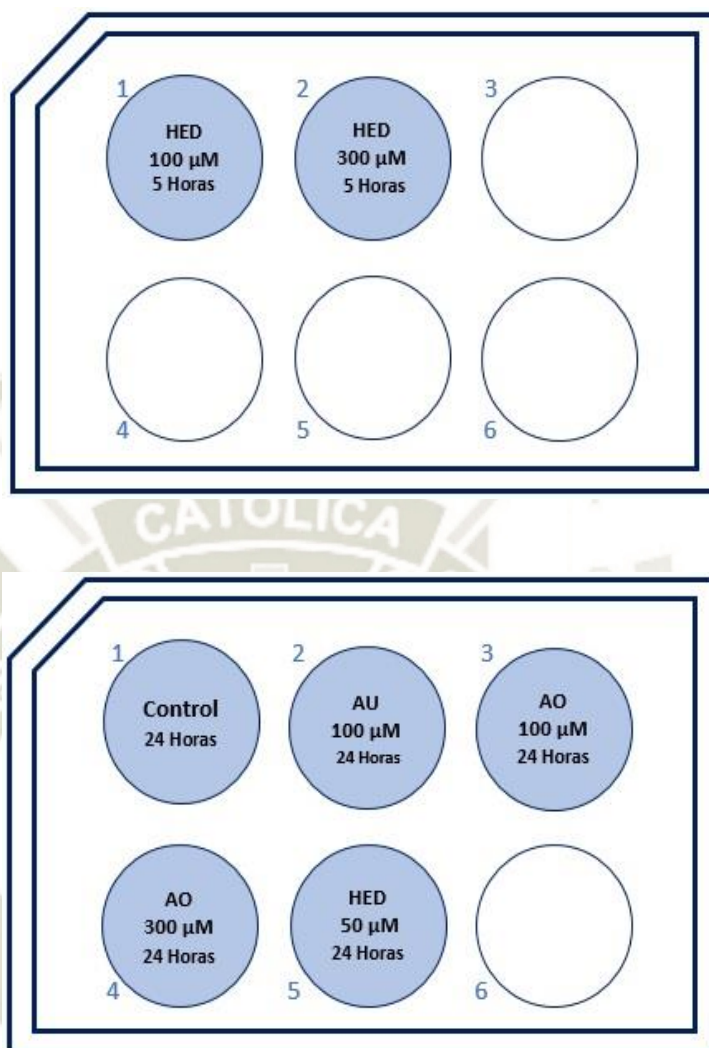


Figura 2.3. Distribución del tratamiento de *Western Blot* en platos de 6 pocillos.

Se decidió usar concentraciones de 50 µM, 100 µM y 300 µM debido a que en otras concentraciones no se obtuvieron resultados significativos. Pasado el tiempo para cada tratamiento los platos fueron colocados en una cubeta de hielo para evitar la degradación de las proteínas, se eliminó el medio y se procedió a lavar dos veces con 500 µL de PBS frío (4°C), luego se agregaron 300 µL de reactivo de lisis celular MPER por 5 minutos a cada pocillo, a continuación se raspó cada pocillo con un rascador de células, hasta no notar la presencia de células en el fondo. Se transfirió el contenido de cada pocillo a tubos de microcentrífuga y se centrifugó a 14000 rcf por 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a nuevos tubos de microcentrífuga rotulados, los cuales fueron conservados a -80°C.

2.2.6.2. CUANTIFICACION DE PROTEINAS EN LISADOS CELULARES

Se obtuvo una suspensión de células y se cuantificó las proteínas a usarse mediante el método de BCA siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.2.5.2, siendo la única diferencia en esta ocasión la dilución, la cual fue de 1:2, usando 30 μ L de muestra y 60 μ L de PBS, posteriormente se normalizó el nivel de proteínas totales de muestras y controles a 20 unidades de proteína por mL.

2.2.6.3. PROTEINAS ESPECIFICAS EN LISADOS CELULARES (WESTERN BLOT)

Se encontró las concentraciones reales de las proteínas mediante el ensayo BCA, se agregó SDS-4x a cada muestra de acuerdo a la concentración hallada, los tubos Eppendorf con la mezcla anterior se desnaturalizaron en un hotplate durante 5 minutos a 95°C. La electroforesis se ejecutó en un gel de poliacrilamida al 7.5 % de la empresa *Bio-Rad*, en el primer pozo se colocó 5 μ L del marcador y el resto de los pozos contenían cada una de las muestras, se agregó 500mL de buffer de corrida 1x a partir de buffer 10x con agua destilada a la cámara y se corrió con una fuente de poder a 120 Voltios por 50 minutos.

Para la electrotransferencia, se cortó dos moldes de papel filtro, dos esponjas y una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de diámetro de poro para cada gel, se sumergieron los mencionados en buffer de transferencia 1X, 10 minutos previos antes de que la corrida acabara. Terminada la electroforesis se retiró el gel de la cámara y de su empaque de plástico con una espátula, se procedió al armado del "sándwich" siguiendo el siguiente orden: esponja, papel filtro, membrana de nitrocelulosa, gel de electrotransferencia, papel filtro, y esponja. Se eliminaron las burbujas con la ayuda de un rodillo y se agregó un poco de buffer de transferencia 1-step, para evitar que se queme la membrana durante la transferencia, el sándwich se colocó en la superficie de transferencia y se expuso a 25 Voltios durante 10 minutos. Al término se retiró la membrana y se la colocó en un case para luego ser teñida con rojo de ponceau, se dejó

por unos minutos en el rocket, posteriormente se recuperó el mencionado, después se lavó con agua destilada evitando que caiga directamente a la membrana.

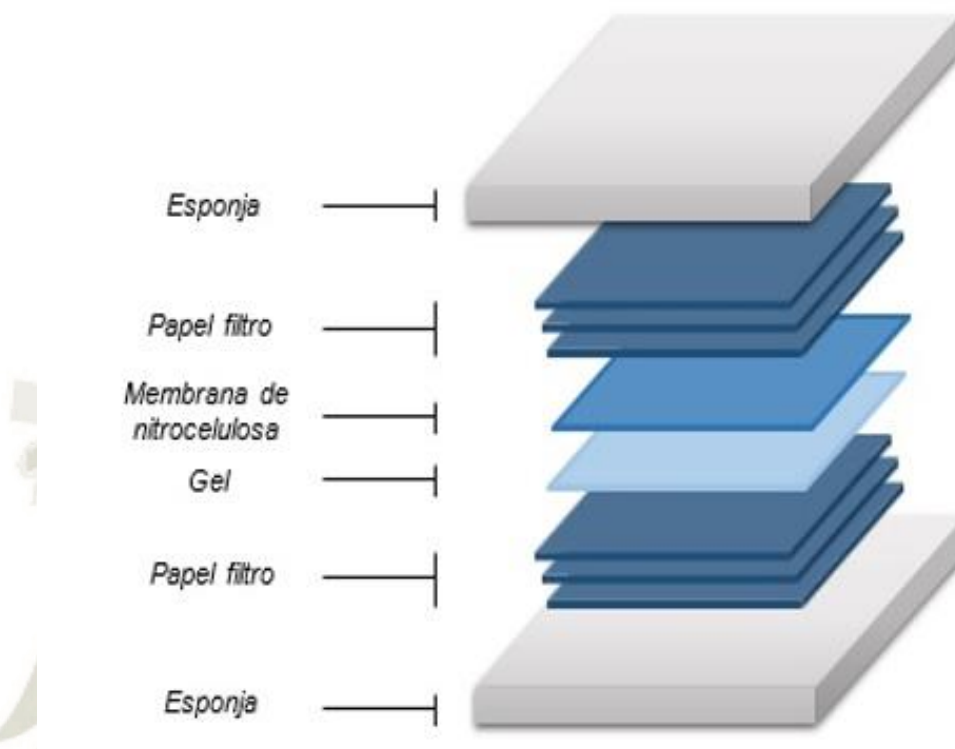


Figura 2.4. Armado de “sándwich” en *Western Blot*.

2.2.6.4. DETERMINACION DE LOS BIOMARCADORES (*Cleaved* PARP-1, PARP-1 Y β -Actina) Y REVELADO DE PROTEINAS

Luego de que las membranas fueron lavadas previamente, se procedió a incubar con el anticuerpo primario ab32064, este se diluyó 1:5000 con buffer de bloqueo. Cada membrana fue incubada durante toda la noche a 4°C en una plataforma con agitación constante, para que el anticuerpo primario se una a la proteína, culminado el tiempo se lavó tres veces la membrana con TBS-T por 5 minutos cada uno. Seguidamente se colocó el anticuerpo secundario ab97051 que tuvo una dilución de 1:5000 por una hora a temperatura ambiente, se volvió a lavar la membrana tres veces con buffer de lavado por 5 minutos cada uno, posteriormente se agregó el revelado el consta de dos reactivos: *Super Signal West Pico Plus Stable Peroxide Solution* y *Super Signal West Pico Plus Luminol/Enhancer Solution*, ambos se mezclaron colocando 5 mL de cada uno, y se

colocó 5mL. a cada una de las membranas por 5 minutos en oscuridad con constante agitación a temperatura ambiente, después se retiró la membrana y se colocó en el escáner, se analizaron las imágenes en *Image Studio Digits*.

Terminando la lectura se colocó anticuerpo primario ab32138 (diluido 1:5000) durante toda la noche a 4°C en agitación constante, se volvió a lavar el anticuerpo tres veces la membrana con TBS-T por 5 minutos cada uno, se colocó en anticuerpo secundario por una hora a temperatura ambiente, se lavó nuevamente 3 veces por 5 minutos con buffer de lavado, se colocó la misma cantidad de revelado que se mencionó anteriormente y se leyó la membrana en el escáner, por último se colocó β -actina la cual estuvo diluida 1:10000 con buffer de bloqueo durante una hora, se lavó, agregó el revelado tal como se citó antes, finalmente se llevó al escáner donde se calcularon las áreas de las bandas obtenidas y se exportaron los datos a *Microsoft Excel 2013* para su posterior análisis.

2.2.7. PURIFICACION Y CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS Y SAPONINAS

2.2.7.1. OBTENCION DE SAPONINAS MEDIANTE EXTRACCION LIQUIDO - LIQUIDO

Se pesó 5 gramos del concentrado de la muestra vegetal que se obtuvo del rotavapor y se mezcló con 15 mL de agua destilada, se procedió a sonicar para tener una mezcla uniforme, posteriormente se vertió este contenido a una pera de decantación y se realizó extracciones con solventes orgánicos, se comenzó con 3 extracciones continuas de 10 mL de cloroformo cada una, se eliminó la fase inferior que se formó, se continuó con extracción con acetato de etilo la misma cantidad que el anterior 3 veces seguidas, eliminando la fase oleosa, por último se realizó la extracción con 1-butanol de la misma forma que las anteriores eliminando la fase acuosa, se recolectó la fase oleosa y se llevó a estufa por 24 horas a 90°C hasta que se secase, pasado el tiempo mencionado se disolvió el polvo obtenido con 10 mL de NaOH al 1%, y se procedió a realizar 3 extracciones sucesivas con 5 mL de 1-butanol, se recuperó la fase superior

llevándola a estufa a 90°C hasta que el líquido estuviera completamente seco, obteniendo saponinas purificadas. Para verificar la presencia de saponinas se realizó una cromatografía en capa fina para ello se preparó una placa de *silica gel* de 10 cm de largo x 1.5 cm de ancho, luego se trazó un margen a 1 cm del borde de la placa en la parte inferior, con los capilares se sembró las saponinas purificadas de cada una de las quinuas y el estándar de saponina, se metió la placa dentro de la cuba la cual contenía la fase móvil por lo menos 15 minutos antes para poder saturar la cámara cromatográfica, la fase móvil estaba compuesta por Cloroformo: Metanol: Agua (70:44:10), comenzó a ascender y faltando aproximadamente 1 cm antes del margen superior se sacó la placa para acabar con la corrida, por último se secó las placas a temperatura ambiente y fueron reveladas con el reactivo *Liebermann – Burchard*, para ello en un vaso de precipitado se colocó 10 mL de metanol frío, luego se agregó 1 mL de ácido sulfúrico con 1 mL de ácido acético, el revelado se llevó a cabo colocando la placa durante 5 minutos a 100°C.

2.2.7.2. OBTENCION DE SAPOGENINAS (HIDROLISIS ACIDA)

Para comenzar con la hidrolisis se pesó 100 mg de saponinas obtenidas anteriormente, luego se le agregó 25 mL de agua destilada, la mezcla se colocó en baño maría hasta que alcanzará 70 °C, luego se añadió 10 mL de ácido clorhídrico concentrado y se llevó a reflujo por 20 minutos, se detuvo la reacción en baño de hielo y se ajustó el pH con hidróxido de sodio al 30% (pH 6.5 - 7.2), se trasvasó el contenido a una pera de decantación y se realizó 3 extracciones sucesivas con 10 mL de cloroformo, la fase clorofórmica se llevó a estufa a 60°C hasta la evaporación completa del solvente, al final el polvo que se obtuvo fueron las sapogeninas. Para confirmar la presencia de sapogeninas se realizó TLC, las medidas de placa fueron 10 cm de largo x 4.4 cm de ancho, con ayuda de los capilares se sembró los estándares de Hederagenina y Acido Oleanólico, y la muestras de sapogeninas de quinoa blanca y roja, la fase móvil en este caso fue Dietil Eter: Cloroformo: Metanol (10:30:1), al terminar la corrida la placa se secó a temperatura ambiente y se reveló los colores con reactivo *Liebermann – Burchard*.

2.2.7.3. CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS MEDIANTE HPLC

2.2.7.3.1. PREPARACION DE PATRONES CROMATOGRAFICOS

Se preparó soluciones stock de los estándares Hederagenina y Acido Oleanólico para ello se pesó 1 mg en balanza analítica, luego se llevó a una fiola de 5 mL y se enrasó con metanol de grado HPLC teniendo una concentración de 200 ppm. A partir de las soluciones anteriores se preparó diluciones para la curva de calibración en una fiola de 2 mL se agregó 20 μ L de la solución de Hederagenina, junto con 20 μ L de la solución de Acido Oleanólico y se enrasó con metanol grado HPLC obteniendo una concentración de 2 ppm en ambos estándares, para tener una concentración de 4 ppm se tomó 40 μ L de HED y la misma cantidad para AO, llevando a una fiola de 2 mL y enrasándolo con el mismo metanol, se realizó concentraciones de 8 ppm, 16 ppm y 32 ppm tomando alícuotas de cada uno de los estándares de 80 μ L, 160 μ L y 320 μ L respectivamente, se ejecutó el mismo procedimiento que los anteriores.

2.2.7.3.2. PREPARACION DE FASE MOVIL Y DESGASIFICACION

Se usó como fase móvil Metanol: Agua Ácida (89:11) para la preparación de agua ácida se tomó con una pipeta 0,5 mL de ácido ortofosfórico y se dispuso en una fiola de 50 mL enrasando con agua ultra pura, luego 0,87 mL de esta solución fue tomada y se llevó a 200 mL de agua ultra pura en una probeta. Se armó un equipo convencional de sistema de vacío para solventes de HPLC, el filtro usado fue una membrana de 0.2 μ m estéril. El metanol $\geq 99\%$ HPLC se filtró con el equipo ya mencionado, se llevó a la botella del solvente para HPLC y está se conectó a la bomba del equipo.

2.2.7.3.3. PREPARACION DEL EQUIPO DE HPLC

Para la preparación del equipo, primero se prendió la computadora, luego se encendió el equipo HPLC *Hitachi Primaide* en el siguiente orden Organizador, Bomba, Muestreador Automático, Horno y finalmente Detector de Arreglos de Diodos, posteriormente se abrió el software *Primaide*.

El software debe de reconocer al equipo es por ello que se selecciona *Module Status* se inicializa, luego de ello se realizó la purga de los canales, en primer lugar se desajusto la válvula de purgado, se seleccionó *Module Detail Information*, pestaña *pump*, click en *purge*, luego se realizó click en el botón *purge on*, iniciando el purgado, se seleccionó cada uno de los canales A-B-C-D se les dio un tiempo de purgado, al acabar esta acción se presionó *purge off* y se cerró la llave de purga. También se purgó la aguja de toma de muestra, en este caso se seleccionó la pestaña *sampler*, luego click en *flush wash port* y por ultimo *ok*.

Las 5 concentraciones explicadas anteriormente fueron vertidas en viales para HPLC de 2 mL, los cuales se coloran en el automuestrador, en esta etapa el equipo estaba adaptado a todas las condiciones para realizar el procedimiento, la inyección de cada una de las muestras fue de 20 μ L a un flujo de 1.5 mL/min. a 20°C durante 10 minutos, la detección de la saponinas (Hederagenina/ Acido Oleanólico) se realizó a una longitud de onda de 210 nm⁽⁸⁵⁾.

2.2.7.3.4. CUANTIFICACION DE LAS MUESTRAS

Se pesó 4 mg del polvo obtenido de la hidrolisis de cada una de las muestras de *Chenopodium quinoa Willd.* y se colocó en 2 mL de metanol, de esta solución se tomó 600 μ L y se diluyó en 2 mL de metanol, se filtró estas muestras con filtros de jeringa de 0.45 μ m estériles y se colocó en viales para HPLC de 2 mL, fueron colocadas en el automuestrador y se cargó el método de “*Saponinas*” el cual cuenta con las condiciones mencionadas anteriormente y se corrió las muestras en el equipo para su análisis.

2.3. ANALISIS ESTADISTICO

El efecto citotóxico de los extractos de *Chenopodium quinoa Willd.* y de los estándares HED. AO, AU, sobre la viabilidad celular por el método MTS, fue evaluado mediante el test de *One-way ANOVA*, las comparaciones entre los controles y los estándares se

determinaron mediante el *test de post hoc Tuckey*, el software usado fue *GraphPad Prism 6*.





CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. OBTENCION DE SAPONINAS

3.1.1. RECOLECCION DE LOS RESIDUOS DEL ESPECIMEN VEGETAL

Para la obtención de la muestra se consultó con diversos productores de quinua, los cuales nos indicaron la presencia de la empresa JIWRA SAC en el distrito de Santa Rita de Sigüas, departamento de Arequipa, dicha empresa cuenta con una autorización sanitaria de establecimiento dedicado al procesamiento primario de alimentos agropecuarios dictada por SENASA (Anexo 1).

JIWRA SAC es una empresa encargada de transformar el grano de quinua en un producto exportable. El proceso comienza con el trillado, el cual consiste en separar el grano de la planta, luego la materia prima es recepcionada para continuar con el zarandeado, en donde un equipo con movimiento vibratorio longitudinal separa el producto con gran eficacia de las impurezas presentes (hojas, basura, etc.), después, la Quinua pasa por un segundo método de limpieza, el despedrado, en donde se eliminan las piedras, posteriormente se realiza el escarificado que consiste en eliminar las saponinas presentes en la quinua, este proceso consta de raspado y pelado del grano en donde se genera un polvillo fino rico en saponinas. Terminado el proceso de limpieza, el grano se lava para lo cual existen dos métodos: el lavado a vapor y el lavado con agua, obteniéndose en cualquiera de las dos opciones soluciones acuosas con saponinas. Luego del lavado se continúa con un secado de aire caliente, se enfría y es a partir de aquí que se realiza una selección de acuerdo a lo solicitado por el cliente, esta solicitud puede implicar un pedido tomando en consideración el tamaño, peso específico o color de grano. Finalmente, se realiza una detección de metales para descartar que algún tipo de metal, que pudo haberse desprendido debido a las vibraciones de las máquinas en algún punto del proceso, se encuentre entre el grano de quinua. Por último, se realiza el empaque y almacenamiento del producto.

Se logró conseguir 5 kg. de polvillo fino de cáscara de dos variedades de quinua (blanca y roja), las cuales fueron trasladadas al laboratorio H-202 ubicado en la

Universidad Católica de Santa María, donde se mantuvieron en un ambiente fresco y oscuro hasta su uso.



Figura 3.1. Polvillo fino de la cáscara de *Chenopodium quinoa Willd.*

3.1.2. EXTRACCION POR PERCOLACION

Para la extracción se pesó 150 gramos de cáscara y se puso en contacto con aproximadamente 200 mL de alcohol etílico absoluto en un percolador casero por 24 horas, 750 mL de extracto etanólico fueron recolectados de cada una de las quinuas, ambos extractos presentaron un color verdoso, aunque la muestra de quinua blanca fue más intensa que la de quinua roja.



Figura 3.2. Extracto etanólico obtenido por percolación.

3.1.3. CONCENTRACION

Se concentró los extractos a sequedad mediante un rotavapor junto con una bomba al vacío, obteniendo un residuo pastoso de color verde intenso en quinua blanca el cual

pesó 7.0888 g, mientras tanto en quinua roja se obtuvo 7.3397 g de concentrado con la misma consistencia que el anterior pero de un color menos intenso.

3.2. DETERMINACION DEL IC50 EN DIFERENTES LINEAS CELULARES

3.2.1 CULTIVO CELULAR

Previo al realizar el pasaje celular, conteo celular, o tratamientos con algún estándar o extracto etanólico, se observaron las líneas celulares bajo el microscopio invertido para garantizar que estas se encontraran aptas. Al observar la línea celular *A549* se pudo notar que las células son de forma poligonal, y están fuertemente adheridas al flask creciendo en monocapa. Sin embargo, en la línea celular *SH-SY5Y* se percibió que estas poseen una morfología neuronal muy característica, además de crecer de forma adherente y en suspensión a la vez, por lo que se decidió tener cuidado al momento de decantar el medio en futuros ensayos.

En el caso de la línea celular *HeLa* se contempló que son células adherentes de tipo fibroblastica con forma triangular alargada, esta línea también crece en forma de monocapa, por último, en la línea celular *HepG2* se notó que contiene propiedades adherentes, crecen como monocapas en pequeños agregados y una morfología de tipo epitelial.

3.2.2 EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD DE DMSO EN LAS LINEAS CELULARES *A549*, *HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y*

Con el método MTS se determinó la viabilidad celular en *A549*, *HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y* frente a los extractos de *Chenopodium quinoa Willd.* y los estándares de sapogeninas, en la Tabla 3.1 describe la solubilidad de las drogas con DMSO. Los datos sobre la solubilidad de las sapogeninas se obtuvieron en las hojas de información al comprarlos, en cuanto a los extractos etanólicos su solubilidad se halló tomando como base la de los estándares.

Tabla 3.1. Solubilidad en DMSO de los estándares de sapogeninas y de los concentrados de Quinoa Blanca y Quinoa Roja.

Solubilidad en DMSO	
Acido Ursólico	27.4 mg/mL
Acido Oleanólico	28.0 mg/mL
Hederagenina	28.4 mg/mL
Quinoa Blanca	22.2 mg/mL
Quinoa Roja	23.3 mg/mL

El DMSO posee un dominio altamente polar y dos grupos metilo apolares, lo que lo hace soluble en medios acuosos y orgánicos, debido a sus propiedades fisicoquímicas, es un solvente muy eficiente para compuestos insolubles en agua^(82,86), asimismo presenta una baja toxicidad, por ello, el DMSO ha sido ampliamente utilizado como disolvente para la disolución de fármacos en muchas investigaciones, así como también para la criopreservación celular debido a sus propiedades de penetración de membrana y desplazamiento de agua⁽⁸⁷⁾. En el presente trabajo, los extractos etanólicos se disolvieron con menos del 5% de DMSO, ya que este compuesto es capaz de disolver tanto componentes polares como no polares^(82,86) y desconociendo la composición exacta de los extractos etanólicos, fue DMSO la mejor opción a pesar de que posee actividad citotóxica. Para garantizar que la cantidad de dimetilsulfóxido utilizada no afecte la viabilidad celular de ninguna de las líneas, se utilizó el método MTS para evaluar las líneas celulares *A549*, *HeLa*, *HepG2*, *SH-SY5Y* cuando se tratan con diferentes concentraciones de DMSO (Tabla 2.1).

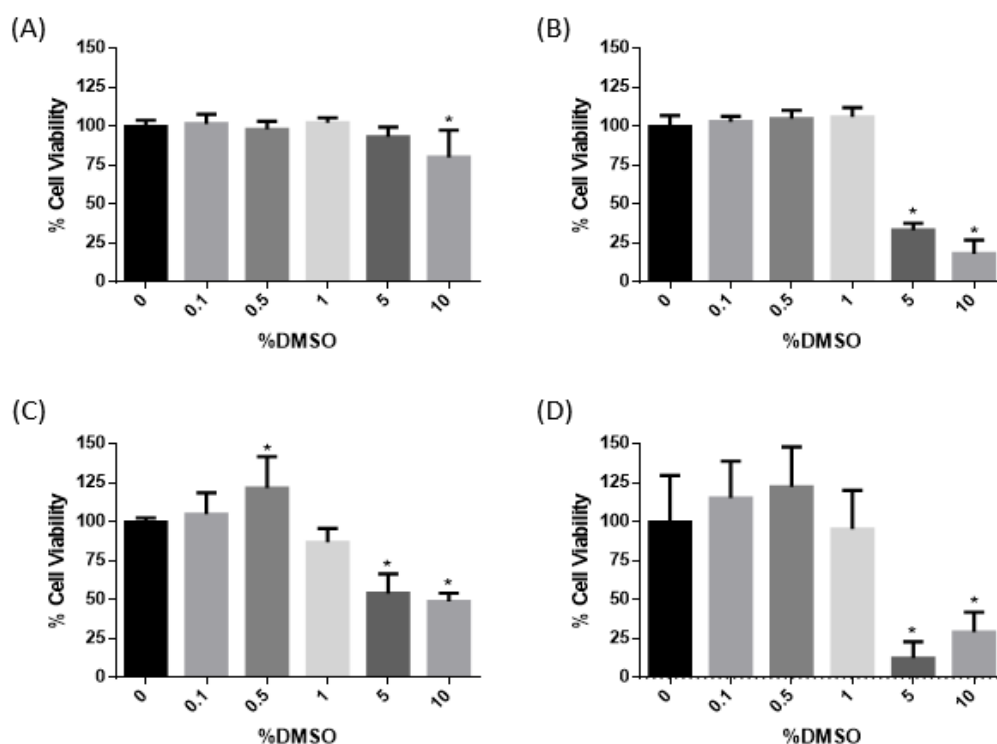


Figura 3.3. Porcentajes de viabilidad celular de *A549* (A), *HeLa* (B), *HepG2* (C), *SH-SY5Y* (D) vs Concentración % de DMSO (0 %-10%).

Tras hacer al análisis estadístico *One-way ANOVA* de los datos obtenidos apartir de las absorbancias (*Tabla anexa 1-4*) se concluyó que al igual que otras investigaciones que el DMSO afecta a las células en concentraciones mayores al 5 %^(86,87), como se observa en la Figura 3.3 la única concentración que tiene un efecto citotóxico significativo sobre la línea celular *A549* es DMSO 10% ($p < 0.002$), asimismo la viabilidad celular de *HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y* se ven afectadas cuando son tratadas con DMSO al 5% y al 10 % ($p < 0.0001$).

3.2.3. VIABILIDAD CELULAR DE LAS LINEAS *Hela*, *HepG2*, *SH-SY5Y* y *A549* AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON EXTRACTOS ETANOLICOS (QUINUA ROJA Y QUINUA BLANCA)

A través del método MTS se comparó la viabilidad de las células *A549*, *HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y* tratadas con extractos etanólicos de Quinoa Blanca y Quinoa Roja cuyas

concentraciones se encuentran en la Tabla 2.1 contra un control negativo (células sin tratar).

Como se representa en la Figura 3.4 – 3.5 y después de haber realizado un análisis con el software computacional estadístico *GraphPad Prism 6*, los resultados demostraron que ninguno de los dos extractos etanólicos reduce la viabilidad celular sobre ninguna de las cuatro líneas celulares *A549*, *HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y* cuando se comparan con el control (0 ppm), por lo que podemos afirmar que tanto el extracto de quinua blanca como roja no poseen efecto citotóxico alguno, futuros ensayos con estos dichos extractos fueron descartados.

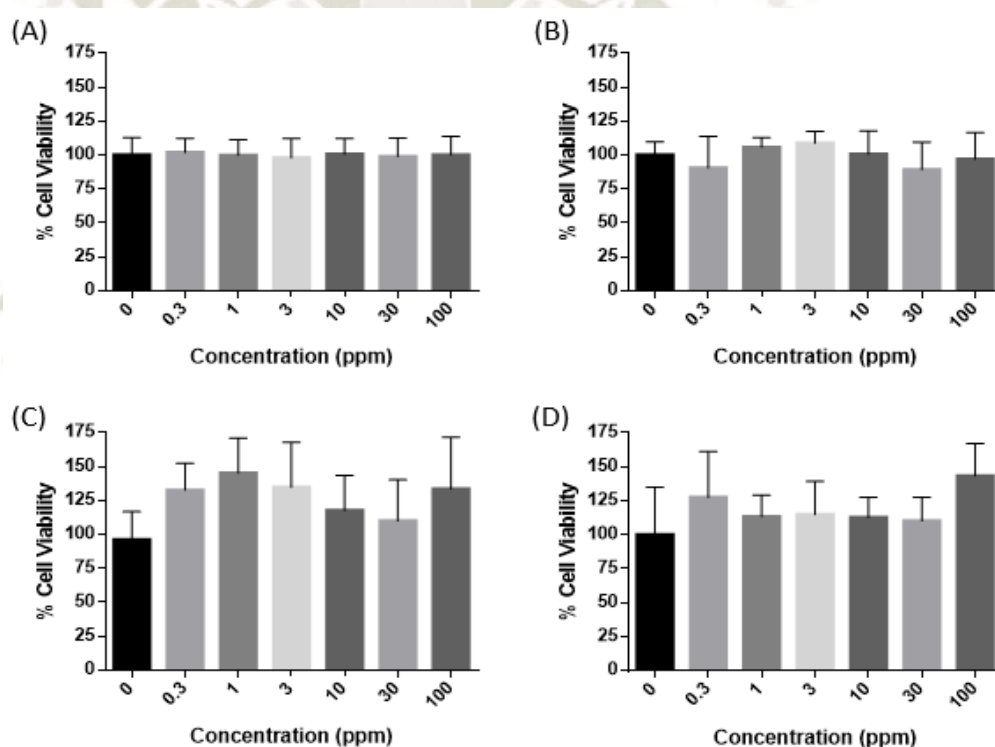


Figura 3.4. Porcentajes de viabilidad celular de *A549* (A), *HeLa* (B), *HepG2* (C), *SH-SY5Y* (D) vs Concentración ppm de extracto etanólico de Quinua Blanca (0 ppm–100 ppm).

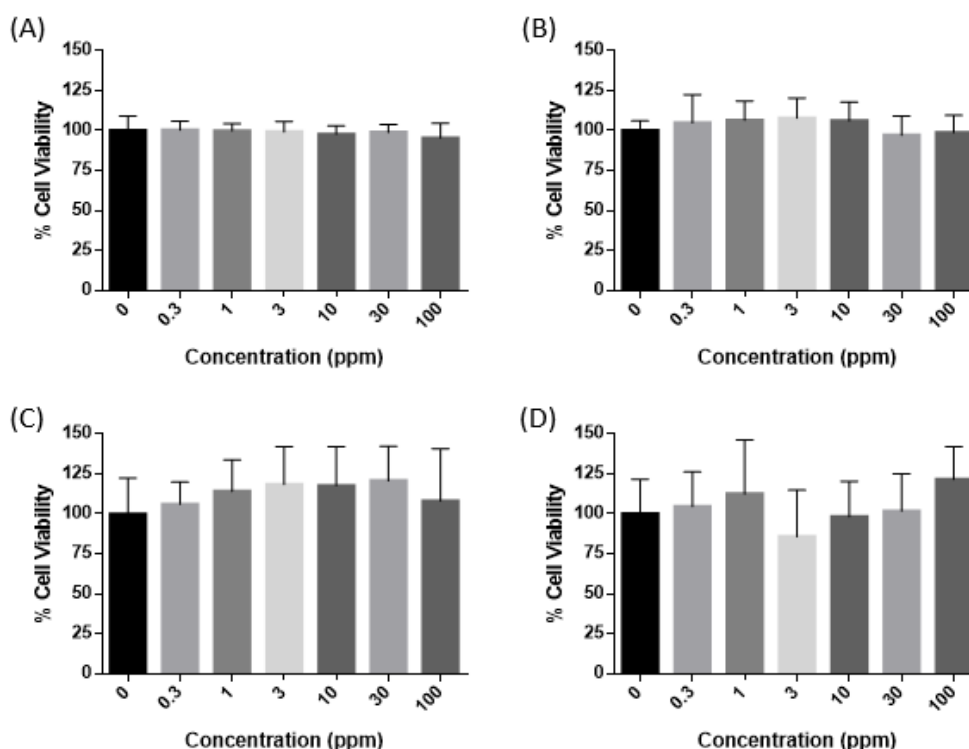


Figura 3.5. Porcentajes de viabilidad celular de *A549* (A), *HeLa* (B), *HepG2* (C), *SH-SY5Y* (D) vs Concentración ppm de extracto etanólico de Quinoa Roja (0 ppm–100 ppm).

3.2.4. RESULTADOS DEL IC50 OBTENIDOS AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON ESTANDARES DE SAPOGENINA (ACIDO URSOLICO) EN LINEAS CELULARES *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y*

Para determinar la viabilidad de las líneas celulares *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y* tratadas con el estándar de sapogenina Acido Ursólico en diferentes concentraciones (Tabla 2.1) su utilizó el ensayo MTS, el procedimiento se describe en el Capítulo 2.

La Figura 3.6. se obtuvo a partir de las absorbancias obtenidas, mostradas en las Tablas anexas 13-16, la imagen representa los porcentajes de viabilidad celular de las líneas *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y* frente al tratamiento con Acido Ursólico a diferentes concentraciones 0 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M y 300 μ M. Como se puede observar en la figura, la línea celular *A549* demostró una viabilidad celular constante, cercana al 100% cuando es tratada con concentraciones menores a 10 μ M,

el cambio se observó a partir de 30 μM , en donde el porcentaje de viabilidad bajo aproximadamente 50% y a partir de 100 μM la viabilidad disminuyó significativamente. Tras el análisis con *GraphPad Prism 6* se observó que a partir de 10 μM la viabilidad de *A549* disminuyó significativamente ($p < 0.0001$), por lo que se puede concluir que a concentraciones de 30 μM , 100 μM y 300 μM de Acido Ursólico son citotóxicas en la línea celular. Por otro lado, el porcentaje de viabilidad celular en *HeLa* se mantuvo constante cuando se trató con 1 μM y 3 μM de Acido Ursólico, el efecto de esta sapogenina empezó a hacerse notar desde la dosis con 10 μM . El tratamiento con la concentración del 10 μM hizo disminuir un 30% la viabilidad celular y concentraciones mayores a 30 μM lograron una disminución casi total. El análisis estadístico arrojó con certeza que las concentraciones de Acido Ursólico 10 μM , 30 μM , 100 μM y 300 μM causan citotoxicidad sobre células *HeLa* pues causaron una disminución significativa en la viabilidad ($p < 0.0001$).

Asimismo, después de realizar el análisis estadístico *ANOVA* de los datos conseguidos a partir de las absorbancias (*Tabla anexa 13 -16*), se concluyó que las células *HepG2* son resistentes al Acido Ursólico cuando son tratadas con concentraciones de 10 μM , 30 μM y 100 μM , la única concentración que demostró un cambio significativo fue 300 μM ($p < 0.0001$). La línea celular *SH-SY5Y* no se vio afectada con concentraciones menores a 3 μM , tras el análisis con el programa *GraphPad Prism 6* se determinó que el Acido Ursólico es citotóxico sobre las células *SH-SY5Y* en concentraciones 10 μM , 30 μM , 100 μM y 300 μM ($p < 0.0001$).

Los resultados presentados en este trabajo son respaldados por investigaciones anteriores en donde se estudió la citotoxicidad del Acido Ursólico frente a diferentes líneas celulares como, la línea celular de cáncer de leucemia humana (*HL-60*); línea celular de cáncer gástrico humano (*BGC-823*); línea celular de cáncer de mama humano (*MDA-MB-435*); línea celular cervical humana (*Hela*) y línea celular de carcinoma hepatocelular humano (*Bel-7402*), en donde se comprobó que esta sapogenina muestra una actividad inhibitoria frente a la viabilidad celular⁽⁸⁸⁾, en otros trabajos se estudió su efecto sobre la línea celular de carcinoma de piel humana (*A431*) y las célula de glioma C6 de ratón, en donde se encontró actividad citotóxica a 10

$\mu\text{M}^{(89)}$, en la línea celular de carcinoma de colon humano (*HCT15*) la viabilidad celular disminuyó significativamente con un IC_{50} de $30 \mu\text{mol} / \text{L}$ ($p < 0.05$)⁽⁹⁰⁾.

Asimismo, en otras investigaciones se hallaron actividades citotóxicas moderadas contra tres células tumorales humanas, línea celular de leucemia humana (*HL-60*), línea celular de cáncer de mama (*MCF-7*), línea celular de cáncer de hígado humano (*HepG2*) con valores IC_{50} de 11.8, 14.9, $27.6 \mu\text{M}$ respectivamente⁽⁹¹⁾.

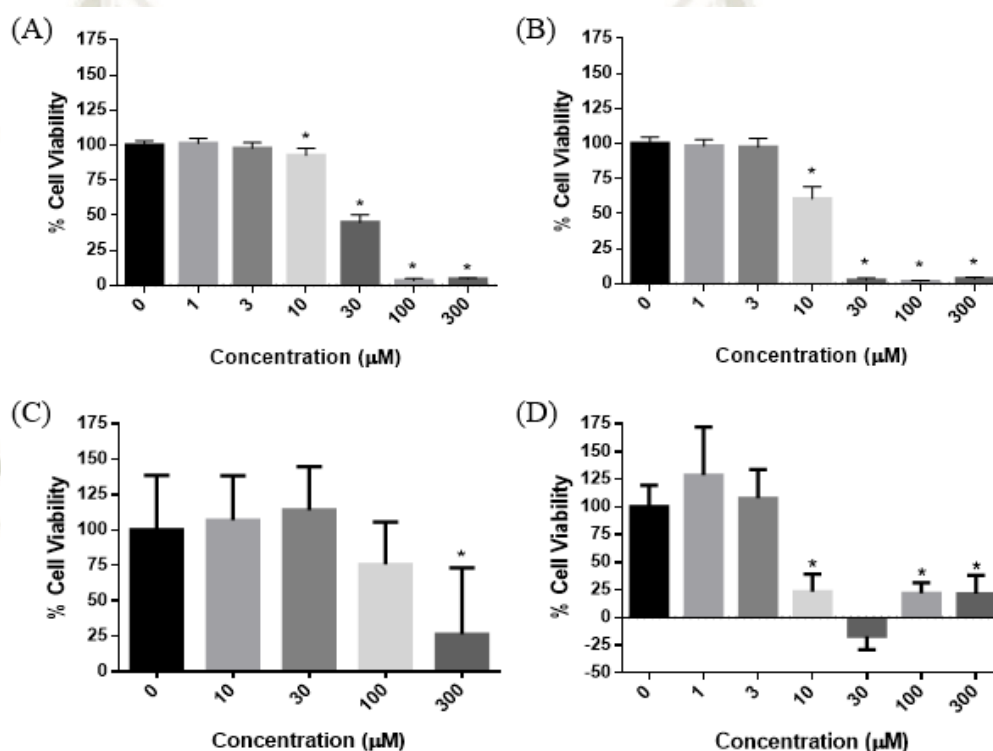


Figura 3.6. Porcentajes de viabilidad celular de *A549* (A), *HeLa* (B), *HepG2* (C), *SH-SY5Y* (D) vs Concentración μM de Acido Ursólico ($0 \mu\text{M}$ - $300 \mu\text{M}$).

La Figura 3.7 muestra las curvas que se obtuvieron al graficar el porcentaje de viabilidad celular contra las concentraciones del tratamiento de Acido Ursólico en escala logarítmica, y los cuatro IC_{50} obtenidos a partir del análisis estadístico. Como se puede observar los IC_{50} de *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y* fueron, 21.9, 11.2, 104.2 y $6.2 \mu\text{M}$ respectivamente. Lo que quiere decir que son estas concentraciones las necesarias para obtener el 50% de células muertas.

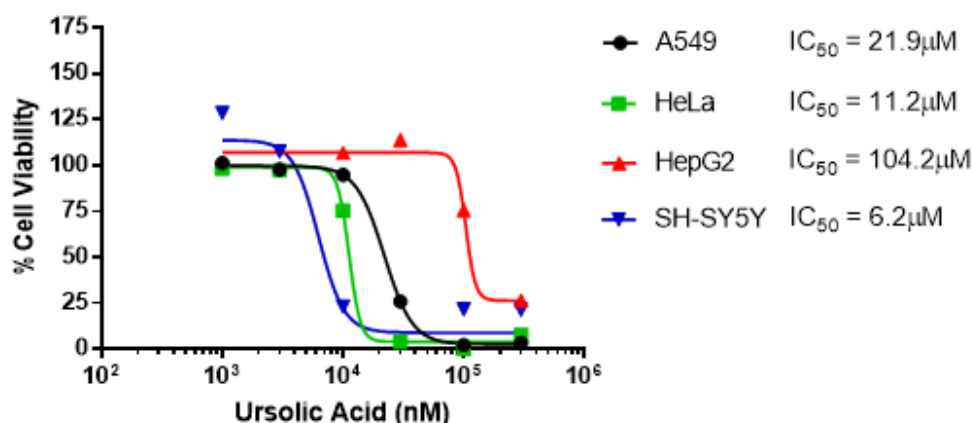


Figura 3.7. Porcentajes de viabilidad celular y Obtención de IC₅₀ de Acido Ursólico sobre las líneas celulares *A549*, *HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y* a escala logarítmica.

3.2.5. RESULTADOS DEL IC₅₀ OBTENIDOS AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON ESTANDAR DE SAPOGENINA (ACIDO OLEANOLICO) EN LINEAS CELULARES *A549*, *HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y*

Se evaluó mediante el ensayo MTS la viabilidad celular de cuatro líneas celulares diferentes frente al estándar de Acido Oleanólico usando diversas concentraciones que van desde 0 μM hasta 300 μM, en la Figura 3.8 se puede observar que concentraciones de 10 y 30 μM de Acido Oleanólico en la línea celular *A549* mantienen una viabilidad celular constante cercana al 100%, sin embargo, cuando se trata con 100 μM el porcentaje de viabilidad celular disminuye a la mitad, asimismo con 300 μM se observa que la mencionada tiene un descenso cerca del 95%. Con ayuda del software *GraphPad Prism 6* se concluyó que Acido Oleanólico 100 y 300 μM produce citotoxicidad en esta línea celular puesto que la viabilidad disminuyo de manera significativa ($p < 0.0001$).

De forma similar se analizó la viabilidad celular que presenta *HeLa* frente a Acido Oleanólico, siendo concentraciones de 10 y 30 μM las que no muestran cambio con respecto al porcentaje de viabilidad, pero es a partir de 100 μM que esta disminuye hasta 25% y existe un descenso drástico usando la concentración de 300 μM, es por ello que se concluyó con ayuda estadística de que la viabilidad disminuyo significativamente ($p < 0.0001$) con las dos últimas concentraciones usadas. Por otro

lado se observa que concentraciones de 10, 30 y 100 μM de Acido Oleanólico no causan citotoxicidad en células *HepG2*, siendo 300 μM la única concentración que causa una reducción de casi 50% sobre su viabilidad, tras el análisis con *GraphPad Prism 6* se determinó que la línea celular *HepG2* se ve afectada en su porcentaje de viabilidad celular cuando esta expuesta a 300 μM de Acido Oleanólico ($p < 0.0001$). Las concentraciones de 10 μM , 30 μM , 100 μM y 300 μM también fueron usadas en la línea celular *SH-SY5Y* donde todas ellas mediante un análisis de dosis vs respuesta demostraron causar una disminución significativa en la viabilidad ($p < 0.0001$), siendo la concentración de 100 μM la que produce un mayor descenso en la viabilidad celular de casi 80%.

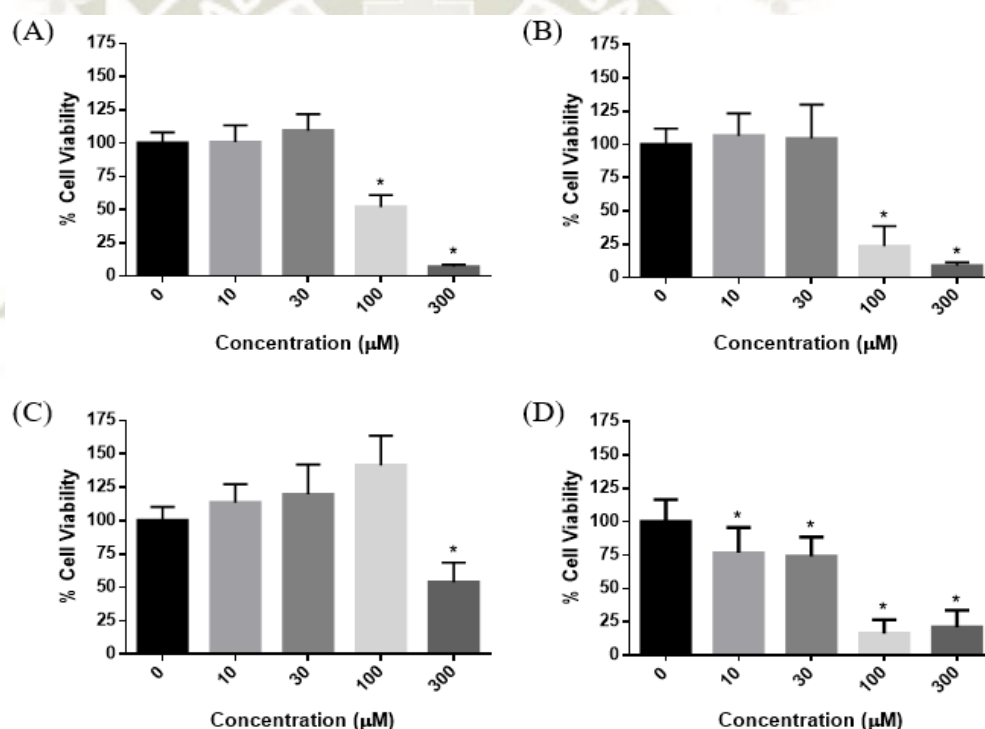


Figura 3.8. Porcentajes de viabilidad celular de A549 (A), HeLa (B), HepG2 (C), SH-SY5Y (D) vs Concentración μM de Acido Oleanólico (0 μM -300 μM).

Se informó que esta sapogenina exhibe actividad citotóxica contra una serie de líneas celulares tumorales, incluyendo células de cáncer de ovario, cerebro, colón, mama y células de melanoma, siendo más específicos en líneas celulares como; *H460* (células no pequeñas de cáncer de pulmón), *Huh7* (células de carcinoma hepatocelular humano)

HL-60 (células de leucemia promielocítica aguda) *P3HR1* (células de linfoma de Burkitt)⁽⁹²⁾.

Existen registros en previas investigaciones donde se ha demostrado que el valor IC_{50} para Acido Oleanólico en un cultivo de células humanas diploides compuesta de fibroblastos (*MRC-5*) es de 643 μM , en cambio para la línea celular de cáncer humano gástrico (*AGS*) necesita una concentración de 182 μM ⁽⁹³⁾, la viabilidad celular decreció de manera significativa a una concentración de 60 $\mu mol/L$ en la línea celular de carcinoma de colon humano (*HCT15*)⁽⁹⁰⁾ y para lograr obtener el 50% de células muertas con *HepG2* se necesitó usar una concentración de 48 μM ⁽⁹¹⁾.

Se muestra las curvas de porcentaje de viabilidad celular contra las concentraciones del tratamiento de Acido Oleanólico en escala logarítmica en la Figura 3.9, además de los cuatro IC_{50} obtenidos en el análisis estadístico. Se determinó que las concentraciones las necesarias para conseguir la mitad de células muertas en *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y* fueron, 98.9, 83.6, 408.3 y 34.1 μM respectivamente.

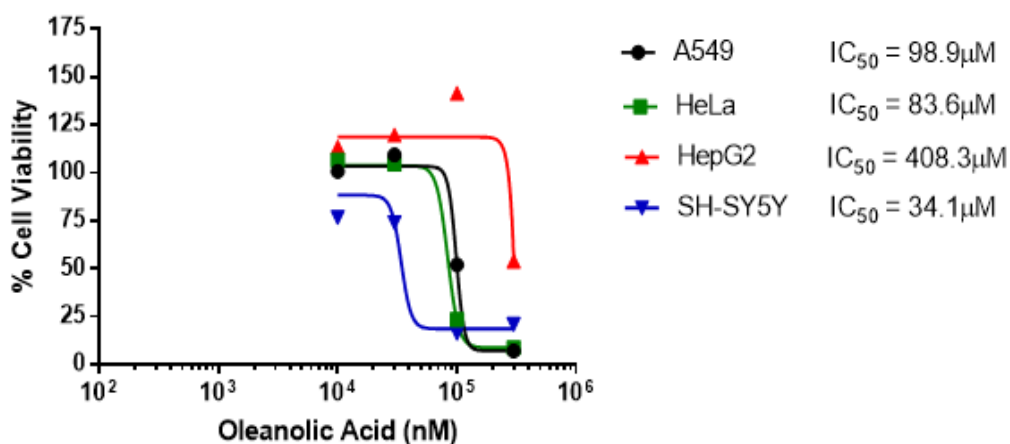


Figura 3.9. Porcentajes de viabilidad celular y Obtención de IC_{50} de Acido Oleanólico sobre las líneas celulares *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y* a escala logarítmica.

3.2.6. RESULTADOS DEL IC₅₀ OBTENIDOS AL APLICAR EL TRATAMIENTO CON ESTANDAR DE SAPOGENINAS (HEDERAGENINA) EN LINEAS CELULARES *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y*

La viabilidad de las células *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y* fue determinada con el ensayo MTS luego de que fueron tratadas con diferentes concentraciones de Hederagenina (Tabla 2.1), tras un análisis *ANOVA* de los resultados obtenidos después de conseguir las absorbancias (Tablas anexas 21-24) se llegó a la conclusión de que concentraciones mayores a 100 μM causan un efecto citotóxico sobre la mayoría de las células ya mencionadas.

La Figura 3.10 describe el comportamiento de la línea celular *A549* frente a dosis de 0 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM y 300 μM de esta sapogenina. Como se puede observar, concentraciones iguales o menores a 30 μM no demuestran ser citotóxicos, sin embargo cuando se aplicó una concentración de 100 μM la viabilidad celular disminuyó más del 50% y con 300 μM la viabilidad se redujo casi en su totalidad (más del 90%), luego del análisis con el programa estadístico *GraphPad Prism 6* se concluyó que la sapogenina Hederagenina tiene un comportamiento citotóxico sobre células *A549* a concentraciones mayores a 100 μM ($p < 0.0001$). Por otro lado las líneas celulares *HeLa* y *HepG2* demostraron igual sensibilidad bajo concentraciones de 100 y 300 μM ($p < 0.0001$) y la viabilidad de las células *SH-SY5Y* bajó a partir de una dosis de 30 μM ($p < 0.0001$).

Estos resultados demuestran que Hederagenina si posee una actividad citotóxica, sin embargo este comportamiento no sólo es exclusivo sobre las líneas celulares estudiadas en este trabajo. En anteriores investigaciones la capacidad citotóxica de Hederagenina fue evaluada sobre carcinoma de células escamosas hipofaríngeas (*SNU-1041*), carcinoma de células escamosas laríngeas (*SNU-1066*) (*SNU-1076*)^(94,95) en donde la actividad citotóxica fue significativa, así como las células de cáncer de colon humano (*LoVo*) en donde se halló una disminución significativa de la viabilidad celular, el IC₅₀ para Hederagenina en las células *LoVo* fue de 1.39 μM ⁽⁹⁶⁾, en la línea

celular de leucemia promielocítica caucásica humana (*HL60*), línea celular de macrófagos humanos (*U937*), línea celular de leucemia linfocítica de ratón (*L1210*), línea celular de cáncer de hígado humano (*HepG2*), adenocarcinoma de ciego (*SNU-C5*), línea celular de linfoma de ratón (*P388*), en donde luego de un tratamiento con Hederagenina los IC_{50} fueron de 42.6, 19.3, 49.4, 8.9, 42.8, 61.0 μM respectivamente⁽⁹⁷⁾. Adicionalmente al igual que nuestro trabajo la línea celular *A549* fue evaluada y se observó que Hederagenina causó la muerte celular del 99.1% en las células cuando fueron tratadas con 100 μM ⁽⁹⁸⁾.

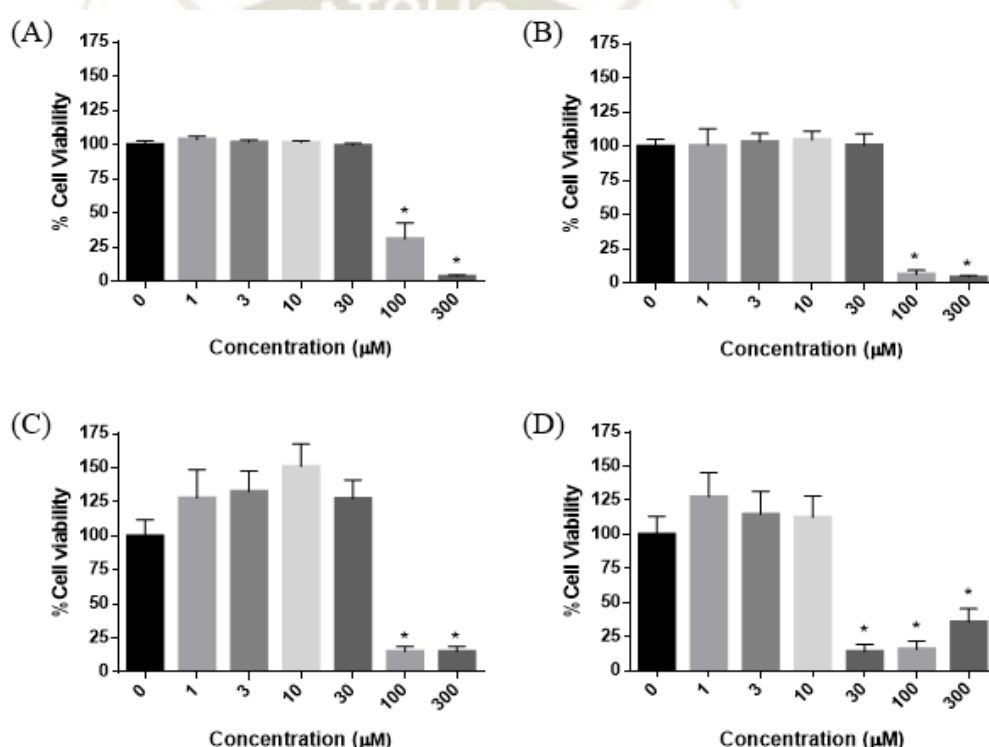


Figura 3.10. Porcentajes de viabilidad celular de *A549* (A), *HeLa* (B), *HepG2* (C), *SH-SY5Y* (D) vs Concentración μM de Hederagenina (0 μM -300 μM).

La Figura 3.11 muestra las curvas que se obtuvieron al graficar el porcentaje de viabilidad celular contra las concentraciones del tratamiento de Hederagenina en escala logarítmica, y los cuatro IC_{50} obtenidos a partir del análisis estadístico *ANOVA*. Como se puede observar los IC_{50} de las células *A549*, *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y* fueron, 78.4, 56.4, 40.4 y 12.3 μM respectivamente. Lo que quiere decir que estas concentraciones son las necesarias para obtener el 50% de células muertas.

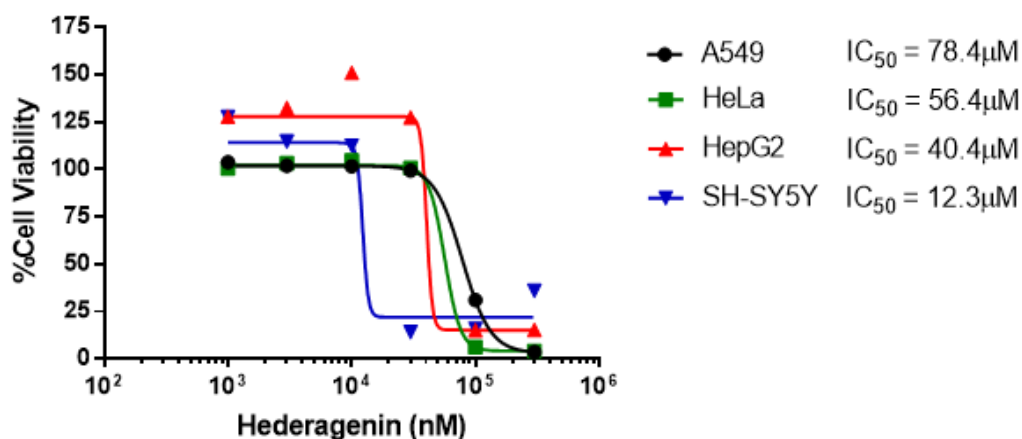


Figura 3.11. Porcentajes de viabilidad celular y Obtención de IC₅₀ de Hederagenina sobre las líneas celulares *A549*, *HeLa*, *HepG2* y *SH-SY5Y* a escala logarítmica.

Tabla 3.2. Resumen de los valores crudos de IC₅₀ obtenidos luego del análisis con el programa *GraphPad Prism 6*.

	Acido Oleanólico	Acido Ursólico	Hederagenina
<i>A549</i>	98.9 μM	21.9 μM	78.4 μM
<i>HeLa</i>	83.6 μM	11.2 μM	56.4 μM
<i>HepG2</i>	408.3 μM	104.2 μM	40.4 μM
<i>SH-SY5Y</i>	34.1 μM	6.2 μM	12.3 μM

Tabla 3.3. Concentraciones derivadas del IC₅₀, usadas para el ensayo de Caspasa 3 en cada una de las líneas celulares.

	Acido Oleanólico	Acido Ursólico	Hederagenina
<i>HeLa</i>	100 μM	30 μM	100 μM
<i>HepG2</i>	300 μM	150 μM	100 μM
<i>SH-SY5Y</i>	50 μM	10 μM	20 μM

3.3. ACTIVIDAD DE CASPASA 3

3.3.1. PROTEÍNAS TOTALES

Para determinar la actividad de caspasa en las líneas celulares *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y*, se hicieron una serie de ensayos previos al Kit de Caspasa 3, como se describió en el punto 2.2.5, el primer paso necesario fue cuantificar las proteínas provenientes de los lisados celulares de cada línea, mediante el método BCA, para ello se realizó una curva de calibración con la proteína albumina (estándar de Kit de BCA) con concentraciones de 2000 μM , 1000 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 0 μM (Blanco), las absorbancias se muestran en la Tabla 3.4.

Posteriormente, los cultivos de *Hela*, *HepG2* y *SH-SY5Y* se sometieron a un tratamiento de lisis celular y se determinaron sus respectivas concentraciones proteínicas usando la ecuación encontrada al realizar la curva de calibración (Figura 3.12).

Tabla 3.4. Absorbancias de diversas concentraciones del estándar de BCA.

	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	ABS Corregida	DESVEST, ABS
2000 μM	0.997	0.998	0.995	0.997	0.903	0.002
1000 μM	0.571	0.574	0.575	0.573	0.480	0.002
500 μM	0.352	0.358	0.356	0.355	0.262	0.003
250 μM	0.229	0.222	0.233	0.228	0.134	0.006
125 μM	0.161	0.16	0.16	0.160	0.067	0.001
0 μM	0.09	0.09	0.101	0.094	0.000	0.006

Una curva de calibración fue construida con ayuda de los datos presentados en la Tabla 3.4, las absorbancias corregidas del estándar y las diferentes concentraciones fueron relacionadas para obtener la curva y con ella, una ecuación que se usó para hallar las

concentraciones de las muestras, el coeficiente de correlación alcanzado fue de 0.9981, siendo cercano a 1 por lo que es permisible continuar con los ensayos.

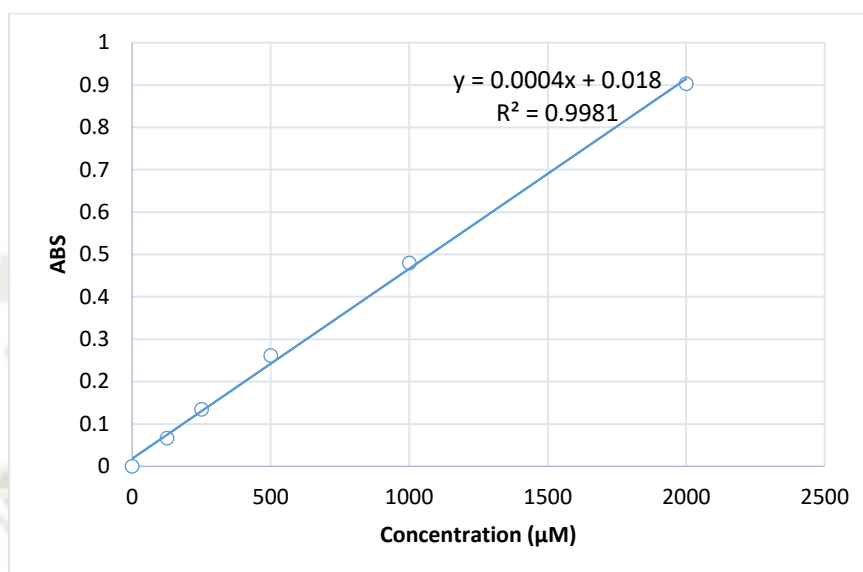


Figura 3.12. Curva de calibración para determinar proteínas totales en lisados celulares realizando ensayo Caspasa 3.

3.3.2. ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LINEAS CELULARES *Hela*, *HepG2*, *SH-SY5Y* y *A549* COMPARADO CON STS

Se realizó una prueba preliminar con el objetivo de evaluar si las cuatro líneas celulares activan la vía de las caspasas al momento de la apoptosis, la prueba y el procedimiento que se realizó se describe a detalle en el punto 2.2.5, las absorbancias obtenidas se normalizaron usando *Microsoft Excel 2013* (Tabla anexa 25). En cada una de las 4 líneas se tuvo un control negativo y un tratamiento con STS (1 μM). Las líneas que demostraron activar la caspasa presentaron una mayor actividad del control positivo al compararlas con las células no tratadas, como se demuestra en la Figura 3.13, la única línea celular en la que no se vio actividad, inclusive cuando fue tratada con concentraciones mayores de STS (100 μM) fue *A549*, por ello se le excluyó de tratamientos posteriores. Por otro lado, las líneas celulares que si presentaron actividad, *SH-SY5Y*, *Hela* y *HepG2*, fueron tratadas con las concentraciones derivadas del IC_{50} obtenido del ensayo de viabilidad celular (Tabla 3.3), con el objetivo de evaluar si el tratamiento con las sapogeninas Acido Oleanólico, Acido Ursólico y Hederagenina activa la vía de las caspasas, como se puede ver en la imagen la única línea celular

que presenta cierta actividad en comparación con el control es *HeLa*, con concentraciones de 100 μM , 300 μM y 100 μM , respectivamente. Las otras líneas celulares, *SH-SY5Y* y *HepG2*, fueron descartadas para posteriores ensayos.

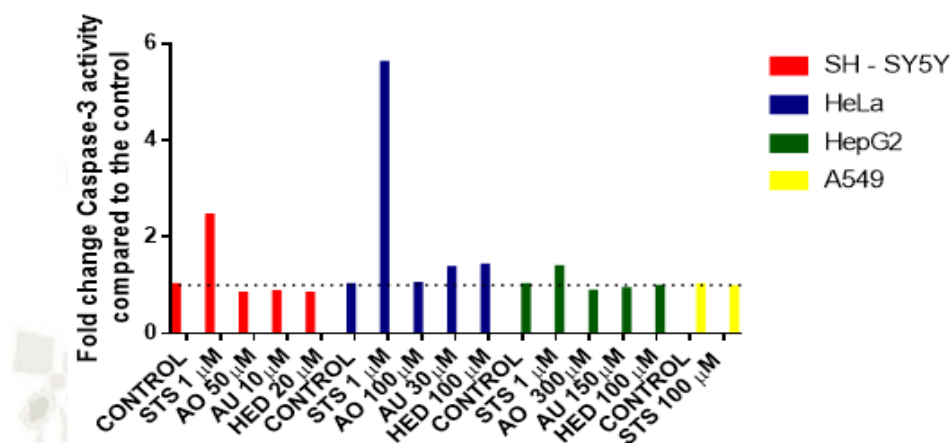


Figura 3.13. Actividad de la Caspasa 3 presente en las líneas celulares *SH-SY5Y*, *Hela*, *HepG2* y *A549* utilizando el IC_{50} de sapogeninas.

3.3.3. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LINEA CELULAR *Hela*

Con el objetivo de evaluar más a detalle la actividad de la caspasa en células *HeLa*, se aumentaron más dosis, las nuevas concentraciones a tratar fueron, 100 μM , y 300 μM de AO, 10 μM , 30 μM , y 100 μM de AU y 50 μM , 100 μM y 300 μM de Hederagenina. Luego del tratamiento se ejecutó un test *One-way ANOVA* con los datos presentados en la Tabla anexa 26. Se realizó una prueba *T-student* desapareada para el desarrollo de la Figura 3.14, en donde se ve un aumento significativo de producción de Caspasa 3 del control positivo (STS) cuando se compara con el control negativo, confirmando así, que este inhibidor potente y no selectivo de las proteínas quinasas induce apoptosis como mecanismo de muerte celular⁽⁹⁹⁾. Asimismo se puede notar cierta actividad con los tratamientos de las tres sapogeninas.

Como se puede observar en la Figura 3.14 la actividad de caspasa del tratamiento con STS (A) frente al control negativo es 5 veces más potente, lo que confirma que este control positivo es efectivo ($p < 0.0002$), por otro lado aunque Acido Oleanólico (B)

presenta una actividad de caspasa dependiente de la concentración de tratamiento, esta no fue intensa ($p < 0.003$). En cuanto a Acido Ursólico (C), sólo la dosis de 100 μM demostró tener una actividad significativa cuando se le compara con el control, finalmente Hederagenina fue la sapogenina que demostró más actividad significativa de caspasa con valor de $p < 0.02$.

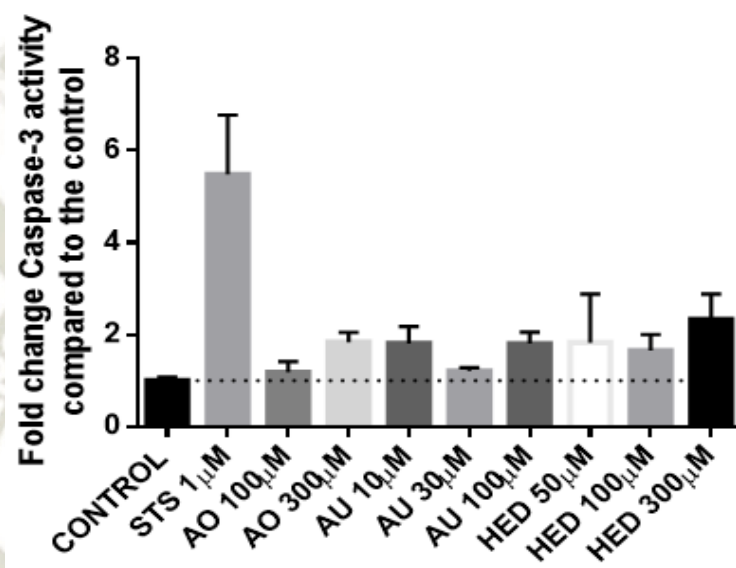


Figura 3.14. Actividad de Caspasa 3 presente en *Hela* utilizando diferentes concentraciones de sapogeninas.

La apoptosis es un proceso suicida que permite a los organismos biológicos destruir células dañadas o no deseadas de manera ordenada, este proceso se acompaña de cambios característicos en la célula, como la condensación de cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos, la degradación del ADN, etc y puede ser activada mediante muchos estímulos, como la abstinencia del factor de crecimiento, la radiación UV, la activación del "dominio de la muerte", tratamiento con hormonas o medicamentos/drogas. Este tipo de muerte celular puede activarse a través de dos vías principales, que requieren la activación de un conjunto de cisteína proteasas denominadas caspasas que tienen funciones críticas en la ejecución de la apoptosis, en particular, Caspasa 3. Como se sabe la activación de Caspasa 3 es un evento central en la apoptosis, pues realiza una serie de principales funciones ejecutoras y es capaz de escindir muchos sustratos celulares importantes, incluida la polimerasa de poli- (ADP-ribosa) (PARP), actina, fodrina, lamina y el inhibidor de CAD, debido a sus múltiples

funciones este particular tipo de caspasa puede realizar el desamblaje total de la célula que conducirá a la inevitable muerte celular. Es por ello que el análisis de la actividad de Caspasa 3 se utiliza ampliamente como una herramienta para detectar la muerte celular programada en varios trabajos^(100,101). Investigaciones anteriores han informado que las células *HeLa* poseen actividad de caspasa luego de inducir muerte celular en ellas con alguna droga, se observó que el tratamiento con oridonina, indujo apoptosis sobre las células *HeLa*, al alterar el equilibrio de la expresión de la proteína Bcl-2 y Bax y al activar de la vía Caspasa-3/ICAD⁽⁹⁹⁾, en otros estudios se aplicaron diversas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 8h, para desencadenar la apoptosis donde se encontró una rápida activación de Caspasa 3, concluyéndose que la apoptosis inducida depende de la activación de la Caspasa 3⁽¹⁰²⁾. Por otro lado, sustancias naturales aisladas de plantas como Shikonin fueron evaluadas sobre *HeLa* en donde luego del tratamiento las células mostraron marcados cambios morfológicos apoptóticos tales como una forma redonda, ampollas de membrana, cuerpos apoptóticos derivados de los núcleos fragmentados y fragmentación del ADN, que se observó por electroforesis en gel, para confirmar la participación de las caspasas en la apoptosis de las células *HeLa* inducidas por Shikonina, se midió la actividad de las proteinasas Caspasa 3 y tras el tratamiento con Shikonina, se pudo observar que la actividad de la caspasa aumentó notablemente dentro de las 12 h posteriores al tratamiento farmacológico⁽¹⁰³⁾. Asimismo la capacidad de varias saponinas para activar la actividad caspasa sobre *HeLa* fue evaluada, las saponinas extraídas de pennogenilo de *Paris quadrifolia*, fueron utilizadas como tratamiento en donde se observaron cambios significativos en el número de células apoptóticas⁽¹⁰⁴⁾, así como las saponinas triterpenoides que fueron extraídas de la familia *Anemone*, estas mostraron ser citotóxicas contra la línea celular *HeLa*, asimismo estas células exhibieron características apoptóticas como, contracción celular, condensación de cromatina nuclear y agregación dentro de la envoltura nuclear. Se evaluó la activación de Caspasa 3 de los compuestos en donde los resultados mostraron una alta actividad comparada con el control ($p < 0.01$)⁽¹⁰⁵⁾. Debido a los datos presentados en este y otros trabajos se puede concluir que las saponinas triterpenoides naturales pueden considerarse estructuras excelentes para el desarrollo potencial de nuevos agentes anticancerígenos.

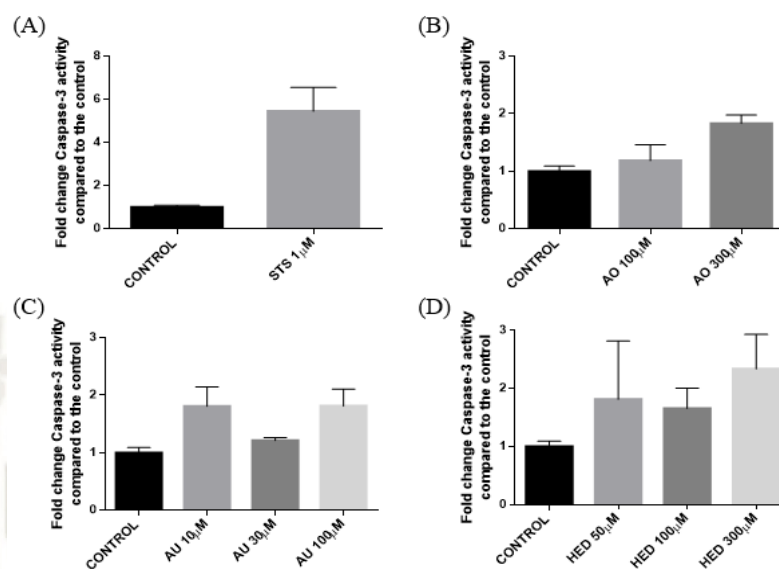


Figura 3.15. Actividad de Caspasa 3 en *HeLa* comparando control negativo (células sin tratar) frente a STS (A), Acido Oleanólico (B), Acido Ursólico (C) y Hederagenina (D).

3.4. HIDROLISIS DE PARP-1 EN CELULAS *HeLa* (WESTERN BLOT)

3.4.1. PROTEINAS TOTALES

Para realizar el ensayo de *Western Blot* en la línea celular *Hela*, primero fue necesario cuantificar mediante el método BCA las proteínas obtenidas luego de aplicar el tratamiento con los estándares a las células (Figura 2.3), para ello se realizó una curva de calibración con el estándar proporcionado en el Kit de BCA a concentraciones de 2000 μM, 1000 μM, 500 μM, 250 μM, 125 μM, 0 μM (Blanco), las absorbancias se muestran en la Tabla 3.5, se determinaron las concentraciones proteínicas usando la ecuación indicada en la Figura 3.16.

Tabla 3.5. Absorbancias de diversas concentraciones del estándar de BCA.

	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	ABS Corregida	DESVEST, ABS
2000 μM	0.994	1.012	0.993	1.000	0.884	0.011
1000 μM	0.583	0.642	0.591	0.605	0.490	0.032

500 μM	0.349	0.365	0.36	0.358	0.243	0.008
250 μM	0.235	0.314	0.238	0.262	0.147	0.045
125 μM	0.159	0.159	0.161	0.160	0.044	0.001
0 μM	0.083	0.085	0.178	0.115	0.000	0.054

La curva de calibración fue construida relacionando absorbancias corregidas del estándar y las diferentes concentraciones usadas del mismo, el coeficiente de correlación alcanzado fue de 0.9952, siendo cercano a 1 por lo que es permisible continuar con el ensayo.

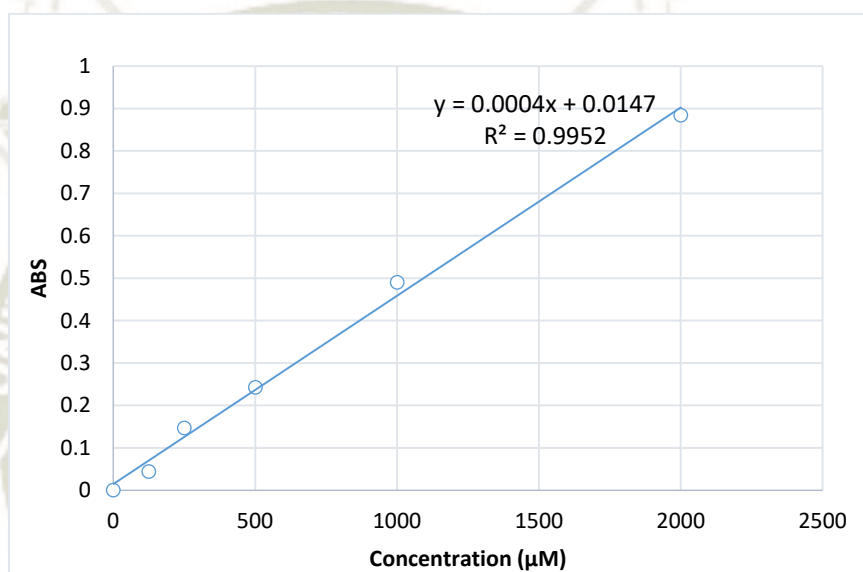


Figura 3.16. Curva de calibración para determinar proteínas totales a usarse en *Western Blot*.

Luego de conseguir la concentración real de proteínas, se procedió a cargar las muestras en el gel, para ello fue necesario que todas se encuentren en la misma concentración proteica; con ayuda de la ecuación 3.1 se halló la cantidad de μL a tomar de muestra para obtener la misma concentración de 20 μg por mL en cada pozo.

$$\mu\text{L}_{\text{demuestra}} = \frac{20\mu\text{g}}{\text{CC. Real}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}}$$

Ecuación 3.1. Proteína a tomar en cada una de las muestras donde “20 μg ” es la cantidad de proteína que debe haber en cada pozo del gel, “CC. Real” es la concentración real hallada en $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 3.6. Volúmenes de muestra y SDS-4x obtenidos de las concentraciones para realizar ensayo de *Western Blot*.

	CC.	CC. Real	20 µg/ mL (µL)	SDS-4x (µL)
Control 5 horas	679.917	2039.750	10	2
STS 5 horas	359.083	1077.250	19	5
Hederagenina 50 µM / 5 horas	1007.417	3022.250	7	2
Hederagenina 100 µM / 5 horas	762.417	2287.250	9	2
Hederagenina 300 µM / 5 horas	474.083	1422.250	14	4
Acido Ursólico 100 µM / 5 horas	653.250	1959.750	10	3
Acido Oleanólico 100 µM / 5 horas	471.583	1414.750	14	4
Acido Oleanólico 300 µM / 5 horas	311.583	934.750	21	5
Control 24 horas	894.917	2684.750	7	2
Hederagenina 50 µM / 24 horas	977.417	2932.250	7	2
Acido Ursólico 100 µM / 24 horas	692.417	2077.250	10	2
Acido Oleanólico 100 µM / 24 horas	909.917	2729.750	7	2
Acido Oleanólico 300 µM / 24 horas	858.250	2574.750	8	2

3.4.2. DETECCION DE LA PROTEINA *Cleaved* PARP-1, PARP-1 Y β-Actina EN LINEA CELULAR *HeLa* TRATADA CON ESTANDARES DE SAPOGENINA POR 5 HORAS

La apoptosis, es un tipo de muerte celular programada esencial para el mantenimiento y la supervivencia homeostática de muchos organismos multicelulares, este proceso controla el número de células, la morfología, elimina las células lesionadas o mutadas, entre otros. La familia más característica de este proceso es la de las cisteinil-aspartato proteasas (caspasas), estas son las responsables de escindir varias proteínas clave necesarias para el funcionamiento celular y la supervivencia. La familia PARP consta de 17 miembros que tienen diferentes estructuras y diversas funciones en las células,

entre ellas es PARP-1, una polimerasa de poli (ADP-ribosa) nuclear de 116 kDa, la principal representante, se describe como una enzima nuclear abundante, con aproximadamente 1 a 2 millones de copias en la célula que representa ~ 85% de la actividad celular total de PARP, es por ello que es frecuentemente analizada debido a sus roles multifacéticos en muchas actividades celulares. La función más conocida de la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) es la reparación rutinaria del ADN cuando sufre daños en respuesta a una variedad de tensiones celulares, mediante la adición de polímeros de poli (ADP-ribosa). La modificación posterior a la traducción que implica poli (ADP-ribosil) acción desempeña un papel central en la homeostasis celular. La escisión de PARP-1 por Caspasa 3 se considera un sello distintivo de la apoptosis, creando 2 fragmentos específicos: un fragmento catalítico de 89 kDa y otro de 24 kDa. Una vez que la caspasa escinde PARP durante la apoptosis, su función de reparación de ADN se ve afectada^(106,107).

Uno de los métodos más utilizados para la identificación de la apoptosis es el análisis de transferencia Western de apoptosis permite la detección y cuantificación de proteínas involucradas en la señalización apoptótica, hay muchas proteínas que pueden ser identificadas mediante *Western Blot*. En la fase temprana de la apoptosis la familia Bcl-2 puede ser analizada (camino intrínseco), en la fase media, la activación de las caspasas puede ser analizada, en el caso del camino intrínseco la actividad del Citocromo c, Caspasa 9, Apaf-1 mientras que en el extrínseco se busca la actividad de Caspasa 3 y Caspasa 7, finalmente en la fase tardía, que se caracteriza por una serie de cambios morfológicos en la célula, el análisis por *Western Blot* implica la detección de proteínas de señalización clave que son responsables de los cambios morfológicos significativos, como PARP-1 que participa en la reparación del ADN en respuesta al estrés ambiental y que durante la apoptosis, es escindida por la Caspasa 3 inactivando su capacidad y haciendo que la muerte celular sea un procesos irreversible, por ello *Cleaved PARP* es un marcador reconocido de señalización apoptótica en el análisis de transferencia Western. En el presente trabajo se realizó la detección de las proteínas *Cleaved PARP-1*, PARP-1 Y β -Actina, para ello una electroforesis de las proteínas en gel de poliacrilamida fue realizada luego de la cuantificación de las proteínas totales, después de la migración de acuerdo al peso molecular, se procedió a realizar la

electrotransferencia hacia una membrana de nitrocelulosa, como se explicó más detalladamente en el punto 2.2.6.3. Al finalizar, la membrana se colocó en un case donde las proteínas fueron reveladas de modo cualitativo mediante tinción con rojo de Ponceau (Figura 3.17).



Figura 3.17. Análisis cualitativo de proteínas con Rojo Ponceau.

Para continuar con el ensayo de *Western Blot*, se incubaron los anticuerpos primario y secundario y el revelador quimioluminiscente fue agregado con el objetivo de detectar las bandas de PARP-1 (peso molecular 113 kDa), *Cleaved* PARP-1 (peso molecular 25 kDa) y un control de carga en este caso se escogió β -Actina (peso molecular 42 kDa). Se determinó el área de cada una de las bandas mediante el software *Image Studio Digits*, luego de que la membrana fuera escaneada (Figura 3.18), los datos se sometieron a un análisis estadístico con el programa *GraphPad Prism 6* y se hicieron gráficos de barras (Figura 3.19), comparando todos los tratamientos con el control, como se hizo en ensayos anteriores y para una mejor interpretación de los resultados, el control fue representado con la unidad, como se puede observar en la imagen.

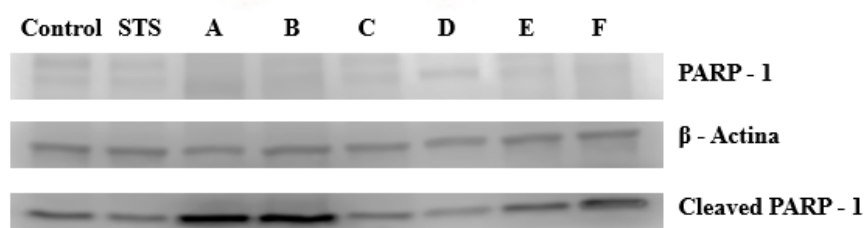


Figura 3.18. Bandas de *Cleaved* PARP-1, PARP-1 Y β -Actina obtenidas a partir de *Western blot* en células *HeLa*, donde A es Acido Ursólico (100 μ M), B es Acido Oleanólico (100 μ M), C es Acido Oleanólico (300 μ M), D es Hederagenina (50 μ M),

E es Hederagenina (100 μ M) y F es Hederagenina (300 μ M) en tratamiento de 5 horas.

Se evaluó la capacidad de inducir apoptosis de Acido Ursólico (100 μ M), Acido Oleanólico (100 μ M y 300 μ M), Hederagenina (50 μ M, 100 μ M y 300 μ M), control positivo que induce apoptosis (STS) y el control negativo (células sin ningún tratamiento). Tanto AU y AO inducen el doble de apoptosis en comparación al control, cuando se utiliza una concentración de 100 μ M sobre células *HeLa*, se llegó a esta conclusión debido a que, según el grafico de barras (Figura 3.19) hubo una mayor detección de *Cleaved* PARP cuando se usó AU y AO a dicha concentración, lo que significa que Caspasa 3 escindió PARP-1 en la fase tardía de la apoptosis. Por otro lado cuando *HeLa* fue tratado con Hederagenina a 100 μ M, presento una actividad apoptótica tres veces mayor a comparación del control, esta fue la mayor actividad encontrada en el estudio, lo que quiere decir que entre todas las sapogeninas estudiadas en el presente trabajo, Hederagenina es la que tiene una mayor capacidad de inducir muerte celular por apoptosis. Con respecto al tratamiento con concentraciones mayores de AO y Hederagenina a 300 μ M que demostraron no tener la misma cantidad de *Cleaved* PARP que cuando se trató con concentraciones menores, puede explicarse debido a que con concentraciones mayores las células pueden optar por provocar otro tipo de muerte celular más agresiva como necrosis.

Diversos estudios han reportado tanto la actividad apoptótica, debido a la escisión de PARP-1 por Caspasa 3, como el papel de PARP-1 en el proceso en células *HeLa*⁽¹⁰⁸⁾, se comprobó la inducción de apoptosis al tratar esta línea celular con un extracto etanólico de *Corallina pilulifera* mediante un estudio de *Western Blot* analizando la expresión de Caspasa 3 y 8, Citocromo c y PARP⁽¹⁰⁹⁾, asimismo se hizo un análisis de transferencia Western para estudiar los efectos de ELY en la expresión de proteínas apoptóticas sobre la línea celular *HeLa* y una tinción de inmunofluorescencia, en donde se comprobó que las proteínas efectoras clave, Caspasa3 y *Cleaved* PARP, se incrementaron mediante el tratamiento⁽¹¹⁰⁾, en otro estudio se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón para analizar la presencia de *Cleaved* PARP mediante un análisis de transferencia Western, cuando *HeLa* fue tratada con elitocina⁽¹¹¹⁾.

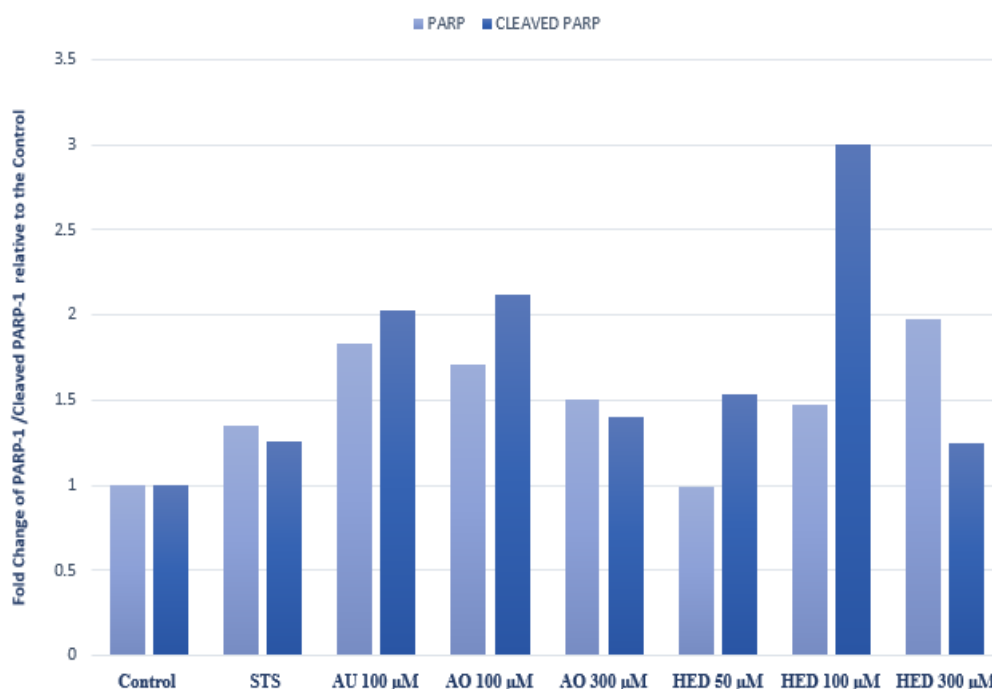


Figura 3.19. Efecto de las Sapogeninas Acido Ursólico, Acido Oleanólico y Hederagenina en la hidrólisis de PARP-1 sobre células *HeLa* por 5 horas, a través del método *Western Blot*.

3.4.3. DETECCION DE LA PROTEINA *Cleaved* PARP- 1, PARP-1 Y β -Actina EN LINEA CELULAR *HeLa* TRATADA CON ESTANDARES DE SAPOGENINA POR 24 HORAS

Del mismo modo, se evaluó la capacidad que posee los estándares de sapogeninas para inducir apoptosis, pero a un tiempo de exposición de 24 horas, posterior al escaneo de la membrana se obtuvieron las bandas de cada marcador molecular (Figura 3.20), se realizó un análisis que ejecutó un gráfico de barras representado en la Figura 3.21, donde se compara cada uno de los tratamientos con el respectivo control de 24 horas, siendo este representado con la unidad.

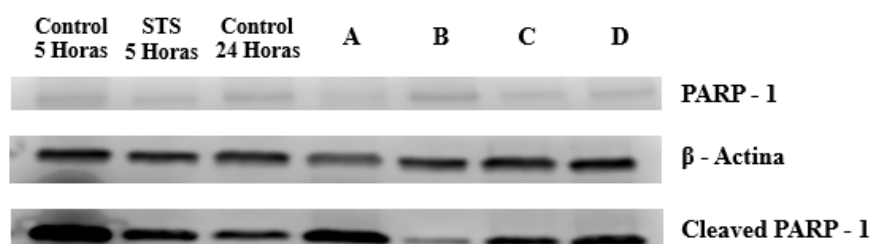


Figura 3.20. Bandas de *Cleaved* PARP-1, PARP-1 Y β -Actina obtenidas a partir de *Western blot* en células *HeLa*, donde A es Acido Ursólico (100 μ M), B es Acido Oleanólico (100 μ M), C es Acido Oleanólico (300 μ M) y D es Hederagenina (50 μ M) en tratamiento de 24 horas.

En esta ocasión se usaron las siguientes concentraciones de las sapogeninas; 100 μ M de Acido Ursólico, 100 μ M y 300 μ M de Acido Oleanólico, 50 μ M de Hederagenina, junto con ellos se analizó el control positivo y negativo de 5 horas, algunas concentraciones usadas con tratamiento a 5 horas fueron excluidas debido a que el tratamiento por 24 horas eliminó a todas las células y no se pudo obtener la cantidad necesaria de proteínas para la prueba. Concentraciones de AO 300 μ M y HED 50 μ M muestran no inducir apoptosis a 24 horas, debido a que a la detección de *Cleaved* PARP es menor al control, tal y como se observa en el gráfico de barras, por otro lado podemos decir que Caspasa 3 escindió PARP-1 con concentraciones de AU y AO a 100 μ M ya que ambos poseen una actividad apoptótica más alta al control negativo y al control positivo (STS).

Se ha confirmado que apoptosis puede ser inducida por la sapogenina Hederagenina en diversos tipos de células cancerosas humanas, activando componentes de la vía de apoptosis intrínseca mediada por mitocondrias, como la polimerasa de poli (ADP-ribosa) escindida (PARP), Caspasa 3 escindida, Caspasa 9 escindida y Bax, e inhibiendo la proteína antiapoptótica Bcl-2. Sin embargo dicha sapogenina no afecta significativamente las proteínas asociadas con la vía de muerte celular extrínseca, como lo es Caspasa 8. En un estudio con células *HNC*, demostraron que Hederagenina 80 μ M con un exposición de 24 h aumentó los niveles de las proteínas proapoptóticas; *Cleaved* PARP, Caspasa-3 escindida y *BAX*⁽⁹⁴⁾.

Con respecto a Acido Oleanólico se informó que puede suprimir la proliferación de células de carcinoma de pulmón a través de la vía *miR-122/cyclin G1/MEF2D*, inhibe carcinoma hepatocelular a través de la detención del ciclo celular mediada por ERK-p53 y la apoptosis dependiente de mitocondrias. PARP puede activarse en células que experimentan estrés y/o daño en el ADN, agotando el trifosfato de adenosina en la célula y eventualmente induciendo apoptosis, esto fue lo que pasó cuando se trató con AO en células de cáncer de vesícula biliar humana (*GBC-SD* y *NOZ*)⁽¹¹²⁾.

La evidencia previa muestra que el Acido Ursólico induce apoptosis en varios tipos de cáncer, como el cáncer de colon, el cáncer de mama, leucemia, melanoma y cáncer de próstata^(113,114), aunque en un estudio con células de cáncer de próstata (*PC-3*) mostró que el AU activó Caspasa 9 y 3 y *Cleaved* PARP lo que implica que esta sapogenina induce apoptosis por vía dependiente mitocondrial⁽¹¹³⁾.

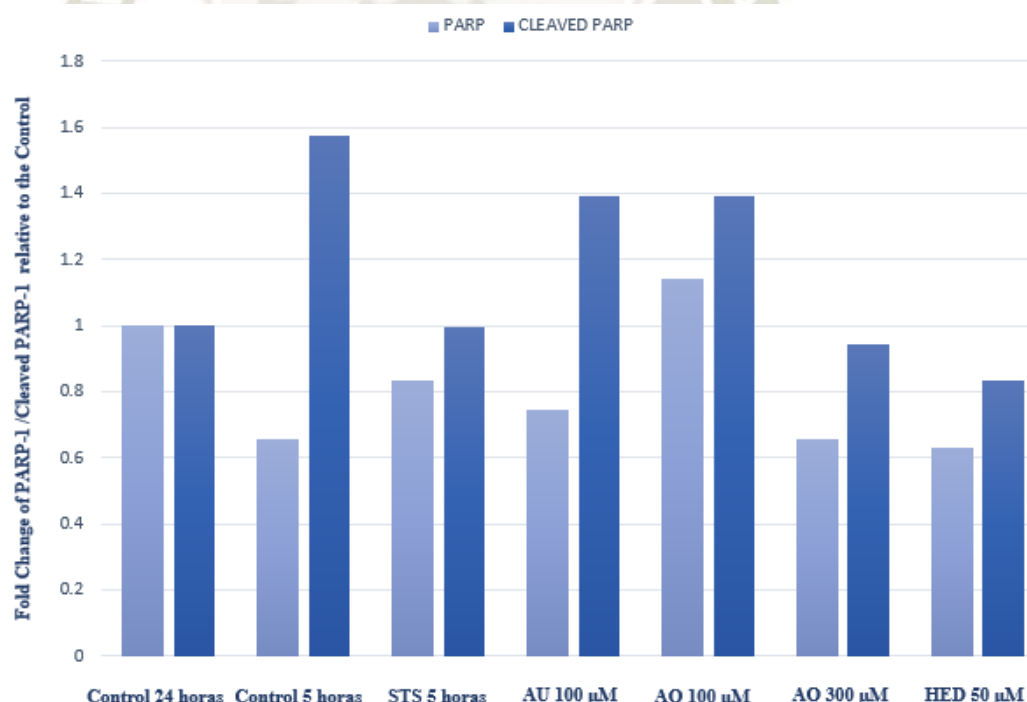


Figura 3.21. Efecto de las Sapogeninas Acido Ursólico, Acido Oleanólico y Hederagenina en la hidrólisis de PARP-1 sobre células *HeLa* por 24 horas, a través del método *Western Blot*.

3.5. PURIFICACION Y CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS

3.5.1. OBTENCION DE SAPONINAS

Para obtener saponinas se utilizó la extracción líquido- líquido con solventes, primero, 5 gramos del concentrado de la muestra vegetal, que se obtuvo del rotavapor, se pesaron y se mezclaron con 15 mL de agua destilada para el proceso de sonicación, posteriormente este contenido se colocó en una pera de decantación donde se realizaron los siguientes pasos; 3 extracciones continuas con de 10 mL de cloroformo cada una, recuperándose la fase acuosa, se continuó con 3 extracciones seguidas utilizando 10 ml de acetato de etilo, eliminando la fase oleosa y por último se realizaron tres extracciones con 1-butanol eliminándose la fase acuosa. Se recolectó la fase oleosa y se llevó a estufa por 24 horas a 90°C hasta sequedad completa, luego el polvo obtenido fue disuelto con 10 mL de NaOH al 1%, y se procedieron a realizar 3 extracciones más con 5 mL de 1-butanol, la fase superior se recuperó la cual fue llevada a estufa a 90°C hasta que el líquido estuviera completamente seco, obteniendo saponinas purificadas, ambos concentrados (de Quinoa Blanca y de Quinoa Roja) se sometieron al mismo procedimiento.



Figura 3.22. Saponinas extraídas provenientes de Quinoa Blanca y Quinoa Roja a partir del método de extracción líquido-líquido.

De los 5 gramos de concentrado que se tomaron para hacer la extracción se obtuvieron, 0.1133 gramos de saponina proveniente del concentrado de Quinoa Blanca

(rendimiento de 2.3%) y 0.2577 gramos de saponina procedente del concentrado de Quinua Roja (rendimiento de 5.2%).

Para verificar si la extracción para obtener saponinas fue exitosa, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC). Para ello se preparó una placa de silica gel de 10 cm de largo x 1.5 cm de ancho, las saponinas de cada muestra fueron sembradas por capilaridad, luego esta se metió en una cuba que contenía la fase móvil, compuesta por Cloroformo: Metanol: Agua (70:44:10)⁽¹¹⁵⁾, la fase móvil se colocó en la cuba cromatográfica por lo menos 15 minutos antes para poder saturarla. Acabando la corrida se secó a temperatura ambiente, se leyó bajo luz ultravioleta a 254 nm y a 366 nm, para posteriormente ser revelada con el reactivo *Liebermann – Burchard*.

Se siguió lo estipulado en el libro *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, el cual indica que se puede usar *Liebermann – Burchard* como indicador de saponinas⁽¹¹⁶⁾, se observa en la placa luego de ser revelada diferentes manchas a lo largo de la corrida, esto es indicativo de que nuestras muestras presentan diversos compuestos, lo cual significa que no se encuentran purificadas, aun así se puede observar a 4.6 cm de haber iniciado la corrida de las muestras, una mancha de color rosa-violeta para quinua blanca, y un color violeta intenso para quinua roja, esto hace referencia a que la muestra es una saponina triterpenoide, pues el reactivo se torna a color rosa a violeta con triterpenoides, por otro lado el reactivo torna a color verde si son esteroidales⁽¹¹⁷⁾. La placa fue expuesta a 254 nm siendo una longitud de onda apta para observar las bandas, otra manera de afirmar su presencia es al exhibir la placa a una longitud de 366 nm pues se conoce que las saponinas no se revelan al estar expuestas a esta luz (Figura 3.23, imagen C), si es que antes las muestras no pasan por un proceso como derivatización^(118,119), es así que las mismas bandas coloridas que se observan en la imagen A y B no pueden ser observadas en la imagen C, tanto para quinua blanca y quinua roja. El Rf obtenido para Quinua Blanca fue de 0.46 mientras tanto para Quinua Roja fue de 0.58.

TLC se ha usado como primer filtro para identificar presencia de saponinas es por ello que Kuljanabhagavad T. y colaboradores usaron una fase móvil compuesta por

Cloroformo:Etanol: Agua (4:2:0.4) para identificar 20 saponinas triterpénicas aisladas de diversas partes de la planta de quinua⁽¹³⁾. Asimismo en un estudio con *Chenopodium quinoa Willd.* realizada por Kim G. Ng y colaboradores utilizaron como fase móvil Metanol:Agua (2:1), identificando presencia de Acido Fitolacagénico y Acido Oleanólico en la primera mancha corrida en la placa, teniendo un Rf de 0.08, la segunda con un Rf = 0.14 fue determinada como saponina derivada de Hederagenina, una muestra con un Rf de 0.27 fue reconocida como una saponina que en su composición química presentaba como aglicón a Acido Oleanólico⁽¹²⁰⁾.

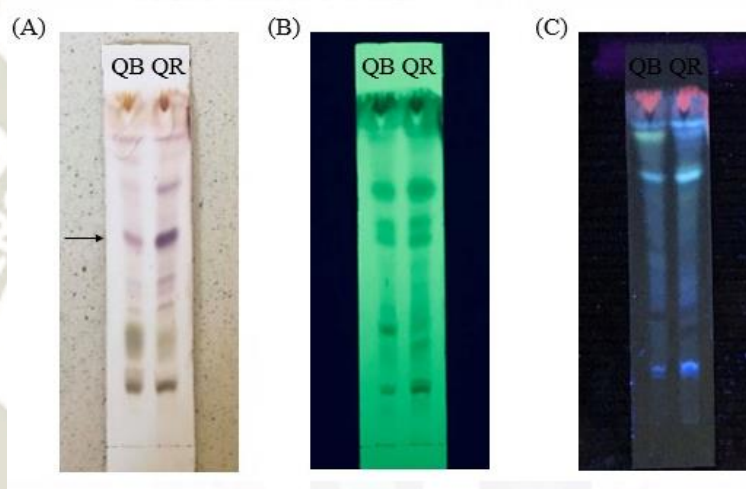


Figura 3.23. Placas de cromatografía en capa fina (TLC) comparando las muestras de saponina provenientes de Quinua Blanca y Quinua Roja, al ser reveladas con reactivo *Liebermann – Burchard* (A), visualizadas bajo luz ultravioleta a 254 nm (B) y bajo luz ultravioleta a 366 nm (C).

3.5.2. OBTENCION DE SAPOGENINAS

Se realizó una hidrólisis ácida para obtener sapogeninas para ello se pesaron por separado 100 mg de saponinas provenientes de Quinua Roja y Blanca, cada una fue disuelta en 25 mL de agua destilada, se calentó en baño maría y posteriormente se añadió 10 mL de ácido clorhídrico concentrado y se reflujo por 20 minutos, después de detener la reacción se ajustó el pH con hidróxido de sodio al 30%, finalmente en una pera de decantación se realizaron 3 extracciones sucesivas con 10 mL de cloroformo, siendo la fase clorofórmica la que se llevó a estufa hasta la evaporación

completa del solvente, dejando un polvo remanente que son identificadas como saponinas, ambas saponinas de quinua blanca y quinua roja se cometieron a este procedimiento .

De los 100 miligramos de saponinas usados para la hidrólisis se obtuvo 0.0841 gramos de saponina procedente del polvo obtenido en la partición de Quinoa Blanca (rendimiento de 84.1%) y en el caso de Quinoa Roja se produjo 0.0706 gramos de saponina (rendimiento de 70.6%).



Figura 3.24. Saponinas extraídas provenientes de Quinoa Blanca y Quinoa Roja a partir del método de la hidrólisis ácida.

Para ratificar la presencia de saponinas se realizó TLC, se preparó una placa de silicagel donde primeramente se sembraron los estándares de AU, HED, AO, seguido del polvo obtenido de la hidrólisis de cada una de las quinoas, la fase móvil a usar fue Dietil Eter: Cloroformo: Metanol (10:30:1), terminada la corrida se reveló con *Liebermann – Burchard*.

En la Figura 3.25 se observa una primera mancha con un tono bajo violeta perteneciente al estándar de Acido Ursólico, con un $R_f = 0.66$, contigua a esta se encuentra Hederagenina presentando un color violeta, su R_f es 0.375, el ultimo estándar, Acido Oleanólico posee las mismas características colorimétricas que las otras saponinas triterpénicas, pero con un $R_f = 0.66$. Se puede observar que la corrida de las muestras de quinua presenta 3 manchas cada una, las manchas más alejadas a la línea base coinciden con las manchas de AU y AO presentando un color

rosado-violeta, las manchas en el medio concuerdan con la misma altura que presenta HED aunque a diferencia de las anteriores estas tienen un tono ligeramente más fuerte, las últimas manchas no fueron identificadas, pero se presume que puedan ser otra sapogenina que también está presente en la Quinoa, Acido Serjánico o Acido Fitolacagénico. Los valores de Rf de Hederagenina y Acido Oleanólico en Quinoa Roja fueron de 0.38 y 0.66 respectivamente, asimismo los Rf de Hederagenina y Acido Oleanólico en Quinoa Blanca fueron 0.38 y 0.67 respectivamente. En una investigación previa donde dispusieron usar TLC para identificar Acido Ursólico en *Verbena officinalis*, observaron la presencia de una mancha violeta para AU⁽¹²¹⁾, del mismo modo, para identificar Acido Oleanólico en *Forsythia suspensa Vahl* usaron el revelador *Liebermann – Burchard*, este mostró una mancha de color rosa, la cual coincide con la mancha del estándar que usaron⁽¹²²⁾, y en el caso de Hederagenina, Naidu indica en su libro, que al ser revelada esta sapogenina con el revelador ya mencionado presentará un color que ira desde rosa hasta violeta, característico de saponinas triterpenoides⁽¹²³⁾.

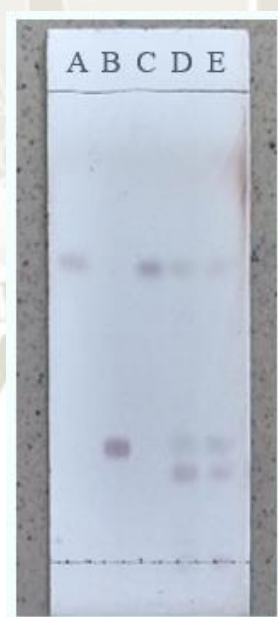


Figura 3.25. Placa de cromatografía en capa fina (TLC) comparando los estándares de (A) Acido Ursólico, (B) Hederagenina, (C) Acido Oleanólico vs las muestras de sapogenina provenientes de (D) Quinoa Roja y (E) Quinoa Blanca, en el respectivo orden, luego de aplicar el revelador *Liebermann – Burchard*.

3.5.3. CUANTIFICACION DE SAPOGENINAS MEDIANTE HPLC

Para empezar con el ensayo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se preparó soluciones stock de Hederagenina y Acido Oleanólico a una concentración de 200 ppm cada una, posteriormente se preparó 5 diluciones para cada una de las sapogeninas (Tabla 3.7), asimismo se prepararon las muestras para correrlas en el equipo, para ello se disolvió 4 mg del polvo obtenido a partir de la hidrolisis de saponinas de cada una de las quinuas en 2 mL de metanol, se tomaron 600 μ L de lo preparado y se diluyó nuevamente en 2 mL de metanol, antes de colocar las muestras en los viales se filtraron con ayuda de una jeringa de vidrio, durante todo el desarrollo del experimento se usó metanol $\geq 99\%$ HPLC.

Tabla 3.7. Concentraciones de los estándares.

Estándar Hederagenina / Acido Oleanólico	Volumen de alícuota	Concentración
Solución stock	---	200 ppm
1	320 μ L	32 ppm
2	160 μ L	16 ppm
3	80 μ L	8 ppm
4	40 μ L	4 ppm
5	20 μ L	2 ppm

La fase usada fue Metanol: Agua Ácida (89:11), para la preparación de agua ácida se diluyó ácido ortofosfórico en agua ultrapura, como se describió en el punto 2.2.7.3.2, se armó un equipo convencional de sistema de vacío para solventes de HPLC para filtrar el metanol $\geq 99\%$ HPLC, se realiza este proceso antes de comenzar la corrida para evitar impurezas que puedan estar presentes en el solvente, remover partículas inertes, al mismo tiempo se desgasifica evitando gases disueltos en la fase móvil pues pueden producir liberación de burbuja en el cabezal de la bomba, pérdida de sensibilidad en los detectores de fluorescencia y oxidación de los analitos.

Las diluciones de los estándares fueron vertidas en viales para HPLC de 2 mL, una vez ubicadas en el automuestrador, se inició el método programado el cual indicaba que debía cargar hacia la columna 20 μ L por cada uno de los viales y comenzar una corrida de 10 minutos a una temperatura de 20°C con un flujo de 1.5 mL/min, se realizó dicha corrida por triplicado a cada una de las concentraciones mencionadas en la Tabla 3.7, se utilizó una longitud de onda de 210 nm para la detección de Hederagenina y Acido Oleanólico.

Tabla 3.8. Condiciones del método usado en HPLC.

Fase Estacionaria	Columna GOLD Hypersil-5 μ m
Fase Móvil	89% metanol / 11% agua ácida
Flujo	1.5 mL/min
Longitud de Onda	210 nm
Temperatura de la columna	20°C
Volumen de inyección	20 μ L
Numero de repeticiones	3
Tiempo de retención	Hederagenina: 2.8 min Acido Oleanólico: 4.8 min
Ruido	1 min
Tiempo total de corrida	10 min

Como se mencionó, las lecturas en el HPLC se hicieron por triplicado tanto con los estándares como con las muestras, los datos obtenidos (Tablas 3.9 y 3.10) fueron cruciales para poder elaborar la curva de calibración, esta se realizó comparando las diferentes concentraciones contra el área específica que cada una de ellas presentaba al momento de la corrida (Figura 3.26). Con la ayuda de la ecuación de la recta derivada de cada curva de calibración se pudieron hallar las concentraciones de sapogeninas que se colocaron en cada vial en ppm (Tabla 3.11 y 3.12), asimismo se pudieron hallar los miligramos de cada sapogenina, sea de Acido Oleanólico o Hederagenina, por cada gramo de polvo en ambas quinuas, en el caso de la Quinua Blanca, los resultados del HPLC indicaron que se obtuvo 5.61 ppm de Acido

Oleanólico y 9.43 ppm de Hederagenina en la dilución de la muestra analizada, con esta información y luego de realizar los respectivos cálculos se concluye que por cada gramo de residuo de polvo que se produce al procesar Quinua Blanca hay 2.805 mg de Acido Oleanólico y 4.715 mg de Hederagenina. Por otro lado los resultados del HPLC al analizar la muestra diluida de Quinua Roja indicaron que se obtuvo 5.30 ppm de Acido Oleanólico y 14.44 ppm de Hederagenina, concluyendo que por cada gramo de residuo pulverulento que se produce al procesar Quinua Roja hay 2.65 mg de Acido Oleanólico y 7.22 mg de Hederagenina.

En una previo estudio realizado para determinar la cantidad de sapogeninas que contenía la semilla de quinua mediante HPLC, usaron como fase móvil Hexano:Isopropanol:Metanol (96:3.5:0.5) con un flujo de 2 mL/min y longitud de onda de 210 nm, obteniendo 3 mg de AO por gramo de semilla y 1.43 mg de HED por gramo⁽¹²⁴⁾. En otra investigación, determinaron la cantidad de Hederagenina y Acido Oleanólico en residuo de quinua usando Acido Fórmico 0.1% y Metanol como fase móvil, e igualmente a una longitud de 210 nm con flujo de 1.0 mL/min, consiguiendo 24% de AO y 28% de HED de un extracto que contenía 91% de sapogeninas, el porcentaje restante pertenecía a Acido Fitolacagénico y Oleato de Metilo⁽¹²⁵⁾.

Adicionalmente, con los datos obtenidos se elaboró un gráfico (Figura 3.27), en donde se puede observar que ambas muestras de Quinua, tanto blanca como roja, presentan una mayor concentración de Hederagenina en comparación al Acido Oleanólico.

Finalmente, al conocer la concentración en ppm de las sapogeninas en ambas muestras, se realizó una conversión de las unidades de concentración usadas en el HPLC (ppm), a las unidades usadas en las pruebas de citotoxicidad (μM), con el objetivo de comparar las concentraciones de las geninas en las muestras contra las empleadas para provocar un efecto citotóxico en las líneas celulares estudiadas. Los resultados mostraron que sólo hay 0.0123 μM (5.61 ppm) de Acido Oleanólico y 0.020 μM (9.43 ppm) de Hederagenina presentes en la Quinua Blanca, así como 0.0116 μM (5.30 ppm) de Acido Oleanólico y 0.0305 μM (14.44 ppm) de Hederagenina presentes en la Quinua Roja, lo que explica el porqué de la ausencia de citotoxicidad cuando se

evaluaron los extractos etanólicos, pues se requiere una concentración mínima de 12.3 μM (Tabla 3.2) para poder provocar algún efecto en las líneas celulares y como se puede observar las concentraciones de sapogeninas en las muestras de quinua son menores a 1 μM .

Tabla 3.9. Resumen de las tres repeticiones de tiempo de retención y área de Hederagenina.

Concentración	Tiempo retención (minutos)	Area de curva	Promedio del área
32 ppm	2.840	107838	105950
	2.833	104266	
	2.837	105747	
16 ppm	2.837	47721	47496
	2.840	47486	
	2.840	47280	
8 ppm	2.837	26804	26557
	2.837	26352	
	2.840	26514	
4 ppm	2.850	14745	14655
	2.853	15095	
	2.843	14124	
2 ppm	2.820	7350	7291
	2.827	7246	
	2.830	7278	

Tabla 3.10. Resumen de las tres repeticiones de tiempo de retención y área de Acido Oleanólico.

Concentración	Tiempo retención (minutos)	Area de curva	Promedio del área
32 ppm	4.803	115129	115204
	4.800	115512	
	4.800	114971	
16 ppm	4.807	58271	58910
	4.807	58983	
	4.810	59477	

8 ppm	4.797	27092	27550
	4.800	27596	
	4.800	27962	
4 ppm	4.797	10481	10466
	4.800	10362	
	4.800	10554	
2 ppm	4.807	3924	3963
	4.807	3998	
	4.807	3967	

Tabla 3.11. Resumen de las tres repeticiones de área y las concentraciones derivadas de sapogeninas (ppm) en Quinoa Blanca.

Quinoa Blanca					
Hederagenina			Acido Oleanólico		
Area	Concentración (ppm)	Promedio	Area	Concentración (ppm)	Promedio
30441	9.33	9.43	17751	5.57	5.61
30885	9.47		18238	5.70	
30884	9.47		17728	5.56	

Tabla 3.12. Resumen de las tres repeticiones de área y las concentraciones derivadas de sapogeninas (ppm) en Quinoa Roja.

Quinoa Roja					
Hederagenina			Acido Oleanólico		
Area	Concentración (ppm)	Promedio	Area	Concentración (ppm)	Promedio
46927	14.41	14.44	16524	5.24	5.30
46811	14.38		16949	5.36	
47301	14.53		16763	5.31	

$$y = 3245.7x + 143.42$$

Ecuación 3.4. Ecuación de la recta utilizada para hallar la concentración de Hedereganina en muestras diluidas de 4mg de Quinoa Blanca y Quinoa Roja en 2 mL de solvente.

$$y = 3729.4x - 3025.7$$

Ecuación 3.5. Ecuación de la recta utilizada para hallar la concentración de Acido Oleanólico en muestras diluidas de 4mg Quinua Blanca y Quinua Roja en 2 mL de solvente.

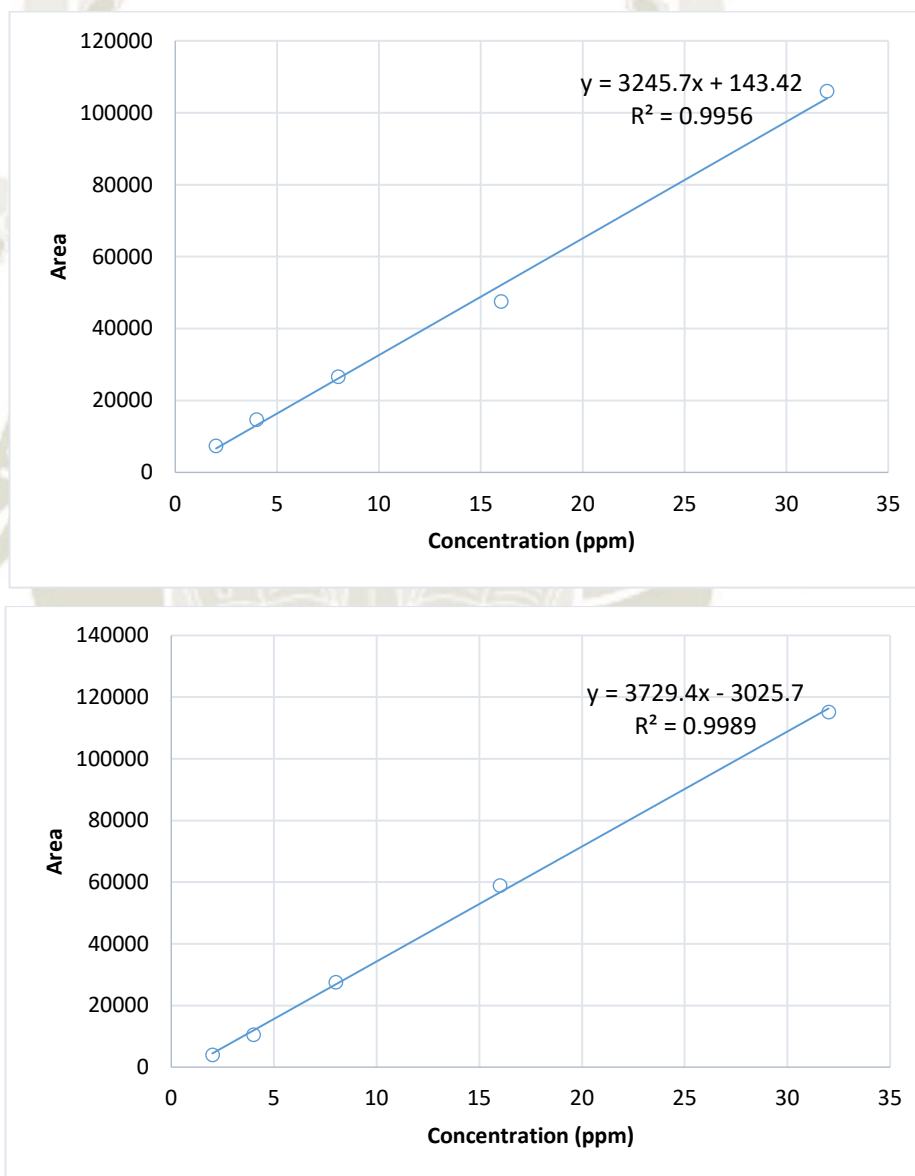


Figura 3.26. Curva de calibración para evaluar las concentraciones de Sapogeninas Hederagenina (A) y Acido Oleanólico (B), presentes en la Quinua Blanca y Quinua Roja.

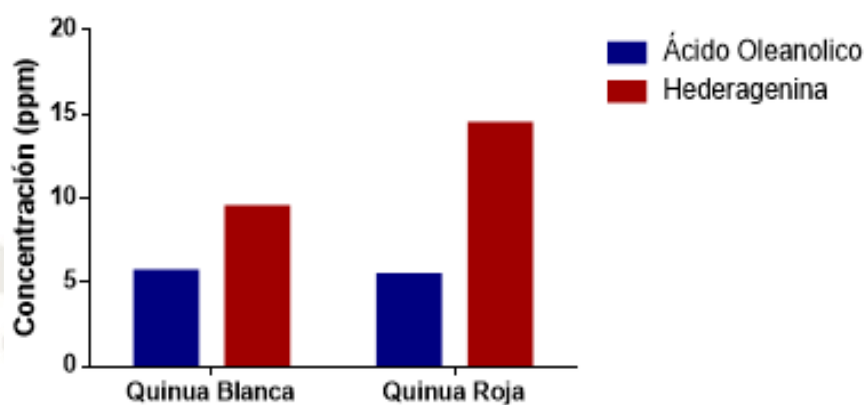


Figura 3.27. Comparación entre las concentraciones (ppm) de Acido Oleanólico y Hederagenina en Quinoa Blanca y Quinoa Roja.

CONCLUSIONES

PRIMERA: Los extractos etanólicos obtenidos de los residuos de *Chenopodium quinoa Willd.* no presentaron citotoxicidad, sin embargo, los estándares de sapogeninas: Acido Ursólico, Acido Oleanólico y Hederagenina disminuyeron significativamente la viabilidad de las líneas celulares *HeLa*, *A549*, *HepG2* y *SH-SY5Y*, pudiendo ser catalogados como posibles agentes anticancerígenos.

SEGUNDA: El IC_{50} del Acido Oleanólico presente en la quinua, es de 98.9 μM para *A549*, 83.6 μM en *HeLa*, 408.3 μM en *HepG2* y 34.1 μM para *SH-SY5Y*, por otro lado, Hederagenina presenta un IC_{50} de 78.4 μM , 56.4 μM , 40.4 μM y 12.3 μM en células *A549*, *HeLa*, *HepG2*, *SH-SY5Y* respectivamente.

TERCERA: Mediante el ensayo de Caspasa 3, se determinó que el mecanismo responsable de la muerte celular de la línea *HeLa* es por la vía de la apoptosis, siendo Hederagenina la que incrementa significativamente la concentración de esta, sin embargo los mecanismos de muerte celular en las líneas *A549*, *HepG2*, *SH-SY5Y* no se determinaron por lo que se necesitaran estudios posteriores. Asimismo, se concluyó que Hederagenina produce un incremento significativo de la hidrólisis de PARP-1 en células *HeLa*, por lo que se puede confirmar la vía utilizada para la muerte celular.

CUARTA: Al cuantificar las sapogeninas, se encontró una mayor concentración de Hederagenina en comparación al Acido Oleanólico, tanto en la muestra de Quinoa Blanca como en la de Quinoa Roja.

SUGERENCIAS

PRIMERA: Analizar los demás componentes de *Chenopodium quinoa Willd.* como las sapogeninas, Acido Serjánico y el Acido Fitolacagénico que no pudieron ser estudiados en el presente trabajo debido a falta de tiempo y recursos.

SEGUNDA: Estudiar las otras posibles vías de muerte celular (Autofagia, Necrosis, etc) en las líneas celulares del presente estudio para poder determinar cual es el mecanismo que regula su muerte celular al someterlas a tratamiento.

TERCERA: Realizar estudios a los otros tipos de *Chenopodium quinoa Willd.*, que son cultivados en Perú, con el objetivo de analizar si otras sapogeninas poseen mayor efecto citotóxico.

REFERENCIAS

1. Houts PS, Lenhard RE, Varricchio C. American Cancer Society Cancer Facts and Figures 2019. *Cancer Pract.* 2019;8(3):105–8.
2. National Cancer Institute. Chemotherapy and You. 2007;68. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/coping/chemotherapy-and-you>
3. Rojas W, Alandia G, Irigoyen J, Blajos J, Santivañez T. La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Of Reg para Am Lat y el Caribe*, FAO. 2011;37:66.
4. Estrada A, Li B, Laarveld B. Adjuvant action of *Chenopodium quinoa* saponins on the induction of antibody responses to intragastric and intranasal administered antigens in mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1998;21(3):225–36.
5. Bhargava A, Shukla S, Ohri D. *Chenopodium quinoa* - An Indian perspective. *Ind Crops Prod.* 2006;23(1):73–87.
6. Yawadio Nsimba R, Kikuzaki H, Konishi Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. *Food Chem.* 2008;106(2):760–6.
7. Nowak V, Du J, Charrondière UR. Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Chem* [Internet]. 2016;193:47–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.111>
8. Ahumada A, Ortega A, Chito D, Benítez R. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas.* 2016;45(3):438–69.
9. Arenas Rivera LC, Heredia Hernandez AK. CALIDAD Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE QUINUA *Chenopodium quinoa* Willd. ALMACENADAS ARTESANALMENTE POR PRODUCTORES. 2017.
10. Nowak R, Szewczyk K, Gawlik-Dziki U, Rzymowska J, Komsta Ł. Antioxidative and cytotoxic potential of some *Chenopodium* L. species growing in Poland. *Saudi J Biol Sci.* 2016;23(1):15–23.

11. Gómez-Caravaca AM, Iafelice G, Verardo V, Marconi E, Caboni MF. Influence of pearling process on phenolic and saponin content in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). Food Chem. 2014;157:174–8.
12. Turcios AE, Papenbrock J. Biofiltration of the antibacterial drug sulfamethazine by the species *Chenopodium quinoa* and its further biodegradation through anaerobic digestion. J Environ Sci (China) [Internet]. 2019;75:54–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.02.022>
13. Kuljanabhagavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, Wink M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa Willd*. Phytochemistry. 2008;69(9):1919–26.
14. Léauté et al. Process for recovery and purification of saponins and sapogenins from quinoa (*Chenopodium Quinoa*). 2004;2(12):1–8.
15. Lin M, Han P, Li Y, Wang W, Lai D, Zhou L. Quinoa secondary metabolites and their biological activities or functions. Molecules. 2019;24(13).
16. Mastebroek HD, Limburg H, Gilles T, Marvin HJP. Occurrence of sapogenins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). J Sci Food Agric. 2000;80(1):152–6.
17. Wolska KI, Grudniak AM, Fiecek B, Kraczkiewicz-Dowjat A, Kurek A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. Cent Eur J Biol. 2010;5(5):543–53.
18. Madl T, Sterk H, Mittelbach M, Rechberger GN. Tandem Mass Spectrometric Analysis of a Complex Triterpene Saponin Mixture of *Chenopodium quinoa*. J Am Soc Mass Spectrom. 2006;17(6):795–806.
19. Jiang X, Cao Y, Jørgensen L von G, Strobel BW, Hansen HCB, Cedergreen N. Where does the toxicity come from in saponin extract? Chemosphere [Internet]. 2018;204:243–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.044>
20. Pappier U, Fernández Pinto V, Larumbe G, Vaamonde G. Effect of processing for saponin removal on fungal contamination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa Willd*). Int J Food Microbiol. 2008;125(2):153–7.
21. Fiallos-Jurado J, Pollier J, Moses T, Arendt P, Barriga-Medina N, Morillo E, et al. Saponin determination, expression analysis and functional characterization

- of saponin biosynthetic genes in *Chenopodium quinoa* leaves. Plant Sci [Internet]. 2016;250:188–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.05.015>
22. Stuardo M, San Martín R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. Ind Crops Prod. 2008;27(3):296–302.
23. Flores T, Huamán J, Tomás G. Estudio comparativo de tres metodologías cuantitativas de extracción de saponinas de la Melisa *Officinalis* “Toronjil.” 2013;16:47–51.
24. Sparg SG, Light ME, Van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. J Ethnopharmacol. 2004;94(2–3):219–43.
25. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: A review. Phytochem Rev. 2010;9(3):425–74.
26. Balandrin MF. Commercial utilization of plant-derived saponins: An overview of medicinal, pharmaceutical, and industrial applications. 1996;
27. Guclu-Ustundag Ö, Mazza G. Saponins: Properties, applications and processing. Crit Rev Food Sci Nutr. 2007;47(3):231–58.
28. Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. Vaccine. 2009;27(12):1787–96.
29. Lozano M, Ticona E, Carrasco C, Flores Y, Almanza GR. Cuantificación De Saponinas En Residuos De Quinoa Real *Chenopodium Quinoa Willd*. Rev Boliv Química. 2012;29(2):128–35.
30. Cheok CY, Salman HAK, Sulaiman R. Extraction and quantification of saponins: A review. Food Res Int. 2014;59:16–40.
31. Singh B, Kaur A. Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. LWT - Food Sci Technol [Internet]. 2018;87:93–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.077>
32. Zhao M, Da-Wa ZM, Guo D Le, Fang DM, Chen XZ, Xu HX, et al. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Clematis tangutica*. Phytochemistry [Internet]. 2016;130:228–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.05.009>
33. Soltani M, Parivar K, Baharara J, Kerachian MA, Asili J. Hemolytic and

- cytotoxic properties of saponin purified from *Holothuria leucospilota* sea cucumber. *Reports Biochem Mol Biol* [Internet]. 2014;3(1):43–50. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26989736><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4757088>
34. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(9):1463–7.
 35. Marters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):311–5.
 36. European Collection of Authenticated Cell Cultures. Cell line profile- SH-SY5Y. *Public Heal Engl* [Internet]. 2016;2780(84113001):1–2. Available from: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/114601/sh-sy5y-cell-line-profile.pdf>
 37. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp*. 2016;2016(108):1–11.
 38. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the Use of SH - SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Neuronal Cell Cult Methods Protoc* [Internet]. 2013;1078:35–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-640-5>
 39. Hep-g A. Cell line profile Hep-G2 (ECACC catalogue no . 85011430). 2013;2(85011430):2–3.
 40. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Protoc Vitro Hepatocyte Res*. 2015;1250:1–390.
 41. Qiu GH, Xie X, Xu F, Shi X, Wang Y, Deng L. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*. 2014;67(1):1–12.
 42. Cooper J. A549 Cell line profile. *Assess Cell Line Model Prim Hum Cells by Raman Spectr Phenotyping Biophys J* [Internet]. 2012;51(86012804):1–2. Available from: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/126404/a549-cell-line-profile.pdf>
 43. A549 cell line: Cell culture and transfection protocol [Internet] [Access date

- June 20,2020].. Available from: <http://www.a549.com/>
44. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111(1):A3.B.1-A3.B.3.
 45. Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One*. 2011;6(9):2–6.
 46. McGowan EM, Alling N, Jackson EA, Yagoub D, Haass NK, Allen JD, et al. Evaluation of cell cycle arrest in estrogen responsive MCF-7 breast cancer cells: Pitfalls of the MTS assay. *PLoS One*. 2011;6(6):1–8.
 47. O'Toole SA, Sheppard BL, McGuinness EPJ, Gleeson NC, Yoneda M, Bonnar J. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. *Cancer Detect Prev*. 2003;27(1):47–54.
 48. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*. 1997;124(3):179–92.
 49. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. *Assay Guid Man* [Internet]. 2004;(Md):1–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
 50. Chen Q, Kang J, Fu C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2018;3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-018-0018-5>
 51. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* [Internet]. 2019;43(6):582–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>
 52. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
 53. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2018;36(1):489–517.
 54. Jaramillo S, Muriana FJG, Guillen R, Jimenez-Araujo A, Rodriguez-Arcos R, Lopez S. Saponins from edible spears of wild asparagus inhibit AKT, p70S6K, and ERK signalling, and induce apoptosis through G0/G1 cell cycle arrest in human colon cancer HCT-116 cells. *J Funct Foods* [Internet]. 2016;26:1–10.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.07.007>

55. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):99–104.
56. Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. Caspase-3 is required for α -fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273(25):15540–5.
57. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun.* 2005;73(4):1907–16.
58. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 2005;115(1980):1–67.
59. Escobar ML, Echeverría OM, Vázquez-Nin GH. Necrosis as Programmed Cell Death. *Cell Death - Autophagy, Apoptosis Necrosis.* 2015;
60. Syntichaki P, Tavernarakis N. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep.* 2002;3(7):604–9.
61. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(1):37–43.
62. Mesa MA, Vasquez G. NETosis. *Autoimmune Dis.* 2013;2013.
63. Yam-Puc JC, García-Marín L, Sánchez-Torres LE. Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. *Gac Med Mex.* 2012;148(1):68–75.
64. Viva Q, Laura M, Gabelloni ML, Sabbione F, Iula L, Keitelman I. Trampas extracelulares de neutrófilos: una novedosa estrategia antiinfecciosa empleando moléculas antimicrobianas largamente conocidas. *Química Viva.* 2013;12(1):3–13.
65. Schiewer MJ, Knudsen KE. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Mol Cancer Res.* 2014;12(8):1069–80.
66. Green AR, Caracappa D, Benhasouna AA, Alshareeda A, Nolan CC, Macmillan RD, et al. Biological and clinical significance of PARP1 protein expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;149(2):353–62.
67. Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol.* 2003;31(6):446–54.

68. Morales JC, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2014;24(1):15–28.
69. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2017;18(10):610–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.53>
70. Martire S, Mosca L, d’Erme M. PARP-1 involvement in neurodegeneration: A focus on Alzheimer’s and Parkinson’s diseases. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2015;146–148:53–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2015.04.001>
71. Dahimiwal SM, Thorat DB, Jain NP, Jadhav VB, Patil PB. A review on high performance liquid chromatography. *Int J Pharm Res*. 2013;5(3):1–6.
72. Runner RTM. Extraction and Isolation of Saponins. *Nat Prod Isol* [Internet]. 2006;864(February 2012):1–25. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-624-1>
73. Bele AA, Khale A, Archana M, Bele A. An Overview on Thin Layer Chromatography. *Ijpsr* [Internet]. 2011;2(2):256–67. Available from: www.ijpsr.com
74. Oleszek W, Bialy Z. Chromatographic determination of plant saponins-An update (2002-2005). *J Chromatogr A*. 2006;1112(1–2):78–91.
75. Oleszek WA. Chromatographic determination of plant saponins. *J Chromatogr A*. 2002;967(1):147–62.
76. Kontogianni VG, Exarchou V, Troganis A, Gerothanassis IP. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods. *Anal Chim Acta*. 2009;635(2):188–95.
77. JIWRA: QUINOA & Ancient Grains [Internet] [Access date June 20,2020].. Available from: <http://www.jiwra.com/>
78. Arora M. Cell Culture Media: A Review. *Mater Methods*. 2013;3:1–29.
79. Patel RM, Patel SK. Cytotoxic activity of methanolic extract of artocarpus heterophyllus against a549, hela and mcf-7 cell lines. *J Appl Pharm Sci*.

- 2011;1(7):167–71.
80. Piret J-P, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl₂, a Chemical Inducer of Hypoxia-Inducible Factor-1, and Hypoxia Reduce Apoptotic Cell Death in Hepatoma Cell Line HepG2. *New York Acad Sci.* 5:3–7.
 81. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2009;34(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.006>
 82. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(7):1035–41.
 83. Samuelsson MKR, Pazirandeh A, Okret S. A pro-apoptotic effect of the CDK inhibitor p57kip2 on staurosporine-induced apoptosis in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296(3):702–9.
 84. Yue TL, Wang C, Romanic AM, Kikly K, Keller P, DeWolf WE, et al. Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(3):495–507.
 85. Wang H, Wang Z, Guo W. Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid of *Macrocarpium officinalis* (Sieb. et Zucc.) Nakai by RP-HPLC. *Ind Crops Prod.* 2008;28(3):328–32.
 86. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(12):1600–3.
 87. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 2014;28(3):1317–30.
 88. Ma CM, Cai SQ, Cui JR, Wang RQ, Tu PF, Hattori M, et al. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. *Eur J Med Chem.* 2005;40(6):582–9.
 89. Mazumder K, Tanaka K, Fukase K. Cytotoxic activity of ursolic acid derivatives obtained by isolation and oxidative derivatization. *Molecules.* 2013;18(8):8929–44.
 90. Li J, Guo WJ, Yang QY. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human

- colon carcinoma cell line HCT15. World J Gastroenterol. 2002;8(3):493–5.
91. Akihisa T, Kamo S, Uchiyama T, Akazawa H, Banno N, Taguchi Y, et al. Cytotoxic activity of *Perilla frutescens* var. *japonica* leaf extract is due to high concentrations of oleanolic and ursolic acids. J Nat Med. 2006;60(4):331–3.
92. Paszel-Jaworska A, Romaniuk A, Rybczynska M. Molecular Mechanisms of Biological Activity of Oleanolic Acid - A Source of Inspiration for A New Drugs Design. Mini Rev Org Chem. 2014;11(3):330–42.
93. Sánchez M, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G, Razmilic I, Yáñez T, Rodríguez JA. Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: In vitro-in vivo relationships. Life Sci. 2006;79(14):1349–56.
94. Kim EH, Baek S, Shin D, Lee J, Roh JL. Hederagenin Induces Apoptosis in Cisplatin-Resistant Head and Neck Cancer Cells by Inhibiting the Nrf2-ARE Antioxidant Pathway. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017.
95. Oladimeji AO, Oladosu IA, Ali MS, Khan SA, Yousuf S. Cytotoxic Effect of Hederagenin on NCI-H460, Human Non-small Lung Cancer Cells and its Free Radical Scavenging Activities. J Biol Act Prod from Nat. 2016;6(5–6):365–72.
96. Liu BXZ, Zhou JY, Li Y, Zou X, Wu J, Gu JF, et al. Hederagenin from the leaves of ivy (*Hedera helix* L.) induces apoptosis in human LoVo colon cells through the mitochondrial pathway. BMC Complement Altern Med. 2014;14:412.
97. Lee KT, Sohn IC, Park HJ, Kim DW, Jung GO, Park KY. Essential moiety for antimutagenic and cytotoxic activity of hederagenin monodesmosides and bisdesmosides isolated from the stem bark of *Kalopanax pictus*. Planta Med. 2000;66(4):329–32.
98. Gao Y, He C, Bi W, Wu G, Altman E. Bioassay Guided Fractionation Identified Hederagenin as a Major Cytotoxic Agent from *Cyclocarya paliurus* Leaves. Planta Med. 2015;82(1–2):171–9.
99. Zhang CL, Wu LJ, Tashiro SI, Onodera S, Ikejima T. Oridonin induces apoptosis of HeLa cells via altering expression of Bcl-2/Bax and activating caspase-3/ICAD pathway. Acta Pharmacol Sin. 2004;25(5):691–8.
100. Luo KQ, Yu VC, Pu Y, Chang DC. Application of the fluorescence resonance energy transfer method for studying the dynamics of caspase-3 activation during UV-induced apoptosis in living hela cells. Biochem Biophys Res Commun.

- 2001;283(5):1054–60.
101. Mizukami S, Kikuchi K, Higuchi T, Urano Y, Mashima T, Tsuruo T, et al. Imaging of caspase-3 activation in HeLa cells stimulated with etoposide using a novel fluorescent probe. *FEBS Lett.* 1999;453(3):356–60.
 102. Wu Y, Wang D, Wang X, Wang Y, Ren F, Chang D, et al. Cellular Physiology Biochemistry and Biochemistr y Caspase 3 is Activated through Caspase 8 instead of Caspase 9 during H₂O₂-induced Apoptosis in HeLa Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2011;100084.
 103. Wu Z, Wu LJ, Li LH, Tashiro SI, Onodera S, Ikejima T. Shikonin regulates HeLa cell death via caspase-3 activation and blockage of DNA synthesis. *J Asian Nat Prod Res.* 2004;6(3):155–66.
 104. Stefanowicz-Hajduk J, Bartoszewski R, Bartoszevska S, Kochan K, Adamska A, Kosiński I, et al. Pennogenyl saponins from *Paris quadrifolia* L. induce extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis in human cervical cancer HeLa cells. *PLoS One.* 2015;10(8).
 105. Han LT, Li J, Huang F, Yu SG, Fang NB. Triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* induce apoptosis activity in HeLa cells. *J Asian Nat Prod Res.* 2009;11(2):122–7.
 106. Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2010;8(1):31. Available from: <http://www.biosignaling.com/content/8/1/31>
 107. Casao A, Mata-Campuzano M, Ordás L, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Martínez-Pastor F. Cleaved PARP-1, an Apoptotic Marker, can be Detected in Ram Spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2015;50(4):688–91.
 108. Cohausz O, Althaus FR. Role of PARP-1 and PARP-2 in the expression of apoptosis-regulating genes in HeLa cells. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(4):379–91.
 109. Kwon HJ, Bae SY, Kim KH, Han CH, Cho SH, Nam SW, et al. Induction of apoptosis in HeLa cells by ethanolic extract of *Corallina pilulifera*. *Food Chem.* 2007;104(1):196–201.
 110. Kim EJ, Kang CW, Kim NH, Seo YB, Nam SW, Kim G Do. Induction of Apoptotic Cell Death on Human Cervix Cancer HeLa cells by Extract from

- Loranthus yadoriki. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2018;23(2):201–7.
111. Ren G, Zhao Y peng, Yang L, Fu CX. Anti-proliferative effect of clitocine from the mushroom *Leucopaxillus giganteus* on human cervical cancer HeLa cells by inducing apoptosis. *Cancer Lett.* 2008;262(2):190–200.
 112. Liu Y Bin, Wang XA, Xiang SS, Hu YP, Jiang L, Shu YJ, et al. Oleanolic acid induces mitochondrial-dependent apoptosis and G0/G1 phase arrest in gallbladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3017–30.
 113. Park JH, Kwon HY, Sohn EJ, Kim KA, Kim B, Jeong SJ, et al. Inhibition of Wnt/b-catenin signaling mediates ursolic acid-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *Pharmacol Reports [Internet].* 2013;65(5):1366–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71495-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71495-6)
 114. Kim K, Shin EA, Jung JH, Park JE, Kim DS, Shim BS, et al. Ursolic acid induces apoptosis in colorectal cancer cells partially via upregulation of microRNA-4500 and inhibition of JAK2/STAT3 phosphorylation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1):1–13.
 115. Luciana D, Mihaela Z, Mariana M, Simona V, Angela A. The thin layer chromatography analysis of saponins belonging to *Solidago* species. 2013;XXI:56–60.
 116. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas.* Vol. 2. 1983.
 117. Hassan HS, Sule IM, Musa MA, Musa YK, Abubakar SM, Hassan SA. Anti-inflammatory activity of crude saponin extracts from five Nigerian medicinal plants. *African J Tradit Complement Altern Med.* 2012;9(2):250–5.
 118. Karthika K, S J, Paulsamy S. TLC and HPTLC Fingerprint Profiles of Different Bioactive Components from the Tuber of *Solena amplexicaulis*. *J Pharmacogn Phytochem JPP.* 2014;3(31):198–206.
 119. Senguttuvan J, Subramaniam P. HPTLC Fingerprints of Various Secondary Metabolites in the Traditional Medicinal Herb *Hypochoeris radicata* L. *J Bot.* 2016;2016.
 120. Ng KG, Price KR, Fenwick GR. A TLC method for the analysis of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. *Food Chem.* 1994;49(3):311–5.
 121. KAUR J, KUMAR D, MADAAN R, KUMAR S. Estimation of Isolated

- Triterpenoid - Ursolic Acid in *Verbena officinalis* L. Aerial Parts Using TLC Densitometry. *J Pharm Technol Res Manag*. 2014;2(2):121–35.
122. Klimek B, Tokar M. Biologically active compounds from the flowers of *Forsythia suspensa* Vahl. Vol. 55, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 1998. p. 499–504.
 123. Naidu AS. Natural Food Antimicrobial Systems. Vol. 76, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1850. 354–354 p.
 124. Burnouf-Radosevich M, Delfel NE. High-performance liquid chromatography of oleanane-type triterpenes. *J Chromatogr A*. 1984;292(2):403–9.
 125. Lozano M, G E, Flores Y, A GR. Effect in Acute Inflammation of Sapogenin Extract Andisolated Sapogenins From Quinoa Waste (*Chenopodium Quinoa Willd*). *Rev Boliv Química*. 2013;30(2):115–21.

ANEXO I

Acreditación de SENASA para el funcionamiento de la empresa JIWRA SAC



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego

SENASA
PERU

DIRECCIÓN GENERAL DE INSUMOS AGROPECUARIOS E INOCUIDAD AGROALIMENTARIA
SUBDIRECCIÓN DE INOCUIDAD AGROALIMENTARIA

AUTORIZACIÓN SANITARIA DE ESTABLECIMIENTO DEDICADO AL
PROCESAMIENTO PRIMARIO DE ALIMENTOS AGROPECUARIOS

N° 000052-MINAGRI-SENASA-AREQUIPA

De conformidad a lo establecido en el el Artículo 33° del Reglamento de Inocuidad Agroalimentaria, aprobado mediante Decreto Supremo N° 004-2011-AG; la Subdirección de Inocuidad Agroalimentaria de la Dirección General de Insumos Agropecuarios e Inocuidad Agroalimentaria, a través del Área de Insumos Agropecuarios e Inocuidad Agroalimentaria de la Dirección Ejecutiva AREQUIPA del Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA; certifica que el establecimiento que a continuación se detalla, se encuentra autorizado para efectuar el procesamiento primario de alimentos agropecuarios, de acuerdo a lo siguiente:

Razón Social del Establecimiento: JIWRA SOCIEDAD ANONIMA CERRADA - JIWRA S.A.C.

Ubigeo: AREQUIPA / AREQUIPA / SANTA RITA DE SIGUAS

N° RUC: 20602101798

Domicilio Legal: CAL. JERUSALEN NRO. 201 (PUERTA E INTERIOR 3-2) AREQUIPA AREQUIPA AREQUIPA

Dirección del Establecimiento: AV. LOS FUNDADORES S/N

Departamento: AREQUIPA

Provincia: AREQUIPA

Distrito: SANTA RITA DE SIGUAS

Giro de Establecimiento:

PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Grupo	Tipo Procesamiento	Producto	Variedad
Gramíneas - cereales en grano	Enfriado	Cañihua - Chenopodium pallidicaule	
		Kiwicha - Amaranthus caudatus	
		Quinua - Chenopodium quinoa	
	Envasado	Cañihua - Chenopodium pallidicaule	
		Kiwicha - Amaranthus caudatus	
		Quinua - Chenopodium quinoa	
	Etiquetado	Cañihua - Chenopodium pallidicaule	
		Kiwicha - Amaranthus caudatus	
		Quinua - Chenopodium quinoa	
	Lavado	Cañihua - Chenopodium pallidicaule	
		Kiwicha - Amaranthus caudatus	
		Quinua - Chenopodium quinoa	
	Limpiado	Cañihua - Chenopodium pallidicaule	
		Kiwicha - Amaranthus caudatus	
		Quinua - Chenopodium quinoa	
	Pelado	Cañihua - Chenopodium pallidicaule	
		Kiwicha - Amaranthus caudatus	
		Quinua - Chenopodium quinoa	
	Seleccionado	Cañihua - Chenopodium pallidicaule	
		Kiwicha - Amaranthus caudatus	
		Quinua - Chenopodium quinoa	

El N° de Autorización Sanitaria del Establecimiento generado en el presente documento oficial, corresponde al Código de Rastreabilidad establecido en los Artículos 16°, 26° y 27° del Decreto Supremo N° 004-2011-AG Reglamento de Inocuidad Agroalimentaria.

Página 1 de 2 000052-MINAGRI-SENASA-AREQUIPA GREJAMQZD-26/01/2018 16:15:33



004105

Grupo	Tipo Procesamiento	Producto	Variedad
Nueces y semillas	Enfriado	Chia - Salvia hispanica	
	Envasado	Chia - Salvia hispanica	
	Etiquetado	Chia - Salvia hispanica	
	Lavado	Chia - Salvia hispanica	
	Limpiado	Chia - Salvia hispanica	
	Pelado	Chia - Salvia hispanica	
	Selecccionado	Chia - Salvia hispanica	




PERÚ Ministerio de Agricultura y Riego


 MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO
 SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA
 SENASA AREQUIPA
 M. V. Z. Gilbert Ruanos Caceres
 Jefe de Área de Insumos Agropecuarios e Inocuidad Agroalimentaria

Fecha de Autorización: 26/01/2018
 INDETERMINADA

Jefe de Área de Insumos Agropecuarios e Inocuidad Agroalimentaria
 Dirección Ejecutiva SENASA AREQUIPA


 000052-MINAGRI-SENASA-AREQUIPA

El N° de Autorización Sanitaria del Establecimiento generado en el presente documento oficial, corresponde al Código de Rastreabilidad establecido en los Artículos 16°, 26° y 27° del Decreto Supremo N° 004-2011-AG Reglamento de Inocuidad Agroalimentaria.

Página 6 de 2 000052-MINAGRI-SENASA AREQUIPA 004-TAM020-26/01/2018 16:15:33



004106

ANEXO II

Tablas de resultados referidos a data cruda

Tabla anexa 1. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de % DMSO sobre las células A549 a través del método MTS.

Blanco	0%	0.1%	0.5%	1%	5%	10%
0.417	2.150	2.134	2.112	2.150	1.908	1.237
0.639	2.133	2.274	2.136	2.198	2.052	1.944
0.389	2.125	2.164	2.131	2.148	1.973	1.817
0.394	2.100	2.146	2.055	2.232	2.085	1.933
0.375	2.205	2.084	2.072	2.245	2.080	1.894
0.378	2.285	2.369	2.304	2.283	2.219	2.109

Tabla anexa 2. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de % DMSO sobre las células *HeLa* a través del método MTS.

Blanco	0%	0.1%	0.5%	1%	5%	10%
0.450	1.818	1.999	2.032	2.013	0.998	0.542
0.436	2.037	2.060	2.024	2.056	0.883	0.608
0.431	2.064	2.106	2.117	2.109	0.968	0.678
0.435	2.087	2.084	2.117	2.204	0.902	0.831
0.422	2.124	2.154	2.223	2.234	1.009	0.887
0.438	2.115	2.135	2.212	2.226	1.070	0.834

Tabla anexa 3. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de % DMSO sobre las células *HepG2* a través del método MTS.

Blanco	0%	0.1%	0.5%	1%	5%	10%
0.325	0.765	0.682	0.741	0.636	0.499	0.506
0.325	0.778	0.811	0.767	0.717	0.532	0.551
0.336	0.760	0.850	0.915	0.688	0.619	0.529
0.331	0.746	0.813	0.895	0.726	0.533	0.535
0.328	0.764	0.783	0.962	0.743	0.558	0.563
0.334	0.750	0.755	0.847	0.718	0.637	0.564

Tabla anexa 4. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de % DMSO sobre las células *SH-SY5Y* a través del método MTS.

Blanco	0%	0.1%	0.5%	1%	5%	10%
0.332	0.390	0.404	0.414	0.399	0.334	0.366
0.326	0.415	0.442	0.428	0.407	0.355	0.359
0.362	0.418	0.445	0.462	0.443	0.344	0.352
0.329	0.440	0.466	0.466	0.419	0.359	0.369
0.326	0.460	0.459	0.467	0.459	0.356	0.386
0.359	0.457	0.448	0.466	0.429	0.355	0.362

Tabla anexa 5. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Blanca sobre las células *A549* a través del método MTS.

Blanco	0 ppm	0.3 ppm	1 ppm	3 ppm	10 ppm	30 ppm	100 ppm
0.312	1.778	1.568	1.790	1.517	1.514	1.426	1.658
0.316	1.732	1.734	1.754	1.516	1.629	1.526	1.54
0.315	1.764	1.844	1.780	1.549	1.855	1.905	1.945
0.325	1.681	1.933	1.697	1.600	1.894	1.979	1.949
0.330	1.735	1.905	1.674	1.598	1.798	1.686	1.800
0.333	1.481	1.766	1.632	1.714	1.712	1.705	1.718
0.323	2.047	2.102	2.155	2.066	2.063	2.008	2.120
0.327	2.022	2.173	2.140	2.171	2.099	2.081	2.068
0.329	2.127	2.199	2.200	2.123	2.133	2.102	2.122
0.333	2.257	2.246	2.193	2.199	2.152	2.259	2.343
0.338	2.395	2.238	2.210	2.259	2.282	2.378	2.447
0.342	2.379	2.196	2.178	2.192	2.240	2.309	2.338
0.343	1.870	1.737	1.850	1.734	1.697	1.680	1.728
0.341	1.865	1.868	1.831	1.832	1.872	1.730	1.813
0.337	1.790	1.781	1.566	1.890	1.936	1.874	1.622
0.325	1.849	1.855	1.850	1.973	1.992	1.863	1.908
0.333	1.954	1.907	1.915	2.057	2.079	1.875	1.698
0.337	1.946	1.877	1.894	1.865	1.993	1.923	2.017
0.298	2.107	2.245	2.152	2.124	2.118	2.111	2.161
0.309	2.060	2.173	2.097	2.061	2.130	2.146	2.034
0.304	2.145	2.163	2.140	2.071	2.006	1.993	2.051
0.302	2.015	2.125	2.080	2.050	1.991	2.016	2.010
0.298	2.139	2.102	2.134	2.051	2.077	2.014	1.970
0.299	1.957	2.146	2.137	2.102	2.066	2.100	2.086

Tabla anexa 6. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Blanca sobre las células *HeLa* a través del método MTS.

Blanco	0 ppm	0.3 ppm	1 ppm	3 ppm	10 ppm	30 ppm	100 ppm
0.374	2.113	2.033	2.060	2.027	1.990	1.811	2.234
0.370	1.946	2.192	2.176	2.138	2.150	1.982	2.217
0.372	1.937	2.263	2.224	2.226	2.139	1.934	2.250
0.368	2.112	2.219	2.247	2.306	2.267	1.964	2.211
0.375	2.072	2.201	2.211	2.294	2.264	2.088	2.164
0.380	1.884	2.219	2.160	2.204	2.276	2.048	2.124
0.355	1.298	1.484	1.581	1.501	1.452	1.385	1.191
0.352	1.544	1.570	1.623	1.649	1.577	1.389	1.287
0.357	1.650	1.520	1.745	1.661	1.667	1.285	0.995
0.352	1.680	1.485	1.483	1.651	1.769	1.237	1.205
0.353	1.430	1.464	1.552	1.923	1.854	1.846	0.951
0.354	1.526	1.465	1.829	1.796	1.826	1.710	1.507
0.346	1.631	1.262	1.601	1.456	1.342	1.275	1.630
0.358	1.763	1.124	1.615	1.557	1.714	1.277	1.590
0.363	1.476	0.847	1.559	1.771	1.471	1.273	1.671
0.370	1.486	0.812	1.518	1.754	1.398	1.080	1.774
0.367	1.450	0.812	1.604	1.637	1.042	0.852	1.665
0.375	1.872	1.476	1.771	1.529	1.069	0.993	1.763
0.313	1.807	1.797	1.646	1.682	1.650	1.631	1.623
0.306	1.739	1.798	1.801	1.851	1.796	1.781	1.750
0.306	1.725	1.792	1.833	1.884	1.692	1.733	1.707
0.301	1.787	1.678	1.751	1.922	1.753	1.972	1.659
0.305	1.635	1.643	1.832	1.883	1.706	1.841	1.783
0.302	1.701	1.644	1.816	1.874	1.867	1.766	1.754

Tabla anexa 7. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Blanca sobre las células *HepG2* a través del método MTS.

Blanco	0 ppm	0.3 ppm	1 ppm	3 ppm	10 ppm	30 ppm	100 ppm
0.372	0.968	1.097	1.135	0.905	0.922	0.875	1.451
0.367	0.939	1.181	1.132	1.030	1.160	0.999	1.377
0.373	0.816	1.304	1.120	1.018	0.982	0.846	1.425
0.372	0.909	1.226	1.185	1.033	0.920	0.789	1.485
0.365	0.780	1.041	1.090	0.934	0.868	0.685	1.499
0.377	1.538	0.927	0.990	0.892	0.846	0.703	1.277
0.327	0.463	0.544	0.545	0.488	0.441	0.492	0.432
0.323	0.405	0.509	0.468	0.519	0.482	0.492	0.447
0.325	0.405	0.491	0.516	0.528	0.483	0.502	0.432
0.323	0.443	0.452	0.542	0.500	0.476	0.479	0.530
0.319	0.444	0.468	0.525	0.514	0.482	0.460	0.447

0.322	0.437	0.463	0.531	0.526	0.478	0.460	0.445
0.324	0.413	0.469	0.503	0.448	0.442	0.511	0.541
0.327	0.439	0.489	0.509	0.510	0.496	0.656	0.554
0.326	0.457	0.485	0.529	0.539	0.519	0.489	0.515
0.334	0.462	0.495	0.535	0.559	0.542	0.501	0.511
0.331	0.472	0.479	0.519	0.527	0.477	0.452	0.472
0.340	0.483	0.518	0.524	0.515	0.470	0.474	0.478
0.309	0.764	0.807	0.804	0.759	0.692	0.657	0.687
0.307	0.754	0.803	0.822	0.741	0.699	0.687	0.732
0.304	0.712	0.789	0.797	0.808	0.797	0.831	0.716
0.305	0.735	0.833	0.882	0.826	0.767	0.704	0.677
0.306	0.660	0.838	0.800	0.756	0.754	0.729	0.659
0.313	0.530	0.815	0.749	0.759	0.704	0.649	0.591

Tabla anexa 8. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Blanca sobre las células *SH-SY5Y* a través del método MTS.

Blanco	0 ppm	0.3 ppm	1 ppm	3 ppm	10 ppm	30 ppm	100 ppm
0.290	0.354	0.345	0.333	0.328	0.336	0.334	0.344
0.282	0.350	0.356	0.341	0.347	0.337	0.326	0.348
0.285	0.339	0.347	0.338	0.342	0.336	0.327	0.335
0.282	0.344	0.361	0.345	0.350	0.340	0.332	0.358
0.283	0.336	0.355	0.365	0.352	0.328	0.332	0.354
0.283	0.315	0.361	0.340	0.336	0.328	0.331	0.326
0.286	0.310	0.331	0.333	0.321	0.328	0.323	0.343
0.289	0.311	0.338	0.330	0.328	0.340	0.335	0.354
0.283	0.313	0.317	0.320	0.339	0.349	0.343	0.358
0.288	0.327	0.329	0.342	0.335	0.367	0.350	0.359
0.284	0.327	0.330	0.338	0.334	0.336	0.341	0.358
0.294	0.328	0.328	0.328	0.319	0.327	0.333	0.344

Tabla anexa 9. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Roja sobre las células *A549* a través del método MTS.

Blanco	0 ppm	0.3 ppm	1 ppm	3 ppm	10 ppm	30 ppm	100 ppm
0.310	2.151	2.182	2.113	2.162	2.110	2.094	2.149
0.306	2.203	2.210	2.188	2.196	2.125	2.158	2.184
0.302	2.162	2.220	2.173	2.170	2.103	2.097	2.051
0.322	2.224	2.209	2.193	2.141	2.076	2.045	2.036
0.321	2.239	2.198	2.190	2.148	2.097	2.162	2.210
0.324	2.367	2.201	2.171	2.175	2.202	2.284	2.239
0.316	1.962	1.959	2.031	1.987	1.925	1.910	1.980

0.320	1.927	1.923	2.057	1.946	1.961	1.930	1.890
0.313	1.837	1.906	1.999	1.881	1.893	1.945	1.804
0.323	1.816	1.940	2.004	1.79	1.912	1.943	1.678
0.313	1.927	1.969	2.037	1.907	1.938	2.061	1.843
0.311	1.949	2.001	2.004	1.953	2.002	2.023	1.943
0.325	1.799	1.904	1.744	1.778	1.793	1.765	1.676
0.332	1.917	1.911	1.849	1.931	1.773	1.775	1.597
0.331	1.883	1.809	1.797	1.943	1.714	1.810	1.636
0.348	1.780	1.810	1.767	1.923	1.737	1.881	1.529
0.338	1.603	1.801	1.818	1.862	1.750	1.751	1.816
0.358	2.147	1.896	1.893	1.693	1.721	1.809	1.832
0.311	2.150	2.175	2.172	2.132	2.188	2.123	2.145
0.312	2.213	2.070	2.126	2.128	2.130	2.150	2.178
0.318	2.075	2.066	2.085	2.080	2.079	2.108	2.128
0.318	2.074	2.046	2.053	2.145	2.190	2.154	2.072
0.306	2.113	2.124	1.976	2.046	2.170	2.083	2.120
0.312	2.033	2.165	2.120	2.115	2.135	2.077	2.073

Tabla anexa 10. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Roja sobre las células *HeLa* a través del método MTS.

Blanco	0 ppm	0.3 ppm	1 ppm	3 ppm	10 ppm	30 ppm	100 ppm
0.383	2.060	1.976	1.978	2.085	2.062	2.047	1.997
0.378	2.034	2.027	2.039	2.162	2.171	2.211	2.214
0.384	2.123	1.999	2.11	2.248	2.145	2.202	2.291
0.366	2.095	2.075	2.083	2.341	2.242	2.138	2.154
0.362	2.056	2.120	2.071	2.301	2.278	2.211	2.177
0.371	2.175	2.105	2.073	2.237	2.158	2.206	2.176
0.353	1.387	1.421	1.477	1.401	1.386	1.305	1.316
0.355	1.558	1.396	1.461	1.482	1.587	1.595	1.613
0.341	1.553	1.371	1.691	1.705	1.599	1.531	1.547
0.338	1.566	1.430	1.663	1.640	1.519	1.339	1.499
0.340	1.530	1.372	1.763	1.552	1.612	1.516	1.582
0.342	1.575	1.337	1.581	1.542	1.634	1.459	1.534
0.341	1.506	1.476	1.519	1.468	1.627	1.450	1.392
0.344	1.663	1.710	1.723	1.612	1.700	1.549	1.373
0.345	1.657	1.840	1.792	1.978	1.866	1.624	1.370
0.347	1.702	1.953	1.865	1.941	1.846	1.548	1.321
0.351	1.573	2.071	1.979	1.928	1.735	1.594	1.466
0.353	1.516	1.911	1.816	1.677	1.707	1.585	1.489
0.326	1.685	1.600	1.498	1.547	1.446	1.946	1.915
0.325	1.569	1.803	1.720	1.640	1.594	1.815	1.846
0.325	1.600	1.802	1.668	1.909	1.977	1.685	1.799

0.327	1.811	1.976	1.886	1.899	2.028	1.374	1.869
0.329	1.583	2.139	1.949	1.949	1.923	1.285	1.706
0.329	1.802	1.918	1.878	1.702	1.538	1.395	1.568

Tabla anexa 11. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Roja sobre las células *HepG2* a través del método MTS.

Blanco	0 ppm	0.3 ppm	1 ppm	3 ppm	10 ppm	30 ppm	100 ppm
0.365	0.946	1.180	1.208	1.143	1.101	1.072	1.039
0.352	0.908	1.159	1.332	1.307	1.238	1.235	1.166
0.359	0.873	1.064	1.051	1.261	1.391	1.339	1.407
0.364	0.945	0.993	1.097	1.23	1.248	1.266	1.215
0.365	0.949	1.042	1.163	1.136	1.130	1.147	1.186
0.358	1.233	0.967	1.019	1.117	1.047	1.154	1.061
0.327	0.583	0.512	0.499	0.507	0.534	0.493	0.538
0.317	0.473	0.498	0.507	0.527	0.530	0.532	0.554
0.327	0.465	0.478	0.518	0.500	0.570	0.537	0.603
0.321	0.475	0.485	0.475	0.536	0.555	0.566	0.550
0.321	0.458	0.476	0.478	0.515	0.498	0.496	0.486
0.319	0.488	0.502	0.516	0.624	0.597	0.623	0.582
0.329	0.485	0.524	0.537	0.497	0.518	0.513	0.452
0.324	0.460	0.552	0.522	0.514	0.515	0.505	0.436
0.330	0.467	0.516	0.524	0.513	0.540	0.506	0.457
0.331	0.518	0.525	0.536	0.523	0.533	0.521	0.482
0.327	0.496	0.502	0.538	0.518	0.469	0.471	0.462
0.342	0.574	0.613	0.600	0.583	0.540	0.526	0.550
0.320	0.766	0.815	0.791	0.814	0.755	0.799	0.760
0.332	0.882	0.713	0.730	0.665	0.684	0.742	0.648
0.320	0.691	0.709	0.703	0.681	0.687	0.789	0.613
0.326	0.786	0.721	0.813	0.699	0.711	0.759	0.598
0.323	0.762	0.686	0.712	0.692	0.632	0.776	0.620
0.327	0.609	0.754	0.705	0.855	0.780	0.931	0.707

Tabla anexa 12. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico del extracto etanólico de Quinoa Roja sobre las células *SH-SY5Y* a través del método MTS.

Blanco	0 ppm	0.3 ppm	1 ppm	3 ppm	10 ppm	30 ppm	100 ppm
0.300	0.380	0.386	0.383	0.358	0.362	0.362	0.377
0.299	0.370	0.373	0.390	0.377	0.371	0.373	0.373
0.297	0.350	0.366	0.372	0.350	0.357	0.377	0.360
0.294	0.354	0.366	0.385	0.378	0.372	0.368	0.372

0.297	0.332	0.355	0.368	0.339	0.351	0.336	0.363
0.296	0.341	0.354	0.376	0.332	0.343	0.349	0.378
0.288	0.352	0.356	0.358	0.337	0.361	0.366	0.381
0.289	0.349	0.361	0.374	0.354	0.374	0.370	0.391
0.288	0.349	0.347	0.330	0.326	0.339	0.339	0.359
0.288	0.367	0.335	0.340	0.336	0.343	0.344	0.352
0.296	0.357	0.349	0.338	0.324	0.337	0.346	0.349
0.301	0.365	0.351	0.343	0.350	0.343	0.349	0.369

Tabla anexa 13. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Ursólico sobre las células A549 a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.292	1.910	1.954	1.927	1.746	1.061	0.329	0.372
0.292	1.941	1.958	1.770	1.733	1.077	0.393	0.353
0.294	1.969	1.956	1.921	1.897	1.034	0.373	0.381
0.292	1.953	1.917	1.917	1.785	1.109	0.337	0.379
0.293	2.026	1.931	1.932	1.889	1.136	0.334	0.377
0.291	2.050	1.943	1.913	1.941	1.115	0.360	0.395
0.302	1.998	2.024	2.002	1.800	0.823	0.322	0.385
0.297	2.011	2.002	1.900	1.855	1.076	0.373	0.382
0.302	2.040	1.984	1.978	1.746	0.945	0.354	0.370
0.306	1.878	2.051	1.940	1.908	1.036	0.355	0.372
0.305	1.955	2.101	2.010	1.938	1.028	0.339	0.355
0.315	1.938	2.096	2.026	1.962	1.160	0.402	0.361

Tabla anexa 14. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Ursólico sobre las células HeLa a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.305	1.722	1.776	1.656	1.111	0.367	0.313	0.345
0.299	1.737	1.813	1.779	1.247	0.357	0.321	0.350
0.301	1.736	1.807	1.849	1.302	0.341	0.327	0.371
0.297	1.786	1.778	1.753	1.255	0.321	0.334	0.353
0.292	1.761	1.783	1.740	1.147	0.325	0.345	0.373
0.304	1.733	1.843	1.862	1.428	0.343	0.343	0.388
0.301	1.875	1.692	1.691	1.305	0.364	0.315	0.343
0.300	1.917	1.736	1.636	1.238	0.377	0.328	0.347
0.297	1.828	1.706	1.723	1.111	0.325	0.315	0.343
0.304	1.834	1.646	1.626	1.188	0.320	0.323	0.356
0.298	1.864	1.740	1.844	0.915	0.303	0.315	0.332

0.301 1.734 1.899 1.904 1.211 0.315 0.310 0.332

Tabla anexa 15. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Ursólico sobre las células *HepG2* a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.412	0.818	0.766	0.757	0.713	0.447
0.408	0.725	0.752	0.744	0.711	0.470
0.419	0.787	0.769	0.798	0.654	0.471
0.413	0.771	0.804	0.784	0.662	0.490
0.439	0.780	0.775	0.793	0.671	0.847
0.360	0.577	0.568	0.581	0.506	0.401
0.346	0.581	0.591	0.604	0.531	0.386
0.354	0.603	0.627	0.654	0.535	0.389
0.358	0.561	0.626	0.650	0.517	0.385
0.359	0.559	0.622	0.611	0.537	0.394
0.353	0.553	0.611	0.771	0.537	0.378
0.360	0.583	0.612	0.616	0.513	0.398

Tabla anexa 16. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Ursólico sobre las células *SH-SY5Y* a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.294	0.394	0.416	0.401	0.349	0.327	0.340	0.335
0.331	0.384	0.419	0.397	0.350	0.325	0.342	0.330
0.333	0.385	0.406	0.388	0.345	0.320	0.330	0.327
0.330	0.378	0.423	0.386	0.344	0.311	0.329	0.342
0.331	0.384	0.400	0.378	0.335	0.312	0.342	0.331
0.327	0.381	0.388	0.364	0.340	0.313	0.339	0.340
0.328	0.368	0.369	0.369	0.346	0.328	0.336	0.347
0.329	0.372	0.361	0.360	0.336	0.320	0.342	0.333
0.330	0.367	0.360	0.370	0.333	0.321	0.345	0.342
0.333	0.358	0.377	0.391	0.333	0.311	0.337	0.328
0.329	0.376	0.392	0.387	0.327	0.314	0.339	0.354
0.329	0.382	0.391	0.385	0.326	0.320	0.334	0.344

Tabla anexa 17. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Oleanólico sobre las células A549 a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.339	1.597	1.456	1.682	0.989	0.425
0.336	1.745	1.669	1.634	1.025	0.443
0.337	1.654	1.639	1.800	1.123	0.452
0.337	1.525	1.594	2.016	1.004	0.407
0.328	1.671	1.827	1.831	1.050	0.423
0.343	1.642	1.627	1.514	0.890	0.442
0.343	1.402	1.423	1.514	0.839	0.408
0.333	1.473	1.378	1.685	0.851	0.457
0.336	1.708	1.802	1.840	0.858	0.403
0.344	1.673	1.862	1.860	1.186	0.417
0.336	1.530	1.472	1.704	1.018	0.406
0.340	1.577	1.554	1.528	1.101	0.446

Tabla anexa 18. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Oleanólico sobre las células HeLa a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.313	1.342	1.289	1.323	0.796	0.388
0.313	1.303	1.404	1.463	0.719	0.406
0.311	1.335	1.424	1.68	0.748	0.423
0.306	1.132	1.469	1.669	0.573	0.383
0.309	1.383	1.529	1.492	0.521	0.371
0.322	1.350	1.321	1.361	0.500	0.364
0.325	1.185	1.169	1.222	0.549	0.391
0.327	1.203	1.054	1.041	0.486	0.426
0.323	1.086	1.045	0.871	0.376	0.400
0.320	1.476	1.433	1.148	0.381	0.402
0.320	1.188	1.417	1.173	0.407	0.445
0.326	1.228	1.403	1.283	0.428	0.418

Tabla anexa 19. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Oleanólico sobre las células *HepG2* a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.332	0.506	0.509	0.501	0.552	0.433
0.356	0.505	0.562	0.545	0.576	0.469
0.351	0.499	0.521	0.492	0.543	0.421
0.341	0.488	0.530	0.493	0.521	0.43
0.340	0.502	0.541	0.485	0.545	0.407
0.341	0.517	0.522	0.504	0.503	0.442
0.354	0.508	0.511	0.531	0.575	0.430
0.337	0.513	0.534	0.591	0.587	0.437
0.335	0.505	0.489	0.548	0.631	0.445
0.326	0.473	0.497	0.545	0.595	0.387
0.352	0.491	0.516	0.582	0.576	0.411
0.331	0.463	0.489	0.520	0.542	0.395

Tabla anexa 20. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Acido Oleanólico sobre las células *SH-SY5Y* a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.309	0.442	0.390	0.406	0.354	0.378
0.314	0.475	0.437	0.445	0.354	0.370
0.325	0.475	0.451	0.431	0.355	0.355
0.329	0.480	0.428	0.434	0.350	0.344
0.338	0.483	0.448	0.456	0.382	0.374
0.320	0.474	0.444	0.419	0.336	0.331
0.330	0.445	0.413	0.406	0.347	0.365
0.330	0.489	0.474	0.456	0.360	0.382
0.333	0.428	0.399	0.398	0.346	0.341
0.343	0.461	0.438	0.425	0.338	0.350
0.344	0.474	0.450	0.439	0.350	0.349
0.323	0.423	0.400	0.415	0.327	0.337

Tabla anexa 21. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Hederagenina sobre las células *A549* a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.297	2.168	2.199	2.164	2.154	2.136	0.980	0.366
0.294	2.136	2.210	2.129	2.131	2.077	0.853	0.354
0.290	2.111	2.239	2.174	2.157	2.107	1.140	0.359
0.286	2.127	2.213	2.135	2.155	2.139	1.261	0.375
0.288	2.091	2.205	2.200	2.182	2.137	1.060	0.358
0.286	2.167	2.254	2.198	2.172	2.140	0.909	0.348
0.299	2.122	2.163	2.170	2.154	2.098	0.609	0.340
0.299	2.151	2.133	2.134	2.120	2.080	0.686	0.392
0.299	2.067	2.130	2.112	2.100	2.065	0.770	0.394
0.302	2.072	2.215	2.149	2.165	2.094	0.623	0.343
0.304	2.023	2.162	2.136	2.132	2.129	0.73	0.343
0.309	2.208	2.149	2.163	2.153	2.107	0.719	0.366

Tabla anexa 22. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Hederagenina sobre las células *HeLa* a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.301	1.837	1.927	1.996	1.905	1.813	0.538	0.340
0.297	1.980	2.014	1.988	1.951	1.879	0.456	0.332
0.317	2.053	1.933	1.990	2.031	1.949	0.387	0.378
0.304	1.980	2.046	2.062	1.970	1.828	0.403	0.378
0.300	1.975	1.954	2.104	2.134	1.943	0.429	0.396
0.294	2.005	1.963	2.019	2.114	2.112	0.388	0.400
0.311	2.005	1.770	2.010	2.133	2.051	0.426	0.372
0.310	1.939	2.113	2.063	2.023	2.002	0.363	0.372
0.311	1.810	2.042	2.023	2.135	2.115	0.399	0.353
0.314	1.919	1.402	1.716	1.841	2.117	0.366	0.395
0.310	1.801	1.964	1.928	1.911	1.855	0.365	0.385
0.312	1.913	2.206	1.938	1.973	1.702	0.359	0.386

Tabla anexa 23. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Hederagenina sobre las células *HepG2* a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.307	0.680	0.805	0.729	0.805	0.689	0.344	0.333
0.305	0.602	0.783	0.751	0.788	0.673	0.348	0.338
0.301	0.634	0.692	0.718	0.745	0.718	0.370	0.346

0.303	0.591	0.749	0.763	0.874	0.736	0.352	0.361
0.299	0.575	0.734	0.770	0.773	0.658	0.346	0.370
0.300	0.607	0.733	0.727	0.768	0.684	0.356	0.356
0.303	0.557	0.607	0.647	0.710	0.677	0.375	0.348
0.304	0.606	0.624	0.612	0.683	0.629	0.346	0.350
0.302	0.587	0.616	0.687	0.829	0.678	0.349	0.363
0.306	0.622	0.690	0.730	0.735	0.784	0.342	0.353
0.304	0.674	0.668	0.683	0.776	0.743	0.341	0.355
0.312	0.620	0.688	0.742	0.760	0.704	0.337	0.338

Tabla anexa 24. Data cruda de absorbancias: Efecto citotóxico de Hederagenina sobre las células *SH-SY5Y* a través del método MTS.

Blanco	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	300 μ M
0.311	0.437	0.490	0.473	0.441	0.335	0.330	0.361
0.305	0.412	0.453	0.448	0.448	0.330	0.321	0.358
0.306	0.403	0.453	0.459	0.476	0.331	0.326	0.375
0.302	0.398	0.439	0.453	0.451	0.320	0.316	0.345
0.300	0.409	0.424	0.411	0.413	0.322	0.328	0.354
0.303	0.425	0.463	0.438	0.449	0.326	0.335	0.356
0.318	0.445	0.435	0.417	0.410	0.324	0.321	0.340
0.316	0.440	0.449	0.455	0.438	0.330	0.338	0.348
0.313	0.431	0.474	0.419	0.426	0.323	0.333	0.351
0.317	0.424	0.480	0.424	0.442	0.337	0.337	0.351
0.316	0.432	0.466	0.444	0.435	0.317	0.332	0.344
0.319	0.431	0.435	0.446	0.428	0.323	0.324	0.333

Tabla anexa 25. Data cruda de absorbancias obtenidas al realizar ensayo Caspasa 3 en las líneas celulares *SH-SY5Y*, *HeLa*, *HepG2* y *A549*.

Línea celular	Tratamiento	Absorbancias	Valores Normalizados
<i>SH-SY5Y</i>	Control	0.077	1.000
	Staurosporina 1 μ M	0.188	2.442
	Acido Oleanólico 100 μ M	0.063	0.818
	Acido Ursólico 30 μ M	0.066	0.857
	Hederagenina 100 μ M	0.063	0.818
<i>HeLa</i>	Control	0.115	1.000
	Staurosporina 1 μ M	0.644	5.600
	Acido Oleanólico 50 μ M	0.118	1.026

	Acido Ursólico 10 μ M	0.156	1.357
	Hederagenina 20 μ M	0.162	1.409
<i>HepG2</i>	Control	0.361	1.000
	Staurosporina 1 μ M	0.495	1.371
	Acido Oleanólico 300 μ M	0.313	0.867
	Acido Ursólico 150 μ M	0.332	0.920
	Hederagenina 100 μ M	0.349	0.967
<i>A549</i>	Control	0.0695	1.000
	Staurosporina 100 μ M	0.0665	0.957

Tabla anexa 26. Data cruda de absorbancias obtenidas al realizar ensayo Caspasa 3 en la línea celular *Hela* con diversas concentraciones de Acido Oleanólico, Acido Ursólico y Hederagenina.

	Absorbancias	Valores normalizados
Control	0.106	1.134
	0.087	0.930
	0.091	0.973
	0.090	0.963
STS 1 μ M	0.428	4.578
	0.430	4.599
	0.644	6.888
	0.536	5.733
Acido Oleanólico 100 μ M	0.147	1.572
	0.112	1.198
	0.091	0.973
	0.094	1.005
Acido Oleanólico 300 μ M	0.160	1.711
	0.160	1.711
	0.188	2.011
	0.177	1.893
Acido Ursólico 10 μ M	0.173	1.850
	0.154	1.647
	0.211	2.257
	0.138	1.476
Acido Ursólico 30 μ M	0.110	1.176
	0.117	1.251
	0.108	1.155
	0.118	1.262
Acido Ursólico 100 μ M	0.202	2.160
	0.174	1.861

	0.167	1.786
	0.134	1.433
Hederagenina 50 μ M	0.156	1.668
	0.108	1.155
	0.306	3.273
	0.108	1.155
Hederagenina 100 μ M	0.160	1.711
	0.166	1.775
	0.185	1.979
	0.108	1.155
Hederagenina 300 μ M	0.270	2.888
	0.227	2.428
	0.140	1.497
	0.237	2.535

Tabla anexa 27. Data cruda de absorbancias obtenidas al realizar ensayo BCA en la línea celular *Hela* para determinar proteínas totales obtenidas a aplicar en ensayo Caspasa 3.

	ABS 1	ABS 2	ABS 3	ABS Corregida 1	ABS Corregida 2	ABS Corregida 3
Control	0.898	0.883	0.869	0.804	0.789	0.775
	1.005	1.013	1.006	0.911	0.919	0.912
	0.891	0.868	0.867	0.797	0.774	0.773
	0.804	0.806	0.793	0.710	0.712	0.699
STS 1 μ M	0.655	0.671	0.679	0.561	0.577	0.585
	0.733	0.747	0.744	0.639	0.653	0.650
	0.685	0.691	0.685	0.591	0.597	0.591
	0.618	0.627	0.608	0.524	0.533	0.514
Acido Oleanólico 100 μ M	0.873	0.877	0.866	0.779	0.783	0.772
	1.008	0.908	0.884	0.914	0.814	0.790
	1.029	1.073	1.028	0.935	0.979	0.934
	0.982	0.985	0.992	0.888	0.891	0.898
Acido Oleanólico 300 μ M	0.922	0.967	0.935	0.828	0.873	0.841
	0.804	0.821	0.788	0.710	0.727	0.694
	0.715	0.755	0.753	0.621	0.661	0.659
	0.747	0.787	0.773	0.653	0.693	0.679
Acido Ursólico 10 μ M	0.878	0.901	0.893	0.784	0.807	0.799
	0.710	0.701	0.648	0.616	0.607	0.554
	0.792	0.825	0.800	0.698	0.731	0.706
	0.996	0.995	0.978	0.902	0.901	0.884

Acido Ursólico 30µM	0.869	0.844	0.783	0.775	0.750	0.689
	0.924	0.929	0.881	0.830	0.835	0.787
	0.796	0.842	0.830	0.702	0.748	0.736
	0.850	0.928	0.959	0.756	0.834	0.865
Acido Ursólico 100µM	0.710	0.728	0.708	0.616	0.634	0.614
	0.797	0.802	0.769	0.703	0.708	0.675
	0.706	0.741	0.713	0.612	0.647	0.619
	0.742	0.732	0.740	0.648	0.638	0.646
Hederagenina 50µM	0.827	0.830	0.831	0.733	0.736	0.737
	0.917	0.864	0.814	0.823	0.770	0.720
	0.809	0.795	0.803	0.715	0.701	0.709
	0.937	0.918	0.918	0.843	0.824	0.824
Hederagenina 100µM	0.968	1.021	0.987	0.874	0.927	0.893
	0.848	0.861	0.810	0.754	0.767	0.716
	0.642	0.640	0.647	0.548	0.546	0.553
	0.629	0.628	0.606	0.535	0.534	0.512
Hederagenina 300µM	0.598	0.593	0.568	0.504	0.499	0.474
	0.687	0.681	0.646	0.593	0.587	0.552
	0.363	0.378	0.382	0.269	0.284	0.288
	0.376	0.367	0.378	0.282	0.273	0.284

Tabla anexa 28. Concentraciones reales obtenidas mediante análisis en *Microsoft Excel 2013* y µL de muestra y buffer de lisis a tomar para realizar ensayo de Caspasa 3 en línea celular *HeLa*.

	Promedio de Concentraciones	CC. Real (µg/ml)	µl de muestra	µl de buffer de lisis
Control	1929.167	9645.833	17	33
	2240.833	11204.167	15	35
	1909.167	9545.833	17	33
	1723.333	8616.667	19	31
STS 1µM	1391.667	6958.333	24	26
	1574.167	7870.833	21	29
	1438.333	7191.667	23	27
	1265.000	6325.000	26	24
Acido Oleanólico 100µM	1900.833	9504.167	17	33
	2054.167	10270.833	16	34
	2329.167	11645.833	14	36
	2186.667	10933.333	15	35
Acido Oleanólico	2074.167	10370.833	16	34
	1731.667	8658.333	19	31

300µM	1573.333	7866.667	21	29
	1643.333	8216.667	20	30
Acido Ursólico 10µM	1947.500	9737.500	17	33
	1436.667	7183.333	23	27
	1735.000	8675.000	19	31
	2195.000	10975.000	15	35
Acido Ursólico 30µM	1800.833	9004.167	18	32
	1999.167	9995.833	17	33
	1777.500	8887.500	19	31
	2001.667	10008.333	16	34
Acido Ursólico 100µM	1509.167	7545.833	22	28
	1694.167	8470.833	19	31
	1520.833	7604.167	22	28
	1565.833	7829.167	21	29
Hederagenina 50µM	1794.167	8970.833	18	32
	1883.333	9416.667	18	32
	1726.667	8633.333	19	31
	2031.667	10158.333	16	34
Hederagenina 100µM	2200.833	11004.167	15	35
	1820.000	9100.000	18	32
	1328.333	6641.667	25	25
	1273.333	6366.667	26	24
Hederagenina 300µM	1186.667	5933.333	28	22
	1399.167	6995.833	24	26
	656.667	3283.333	50	0
	655.000	3275.000	50	0

Tabla anexa 29. Data cruda de absorbancias obtenidas al realizar ensayo BCA en la línea celular *Hela* para determinar proteínas totales obtenidas a aplicar en ensayo *Western Blot*.

	ABS 1	ABS 2	ABS 3	ABS Corregida 1	ABS Corregida 2	ABS Corregida 3
Control 5 horas	0.415	0.398	0.393	0.300	0.283	0.278
STS 5 horas	0.272	0.281	0.268	0.157	0.166	0.153
Hederagenina 50 µM/5 horas	0.542	0.529	0.528	0.427	0.414	0.413
Hederagenina	0.433	0.440	0.432	0.318	0.325	0.317

100 μ M/5 horas						
Hederagenina	0.320	0.323	0.316	0.205	0.208	0.201
300 μ M/5 horas						
Acido Ursólico	0.382	0.403	0.389	0.267	0.288	0.274
100 μ M/5 horas						
Acido Oleanólico	0.328	0.329	0.299	0.213	0.214	0.184
100 μ M/5 horas						
Acido Oleanólico	0.326	0.219	0.219	0.211	0.104	0.104
300 μ M/5 horas						
Control	0.490	0.493	0.481	0.375	0.378	0.366
24 horas						
Hederagenina	0.538	0.543	0.482	0.423	0.428	0.367
50 μ M/24 horas						
Acido Ursólico	0.393	0.415	0.413	0.278	0.300	0.298
100 μ M/24 horas						
Acido Oleanólico	0.448	0.510	0.524	0.333	0.395	0.409
100 μ M/24 horas						
Acido Oleanólico	0.455	0.491	0.474	0.340	0.376	0.359
300 μ M/24 horas						

Tabla anexa 30. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Hederagenina.

Concentración	Promedio del área	DE	RSD	Coeficiente de Variación
32 ppm	105950	1795	0.02	1.69
16 ppm	47496	221	0.00	0
8 ppm	26557	229	0.01	1
4 ppm	14655	492	0.03	3
2 ppm	7291	53	0.01	1

Tabla anexa 31. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Acido Oleanólico.

Concentración	Promedio del área	DE	RSD	Coeficiente de Desviación
32 ppm	115204	278	0.00	0.24

16 ppm	58910	606	0.01	1.03
8 ppm	27550	437	0.02	1.59
4 ppm	10466	97	0.01	0.93
2 ppm	3963	37	0.01	0.93

Tabla anexa 32. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Hederagenina en Quinoa Blanca.

Tiempo retención (minutos)	Área de la curva	Promedio	DE	RSD	Coeficiente de Variación
2.853	30441	30737	256	0.01	0.83
2.853	30885				
2.857	30884				

Tabla anexa 33. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Acido Oleanólico en Quinoa Blanca.

Tiempo retención (minutos)	Área de la curva	Promedio	DE	RSD	Coeficiente de Variación
4.827	17751	17906	288	0.02	1.61
4.830	18238				
4.830	17728				

Tabla anexa 34. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Hederagenina en Quinoa Roja.

Tiempo retención (minutos)	Área de la curva	Promedio	DE	RSD	Coeficiente de Variación
2.847	46927	47013	256	0.01	0.54
2.847	46811				
2.850	47301				

Tabla anexa 35. Data cruda de HPLC: Valores de desviación estándar y coeficiente de variación del estándar de Acido Oleanólico en Quinoa Roja.

Tiempo retención (minutos)	Área de la curva	Promedio	DE	RSD	Coeficiente de Variación
4.813	16524	16745	213	0.01	1.27
4.807	16949				
4.810	16763				

