

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

Evaluación de la concordancia entre los ensayos Rojo Neutro y Cristal Violeta para análisis de la citotoxicidad de extractos de plantas.

Valentina Parra Acevedo

Trabajo de grado para obtener el título de bióloga

Directora:

Prof. Dra. Raquel E Ocazonez J

Escuela de Medicina – Departamento de Ciencias Básicas

Universidad industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

2020

Contenido

	Pág.
Introducción.....	10
1.Objetivos.....	13
1.1 General.....	13
1.2 Específicos.....	13
2. Materiales y métodos.....	13
2.1 Muestras.....	13
2.2 Células.....	14
2.3 Ensayos.....	14
2.4 Experimentos.....	15
2.5 Análisis de datos.....	17
3.Resultados.....	18
3.1 Experimento 1: Número de células vs viabilidad.....	18
3.2 Experimento 2: Poder y confiabilidad de los ensayos.....	19
3.3 Experimento 3: Concordancia de citotoxicidad de muestras vegetales.....	22
4. Discusión.....	26
5.Conclusiones.....	29
Referencias bibliográficas.....	30

Lista de figuras

Pág.

- Figura 1 Relación entre número de células de siembra y viabilidad en los ensayos de Cristal Violeta (CV) y Rojo Neutro (RN). Células Vero (número mostrado) se sembraron en cada pozo de una placa de 96 y la viabilidad (D.O.: unidades de densidad óptica) se midió a las 72 h. Arriba: viabilidad de células sin tratamiento (0) y con tratamiento con DMSO (1 = 1%; 2 = 2%), los datos son promedios \pm EE de tres experimentos independientes en triplicado. Abajo, fotografías de monocapas celulares no-tratadas después de 72 h de sembradas en el pozo que fueron captadas a la observación con microscopio invertido de luz corriente.....19
- Figura 2 Citotoxicidad de químicos de referencia según el ensayo de Cristal Violeta (CV) y Rojo Neutro (RN). Células Vero se trataron por 72 h con el químico como se describió en el experimento 2. Los datos son promedios \pm EE de tres experimentos independientes en triplicado. Abajo, fotografías de monocapas celulares tratadas con DMSO por 72 h que fueron captadas a la observación con microscopio invertido de luz corriente.....21
- Figura 3 Citotoxicidad de las muestras vegetales según el ensayo Cristal Violeta (CV) y Rojo Neutro (RN). Células Vero se trataron 72 h con la muestra a las concentraciones mostradas como se describió para el experimento 3 (metodología). Se muestra la concentración de la muestra que redujo la viabilidad en 50% (CC_{50}); gris = CV, rojo = RN. Los datos (viabilidad respecto a células no tratadas) son promedios \pm EE de tres experimentos independientes en triplicado. AE = aceite esencial. EXT = extracto.....23
- Figura 4 Correlación de los ensayos Cristal Violeta (CV) y Rojo Neutro (RN) cada muestra vegetal. Los datos (viabilidad respecto a células no tratadas) son promedios de tres experimentos independientes en triplicado. AE = aceite esencial. EXT = extracto. El coeficiente de correlación se determinó usando el método de Spearman (r_s) con $p < 0.05$24
- [Figura 5](#) Comparación del potencial citotóxico de muestras vegetales estimado con tres ensayos. Cristal Violeta (CV), Rojo Neutro (RN) y MTT. EXT: extracto. AE: aceite esencial. Color azul muy bajo potencial citotóxico. Colores: amarillo y anaranjado bajo potencial citotóxico. Color rojo alto potencial citotóxico.....25

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Poder y confiabilidad de los ensayos según estadísticos.....	22
Tabla 2. Poder y confiabilidad de los ensayos con muestras vegetales.....	25

Agradecimientos

A la Profesora Raquel Ocazonez Jiménez por su orientación, su apoyo y atención en todo mi proceso de formación en investigación. Sus enseñanzas y consejos me ayudan y motivan para continuar en el sacrificante, pero satisfactorio camino de la ciencia.

A mis padres y hermanos por su incondicional apoyo, por creer siempre en mí y a Elizabeth Quintero, Sindi Velandía y Lina Silva mis compañeras de laboratorio por sus enseñanzas y amistad.

A la Universidad industrial de Santander por su formación y a todos mis profesores que de alguna u otra manera aportaron en mi formación académica.

Resumen

Título: Evaluación de la concordancia entre los ensayos Rojo Neutro y Cristal Violeta para análisis de la citotoxicidad de extractos de plantas*

Autor: Valentina Parra Acevedo**

Palabras claves. Citotoxicidad, MTT, Rojo Neutro, Cristal Violeta, Correlación, Extractos, Aceites

Descripción

Existen distintos ensayos *in vitro* para evaluar la tendencia de muestras vegetales a causar toxicidad de células humanas. Con frecuencia, los datos son discordantes entre ensayos debido a falsos positivos o negativos por interferencia de las muestras con las reacciones enzimáticas del ensayo. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue determinar la concordancia de los ensayos colorimétricos Cristal Violeta (CV) y Rojo Neutro (RN) para verificar si la valoración de la citotoxicidad varía con el ensayo. Se usaron protocolos estándar de los ensayos CV y RN en células de riñón de mono (Vero) cultivadas en placas de 96 pozos. Muestras vegetales: extracto (EXT) o aceite esencial (AE) de cuatro plantas de Colombia. Los estadísticos factor Z, coeficiente de variación (CV), proporción señal fondo (S/B), y proporción señal ruido (S/N), se calcularon para determinar la confiabilidad y poder de cada ensayo. La concordancia entre los ensayos se estimó con el coeficiente de correlación de Spearman. Los resultados demostraron que el ensayo CV presentó mayor robustez y confiabilidad respecto al ensayo RN tanto en los experimentos con químicos (factor Z': 0.8 vs 0.3; S/B: 9.9 vs 23; S/N: 24 vs 18; CV: 0.4 vs 1.6) como con las muestras vegetales (factor Z' 0.9 vs 0.5; S/B: 15 vs 5.7; S/N: 11.0 vs 7.4; CV: 0.16 vs 0.25). Se encontró concordancia en la valoración de la citotoxicidad ($r > 0.85$; $p < 0.05$), los valores de la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) fueron: AE-*Baccharis trinervis*, 107 ± 3.4 (CV) vs 174 ± 7.5 (RN); AE-*Calycolpus moritzianus*, 182 ± 8.6 (CV) vs 219 ± 66.0 (RN); EXT-*Piper eriopodon* 56 ± 2.8 (CV) vs 56 ± 4.7 (RN) y EXT-*Hyptis sinuata* >250 $\mu\text{g/mL}$ con ambos ensayos. Este estudio confirmó la utilidad de los ensayos colorimétricos para evaluar la citotoxicidad de muestras vegetales.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Directora Raquel Ocazonez Jimenez.

Abstract

Title: Assessment of concordance between Red Neutral and Violet Crystal assays for toxicity analysis of plant extract*

Author: Valentina Parra Acevedo**

Keywords. Cytotoxicity, MTT, Neutral Red, Violet Crystal, Correlation, Extracts, Oils

Description:

Different *in vitro* assays are available to assess the tendency of plants samples to cause toxicity to human cells. Often, data are inconsistent between teste due the false positives or negatives, mainly by the samples interference with essay's enzymatic reaction. Therefore, the aim of the work was determine the agreement of the Violet Crystal (VC) and Neutral Red (NR) colorimetric assays to verify if the cytotoxicity assessment varies with the assay. Standard protocols were used the CV and RN assays on monkey kidney cells (Vero) grown in 96- wells plates were used. Plant samples: extract (EXT) or essential oil (EO) for four plats in Colombia. The Z factor, coefficient of variation (CV), background singnal ratio (S/B), and signal to noise ratio (S/N), statistics were calculated to determine the reliability and power of each essay. The agreement between the test was estimated with the Spearman correlation coefficient. The CV was more robust than reliable than RN assay both in experiments with chemicals (Z' factor: 0.8 vs 0.3; S/B: 9.9 vs 23; S/N: 24 vs 18; CV: 0.4 vs 1.6) and in plants samples (factor Z' 0.9 vs 0.5; S/B: 15 vs 5.7; S/N: 11.0 vs 7.4; CV: 0.16 vs 0.25). Agreement was found in the cytotoxicity assement ($r > 0.85$; $p < 0.05$), the values of cytotoxicity concentration 50 (CC50) were: AE-*Baccharis trinervis*, 107 ± 3.4 (VC) vs 174 ± 7.5 (NR); AE-*Calycolpus moritzianus*, 182 ± 8.6 (CV) vs 219 ± 66.0 (NR); EXT-*Piper eriopodon* 56 ± 2.8 (VC) vs 56 ± 4.7 (NR) and EXT-*Hyptis sinuate* $> 250 \mu\text{g/mL}$ was observed in both tests. This study confirmed the usefulness of colorimetric tests to evaluate the cytotoxicity of plant samples.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Directora Raquel Ocazonez Jimenez.

Introducción

Las plantas han sido utilizadas por el hombre desde hace miles de años para el cuidado personal y el alivio de diferentes dolencias, y aún hoy, son recurso valioso para las industrias de medicamentos, cosméticos y productos de aseo (Stashenko y Martínez, 2018; Santic et al., 2016). Los ensayos *in vitro* son ampliamente utilizados para la evaluación de propiedades biológicas de material vegetal y químicos tales como citotoxicidad y actividades antitumoral y antimicrobiana (Atanasov et al., 2015; Bhardwaj et al., 2013). La determinación de la citotoxicidad, sin importar si el fin es la determinación de otra actividad biológica, debe ser el primer paso de toda investigación con plantas.

Los ensayos de citotoxicidad son preferidos frente a otras pruebas por su rapidez, bajo costo y por no requerir el uso de animales (Griesinger et al., 2016). Además, logran modelar y predecir aspectos de un sistema complejo, detectando alteraciones a distintos niveles y por diferentes mecanismos de acción (Bunel et al., 2014). Hay una variedad de ensayos basados en diferentes funciones celulares como la actividad enzimática, la permeabilidad de la membrana celular, la adherencia celular, la producción de ATP, la producción de coenzimas y la actividad de captación de nucleótidos (Aslantürk, 2018).

El ensayo de cristal violeta (ECV) desarrollado por Soatome et al. (1989) es una técnica no-enzimática. Tiene en cuenta la afinidad del cristal violeta por la superficie externa del ADN; y la propiedad de las células viables de adherirse a la superficie de una placa de poliestireno; y que las células muertas se desprenden de la superficie de la placa reduciéndose la cantidad de colorante retenido en el cultivo celular. El colorante se puede extraer de las células adheridas utilizando una

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

solución de metanol y la intensidad se mide en un espectrofotómetro (Feoktistova et al., 2016). La cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables

El ensayo de rojo neutro (ERN) fue propuesto por Borenfreund y Puerner (1985) y ajustado por Repetto et al., (2008), es una técnica no-enzimática basada en la capacidad del colorante de penetrar por difusión pasiva la membrana celular y unirse a la matriz lisosomal por enlaces hidrofóbicos con sitios aniónicos. El gradiente de protones que se genera para mantener el pH dentro del lisosoma carga el colorante y lo retiene dentro de la célula. Cuando la célula muere o se reduce el gradiente de pH el colorante no puede retenerse. Por consiguiente, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables.

Los ensayos basados en sales de tetrazolio (MTT, MTS, XTT o WST) son enzimáticos y se basan en la capacidad de las células vivas en reducir la sal de tetrazolio (color amarillo) a cristales de formazan (color violeta) por la acción, principalmente, de la coenzima NAD(p)H y enzimas glucolíticas del sistema endoplásmico (Stapanenko et al., 2015; Stockert et al., 2018). El producto de esta reacción es disuelto en un disolvente orgánico y analizado colorimétricamente. Estos ensayos enzimáticos se usan con alta frecuencia para medir viabilidad celular y citotoxicidad. El ensayo de MTT (bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5- difeniltetrazólico) fue desarrollado por Mosmann, quien propuso que la reducción del MTT era proporcional al número de células metabólicamente viables (Mosmann, 1983).

El ensayo MTT es ampliamente utilizada para evaluar muestras vegetales; sin embargo, está abierto el debate sobre la exactitud y confiabilidad de sus resultados. La citotoxicidad de una muestra vegetal puede ser sobreestimada o subestimada por una serie de factores. Wang et al. (2015) reportó mayor estimación de la viabilidad celular por interferencia de dos glucósidos feniletanoides presentes en el extracto de *C. tubulosa*. Además, algunos extractos poseen color

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

intenso que interfiere con el color del producto enzimático del MTT, otros contienen ioles, quercetina, rutina y luteolina y feniletanoides que pueden reducir el MTT a formazán en ausencia de células viables (Shoemaker et al., 2004; Talorete et al., 2006).

La diversidad de mezclas de fitoquímicos presentes en extractos y aceites es tan amplia que se desconoce hasta qué punto la valoración de la citotoxicidad depende del ensayo empleado (Bunel et al., 2014). El ensayo MTT, como se mencionó anteriormente, presenta interferencia entre las enzimas reductoras de la célula y diversos componentes propios de la planta. Mientras, los ensayos RN y CV no reportan estos inconvenientes debido a sus diferentes mecanismos de medición. El ensayo MTT mide la actividad enzimática, el ensayo (RN) mide la actividad metabólica del lisosoma y el de ensayo (CV) mide el estado de la monocapa. Se podría considerar que los ensayos NR y CV son más informativos en cuanto a la naturaleza de la inhibición de la viabilidad. En este contexto, se plantearon las siguientes preguntas de investigación para desarrollar durante la pasantía: ¿el poder y confiabilidad de los ensayos RN y CV son similares?; la valoración de la citotoxicidad de muestras vegetales es concordante?

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

1. Objetivos

1.2 Objetivo general

Determinar la concordancia de los ensayos RN y CV para verificar si la elección del método impacta en la valoración de la citotoxicidad de muestras vegetales.

1.3 Objetivos específicos

1. Optimizar los ensayos RN y CV para obtener parámetros de calidad y poder que aseguren confiabilidad en los resultados.
2. Comparar la citotoxicidad de muestras de plantas por los ensayos RN y CV.

2. Metodología

1. 1 Muestras

Vegetales. Para la colecta de las plantas se contó con permiso de *Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados No. 101 del 3 de junio de 2014*, suscrito entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM.

Se incluyeron extractos de *Hyptis Sinuata* Pohl ex Benth y *Piper eriopodon* (Miq.) C. DC. obtenidos por extracción con fluido supercrítico; y aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus* (O. Berg) Burret y *Baccharis trinervis* Pers, obtenidos mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas o extracción por arrastre con vapor. Las muestras fueron obtenidas por el grupo de investigación que dirige la profesora Dra. Elena Stashenko, Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, de la Universidad Industrial de Santander (UIS) y se

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

encontraban almacenadas en alícuotas a -20°C . en el Laboratorio de Actividad Biológica del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la UIS. Todas las muestras fueron previamente analizadas en ensayos del MTT en el CINTROP y los valores de la concentración citotóxica 50 (CC_{50}) fueron suministrados para este trabajo. Para cada experimento se usó una alícuota de cada muestra disuelta en dimetil-sulfóxido (DMSO 1%) a concentración de 100 mg/mL y almacenada

Químicos. Se obtuvieron del fabricante Sigma Aldrich (Estados Unidos de America): DMSO, disolvente de las muestras; antibiótico rifampicina como control positivo por su reconocida citotoxicidad para célula humana (Li et al., 2019); y limoneno (monoterpeno) como control negativo considerado de baja citotoxicidad (Avoseh et al., 2015). Para cada experimento se usó una única alícuota de cada químico diluido en medio MEM 2 % a concentración de 100 Mm y almacenado a -20°C .

1.1 Células

Se usó la línea celular Vero (ATCC[®] CCL-81[™]) derivada de células de riñón de mono verde africano y de uso rutinario en el Laboratorio de Actividad Biológica del CINTROP donde se realizaron los experimentos de este trabajo. Se seleccionó esta línea celular debido a que también se usaron para los ensayos del MTT. Los cultivos celulares se realizaron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y en cajas de 25 cm² que se almacenaron a 37°C con atmósfera de CO_2 (5%).

1.2 Ensayos de citotoxicidad

Ensayo de Cristal Violeta (CV). Se siguió el protocolo descrito por Feoktistova et al. (2016). Las células se cultivaron 18 h en una placa de 96 pozos a 37°C ; 5% CO_2 hasta observar monocapa

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

celular confluyente al microscopio invertido de luz corriente. Las células se trataron según el experimento (adelante) y luego se tiñeron como sigue: al final del período de tratamiento se adicionó a cada pozo 50 μ L de una solución de cristal violeta (0.5%); después de 20 min a temperatura ambiente. el exceso de colorante se retiró lavando cada pozo cuatro veces con agua y luego la placa se dejó secar por 2 h a temperatura ambiente. Para determinar la viabilidad celular, el colorante retenido en cada pozo se liberó adicionando a cada pozo 200 μ L de metanol (100%) y la placa se incubó 20 min a temperatura ambiente. La intensidad del color en cada pozo se midió en un espectrofotómetro de placa multiskan go marca thermo scientific a longitud de onda de 570 nm.

Ensayo de Rojo Neutro (RN). Se siguió seguirá el protocolo descrito por Reppeto et al. (2008). Las células se cultivaron 18 h en una placa de 96 pozos a 37°C; 5%CO₂ hasta observar monocapa celular confluyente al microscopio invertido de luz corriente. Las células se trataron según el experimento (adelante) y luego se tiñeron como sigue: al final del período de tratamiento se adicionó a cada pozo 100 μ L de una solución de rojo neutro (4 μ g/ml); después de 2 h de incubar en una incubadora para cultivo celular (37°C; 5%CO₂) el exceso de colorante se retiró lavando cada pozo con 150 μ L de PBS. Para determinar la viabilidad celular, el colorante retenido en cada pozo se liberó adicionando a cada pozo 150 μ L de solución de elución de RN y la placa se incubó durante 20 min con rotación suave en un agitador de Mazzini. La intensidad del color en cada pozo se midió en un espectrofotómetro de placa multiskan go marca thermo scientific a longitud de onda de 540 nm.

1.3 Experimentos

Experimento 1. Es conocido que el número de células sembradas en cada pozo de la placa de 96

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

es un factor determinante de la confiabilidad de los ensayos de citotoxicidad (Repetto et al., 2008): exceso de células puede afectar la viabilidad celular; al contrario, escasez de células puede inhibir crecimiento celular. El experimento 1 se realizó para determinar el número apropiado de células para sembrar en cada pozo de la placa de 96 pozos. Se montaron dos placas en simultáneo, en cada una se sembraron distinto número de células, desde 5000 hasta 32,000 por tripleta. Adicionalmente se sembraron placas con células desde 30,000 hasta 80,000 células por tripleta. Las células se sembraron en medio MEM 10% y las placas se incubaron 18 h a 37°C; 5%CO₂ para crecimiento del monocapa celular y para medir la interferencia de residuos de colorante una tripleta de pozos quedó sin células. Luego, el medio de cultivo se reemplazó por MEM 2% sin o con solvente (DMSO) a concentración presente en las muestras (1%) y ligeramente mayor (2%). El medio con DMSO se adicionó a células de tripletas de pozos del mismo número que las sembradas con medio sin éste. Las placas se incubaron 72 h a 37°C; 5%CO₂ y la intensidad del color (unidades de densidad óptica – D.O) correspondiente al CV y RN se midió en el espectrofotómetro a 570 y 540 nm respectivamente. El número de células que presentó valor promedio de D.O. cercano a 0.8 y 1 con y sin tratamiento con DMSO 2%, respectivamente, se seleccionó para los experimentos siguientes. Se realizaron tres experimentos independientes.

Experimento 2. Se realizó para determinar el poder de cada ensayo diferenciando los efectos del tratamiento con rifampicina (toxico) y limoneno (no-tóxico). Dos placas de 96 pozos se sembraron con las células en simultáneo y después de 18 h de incubación a 37°C; 5%-CO₂ el medio se reemplazó por medio MEM 2% que contenía el químico a concentración desde 3.9 µM hasta 500 µM. Pozos de la placa con células tratadas con distinta concentración (desde 0.5% hasta 2%) de DMSO se incluyeron como controles. En cada placa se incluyeron tripletas de células no-tratadas y tripletas sin células. Las placas se incubaron 72 h a 37°C; 5%-CO₂ y luego se midió la

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

intensidad del colorante como se mencionó antes. Se realizaron tres experimentos independientes.

Experimento 3. Se realizó para determinar la concordancia de la valoración de citotoxicidad de las muestras vegetales: *P. eriopodon*, *H. sinuata*, *C. moritzianus* y *B. trinervis* por los ensayos CV RN. Dos placas se sembraron con las células en simultáneo y después de 18 h de incubación a 37°C; 5% CO₂ el medio se reemplazó por medio MEM 2% que contenía los extractos y aceites a concentraciones desde 7.8 µg/ml hasta 250 µg/ml. Células tratadas con rifampicina (250 µM) y limoneno (250 µM) se incluyeron como químicos de referencia, células no-tratadas como control negativo y tripletas sin células como control del colorante. La viabilidad celular se determinó como en los otros experimentos.

1.4 Análisis de datos

Los datos crudos de D.O se corrigieron restando el valor de los pozos sin célula. La viabilidad se expresó respecto a las células no tratadas y se calculó aplicando la siguiente formula: promedio de los pozos con células no-tratadas/ promedio de los pozos con células-tratadas Las curvas dosis-respuesta se construyen usando el paquete estadístico R (R Development Core Team [2013]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL [http:// www.R-project.org](http://www.R-project.org)). Se calculó la concentración de la muestra que redujo la viabilidad en 50% (CC₅₀). Para determinar el poder y confiabilidad de los ensayos se estimaron los siguientes estadísticos:

Factor Z, califica la calidad del ensayo y toma en cuenta la variación asociada con la medida de controles de referencia. $Z = 1 - [3 \text{ DS de promedio D.O células tratadas} + 3 \text{ DS de promedio D.O células no-tratadas} / \text{promedio D.O células tratadas} - \text{promedio D.O células no-tratadas}]$ (DS = desviación estándar), Coeficiente de variación. $CV = \text{promedio D.O} / \text{DS}$, Proporción señal / ruido. $S/N = \text{promedio D.O control positivo (rifampicina)} - \text{promedio D.O con células no-tratadas} / \text{DS del control positivo}$ y proporción señal –fondo. $S/B = \text{promedio D.O control positivo} / \text{promedio}$

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

D.O con células no-tratadas.

Los estadísticos se determinaron de cada replica y los tres valores fueron promediados. El ensayo se consideró confiable con los siguientes valores: $Z \geq 0.5$; $S/B > 2$; $CV < 15\%$. La correlación entre los ensayos se calculó usando el coeficiente de Spearman con una significancia de $p < 0.05$.

1. Resultados

3.1 Experimento 1 - Número de células vs viabilidad.

Se hicieron experimentos para determinar el número óptimo de células de siembra y obtener la más alta viabilidad durante los 3 días de duración del ensayo. Se sembraron desde 500 hasta 32,000 células por tripleta de pozos, se observaron resultados distintos con cada ensayo como se presenta en la Figura 1.

Con el ensayo de CV, la D.O. de células en medio de cultivo sin DMSO incrementó con el número: con 16,000 y 32,000 células se obtuvieron valores de 1.0 y 1.5. Los valores de D.O en pozos con células tratadas con 1% DMSO estuvieron entre 0.96 y 0.98 dependiendo del número de células sembradas, mientras los valores de pozos tratados con 2% DMSO entre 0.65 y 0.81. Con base en los resultados se decidió usar 32,000 células por pozo para los siguientes experimentos.

Con el ensayo de RN con el mismo rango de célula del ensayo de CV se obtuvieron valores de D.O. entre 0.2 y 0.5 indicando baja señal (datos no mostrados). En consecuencia, se realizaron experimentos sembrando en cada tripleta desde 30,000 hasta 80,000 células por pozo y se obtuvieron valores de D.O. entre 0.75 y 0.89 (Figura 1). Los valores de D.O en pozos con células tratadas con 1% DMSO estuvieron entre 0.57 y 0.35, mientras los de tratadas con 2% DMSO entre

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

0.73 y 0.76. Con base en estos resultados se decidió usar 80,000 células por pozo para los siguientes experimentos.

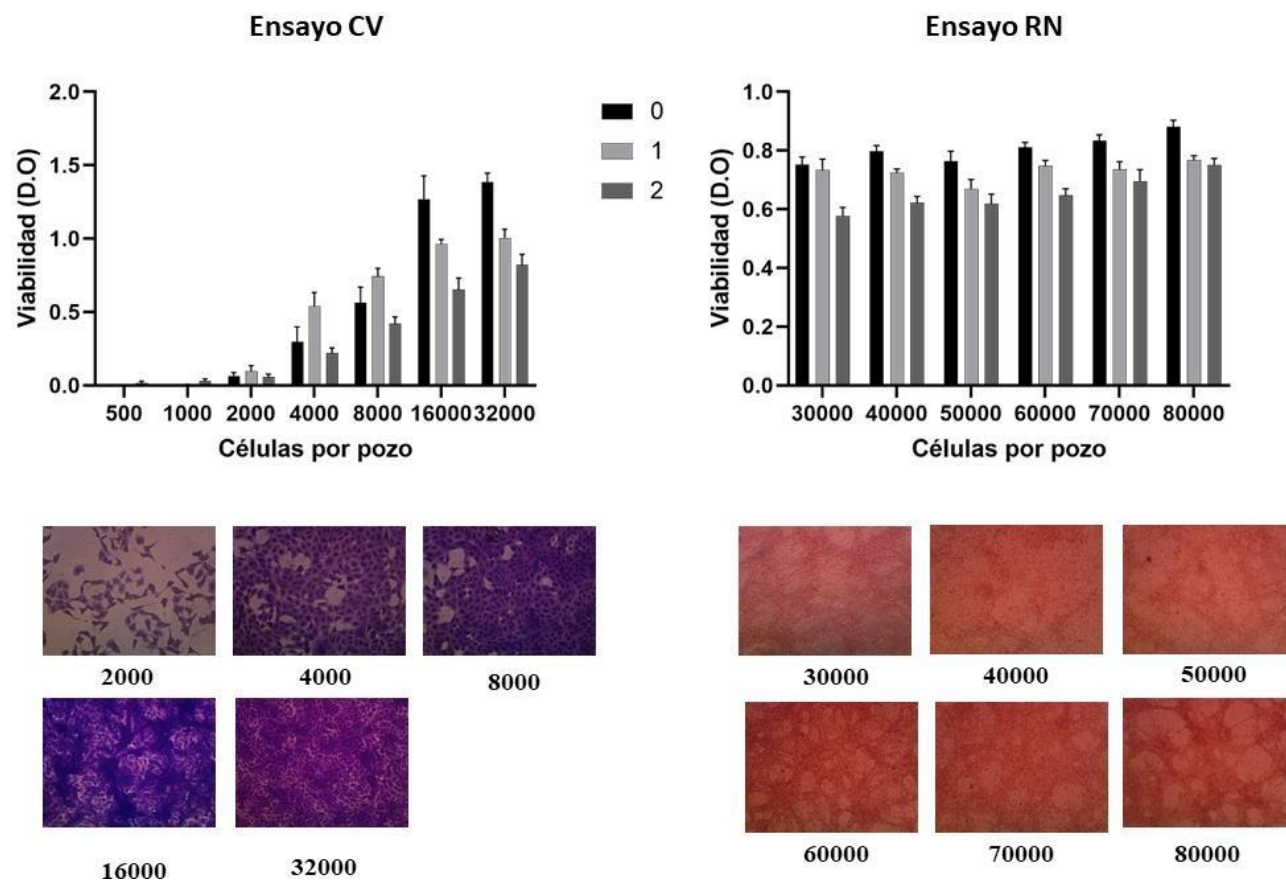


Figura 1. Relación entre número de células de siembra y viabilidad en los ensayos de Cristal Violeta (CV) y Rojo Neutro (RN). Células Vero (número mostrado) se sembraron en cada pozo de una placa de 96 y la viabilidad (D.O.: unidades de densidad óptica) se midió a las 72 h. Arriba: viabilidad de células sin tratamiento (0) y con tratamiento con DMSO (1 = 1%; 2 = 2%), los datos son promedios \pm EE de tres experimentos independientes en triplicado. Abajo, fotografías de monocapas celulares no-tratadas después de 72 h de sembradas en el pozo que fueron captadas a la observación con microscopio invertido de luz corriente.

3.2 Experimento 2 – Poder y confiabilidad de los ensayos

Se hicieron experimentos con compuestos químicos con potencial citotóxico alto (rifampicina) y bajo (limoneno) y con variadas concentraciones de DMSO que pueden o no ser citotóxicas (Figura 2). Con el ensayo CV el tratamiento de las células con limoneno (control negativo) no afectó la

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

viabilidad de 500 μ M; al contrario, el tratamiento con rifampicina disminuyó 3.12 (células no tratadas) a 0.36 y la CC_{50} fue de 227 ± 11.7 .

Con el ensayo RN los resultados fueron similares, la CC_{50} de la rifampicina fue de 154 ± 29.9 . En ambos ensayos, el tratamiento con DMSO 1 redujo la viabilidad entre 3.12 a 2.57 y de 0.79 a 0.60 en el ensayo CV y RN, respectivamente. Las células tratadas con DMSO 1% presentaron valores similares de D.O a las células no tratadas con ambos ensayos (CV 3.0 ± 0.05 vs 3.12 ± 0.02 ; RN 0.69 ± 0.09 vs 0.79 ± 0.03), indicando que el disolvente DMSO 1% no afecta significativamente la valoración de la citotoxicidad.

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

por 72 h que fueron captadas a la observación con microscopio invertido de luz corriente.

La Tabla 1 presenta los estadísticos de poder y confiabilidad de los ensayos utilizando datos de experimentos con control positivo (rifampicina) a distinta concentración. Ensayos con valores $Z' > 0.5$, $S/B > 2.0$; $S/N > 10$, $CV < 15\%$ son aceptables (Inglese et al., 2007). El ensayo CV mostró mayor poder y confiabilidad que el ensayo de RN; con 500 μM de rifampicina los valores fueron $Z': 0.8$ vs 0.3 ; $S/B: 9.9$ vs 23 ; $S/N: 24$ vs 18 ; $CV: 0.4$ vs 1.6 .

Tabla 1. Poder y confiabilidad de los ensayos según estadísticos.

Estadístico	Rifampicina: 500 μM		Rifampicina: 250 μM	
	Cristal Violeta	Rojo Neutro	Cristal Violeta	Rojo Neutro
Z'	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.1 ± 0.2
S/B	9.9 ± 2.8	23.4 ± 27.4	2.5 ± 1.7	2.5 ± 1.2
S/N	24 ± 4.3	18 ± 18.9	102.4 ± 165	7.7 ± 2.1
CV	0.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1

Los datos son promedios de tres experimentos independientes por triplicado. Z' =factor Z' ; S/B = proporción señal fondo, S/N proporción señal ruido, CV = coeficiente de variación. La viabilidad celular a las concentraciones mostradas de rifampicina fue $< 50\%$

3.3 Experimento 3 – Concordancia en la valoración de citotoxicidad de muestras vegetales

Las curvas dosis-respuesta de muestras vegetales obtenidas con los ensayos CV fueron similares a las obtenidas con los ensayos RN (Figura 3), los valores de viabilidad fueron menores con el ensayo RN en la mayoría de las concentraciones.

Los valores de CC_{50} se derivaron de las curvas excepto para *H. sinuata* debido a que no redujo la viabilidad en $> 50\%$ a las concentraciones usadas. Se ha propuesto que muestras vegetales con valores de $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ tienen bajo potencial citotóxico y al contrario con valores $< 50 \mu\text{g/mL}$ (Cos et al., 2006; Ferraz et al., 2013). Los extractos se pudieron clasificar en el mismo rango de citotoxicidad con los dos ensayos. Bajo potencial para *H. sinuata*, $CC_{50} > 250$ y alto

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

potencial para *P. eriopodon*, CC_{50} entre 56 y 50 $\mu\text{g/mL}$. EL AEs de *B. trinervis* mostró mediano potencial citotóxico por los dos ensayos, CC_{50} entre 107 y 174 $\mu\text{g/mL}$; y el AE de *C. moritzianus* bajo potencial citotóxico CC_{50} de 182 (CV) y 219 $\mu\text{g/mL}$ (RN).

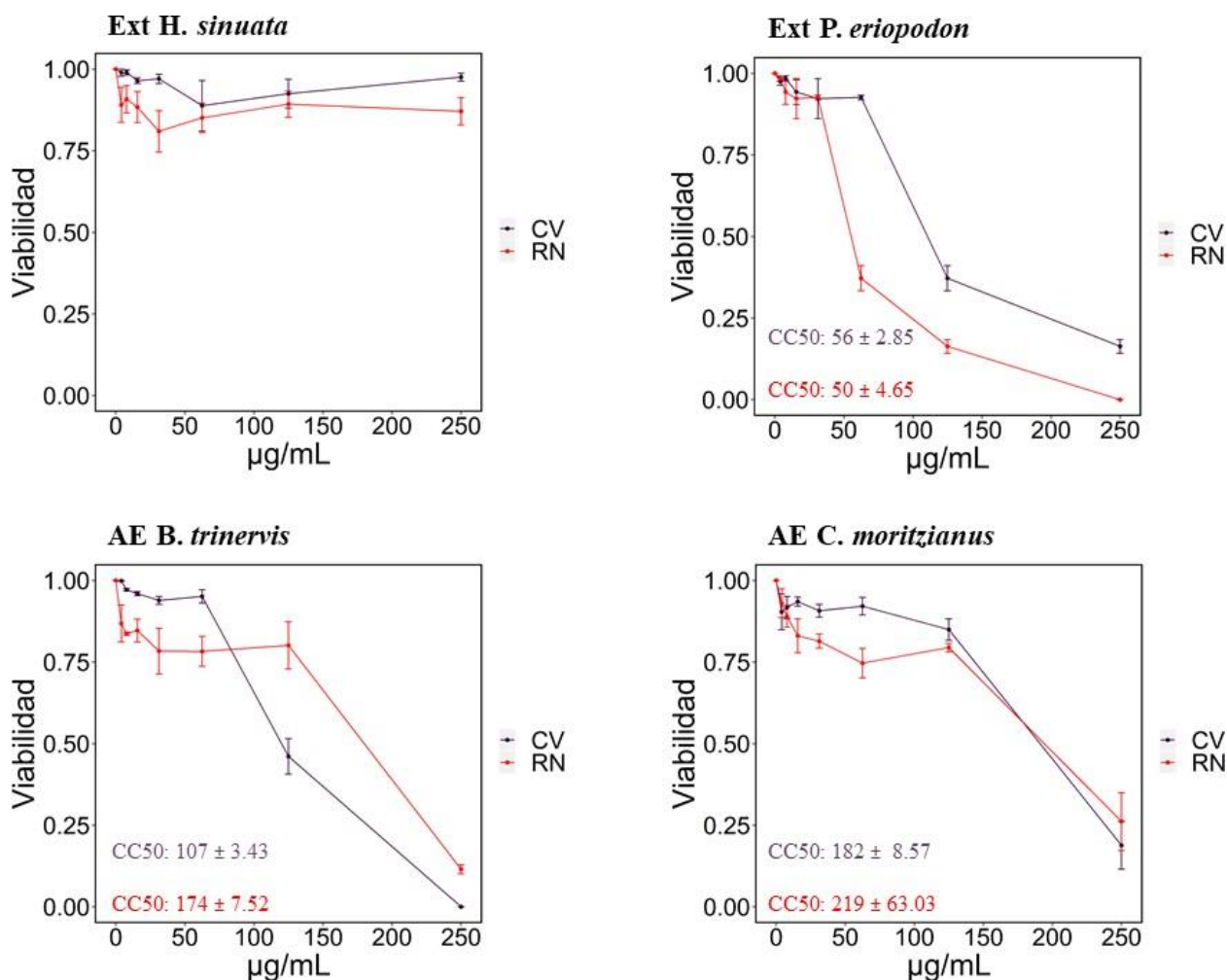


Figura 3. Citotoxicidad de las muestras vegetales según el ensayo Cristal Violeta (CV) y Rojo Neutro (RN). Células Vero se trataron 72 h con la muestra a las concentraciones mostradas como se describió para el experimento 3 (metodología). Se muestra la concentración de la muestra que redujo la viabilidad en 50% (CC_{50}); gris = CV, rojo = RN. Los datos (viabilidad respecto a células no tratadas) son promedios \pm EE de tres experimentos independientes en triplicado. AE = aceite esencial. EXT = extracto.

Los datos de viabilidad celular usados para la elaboración de la curva dosis-respuesta se

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

utilizaron para determinar el grado de correlación de los ensayos RN y CV (Figura 4). La correlación fue significativa ($r_s > 0.8$; $p < 0.05$) en todas las muestras excepto para el EXT de *H sinuata* ($r_s = 0.62$; $p = 0.12$) debido a la ausencia de dosis - respuesta, los datos no fueron adecuados para correlacionar las dos variables.

La Tabla 2 presenta los valores de los estadísticos de poder y confiabilidad para los ensayos con muestras vegetales. Con ambos ensayos los valores fueron mayores a los esperados (referencia) siendo más notorio con el ensayo CV (Z' : 0.92 vs 0.54; S/B: 15.72 vs 5.71; S/N: 11.01 vs 7.37) que el ensayo RN. Los datos confirman el poder y confiabilidad de los ensayos usados.

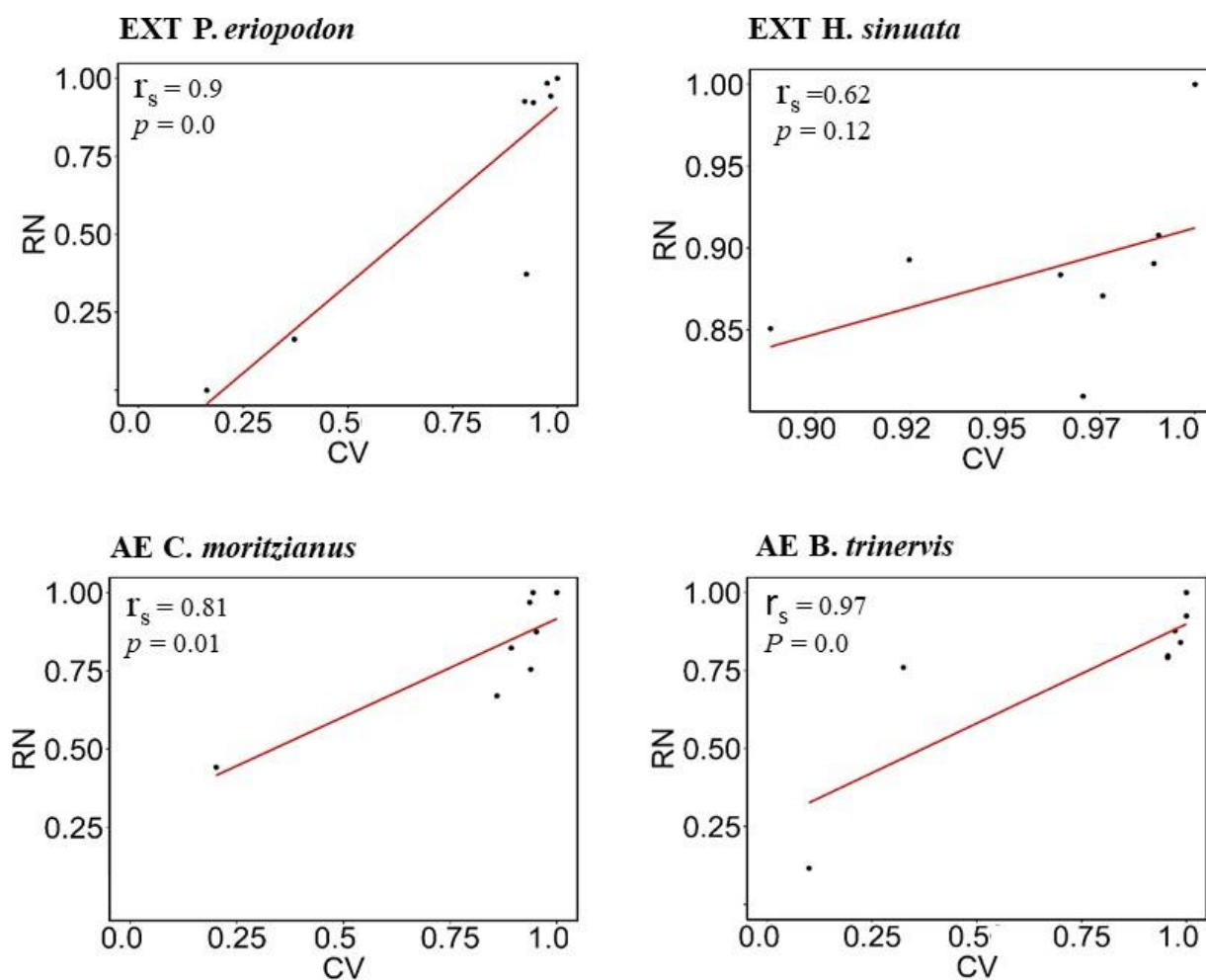


Figura 4. Correlación de los ensayos Cristal Violeta (CV) y Rojo Neutro (RN) cada muestra vegetal. Los datos

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

(viabilidad respecto a células no tratadas) son promedios de tres experimentos independientes en triplicado. AE = aceite esencial. EXT = extracto. El coeficiente de correlación se determinó usando el método de Spearman (r_s) con $p < 0.05$.

Tabla 2. Poder y confiabilidad de los ensayos con muestras vegetales.

Estadístico	Cristal Violeta	Rojo Neutro
Z'	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1
S/B	105 ± 115	6.7 ± 11
S/N	118 ± 103	11.1 ± 8
CV	0.16 ± 0.2	0.25 ± 0.14

El cálculo se hizo con el promedio de tres experimentos independientes por triplicado del valor de D.O en células tratadas con 250 μ M de rifampicina Z'=factor Z' S/B = proporción señal fondo, S/N proporción señal ruido. El CV= coeficiente de variación es el promedio de los CV calculados para todas las muestras vegetales.

La Figura 5 compara la valoración de la citotoxicidad de muestras vegetales con los ensayos CV y RN respecto al ensayo del MTT. Tres de las cuatro muestras se pueden clasificar el mismo potencial citotóxico por los tres ensayos: muy bajo ($CC_{50} > 250 \mu$ g/mL) para *H. sinuata*.; bajo (CC_{50} en el rango de 181-218 para *C. moritzianus*.; y alto para *P. eriopodon* (CC_{50} en el rango de 50 - 61.5). El AE de *B. trinervis* presentó mayor potencial por el ensayo MTT (CC_{50} : 50 μ g/mL) que por los ensayos CV (CC_{50} : 107 μ g/mL) y RN (CC_{50} : 174 μ g/mL).

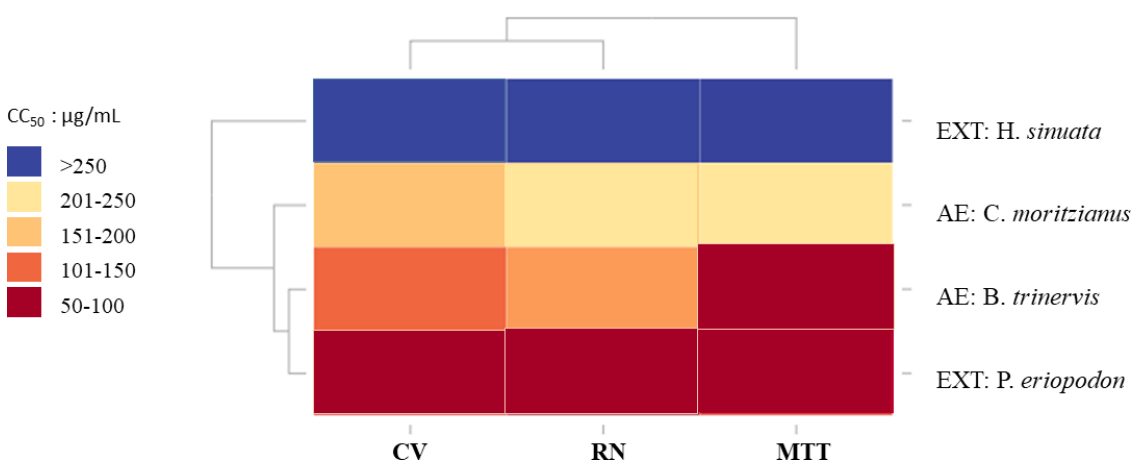


Figura 5. Comparación del potencial citotóxico de muestras vegetales estimado con tres ensayos. Cristal Violeta (CV), Rojo Neutro (RN) y MTT. EXT: extracto. AE: aceite esencial. Color azul muy bajo potencial citotóxico.

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

Colores: amarillo y anaranjado bajo potencial citotóxico. Color rojo alto potencial citotóxico.

4. Discusión

Los resultados del número de células vs viabilidad (Figura 1), muestran que el ensayo RN necesita mayor concentración celular por pozo que el ensayo CV para aumentar la señal del colorante y alcanzar valores de viabilidad cercanas a 1. La baja señal del ensayo RN puede estar relacionada a que el colorante solo es retenido en los lisosomas, Por lo tanto, una monocapa celular en buen estado solo expone pequeños puntos rojos. Por el contrario, el ensayo CV presenta alta señal debido al potente poder de penetración del colorante CV, que a pesar de que solo se ha reportado afinidad con proteínas del ADN, es capaz de teñir toda la célula. Por otra parte, baja señal del ensayo RN en células no tratadas, también puede deberse a baja actividad metabólica, baja concentración celular y precipitación del colorante (Repetto et al., 2008).

El ensayo CV demostró mayor robustez y confiabilidad que el ensayo RN en el experimento con compuestos químicos (Tabla 1). Los estadísticos S/B y S/N en ambos ensayos presentaron valores superiores a los de referencia. El factor Z' fue mejor para el ensayo CV ($Z'= 0.8$) que para el ensayo RN ($Z'= 0.8$). Un factor $Z' < 0.5$ refleja superposición entre los controles positivos y negativos y denota un ensayo de baja confiabilidad (Zhang et al., 1999). El estadístico CV demostró valores altos de variación para los dos ensayos: CV= 0.4 y RN =1.6, estos resultados pueden estar influenciados porque con 500 μM de rifampicina el rango de D.O es de 0 a 0.5, en este pequeño rango la variación es más significativa, además, variantes en el protocolo de lavado de los colorantes RN y CV pueden ser un fuerte determinante del aumento de la variación.

Por otro lado, a pesar de que ambos ensayos presentan alto coeficiente de variación, los valores con el ensayo RN son mayores respecto a el ensayo CV. Además, los valores del factor Z' para RN

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

no son referentes de un buen ensayo. Ambos resultados son indicativos de una alta variación en el ensayo RN que puede estar asociada a la precipitación del colorante en forma de cristales por cambios en temperatura, pH y tiempo de incubación (Bunel et al., 2014).

Las curvas dosis-respuesta de las muestras vegetales obtenidas con los ensayos CV (Figura 3) muestran valores de viabilidad menores con el ensayo RN en la mayoría de las concentraciones (mayor sensibilidad). Se ha documentado que el ensayo RN puede detectar pequeñas alteraciones metabólicas por la susceptibilidad del gradiente de protones lisosoma-citoplasma (Repetto et al., 2008). A diferencia del ensayo CV que solo detecta la citotoxicidad hasta cuando la célula ha perdido la propiedad de adherencia. Por lo tanto, células que permanezcan adheridas, pero en mal estado, no serán detectadas por el ensayo (Feoktistova et al., 2016). Este resultado es acorde con Putnam et al. (2002) y Zwolak et al. (2014) quienes compararon la toxicidad de diferentes compuestos por varios ensayos *in vitro* y encontraron que el ensayo RN fue el más sensible.

En la literatura no hay muchos reportes citotóxicos para las especies estudiadas, el resultado para *P. eriopodon* coincide con la alta citotoxicidad en células vero hallada para una especie del mismo género (*piper hispidum*) (Morales et al., 2013). Así mismo, la baja toxicidad encontrada para *C. moritzianus* concuerda con el reporte de Velandia et al. (2016) quien evaluó la citotoxicidad de esta misma especie en células vero. Por otra parte, la citotoxicidad demostrada para *B. trinervis* no corresponde con el resultado de Silveira et al. (2018) quien no encontró citotoxicidad para *B. trimera* en la máxima concentración evaluada 600 µg/mL.

Como análisis complementario se decidió comparar la valoración de la citotoxicidad de muestras vegetales con los ensayos CV y RN respecto al ensayo del MTT. Los tres ensayos fueron concordantes en tres de las cuatro muestras *H. sinuata*, *C. moritzianus*, y *P. eriopodon*. El AE de *B. trinervis* presentó mayor potencial por el ensayo MTT (CC₅₀: 50 µg/mL) que por los ensayos

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

CV (CC_{50} : 107 $\mu\text{g/mL}$) y RN (CC_{50} : 174 $\mu\text{g/mL}$). Este resultado puede estar relacionado con el mecanismo de medición del ensayo, es posible que el AE de *B. trinervis* afecte directamente una ruta metabólica medida por el ensayo MTT que no puede ser detectada por los otros dos ensayos. Un estudio que evaluó el mecanismo antioxidante de *B. trimera* encontró que esta especie regula e inhibe la fosforilación de la subunidad p47phoxs de la enzima NADPH, enzima relacionada con la reducción de la sal de tetrazolio (De Araújo et al., 2016). Por otro lado, es posible que el ensayo MTT presente interferencia con alguno o varios de los componentes del AE de *B. trinervis*. como se ha reportado con (-)-epigallocatechin-3-gallate, componente principal del té verde (Wang et al., 2010) y glucósidos feniletanoides presentes en el extracto de *C. tubulosa* (Wang et al., 2015). Además, se ha reportado que el ensayo MTT puede presentar resultados falsos negativos o falsos positivos en la valoración de interacciones de compuestos fitoquímicos (Sliwka et al., 2016).

El coeficiente de correlación de los ensayos RN y CV (Figura 4) fue significativo ($r_s > 0.8$; $p < 0.05$) en todas las muestras que presentaron curva dosis respuesta. Este resultado demuestra que los ensayos RN y CV son concordantes en la valoración de la citotoxicidad de extractos y aceites, a pesar de las evidentes disparidades en concentración celular y mecanismo de medición. Es importante recalcar que, debido a la complejidad de las mezclas herbarias, un mayor número de muestra proporcionaría conclusiones más confiables.

La elección del ensayo RN y CV debe ser cuidadosamente tomada dependiendo del objetivo de la investigación y de las limitaciones del método. Si el foco de interés además de la citotoxicidad es la alteración de lisosomas, el ensayo RN es el método más adecuado. Si el objetivo es evaluar el estado de la monocapa después del tratamiento con compuestos, el ensayo CV es más recomendado. El ensayo RN presenta algunas falencias por la naturalidad de los compuestos: inestables, volátiles o de baja solubilidad (Repetto et al., 2008). El ensayo CV puede subestimar

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

los resultados de citotoxicidad por las células muertas que aún adheridas son consideradas células viables por la tinción no específica del colorante (Chiba et al., 1998).

5. Conclusiones

1. Los resultados sugieren que el ensayo RN tiene menor poder y confiabilidad respecto al ensayo CV para valorar la tendencia a citotoxicidad de mezclas de fitoquímicos. Con el ensayo RN se requirió mayor número de células por pozo de la placa para obtener señal aceptable de viabilidad celular
2. La validación de la citotoxicidad de las muestras vegetales y químicos fue similar por los ensayos colorimétricos CV y RN. Esta validación comparada con la previa por el ensayo del MTT fue similar excepto para el aceite de *B. trinervis* que resultó con mayor tendencia a citotoxicidad por el ensayo enzimático
3. Se requiere analizar mayor número de muestras vegetales para precisar el poder y confiabilidad de la valoración de la citotoxicidad por los ensayos CV, RN y MT.

Referencias bibliográficas

- Aslantürk, Ö. S. (2018). *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity - a predictable risk to our actual world*.
- Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., Nkeh-Chungag, B., & Oyedeji, A. (2015). Cymbopogon species; Ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *molecules*, 20(5), 7438–7453.
- Bhardwaj, P., Alok, U. & Khanna, A. (2013). *In vitro* cytotoxicity of essential oils: a review. *International journal of research in pharmacy and chemistry*, 3(3) 675:681.
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods*, 9(1),
- Bunel, V., Ouedraogo, M., Nguyen, A., Stévigny, C., & Duez, P. (2014). Methods applied to the *in vitro* primary toxicology testing of natural products: State of the Art, Strengths, and Limits. *Planta Médica*, 80(14).
- Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 12(3), 251–258.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept.” *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290–302.
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4, 343-346.
- Ferraz, R. P. C., Bomfim, D. S., Carvalho, N. C., Soares, M. B. P., da Silva, T. B., Machado, W. J., ... Bezerra, D. P. (2013). Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia Gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine*, 20(7), 615–621.
- Griesinger, C., Desprez, B., Coecke, S., Casey, W., & Zuang, V. (2016). Validation of alternative *in vitro* methods to animal testing: Concepts, Challenges, Processes and Tools. *Validation of alternative methods for toxicity Testing*, 65–132.
- Inglese, J., Johnson, R. L., Simeonov, A., Xia, M., Zheng, W., Austin, C. P., & Auld, D. S. (2007). High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nature Chemical Biology*, 3(8), 466–479.
- Li, F., Zhou, J., Li, Y., Sun K., & Chen, J. (2019). Mitochondrial damage and drp1 overexpression in rifampicin- and isoniazid-induced liver injury cell model. *Journal of clinical and translational hepatology*, 7(1),40-45.

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

- Morales, A., Rojas, J.D., Moujir, L.M., Araujo, L.M., & Rondón, M. (2013). Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activities of *Piper hispidum* Sw. essential oil collected in Venezuela, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3(6), 16-20.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- Shoemaker, M., Cohen, I., & Campbell, M. (2004). Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3), 381-384.
- Putnam, K. P., Bombick, D. W., & Doolittle, D. J. (2002). Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro*, 16(5), 599-607.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125-1131.
- Santic, Z., Pravdic, N., Bevanda, M., & Galic, K. (2016). The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. *Psychiatria Danubina*, 29(4), 787-792.
- Saotome, K., Morita, H., & Umeda, M. (1989). Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicol In Vitro*, 3(4), 317-321.
- Silveira Rabelo, A. C., & Costa, D. C. (2018). A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. *Chemico-Biological Interactions*.
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K., ... Chilmonczyk, Z. (2016) The Comparison of MTT and CVS Assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLOS ONE*, 11(5).
- Stashenko, E., & Martinez, J. (2018). The expression of biodiversity in the secondary metabolites of aromatic plants and flowers growing in Colombia, potential of essential oils, Hany A. El-Shemy, *IntechOpen*, 4, 60-85.
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193-203.
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in cell Biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159-167.
- Sui, Y., & Wu, Z. (2007). Alternative statistical parameter for high-through put screening assay quality assessment. *J BiomolScreen*, 12(2), 229-234.

VALORACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

- Talorete, T., Bouaziz, M., Sayadi, S., & Isoda, H. (2006). Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology*, 52(3), 189-198.
- Velandia, S., Quintero, E., Stashenko, E., et al. (2018). Actividad antiproliferativa de aceites esenciales de plantas medicinales cultivadas en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 23(2):189-198.
- Wang, P., Henning, S. M., & Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green Tea polyphenols. *PLoS ONE*, 5(4), e10202.
- Wang, Y.J., Zhou, S.M., & Xu, G. (2015). Interference of phenylethanoid glycosides from *cistanche tubulosa* with the mtt assay. *Molecules*, 5;20(5):8060-71.
- Zhang, J., Chung, T., Oldenburg, & K.R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*, 4, 67-73.
- Zwolak, I. (2013). comparison of five different in vitro assays for assessment of sodium metavanadate cytotoxicity in chinese hamster ovary cells (cho-k1 line). *Toxicology and Industrial Health*, 31(8), 677–690.