

Natalia Areiza-Mazo<sup>1</sup>; María Elena Maldonado<sup>2</sup>; Benjamín Rojano<sup>3</sup>

## Resumen

**Antecedentes:** extractos etanólicos de *P. peruviana* han mostrado actividad citotóxica contra diferentes células cancerosas. **Objetivo:** estudiar la actividad anticancerígena de un extracto acuoso del fruto uchuva en células de cáncer de colon SW480 y SW620. **Materiales y métodos:** se analizaron citotoxicidad e índice de selectividad (SI) (MTT), antiproliferación (sulforodamina-B), apoptosis (ciclo celular, anexina-V, receptores TRAIL-DR4/-DR5 y caspasa-3), actividad antioxidante (contenido de flavonoides y carotenoides totales). **Resultados:** el extracto acuoso de uchuva mostró efecto citotóxico y antiproliferativo en células SW480 ( $IC_{50}=44,2 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI=11,6$ ) y SW620 ( $IC_{50}=85,1 \mu\text{g/mL}$ ,  $SI=6,0$ ). Las células hipodiploides SW480 y SW620 aumentaron 13% y 12%, respectivamente. Las células apoptóticas incrementaron 19% y 21% en SW480 y SW620, respectivamente, con incremento en la expresión de receptores TRAIL-DR4/-DR5 en SW480 (+59%/+53%) y SW620 (+67%/+65%), y activación de caspasa-3 en ambas líneas celulares. El extracto neutralizó radicales OH<sup>-</sup>, presentó baja capacidad reductora y atrapadora de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. El contenido de flavonoides y carotenoides fue 487,1 mg catequina y 0,9 mg  $\beta$ -caroteno por 100 g de liofilizado, respectivamente. **Conclusiones:** estos hallazgos sugieren que la uchuva puede ser una fuente prometedora de compuestos bioactivos con actividad quimiopreventiva en cáncer de colon humano.

**Palabras clave:** *Physalis peruviana*, cáncer colorrectal, ciclo celular, apoptosis, antioxidantes, anticancerígenos.

1 Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

2 Grupo Alimentación y Nutrición Humana, Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia. mariaele@quimbaya.udea.edu.co

3 Grupo Ciencias de los Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia. Medellín-Colombia.

Como citar este artículo: Areiza-Mazo N, Maldonado ME, Rojano B. Extracto acuoso de uchuva (*Physalis peruviana*): actividades antiproliferativa, apoptótica y antioxidante. Perspect Nutr Humana. 2013;15: 41-55.

## Aqueous extract of golden berry (*Physalis peruviana*): antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities

### Abstract

**Background:** Ethanolic extracts from *P. peruviana* showed cytotoxic activity against different cancer cell lines. **Objective:** To evaluate the antiproliferative activity of aqueous extract of the fruit golden berry in colon cancer cells. **Materials and Methods:** We analyzed cytotoxicity and selectivity index (SI) (MTT), antiproliferation (sulforhodamine-B), apoptosis (cell cycle, Annexin-V, receptors TRAIL-DR4/-DR5 and caspase-3), and antioxidant activity (content of total carotenoids and flavonoids). **Results:** The aqueous extract showed cytotoxic and antiproliferative effect on SW480 ( $IC_{50} = 44.2 \mu\text{g/ml}$ ,  $SI = 11.6$ ) and SW620 ( $IC_{50} = 85.1 \mu\text{g/ml}$ ,  $SI = 6.0$ ). The hypodiploid SW480 and SW620 cells increased 13% and 12% respectively as well as apoptotic SW480 and SW620 cells (19% and 21 %, respectively), expression of receptors TRAIL-DR4 /-DR5 (SW480: +59% / +53%; SW620: +67% / +65%) and activation of caspase-3. The aqueous extract scavenged OH<sup>-</sup> radicals, showed low oxygen radical capacity and low scavenging capacity for reactive oxygen and nitrogen species. The total flavonoids and carotenoids content was 487.1 mg catechin y 0.9 mg  $\beta$ -carotene by 100 g powder, respectively. **Conclusions:** These findings suggest that golden berry may be a promising source of bioactive compounds with chemopreventive activity against human colon cancer.

**Key words:** *Physalis peruviana*, colorectal neoplasms, cell cycle, apoptosis, antioxidants, anticarcinogenic agents.

### INTRODUCCIÓN

Entre las frutas con alto potencial farmacológico pero escaso conocimiento sobre sus beneficios en la prevención y tratamiento del cáncer, se encuentra el fruto de la planta *Physalis peruviana* (uchuva), una baya de forma ovoide, color dorado brillante, protegida por un cáliz verde claro (1). Esta planta pertenece a las Solanáceas y aunque es el segundo fruto colombiano de mayor exportación su consumo interno es bajo (2).

*P. peruviana*, se postula como nutraceutico, por su alto contenido de vitaminas A, C, D, E y del complejo B; fitoquímicos como polifenoles que pueden actuar como "barredores" de radicales libres, otorgándole a la uchuva propiedad antioxidante, que brindan valor agregado con potencial beneficio para la salud (3). Algunas propiedades me-

dicinales se han asociado con las lactonas como el 28 hidroxiwitanólido, witanólidos, physalinas, phygrina; y flavonoides como el kempferol y glucósidos de quercetina, que han mostrado actividad antioxidante y preventiva al daño peroxidativo en microsomas hepáticos y hepatocitos (4).

En relación con la actividad anticancerígena, las physalinas presentes en las hojas, han mostrado tener actividad citotóxica contra células de cáncer hepático (HA-22T), cérvix (HeLa), leucemia linfocítica aguda (APM1840), leucemia promielocítica aguda (HL-60), leucemia mielocítica aguda (KG-1), leucemia monocítica aguda (CTV-1) y cáncer nasofaríngeo (KB-16) (5-7). Quispe-Mauricio *et al* (8) encontraron que extractos etanólicos del tallo y hojas de *P. peruviana* seleccionaron e inhibieron significativamente el crecimiento de células de adenocarcinoma de colon (HT-29),

cáncer de próstata (PC-3) y de leucemia mieloide crónica (K-562).

Por tanto, el desconocimiento científico de la actividad anticancerígena del fruto de la uchuva, invita a indagar sobre esta propiedad con base en la evaluación de su actividad citotóxica, antiproliferativa, apoptótica y antioxidante en un modelo *in vitro* de cáncer de colon mediante células de adenocarcinoma SW480 y sus derivadas metastásicas SW620, provenientes de un mismo paciente (9); y determinar el efecto selectivo ante células no-malignas VERO, una línea de células no-malignas de epitelio de riñón del mono verde africano, adulto y normal, *Cercopithecus aethiops*; con esta se estudiará la selectividad del extracto y se usará como control negativo (10).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación del extracto acuoso

Se utilizaron frutas de uchuva del departamento de Cundinamarca (Colombia). Para obtener el extracto, 10 g de fruta madura y sana, fue lavada y desinfectada, posteriormente homogenizada con 50 mL de agua ultrapura en un Ultra Turrax® (Ika-Werke, Staufen, Germany) a 15.000 rpm por 20 seg, se filtró con papel Whatman N°1 y se liofilizó en un Labconco, Freezone 2.5 Plus System (Fisher Scientific, Pittsburg). El producto se almacenó a -20°C, protegido de la luz hasta el momento de su uso. Inmediatamente antes de usar, el extracto se filtró con membrana de 0,22 µm.

### Cultivos celulares

Las células SW480, SW620 y VERO obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) se mantuvieron como fue descrito en Maldonado y colaboradores (11). Brevemente, se utilizó medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 10% de suero de caballo inactiva-

do, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, y 1% de aminoácidos no-esenciales. Las incubaciones se hicieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Para todos los experimentos, 24 h después de sembrar, se redujo la concentración del medio a 3% de suero, con 10 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de transferrina, 5 ng/mL de selenio.

### Ensayo MTT

Basado en la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (12). En platos de 96 pozos se sembraron 3.000 células viables/pozo, expuestas al extracto (0 a 400 µg/mL) y cúrcuma (100 µg/mL), como control positivo por 72 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Luego, se adicionó 5 mg/mL por pozo de MTT (4 h, 37°C, en oscuridad). Los cristales de formazán se disolvieron con isopropanol acidificado (0,4 N HCl). La cantidad de formazán – MTT directamente proporcional al número de células vivas fue determinado usando la densidad óptica (OD) a 540 nm mediante lector de platos de ELISA (GloMax®-Multi Promega) y una longitud de onda de referencia a 750 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula: % Inhibición =  $(1 - OD_t / OD_c) \times 100$ . Donde OD<sub>t</sub> = densidad óptica tratadas y OD<sub>c</sub> = densidad óptica control. La concentración del extracto causante del 50% de inhibición del crecimiento celular (IC<sub>50</sub>) se calculó usando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). El índice de selectividad (SI) se calculó usando la siguiente ecuación:  $SI = IC_{50} \text{ células VERO} / IC_{50} \text{ células cancerígenas}$  (12). Si el valor SI es >1, indica que la sustancia es más citotóxica para las células tumorales que para las células normales, si es <1 significa lo contrario.

### Ensayo sulforodamina B (SRB)

Las células se incubaron como fue descrito en el ensayo de MTT. El medio DMEM 3% fue reem-

plazado cada 48 h con diferentes concentraciones del extracto. El cultivo celular se interrumpió con ácido tricloroacético 50% (v/v) por 1h a 4°C, y las proteínas celulares se colorearon con 0,4% (p/v) de SRB a las 24, 48 y 72 horas. La absorbancia de SRB es proporcional al número de células adherentes y vivas que fueron determinadas mediante densidad óptica a 490 nm, usando un lector de platos de ELISA (GloMax®-Multi Promega) (13).

### **Análisis del ciclo celular**

Se usó la tinción de yoduro de propidio (IP) para medir el porcentaje de población celular en la región Sub G0/G1, la cual exhibe un bajo contenido de DN inferior a 2n, característico de células muriendo que exhiben degradación de ADN (14). Esta aproximación permite determinar la cantidad de células muertas o muriendo en una población, pero no da información del proceso de muerte celular en curso como la apoptosis. Después del tratamiento, las células fueron centrifugadas y fijadas en 1 mL de metanol: tampón fosfato salino (PBS), (9:1, v/v) a -20°C por al menos 30 min, lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en 200 µL PBS con 0.25 mg/ml RNAse A y 0.1 mg/mL IP, incubadas en la oscuridad a 37°C por 30 min. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo (EPICS XL, Coulter, Hialeah, Florida) a una velocidad de adquisición de 10000 eventos/seg y se analizó con el programa Windows Multiple Document Interface 2.8, WinMDI, (Scripts Research Institute, La Jolla, CA).

### **Detección de apoptosis**

Mediante detección en superficie celular de fosfatidilserina (15), después de 48 h de tratamiento, las células se recolectaron por tripsinización y se usó el estuche comercial *annexin-V-FLUOS staining*, siguiendo las indicaciones del fabricante (Roche). La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo (EPICS XL, Coulter, Hialeah, Florida) a una velocidad de adquisición de 10.000 eventos/seg y se

analizó con el programa Windows Multiple Document Interface 2.8, WinMDI, (Scripts Research Institute, La Jolla, CA).

### **Detección de receptores de muerte TRAIL-DR4/DR5**

Se utilizó el procedimiento descrito por Maldonado y colaboradores (11). Brevemente, después de 48 horas de tratamiento de las células con el extracto, se recolectaron por tripsinización, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), frío, y se incubaron en oscuridad (30 min, 4°C) con el anticuerpo monoclonal de isotipo anti-IgG de ratón acoplados al fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (BD Biosciences, Belgium); o se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-humano-DR4 y anti-humano-DR5 de ratón, ambos anticuerpos acoplados a FITC (Alexis Biochemicals Co., Lausana, Suiza). La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences, Belgium) a una velocidad de adquisición de 10.000 eventos/seg y se analizó con el programa CellQuest Software (BD Biosciences, Belgium).

### **Actividad de la Caspasa-3**

Se midió con el estuche comercial Caspase-3 Assay Colorimetric Kit (Sigma-Aldrich, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ensayo se basa en la hidrólisis del péptido acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA) por la caspasa-3, resultando en la liberación de pNA, cuya concentración se calculó a partir de la OD a 405 nm y la curva de calibración de pNA. Los resultados se ajustaron al contenido de proteína total, y la actividad se expresó como nmol de p-NA/h/mg de proteína.

### **Determinación del contenido total de flavonoides**

Se empleó el ensayo colorimétrico con cloruro de aluminio usado por Debnath en 2011 (16). Se adi-

cionaron a 25  $\mu\text{L}$  de muestra o solución estándar 125  $\mu\text{L}$  de agua destilada, luego 5  $\mu\text{L}$  de solución de nitrato de sodio al 5% (v/v). La mezcla se incubó por 5 minutos. Posteriormente, 10% (v/v) de solución de cloruro de aluminio fue mezclado con 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior. Finalmente la absorbancia se leyó a 510 nm y el contenido de flavonoides se expresó como mg catequina/100 g de liofilizado.

### **Determinación de carotenoides**

Se usó el método descrito por Biswas y colaboradores en 2011 (17). Se tomó en un tubo de ensayo con 1 g de muestra, se adicionaron 5 mL de acetona fría, se dejó reposar alrededor de 15 min en refrigerador (4°C), pasado este tiempo se agitó en vórtex por 2 min. El precipitado se re-extrajo con 5 mL de acetona fría y se repitió todo el proceso anterior. Ambos extractos acetónicos se mezclaron, luego se filtraron en papel Whatmann No. 42 y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Genesys 20® a longitud de onda de 449 nm. La concentración de carotenoides se estipuló mediante la curva de calibración respectiva, utilizando  $\beta$ -Caroteno como sustancia patrón.

### **ORAC (Capacidad de absorción de radicales del oxígeno)**

Se midió la actividad antioxidante del extracto contra el radical peroxilo 2,2 -Azo-bis(2-amidinopropano) dihydrochlorido (AAPH) generado a 37°C (18). La fluoresceína (FL) se usó como sonda, cuya disminución indica la cantidad del radical peroxilo inhibido. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  Trolox/100g de liofilizado respecto a una curva de calibración de Trolox.

### **Capacidad atrapadora de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) totales**

Se mezclaron 0,3 M A2,2 -Azo-bis(2-amidinopropano) dihydrochlorido (AAPH), 2,4 mM 2,7-diclo-

rofluoresceína diacetato y tampón fosfato salino (PBS) con o sin extracto por 10 min. Los resultados se expresaron como mol de Trolox/100 g de liofilizado o L de solución del extracto (18).

### **Evaluación de la capacidad atrapadora de radicales hidroxilos**

Se mezclaron tereftalato de sodio  $1 \times 10^{-4}$  M, tampón fosfato salino (PBS), el extracto de uchuva, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)  $1 \times 10^{-2}$  M y  $\text{Fe}^{2+}$   $1 \times 10^{-2}$  M. La mezcla se incubó por 6 min con aireación constante y a temperatura ambiente. Se midió la fluorescencia a excitación 326 nm y emisión 432 nm por 10 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  DMSO / 100g liofilizado (18).

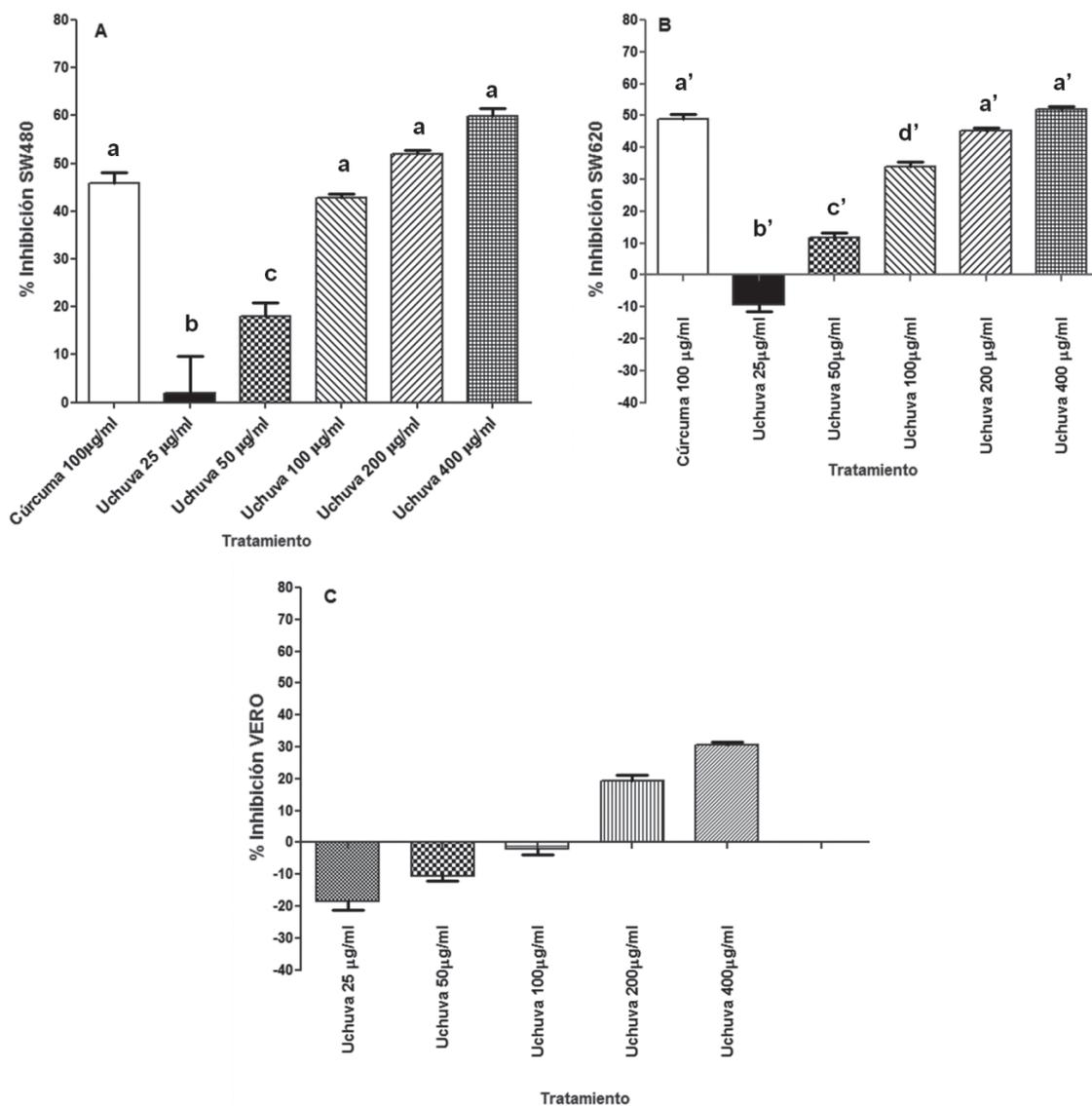
### **Análisis estadísticos**

Los resultados se analizaron con GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California, USA). Los datos se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar de la media (ESM). Las diferencias estadísticas se evaluaron con la prueba t-Student o ANOVA de una vía y post-test de comparaciones múltiples Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

### **Efecto citotóxico selectivo y en el crecimiento celular**

La citotoxicidad incrementó en forma dependiente de la dosis entre 25–400  $\mu\text{g/mL}$  para SW480 (figura 1A) y a partir de 50  $\mu\text{g/mL}$  para SW620 (figura 1B). Esto se ve reflejado a su vez en el aumento del porcentaje de inhibición de la viabilidad celular dependiente de la concentración del extracto, lo que indica un efecto citotóxico de la uchuva sobre estas células cancerígenas. Las concentraciones con mayor efecto citotóxico fueron 100, 200 y 400  $\mu\text{g/mL}$ , las cuales alcanzan porcentajes de inhibición mayores de 30%, en SW620 y más



**Figura 1.** Efecto citotóxico en células SW480 (A), SW620 (B) y VERO (C)

Las células ( $1 \times 10^6$ ) fueron expuestas a diferentes concentraciones de uchuva (25 a 400 µg/mL) por 48 h. La cúrcuma fue empleada como control positivo. Los datos son promedio  $\pm$  error estándar de la media ( $n=3$ ). Diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento fueron determinadas por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para cada línea celular, las columnas que no comparten el índice difieren significativamente  $a \neq b \neq c$ ,  $a' \neq b' \neq c' \neq d'$  (A, B:  $***p < 0,001$ ).

de 40% en SW480 (figura 1A). En SW480 las concentraciones de 200 y 400 µg/ml inhibieron más del 50% de la viabilidad celular, superando la cúrcuma (control positivo), cuyo porcentaje de inhibición fue del 45%. En SW620 solo 400 µg/ml alcanza el 50% de la inhibición, lo que es igual al porcentaje de inhibición de la cúrcuma (figura 1B). El valor  $IC_{50}$  para el extracto de uchuva en células SW480 fue 44,2 µg/mL y para SW620 fue 85,1 µg/mL.

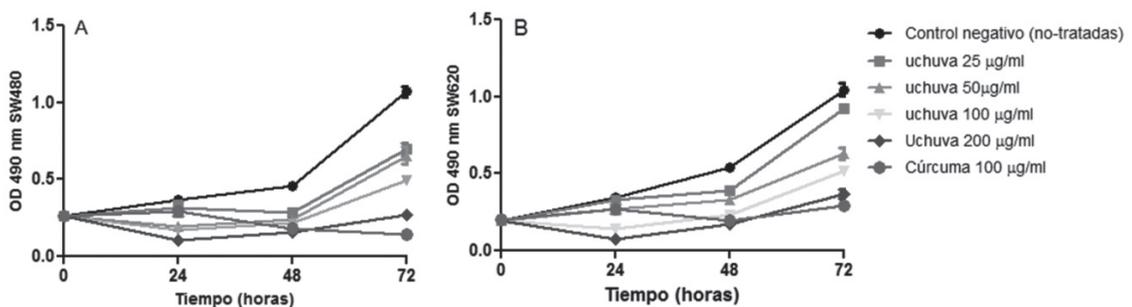
Para calcular el índice de selectividad se realizó el mismo tratamiento a células VERO con el extracto acuoso de uchuva, primero se calculó el % de inhibición de viabilidad, luego su  $IC_{50}$  y posteriormente se aplicó la ecuación descrita en la sección de materiales y métodos. Mientras que la viabilidad de las células VERO bajo las mismas condiciones fue 19,3% y 30,6% a 200 µg/mL y 400 µg/mL, respectivamente, cuyo  $IC_{50}$  fue 514,2 µg/mL (figura 1C). Al calcular el índice de selectividad (tabla 1) se encontró que el extracto acuoso fue más citotóxico para las células SW480 y SW620 que para las

células no-malignas VERO, siendo más sensibles las células SW480.

**Tabla 1.** Valores de  $IC_{50}$  e índice de selectividad (SI) del extracto acuoso de la fruta uchuva.

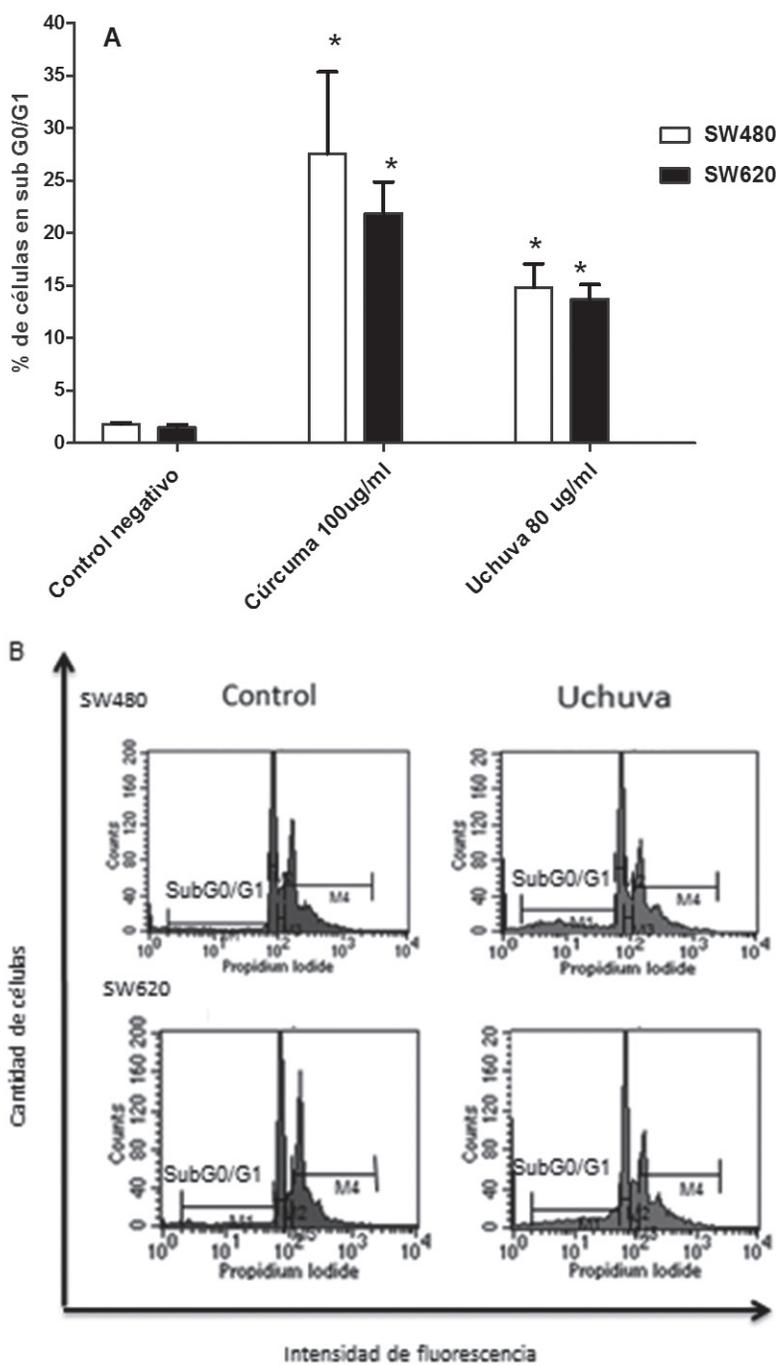
Línea celular	$IC_{50}$ (µg/mL)	SI
SW480	44,2	11,6
SW620	85,1	6,0
VERO	514,2	

El crecimiento celular de SW480 y SW620 disminuyó en forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al extracto de uchuva. El control positivo (cúrcuma 100 µg/mL) tuvo un efecto en la reducción del crecimiento de SW480 del 83% y del 72,3% con respecto a las células no-tratadas. La disminución del crecimiento de células SW480 fue 35% (25 µg/mL), 38,7% (50 µg/mL), 53,5% (100 µg/mL), y 74,8% (200 µg/mL) con respecto a las células no-tratadas (figura 2 A).



**Figura 2.** Efecto del extracto de uchuva (80 µg/mL) en el crecimiento de células SW480 (A) y SW620 (B)

Las células ( $1 \times 10^6$ ) fueron expuestas a concentraciones de 25 a 200 µg/mL por 72 h. Las células control fueron tratadas con el vehículo del extracto (agua ultrapura). La cúrcuma fue empleada como control positivo. Los datos son expresados como promedio  $\pm$  error estándar de la media ( $n=3$ ).



**Figura 3.** Inducción de la muerte de células SW480 y SW620 tratadas con el extracto de uchuva (80 µg/mL)

Análisis (A) de células hipodiploides (región subG0/G1) por citometría de flujo después del tratamiento por 48h. Los datos son expresados como promedio  $\pm$  error estándar de la media (n =3). (B) Histogramas representativos de citometría de flujo del ciclo celular por IP. Para cada línea celular los tratamientos fueron significativos respecto al control (SW480:  $p < 0,0234$ ; SW620:  $p < 0,0008$ , según ANOVA y prueba de comparaciones múltiples Tukey).

Un efecto similar se observó en las células SW620 (11,7% a 25 µg/mL, 40% a 50 µg/mL, 50,3% a 100 µg/mL y 64,9% a 200 µg/mL) a las mismas concentraciones (figura 2B).

### **Efecto en la muerte celular**

La figura 3 muestra que el porcentaje de células SW480 y SW620 en la región SubG0/G1 incrementó 14,8% y 13,7%, respectivamente, después de 48 h de tratamiento con el extracto de uchuva (80 µg/mL) en comparación con las células no tratadas. Bajo estas mismas condiciones se indujo un aumento significativo de células apoptóticas en SW480 (19%) y SW620 (21%) con respecto a las células no-tratadas (figura 4).

### **Expresión de receptores TRAIL-DR4/DR5 y actividad de la caspasa-3**

En la figura 5A se muestra que en células SW480 tratadas con el extracto por 48 h, los receptores TRAIL-DR4 y -DR5 incrementaron hasta 79% y 73%, y en SW620 aumentaron hasta 70% y 67%, respectivamente, en comparación con las células no-tratadas (control). Adicionalmente, el extracto de uchuva incrementó la actividad de caspasa-3 en las células SW480 (figura 5B) y las células SW620 (figura 5C) durante 72 h, evento que ocurrió en paralelo con el aumento de células hipodiploides y apoptóticas en ambas líneas celulares con respecto a sus respectivos controles.

### **Análisis fitoquímico y actividad antioxidante**

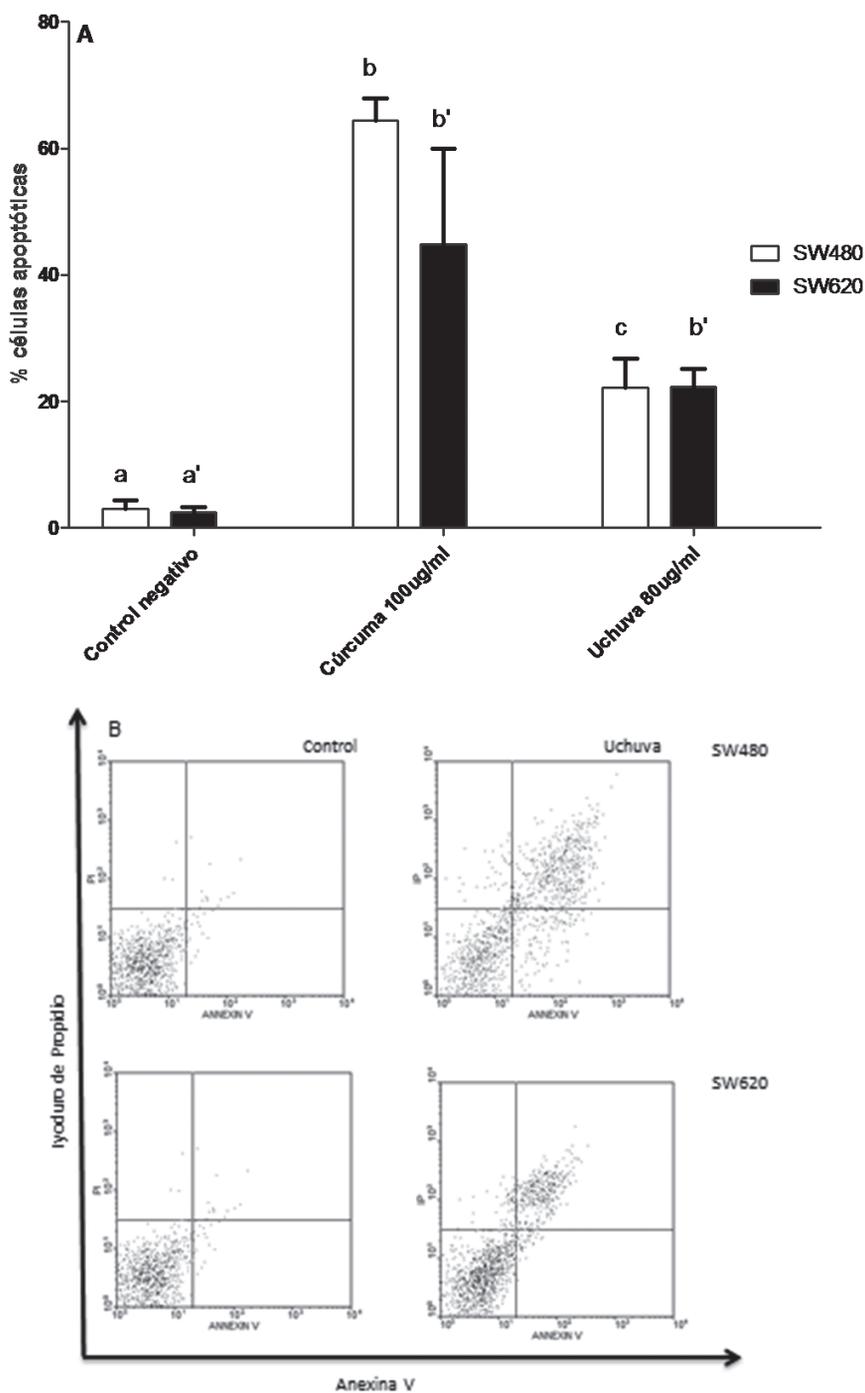
Se encontró un contenido mayor de flavonoides totales y menor de carotenoides en el extracto de uchuva liofilizado (tabla 2). Aunque la capacidad antioxidante del liofilizado de uchuva fue menor frente a la cúrcuma, en solución la actividad antioxidante de la fruta aumentó (tabla 3). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para los valores de ORAC y la capacidad atrapadora de ROS y RNS entre el extracto acuoso de cúrcuma (control positivo) y el respectivo de uchuva.

## **DISCUSIÓN**

En el presente estudio se observó por primera vez que el fruto de *Physalis peruviana* (uchuva) tuvo efecto citotóxico, selectivo y redujo el crecimiento de células de adenocarcinoma y metastásicas de colon, con alteración del ciclo celular, evidenciado con el aumento en el porcentaje de células hipodiploides y la inducción de apoptosis con activación de la caspasa-3 e incremento en la expresión de los receptores de muerte celular TRAIL-DR4/DR5, estos últimos implicados en la transducción de señales apoptóticas (19, 20). La apoptosis es uno de los procesos de muerte celular más ampliamente reconocidos como mecanismo de quimiopreención para el cáncer colorrectal, porque permite desde un punto de vista preventivo eliminar las células anormales sin afectar las células vivas no-malignas (21).

La caspasa-3 es una proteína efectora que se activa tanto en la vía mediada por receptores (extrínseca) como en la vía intrínseca (mitocondrial). Su activación va seguida de contracción celular, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN cromosómico y degradación de proteínas, que finalmente ocasionan la muerte celular (22). La diferencia de actividad de caspasa-3 observada entre SW620 y SW480, y la semejanza en el porcentaje de células apoptóticas y de la expresión de TRAIL-DR4/DR5 en ambas líneas celulares, podría ser debido a que las vías de activación de la apoptosis son diferentes en cada línea celular, lo que requiere estudios adicionales para su descripción detallada.

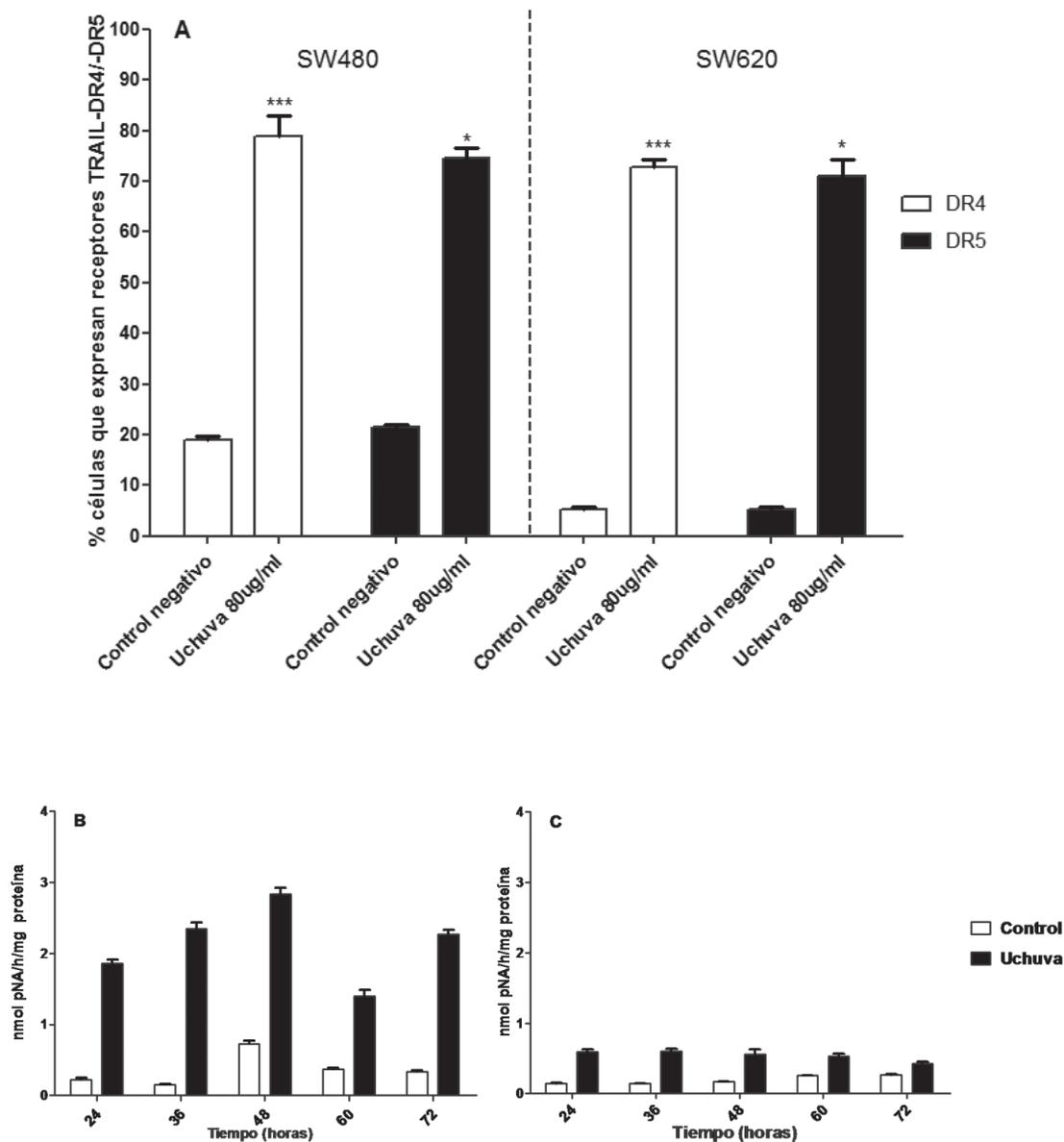
Las células SW620 se caracterizan por no expresar TRAIL-DR4/DR5, confiriéndole carácter resistente a su respectivo ligando TRAIL, que es producido por macrófagos o células asesinas naturales (23). Sin embargo, se ha demostrado que esta resistencia puede ser superada por la aplicación



**Figura 4.** Inducción de apoptosis con el extracto de uchuva (80 µg/mL) por 48h en células SW480 y SW620

(A) Porcentaje de células apoptóticas detectadas por Anexina-V (promedio ± error estándar de la media, n =3, p <0,05). Las columnas que no comparten el índice tienen diferencia significativa  $a \neq b \neq c$  y  $a' \neq b'$   $p < 0,05$ .

(B) Diagramas de puntos representativos de citometría de flujo de anexina-V/IP.



**Figura 5.** Análisis de la expresión de los receptores TRAIL- DR4/DR5 (A) y de la actividad de caspasa-3 en células SW480 (B) y SW620 (C) tratadas o no con uchuva (80 µg/mL) por 48 ó 72 h

Las células fueron recolectadas e incubadas con los anticuerpos monoclonales anti-DR4/-DR5-FITC o para medir la actividad de la caspasa-3 por colorimetría. (A) Los datos promedio ± error estándar de la media, n=3 son representados como el porcentaje de células que expresan los receptores TRAIL-DR4/-DR5 (\*\*p <0,001, \*p <0,05 control vs. tratadas, prueba t de Student). (B) y (C) Los datos son nmol de pNA liberado/mg proteína total (promedio ± error estándar de la media, n=3).

**Tabla 2.** Contenido de flavonoides y carotenoides totales del extracto acuoso de uchuva

Muestra	Flavonoides	Carotenoides
	(mg catequina / 100 g de liofilizado fresco)	(mg beta caroteno/100 g liofilizado fresco )
	(n =3)	(n =3)
	X±ESM	X±ESM
Extracto acuoso de uchuva	487,1±7,5	0,9±0,01

X±ESM = Promedio ± error estándar de la media.

**Tabla 3.** Capacidad antioxidante del extracto acuoso de uchuva

Muestra	ORAC hidrofílico		Capacidad atrapadora de ROS y RNS totales		Capacidad atrapadora de radical hidroxilo	
	µmol Trolox / 100 g liofilizado	µmol Trolox / L solución	µmol Trolox / 100 g liofilizado	µmol Trolox/ L solución	µmol DMSO / 100 g liofilizado	µmol DMSO / L solución
	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3
	X±ESM	X±ESM	X±ESM	X±ESM	X±ESM	X±ESM
<b>Cúrcuma</b>	273875,1±2,4	127351,9±1,1	114095,6±1,8	53054,5±8,1	15824360,2±2,9	7358327,5±1,4
<b>Uchuva</b>	6795,1±1,1	23171,3±3,7	4229,7±1,7	14423,3±5,6	40803,9±3,7	139141,3±1,3
<b>Valor de p*</b>	0,3	0,2	0,7	0,4	0,8	0,6

X±ESM = Promedio ± error estándar de la media.

\*Valores de p según la prueba t de Student.

combinada de compuestos naturales con TRAIL (11, 24-25), capaces de aumentar la expresión de estos receptores o su sensibilidad al ligando, como estrategia promisoría para la terapia del cáncer.

Por otra parte, la actividad antioxidante de frutas y verduras es un atributo que puede favorecer con la disminución en la incidencia del cáncer, propiedad atribuida a las vitaminas C, E, A, el selenio y compuestos flavonoides y fenólicos por su capacidad antioxidante o de remoción de las especies reactivas del oxígeno (ROS), con efecto directo en la disminución del daño celular (21, 26). En este trabajo, el extracto acuoso de uchuva no mostró

una actividad antioxidante relevante en comparación con otras frutas con actividad antioxidante mayor, como la *Passiflora mollisima* (18), *Passiflora edulis*, *Anacardium occidentale* (27) *Vaccinium meridionale Swartz* (28).

En el presente estudio se cuantificó el contenido de flavonoides y carotenoides totales, metabolitos secundarios determinantes en la actividad antioxidante de las frutas; se encontró en 100 g del extracto un contenido de 487,1 mg de flavonoides y 0,9 mg de carotenoides. Los flavonoides además de su actividad antioxidante, pueden afectar la carcinogénesis induciendo la fragmentación del

DNA, deteniendo el ciclo celular, activando caspasas efectoras de muerte celular e induciendo apoptosis (29). Respecto a los carotenoides, pigmentos liposolubles que se presentan como  $\alpha$ ,  $\beta$ -,  $\gamma$ ,  $\Delta$  y  $\epsilon$ -carotenos; son considerados agentes antioxidantes porque protegen los lípidos de la peroxidación por radicales libres (30). En uchuva se han encontrado 22 tipos de carotenoides principalmente todo-trans- $\beta$ -Caroteno que corresponden al 76,8% de esta clase de moléculas (31). Sin embargo, el bajo contenido de estas sustancias en el extracto analizado puede ser debido a la baja solubilidad de los carotenos en el agua, lo que llevó a una pérdida considerable del contenido de los mismos y por ende la baja actividad antioxidante de la uchuva.

Otras sustancias como witanólidos y physalinas, las cuales se han detectado en este fruto y poseen capacidad antioxidante, citotóxica, antiinflamatoria, antimicrobial y antitumoral (31-33), pueden participar sinérgicamente en el efecto anticancerí-

geno aquí observado. Sin embargo, es necesario realizar estudios de fraccionamiento biodirigido para conocer el efecto individual de estos y encontrar los compuestos bioactivos responsables del efecto aquí descrito en las células de adenocarcinoma de colon y sus derivadas metastásicas.

En conclusión, el extracto acuoso de uchuva presentó actividad citotóxica, selectiva, antiproliferativa contra SW480 y SW620, mediante inducción de apoptosis. Estos resultados sugieren que la uchuva puede ser una fuente prometedora de compuestos bioactivos con aplicación quimiopreventiva en el cáncer de colon humano.

### Agradecimientos

Universidad de Antioquia. Estrategia de Sostenibilidad 2010-2012.

Dirección de Investigaciones, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia.

## Referencias

1. Puente LA, Pinto-Muñoz CA, Castro ES, Cortés M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Res Int.* 2011;44:1733-40.
2. Asociación Hortofrutícola de Colombia. Plan frutícola nacional de Colombia 2006. [citado junio de 2012]. Disponible en: [http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca\\_8\\_PFN%20REGION%20CAFETERA.pdf](http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_8_PFN%20REGION%20CAFETERA.pdf)
3. Castro AM, Rodríguez L, Vargas EM. Secado de uchuva (*Physalis peruviana* L) por aire caliente con pretratamiento de osmodeshidratación. *Vitae* 2008;15:226-31.
4. Wu SJ, Ng LT, Huang YM, Lin DL, Wang SS, Huang SN, et al. Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:963-6.
5. Chiang HC, Jaw SM, Chen PM. Inhibitory effects of physalin B and physalin F on various human leukemia cells in vitro. *Anticancer Res.* 1992;12:1155-62.
6. Chiang HC, Jaw SM, Chen CF, Kan WS. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer Res.* 1992;12: 837-43.
7. Ismail N, Alam M. A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia.* 2001;72:676-9.
8. Quispe-Mauricio A, Callacondo D, Rojas J, Zavala D, Posso M, Vaisberg A. Actividad citotóxica de *Physalis peruviana* (Aguaymanto) en cultivos celulares de adenocarcinoma colorrectal, próstata y leucemia mieloide crónica. *Rev Gastroenterol Perú.* 2009;29:239-46.

### ***Physalis peruviana* antiproliferativa, apoptótica y antioxidante**

9. Hewitt RE, McMarlin A, Kleiner D, Wersto R, Martin P, Tsokos M, et al. Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol.* 2000;192:446-54.
10. Russo GL. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem Pharmacol.* 2007;74:533-44.
11. Maldonado ME, Bousseruel S, Gossé F, Minker C, Lobstein A, Raul F. Differential induction of apoptosis by apple procyanidins in TRAIL-Sensitive Human Colon Tumor Cells and Derived TRAIL-Resistant Metastatic Cells. *J Cancer Molecules.* 2009;5:21-30.
12. Moo-Puc R, Robledo D, Freile-Pelegrín Y. *In vitro* cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Cienc Mar.* 2009;35:345-58.
13. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006;1:1112-6.
14. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139:271-9.
15. Chung YC, Lin CC, Chou CC, Hsu CP. The effect of Longan seed polyphenols on colorectal carcinoma cells. *Eur J Clin Invest.* 2010;40:713-21.
16. Debnath T, Park PJ, Debnath NC, Samad NB, Park HW, Lim BO. Antioxidant activity of *Gardenia jasminoides* Ellis fruit extracts. *Food Chem.* 2001;128:697-703.
17. Biswas AK, Sahoo J, Chatli MK. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of  $\beta$ -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *Food Sci Technol.* 2011;44:1809-13.
18. Rojano BA, Zapata-Acosta K, Cortés-Correa FB. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Rev Cubana Plantas Medicinales.* 2012;17:408-19.
19. Henson E, Johnston J, Gibsn S. The role of TRAIL death receptors in the treatment of hematological malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:27-35.
20. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *J Mol Signal.* 2007;2:10.
21. De Kok TM, Van Breda SG, Manson MM. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *Eur J Nutr.* 2008;47:51-9.
22. Rajesh R, Sihna R. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI J.* 2009;8:155-81.
23. Herbeuval JP, Lambert C, Sabido O, Cottier M, Fournel P, Dy M, et al. Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. *J Nat Cancer Inst.* 2003;95:611-21.
24. Lamy V, Roussi S, Chaabi M, Gossé F, Lobstein A, Raul F. Lupulone, a hop bitter acid, activates different death pathways involving apoptotic TRAIL-receptors, in human colon tumor cells and in their derived metastatic cells. *Apoptosis.* 2008;13:1232-42.
25. Kauntz H, Bousserouel S, Gossé F, Raul F. The flavonolignan silibinin potentiates TRAIL-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma and in derived TRAIL-resistant metastatic cells. *Apoptosis.* 2012;17:797-809.
26. WHO, International Agency for Research on Cancer. World cancer report. Lyon: IARC; 2008.
27. Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Res Int.* 2011;44:2047-53.
28. Garzón GA, Narváez CE, Riedl KM, Schwartz SJ. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale Swartz*) from Colombia. *Food Chem.* 2010;122:980-6.

29. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem.* 2007;18:427-42.
30. Foote CS, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by b-carotene. *J Am Chem Soc.* 1968;90:6233-5.
31. Ramadan MF. *Physalis peruviana*: A rich source of bioactive phytochemicals for functional foods and pharmaceuticals. *Food Rev Int.* 2011;27:259-73.
32. Lan YH, Chang FR, Pan MJ, Wu CC, Wu SJ, Chen SL et al. New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. *Food Chem.* 2009;116:462-69.
33. Yen CY, Chiu CC, Chang FR, Chen JYF, Hwang CC, Hseu YC, et al. 4-Hidroxiwithanolide E from *Physalis peruviana* (golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G<sub>2</sub>/M arrest. *BMC Cancer.* 2010;10:46.