

Estrategias para la evaluación de extractos de polifenoles en modelos *in vitro* de cáncer de vías digestivas

Atilio Junior Ferrebuz-Cardozo¹ , Zilpa Adriana Sánchez-Quitian¹ , Ruby Alba Elizabeth

Márquez-Salcedo¹ , Lady Johanna Carreño-Saltarén² 

Resumen

Introducción: Los polifenoles son compuestos que se encuentran naturalmente en alimentos como frutas, verduras, té, vino y chocolates, a los que se les atribuyen beneficios a la salud humana por su capacidad antioxidante. El cáncer de las vías digestivas se encuentra entre la tercera y quinta causas de muerte para la población, por lo que se ha incrementado el interés por realizar los estudios dirigidos a encontrar compuestos polifenólicos que ayuden en su prevención o tratamiento.

Objetivo: Identificar las estrategias disponibles para la evaluación de polifenoles en células de cáncer de vías digestivas.

Metodología: Búsqueda de literatura en bases de datos como Ovid, Pubmed, Science Direct y Elsevier Journal. Se seleccionaron artículos en los cuales se reporta el efecto biológico de los polifenoles sobre líneas celulares de cáncer de vías digestivas publicados entre 2012 y 2022.

Resultados: Varios estudios han reportado el uso de un buen número de líneas celulares como modelos *in vitro* para estudios de polifenoles en cáncer y han resaltado las líneas AGS y HT-29, además de técnicas para la caracterización de los polifenoles, como el ensayo 2,2-Difenil-1-Picril Hidrazilo (DPPH). Sin embargo, para evaluar el efecto biológico se identifican diversas pruebas que deben analizarse antes de su implementación.

Conclusiones: En la literatura se identifica que existen varias alternativas y estrategias para la evaluación de extractos vegetales en cultivos *in vitro* de cáncer de vías digestivas; no obstante, antes de pasar al diseño experimental, deben tenerse en cuenta una serie de consideraciones para garantizar la utilidad de los resultados.

Palabras clave: extractos vegetales; polifenoles; neoplasias; tracto gastrointestinal; técnicas *in vitro*; capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno; concentración inhibitoria 50; apoptosis.

¹ Universidad de Boyacá (Tunja, Colombia).

² Caja de Compensación Familiar CAFAM (Bogotá, Colombia).

Autor de correspondencia: Atilio Junior Ferrebuz-Cardozo. Correo electrónico: ajferrebuz@uniboyaca.edu.co

Citar este artículo así:

Ferrebuz-Cardozo AJ, Sánchez Quitián A, Márquez-Salcedo RAE, Carreño-Saltarén LJ. Estrategias para la evaluación de extractos de polifenoles en modelos *in vitro* de cáncer de vías digestivas. Rev Investig Salud Univ Boyacá. 2021;9(2):194-213. <https://doi.org/10.24267/23897325.916>

Strategies for Evaluation of Polyphenol Extracts on *in vitro* Models of Digestive Tract Cancer

Abstract

Introduction: Polyphenols are compounds naturally found in foods such as fruits, vegetables, tea, wine and chocolates, and it was attributed with benefits to human health due to their antioxidant capacity. Cancer of the digestive tract is between the third and fifth cause of death for the population, increasing the interest in carrying out studies aimed at finding polyphenolic compounds that help in their prevention or treatment.

Objective: Identify the available strategies for the evaluation of polyphenols in digestive tract cancer cells.

Method: A literature search was performed in databases such Ovid, Pubmed, Science Direct and Elsevier Journal and selected articles reporting the biological effect of polyphenols on digestive tract cancer cell lines, published between 2012 and 2022.

Results: Currently studies report the use of a good number of cell lines as *in vitro* models for polyphenol studies in cancer highlighting the AGS and HT-29 lines, in addition to techniques for the characterization of polyphenols such as the α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl DPPH assay, however, to evaluate the biological effect various tests are identified that should be analyzed before implementation. **Conclusions:** The literature identifies that there are many alternatives and strategies for the evaluation of plant extracts in *in vitro* cultures of digestive tract cancer, however, before moving on to the experimental design, a number of considerations should be taken into account to ensure the usability of the results.

Keywords: plant extracts; polyphenols; neoplasms; gastrointestinal tract; *in vitro* techniques; oxygen radical absorbance capacity; inhibitory concentration 50; apoptosis.

Estratégias para a avaliação de extratos de polifenóis em modelos in vitro de câncer do sistema digestivo

Resumo

Introdução: Os polifenóis são compostos encontrados naturalmente em alimentos como frutas, legumes, chá, vinho e chocolates, aos quais são atribuídos benefícios para a saúde humana devido à sua capacidade antioxidante. O câncer do sistema digestivo está entre a terceira e a quinta principais causas de morte na população, o que levou a um interesse crescente em estudos destinados a encontrar compostos polifenólicos que ajudem a prevenir ou tratar esse tipo de câncer.

Objetivo: Identificar as estratégias disponíveis para a avaliação dos polifenóis nas células cancerosas do sistema digestivo.

Metodologia: Pesquisa bibliográfica em bases de dados como Ovid, Pubmed, Science Direct e Elsevier Journal. Foram selecionados artigos que relatam o efeito biológico dos polifenóis em linhas celulares de câncer do sistema digestivo, publicados entre 2012 e 2022.

Resultados: Vários estudos relataram a utilização de várias linhas celulares como modelos in vitro para estudos de polifenóis no câncer destacando as linhas AGS e HT-29, bem como técnicas para a caracterização de polifenóis, como o ensaio 2,2-Difenil-1-Picril Hidrazil (DPPH). No entanto, para avaliar o efeito biológico, são identificados vários testes que devem ser analisados antes da sua aplicação.

Conclusões: A literatura identifica que existem várias alternativas e estratégias para a avaliação de extratos de plantas em culturas in vitro de câncer do sistema digestivo; no entanto, antes de passar à concepção experimental, é necessário ter em conta uma série de considerações para garantir a utilidade dos resultados.

Palavras-chave: Extratos Vegetais; Polifenóis; Neoplasias, Trato Gastrointestinal; Técnica in vitro; Capacidade de Absorbância de Radicais de Oxigênio; Concentração Inibidora 50; apoptose.

Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, por lo que las investigaciones orientadas a la búsqueda de herramientas para el diagnóstico, prevención y tratamiento se ha convertido en una prioridad para la ciencia. El cáncer en las vías digestivas es una enfermedad multifactorial que se puede localizar desde la cavidad oral, el esófago, el estómago, porciones del intestino delgado y, finalmente, en el intestino grueso hasta el recto y el ano. En todo el mundo, los sitios más frecuentes para el diagnóstico son estómago, colon, recto y ano (1). Además, el cáncer gástrico y el cáncer de colon se encuentran entre la tercera y quinta causas de mortalidad por cáncer en el mundo. En los países desarrollados ocupan el tercer lugar en frecuencia en los hombres y el segundo lugar en las mujeres, y su tasa de incidencia aumenta en países no desarrollados (1,2), lo que sugiere que los factores ambientales, hábitos dietarios y estilo de vida constituyen un importante factor de riesgo (3).

Los agentes anticancerosos actuales pueden clasificarse como quimiopreventivos o quimioterapéuticos, según la etapa de la carcinogénesis. Los agentes quimiopreventivos se dividen en agentes de bloqueo, que evitan que los carcinógenos lleguen a los sitios de destino por activación metabólica o al interactuar con macromoléculas como ADN, ARN y proteínas; luego, están los

agentes de supresión, que inhiben la transformación maligna de las células iniciadas (4). Para explorar el potencial quimiopreventivo, las células cancerosas deben exponerse a un agente anticancerígeno alternativamente *in vitro* o en animales para evaluar su respuesta. Existen varios agentes anticancerígenos farmacéuticos obtenidos de productos naturales que en su composición presentan un contenido significativo de polifenoles y han demostrado poseer potentes efectos anticancerígenos y antioxidantes beneficiosos para la salud (1,5).

Los polifenoles hacen parte de una gran variedad de fitoquímicos o metabolitos secundarios producidos por las plantas. Estos comprenden una parte esencial de la dieta humana y son de considerable interés debido a sus propiedades biológicas. Desde el siglo pasado se ha establecido que en plantas estos compuestos se sintetizan principalmente como agentes de defensa contra estimuladores fisiológicos y ambientales (6), y más recientemente en humanos diferentes estudios asocian una dieta rica en polifenoles con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, trastornos hepáticos, obesidad, diabetes y cáncer, este último asociado con sus propiedades antioxidantes, capacidad de modulación de las vías de señalización, alteración o bloqueo celular, inducción de apoptosis, disminución de inflamaciones y de lesiones preneoplásicas (1,7,8).

Con todo esto, los polifenoles constituyen un grupo de metabolitos ampliamente estudiados y caracterizados. De este modo, se cuenta con una base de datos que incluye 502 polifenoles identificados a partir de 452 alimentos, disponibles desde 2010 y actualizada en 2012 y 2013 (9-11). Sin embargo, en el momento de evaluarlos *in vitro* se han encontrado resultados poco concluyentes, en cuanto a su potencial y las técnicas más empleadas para determinar su viabilidad celular, que pueden generar falsos positivos o sobrestimaciones (12-15). De ahí que sea necesaria una revisión profunda para evaluar las herramientas más idóneas para su caracterización. Por lo tanto, el objetivo de la revisión fue presentar las técnicas empleadas para establecer la utilidad de los polifenoles como alternativa terapéutica en el manejo del cáncer de vías digestivas.

Metodología

Para la revisión descriptiva se realizó una búsqueda entre mayo y julio de 2022 en las bases de datos Pubmed, Science Direct, Ovid y Elsevier Journal. Se utilizaron las siguientes palabras clave en inglés y español: *cáncer*, *cáncer gástrico*, *extractos de polifenoles*, *efecto antineoplásico*, *citotoxicidad*, *apoptosis*, *ensayos de citotoxicidad*, que generaron diferentes estrategias de búsqueda combinando las palabras clave con los conectores booleanos: OR, AND y NOT. Se incluyeron artículos originales y revisiones sistemáticas de la

literatura publicados en una ventana de tiempo de diez años (2012-2022), en idioma inglés o español con acceso a texto completo. Así, se identificaron 423 artículos por título que fueron sistematizados en una tabla en el programa Excel®, de donde se extrajo la información de la línea celular empleada, la intervención, el comparador (si existe), los métodos de evaluación y los resultados obtenidos. Después del proceso de selección a texto completo y la depuración de duplicados, se incluyeron 55 estudios relacionados con el análisis de polifenoles en cultivos *in vitro* de células provenientes de neoplasias de vías digestivas. Finalmente, después de revisar las técnicas relacionadas en la literatura, y por la necesidad de describirlas se incluyeron adicionalmente referencias anteriores a este periodo, para brindar la información completa de cada una de las técnicas identificadas y presentadas en esta revisión.

Resultados y discusión

Se recopilaron 55 investigaciones realizadas *in vitro* donde se evidenció el uso de los polifenoles en el cáncer de vías digestivas, identificando diferentes herramientas y pruebas para evaluar la capacidad quimiopreventiva de algunos polifenoles de extractos vegetales. Varios autores coinciden en que la neoplasia maligna colorrectal es una de las principales causas de muerte en hombres y mujeres (16).

En principio, se identificó que los productos naturales y sus derivados cumplen un rol importante en el manejo del cáncer. Los resultados de estos estudios sugieren que la mayoría de estos extractos tienen propiedades antimicrobianas y anticancerígenas, los cuales pueden usarse en nuevas formulaciones y darles una adecuada importancia para promover su consumo e incorporarlos dentro de los hábitos alimentarios (17,18). Un ejemplo lo podemos tomar de la investigación llevada a cabo por Miyata et al. (19) en Asia, China, Corea del Sur e India, el consumo usual del té verde (*Camellia sinensis*) de la familia Theaceae ha demostrado un importante efecto protector contra el cáncer de próstata y una disminución del riesgo de cáncer de próstata con un *odds ratio* (OR) de 0,59. El consumo de más de 3 tazas al día presenta un OR de 0,27, y el consumo de más de 10 tazas al día presenta un OR de 0,67; todos con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Este, como muchos otros estudios, respalda la importancia de continuar con investigaciones sobre polifenoles como alternativa al tratamiento de cáncer.

En este punto es indispensable abordar los modelos *in vitro* (líneas celulares) y las herramientas que permiten una correcta valoración de las propiedades biológicas y antineoplásicas disponibles para la caracterización de extractos naturales ricos en polifenoles como alternativa terapéutica en las neoplasias de vías digestivas.

Modelos in vitro para estudios de cáncer de vías digestivas empleadas para el análisis de la capacidad antioxidante de los polifenoles

El cultivo de células animales *in vitro* constituye una de las técnicas más eficaces para la investigación de procesos celulares cuyos resultados han generado gran impacto en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades (20). Al analizar la literatura obtenida, podemos observar para los estudios de polifenoles en modelos *in vitro* de cáncer de vías digestivas que se hace hincapié en el cáncer gástrico y en cáncer colorrectal. Para cáncer gástrico, se encontró que las líneas más empleadas de adenocarcinoma gástrico son AGS (21-25), SGC7901 (cáncer gástrico humano) (25-28), MKN45 (25,29,30), MKN28 (23,25,31), MGC803 (25,32,33), EPG85-257P (34), HGC-27 (25) y para cáncer colorrectal, las líneas más utilizadas de adenocarcinoma colorrectal son HT29 (16,35-37), HCT116 (carcinoma colorrectal) (36-40), SW480 (1,3,37), HCT15 (41), SW620 (39), CaCo2 (36). Dentro de la revisión se encontraron pocos estudios *in vitro* para probar la eficiencia de los polifenoles en líneas celulares provenientes de cáncer de otros sitios anatómicos de las vías digestivas, identificando el uso de células de adenocarcinoma de esófago (TE-1) (30) y de carcinoma EC109 (42) para evaluar la actividad de productos naturales antioxidantes. Sin embargo, desde el punto de vista de productos sintéticos,

existen mayor número de trabajos en los cuales se evalúan diferentes propiedades antineoplásicas en cultivos *in vitro*. Ello nos genera la necesidad de abordar este tipo de estudios *in vitro* para evaluar la eficiencia de los polifenoles en otros tipos de cáncer de vías digestivas.

Evaluación de la actividad biológica de los polifenoles

Capacidad antioxidante de los polifenoles

La capacidad antioxidante de frutas y vegetales está ampliamente demostrada, por la presencia de sus polifenoles, además de sus efectos benéficos sobre la salud (43,44), lo cual ha despertado un gran interés en la comunidad científica y generado la necesidad de poder caracterizar estas capacidades de cara a su implementación como alternativas terapéuticas. En nuestra revisión, identificamos cómo la mayoría de los estudios realizaron la técnica 2,2-Difenil-1-Picril Hidrazilo (DPPH), que se basa en la reducción de la absorbancia del radical DPPH y posteriormente su lectura bajo una longitud de onda de 517 nm, que fue la más utilizada en los artículos revisados; sin embargo, no todos presentaron los valores obtenidos (45-49).

Además, se caracterizan mediante la determinación de la concentración media inhibitoria (IC50), técnica que se basa en medir la efectividad de un

compuesto para inhibir una actividad biológica o bioquímica, la cual genera mayor información para determinar los extractos potencialmente activos. En este caso, permite establecer la concentración de los extractos vegetales activos (%AA mayor al 25%) necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical DPPH, teniendo en cuenta que un IC50 bajo está directamente asociado con una actividad antioxidante alta (50).

Dentro de los criterios de selección para extractos vegetales basados en la determinación de IC50, se consideran de alto potencial antioxidante aquellos con valores menores a 30 $\mu\text{g/mL}$; con moderado potencial, los ubicados en un rango de entre 30 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$, y de bajo potencial antioxidante, aquellos con un IC50 por encima de 100 $\mu\text{g/mL}$ (51), al analizar solo aquellos extractos que se consideraron activos en el ensayo del DPPH y en las concentraciones más adecuadas para el método.

Entre los estudios revisados, el extracto de mango (*Mangifera indica*) presentó un contenido de fenoles totales de $217,72 \pm 1,35$ mg de ácido gálico/100g (3). Este extracto presenta un alto contenido de polifenoles, indicativos de su gran capacidad antioxidante.

Para el extracto del té verde, las catequinas, un tipo de polifenoles presentes en elevados niveles en el té verde, son las encargadas de ese sabor amargo, y durante la revisión (19) no se presentaron datos sobre su capacidad antioxidante.

Determinación de la concentración inhibitoria

La IC50 es una medida de la potencia que presenta una sustancia o la concentración de un compuesto necesaria para reducir o inhibir *in vitro* una función biológica; en este caso, se trata del crecimiento de las células de cáncer. La mayoría de los estudios realizaron el ensayo MTT (52-55), el cual es un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad metabólica celular y el IC50. Cuantifica la actividad realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa y genera como producto un compuesto de color azul denominado *formazán*. La cantidad de este producto es proporcional a las células vivas, lo que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas y, de esta manera, identificar las células viables. El colorante incoloro XTT (2,3-bis- [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil] -2H-tetrazolio-5-carboxanilida) o tetrazolio de segunda generación también se emplea para ensayos de proliferación celular, y junto con MTT, MTS y WST y un aceptor de electrones 1-metoxi fenazina metosulfato (PMS), es posible acelerar la reducción de estas sales, al aumentar la sensibilidad de la técnica (56,57).

La aplicación de esta técnica se debe a las características del ensayo, el cual permite ser escalado a diferentes volúmenes de cultivo y evaluar en un rango lineal hasta un millón de células (58), y además representa el primer paso en el objetivo de eliminar la dependencia de un radioisótopo para la cuantificación de la viabilidad celular (52) y convertirse en el ensayo de citotoxicidad más empleado. Recientemente, hubo varias controversias frente a este ensayo, debido a que varios autores reportaron inconsistencias, en cuanto a que sobrestiman o subestiman el número de células presentes y por tanto la viabilidad celular. A este respecto, la reducción de MTT en este ensayo la pueden modular significativamente diversos factores metabólicos, energéticos, cambios en la actividad de oxidorreductasas, endo-/exocitosis y tráfico intracelular. Además, este error de estimación de la viabilidad celular por el ensayo MTT puede deberse a la reprogramación adaptativa metabólica y mitocondrial de las células sometidas al estrés, mediado por el tratamiento farmacológico o por los efectos del inhibidor. De ahí que hayan concluido que, para evitar una mala interpretación de los resultados, se recomienda la suplementación de los ensayos basados en sales de tetrazolio (MTT y sus variantes) con otros ensayos no metabólicos (12).

Otros autores demostraron en sus experimentos que el MTT presenta afinidad para unirse a gotas de lípidos, por lo cual debe evitarse esta técnica

cuando se utilizan liposomas en la formulación de las moléculas de prueba (13). Gómez Pérez et al. (14) demostraron que pequeñas concentraciones de cobre interfieren con el ensayo del MTT, y de igual manera se ha demostrado la interferencia en extractos metanólicos de plantas y generado una sobrestimación de la viabilidad celular (15).

Van Tonder et al. (59) demostraron que en presencia de compuestos con potencial de óxido-reducción el ensayo MTT fue menos preciso para detectar cambios en el número de células en el rango lineal, y una mayor variación en las concentraciones de IC50 de los inhibidores de la glucólisis probados. A su vez, en general, el ensayo sulforrodamina B (SRB) se desempeñó mejor, teniendo en cuenta todos los parámetros evaluados; de ahí que se haya sugerido como el ensayo más adecuado para su uso en la detección pre-clínica de nuevos compuestos terapéuticos con potencial óxido-reductor.

En un estudio donde se evaluó la miel como alternativa antineoplásica se demostró que la miel es citotóxica hacia las células de cáncer de próstata PC3 y DU145, mediante diferentes ensayos de citotoxicidad. En sus resultados, se muestra que el ensayo MTT presentó errores debidos a la reducción del reactivo MTT por los azúcares reductores de la miel y los compuestos fenólicos; mientras que el ensayo no metabólico de SRB arrojó resultados válidos en cuanto a la cantidad de células,

con la desventaja de que solo mide proteínas y no aporta información sobre el estado de las células presentes. También se realizó un ensayo microscópico de tinción con yoduro de propidio y Hoechst, el cual proporcionó información morfológica sobre el mecanismo de muerte celular. Finalmente, se concluyó que la combinación de los ensayos de SRB y yoduro de propidio/Hoechst proporcionaría la cuantificación más precisa de la citotoxicidad de la miel (60). En otro estudio donde se evaluaba el efecto del extracto natural de uva sobre células de cáncer de colon se empleó el ensayo de SRB satisfactoriamente (38).

De estos hallazgos se infiere que aun cuando el ensayo del MTT es el test de citotoxicidad más utilizado, antes de implementarlo es precisa una revisión exhaustiva para descartar la existencia de alguna interferencia en los estudios que se vaya a realizar. De igual manera, podemos afirmar que emplear pruebas no metabólicas con el ensayo de SRB nos permite tener una prueba de medición que se puede aplicar ampliamente en nuestros estudios con una muy buena sensibilidad y sin la presencia de posibles interferencias originadas por las moléculas que se van a evaluar.

Evaluación de la apoptosis o muerte celular

En las áreas biomédicas, el estudio de los cambios biológicos que llevan a la muerte celular ha sido tema de continua investigación para su entendimiento y

Tabla 1. Técnicas para el análisis de la apoptosis

Método de detección	Ensayo	Principio
Ensayos mitocondriales	MTT	Cuantifica la cantidad de células viables durante el crecimiento celular a través de la actividad metabólica de las células (56,57).
Alteraciones citomorfológicas	Tinciones histológicas y visualización mediante microscopio de luz o microscopio electrónico de transmisión (TEM)	Es considerada el patrón de referencia (gold standard) para confirmar el estado apoptótico en una célula al poderse observar la membrana celular intacta, desorganización de organelos citoplasmáticos, aumento de tamaño vacuolar, formación de protuberancias irregulares y fragmentación nuclear (62).
Fragmentación del ADN	Marcado de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa o TUNEL	Utiliza la enzima didesoxinucleotidiltransferasa terminal exógena (TdT) para incorporar nucleótidos marcados en el extremo OH 3' de cadenas de ADN fragmentado, los cuales se detectan directa o indirectamente (por ejemplo, a través de biotina o digoxigenina) mediante el uso de trifosfodesoxinucleótidos marcados colorimétrica o fluorescentemente mediante un proceso enzimático (63).
Alteración de membrana	Marcaje celular simultáneo con Anexina V FITC y yoduro de propidio (PI)	Permite la discriminación de las células intactas, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células en necrosis (64).
Actividad enzimática de las caspasas	Western Blot	Las caspasas son un grupo de cisteínil-aspartato proteasas caracterizadas por poseer un residuo de cisteína responsable de la proteólisis de otras proteínas en residuos de aspartato. Estas caspasas están presentes de forma latente en células animales y son activadas en procesos de apoptosis (65,66).

aplicación. Los cambios moleculares, bioquímicos y morfológicos que se dan en un proceso de muerte celular y las consecuencias que generan estos en los tejidos que las contienen han sido cada vez más detallados, gracias a la implementación de metodologías que permiten la elucidación de algunos de estos mecanismos. La técnica de cultivo de células animales se ha convertido en un modelo para identificar la apoptosis celular y detectar eventos particulares de este proceso y mecanismos asociados con este. Los métodos para la detección de apoptosis son variados; sin

embargo, se han clasificado en ensayos mitocondriales y otras técnicas que miden alteraciones citomorfológicas, fragmentación de ADN, alteraciones de membrana y detección de caspasas, descritos en la tabla 1. Para la aplicación de cada uno de estos se deben tener en cuenta las características particulares del tipo celular cultivado, así como el objetivo de caracterización que se pretende alcanzar, restricciones técnicas, costos, entre otros (61).

Estas técnicas se han identificado en diversos estudios para estudiar el efecto de polifenoles en

el cáncer, como el reporte de Liu y Li (30), donde emplearon la caracterización morfológica de las células mediante la doble tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, para evidenciar la reducción del volumen celular y la condensación de la cromatina en células MKN-45 y TE-1. Otro estudio en células de cáncer gástrico SGC-7901, donde se evaluaba el resveratrol, emplearon la tinción con DAPI para evaluar la morfología del núcleo (27).

El ensayo de TUNEL se ha aplicado ampliamente en diferentes tipos de estudios y ha resaltado la determinación de apoptosis en células hepáticas sometidas a extractos de mora (*Morus alba* L.) (67). Por otra parte, el marcaje celular simultáneo con anexina V FITC y yoduro de propidio (PI) se ha reportado en la evaluación de apoptosis inducidas por polifenoles como el resveratrol (27,68-70), extracto de vino rojo (39) y extracto de repollo blanco (24).

Aun cuando los autores emplean diferentes métodos para la cuantificación de la apoptosis, las últimas tendencias indican la cuantificación de proteínas relacionadas con las rutas de apoptosis mediante la técnica de Western Blot, para tener una representación precisa de los procesos bioquímicos que están ocurriendo en las células (30,67,70).

Los hallazgos de estos estudios evidenciaron un mayor número de estudios que emplean la

técnica dependiente de la anexina V para identificar la alteración de la membrana, ya que esta va a permitir evaluar el estado de todas las células estudiadas y discriminar la apoptosis de procesos de necrosis en el cultivo. Adicionalmente, hay una clara tendencia a evaluar las caspasas y los genes que regulan el ingreso a la apoptosis por Western Blot. Sin embargo, ya que todas se han empleado sin ningún inconveniente reportado, la técnica que se elija va a depender del equipamiento disponible en nuestro laboratorio, y de ser posible, incluirá siempre la determinación de mediadores apoptóticos por Western Blot.

Conclusiones

Los extractos naturales ofrecen una fuente de compuestos y productos con posibles efectos antineoplásicos, principalmente los que contienen altas concentraciones de polifenoles. Su estudio requiere identificar cuáles son las mejores alternativas experimentales para llevar a cabo estos procesos de una forma costoeficiente y con resultados de calidad y significancia estadística. En nuestro estudio, identificamos que la caracterización de la capacidad antioxidante se puede determinar con la IC50 en el ensayo del DPPH. Sin embargo, en las pruebas *in vitro*, si bien la gran mayoría utiliza ensayos de citotoxicidad basados en sales de tetrazolio, es importante resaltar que esta técnica emplea en su principio reacciones de óxido-reducción que pueden ser alteradas por la

presencia de los polifenoles en los extractos probados, por lo que recomendamos pruebas colorimétricas enfocadas en el marcaje de proteínas con el ensayo de sulforhodamina B.

Recomendaciones

Posterior al análisis de la información plasmada, se recomienda generar una investigación de mayor nivel, como una revisión de alcance o una revisión sistemática de la literatura, donde se evalúen sesgos y se determine si existe una alteración de los resultados de las pruebas que emplean sales de tetrazolio, por la presencia de compuestos como los polifenoles o los extractos que los contengan. Por otra parte, de precisarse el uso de estos métodos de determinación de densidad celular, se recomienda validar los resultados, incluyendo los controles apropiados que permitan evaluar el efecto de los polifenoles sobre el método de cuantificación.

Limitaciones

Las limitaciones del estudio comprenden la poca evidencia reportada y disponible en los últimos cinco años.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Universidad de Boyacá.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

1. Maldonado Celis ME, Urango Marchena LA, Arismendi Bustamante LJ. Propiedades quimiopreventivas del mango y la manzana en el cáncer de colon. *Salud(i)Ciencia*. 2014;20(6):614-8.
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global cancer observatory: cancer today [internet]. 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/>
3. Corrales-Bernal A, Urango LA, Rojano B, Maldonado ME. Efectos in vitro e in vivo de la pulpa de mango (*Mangifera indica* cv. Azúcar) en la carcinogénesis de colon. *Arch Latinoam Nutr*. 2014;64:16-23.
4. Ferruelo A, Romero I, Cabrera PM, Arance I, Andrés G, Angulo JC. Los efectos de resveratrol y otros polifenoles del vino sobre la proliferación, apoptosis y expresión de receptor androgénico en células LNCaP. *Actas Urol Esp*. 2014;38:397-404.

5. Moore J, Yousef M, Tsiani E. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients*. 2016;8(11):731. <https://doi.org/10.3390/nu8110731>
6. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998;56(11):317-33. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
7. Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Mol Basel Switz*. 2016;21(7):901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
8. Bouyahya A, Omari NE, El Hachlafi N, Jemly ME, Hakkour M, Balahbib A, et al. Chemical compounds of berry-derived polyphenols and their effects on gut microbiota, inflammation, and cancer. *Mol Basel Switz*. 2022;27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103286>
9. Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, et al. Phenol-explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*. 2010;2010:bap024. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
10. Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordóñez M, Knox C, Llorach R, Eisner R, et al. Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *Database*. 2012;2012:bas031. <https://doi.org/10.1093/database/bas031>
11. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remón A, M'Hiri N, García-Lobato P, et al. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*. 2013;2013:bat070. <https://doi.org/10.1093/database/bat070>
12. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 2015 dic;574(2):193-203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>
13. Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2015 mar;29(2):314-9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.11.009>
14. Gomez Perez M, Fourcade L, Mateescu MA, Paquin J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds.

- Anal Biochem. 2017 oct;535:43-6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.027>
15. Karakaş D, Ari F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol Turk Biyol Derg.* 2017;41(6):919-25. <https://doi.org/10.3906/biy-1703-104>
 16. Cassiem W, de Kock M. The anti-proliferative effect of apricot and peach kernel extracts on human colon cancer cells in vitro. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(1):32. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2437-4>
 17. Patra S, Pradhan B, Nayak R, Behera C, Das S, Patra SK, et al. Dietary polyphenols in chemoprevention and synergistic effect in cancer: clinical evidences and molecular mechanisms of action. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* 2021 sep;90:153554. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153554>
 18. Maiuolo J, Gliozzi M, Carresi C, Musolino V, Oppedisano F, Scarano F, et al. Nutraceuticals and cancer: potential for natural polyphenols. *Nutrients.* 2021 oct 27;13(11). <https://doi.org/10.3390/nu13113834>
 19. Miyata Y, Shida Y, Hakariya T, Sakai H. Anti-Cancer effects of green tea polyphenols against prostate cancer. *Mol Basel Switz.* 2019;24(1):193. <https://doi.org/10.3390/molecules24010193>
 20. Rahman HS, Tan BL, Othman HH, Chartrand MS, Pathak Y, Mohan S, et al. An overview of in vitro, in vivo, and computational techniques for cancer-associated angiogenesis studies. *BioMed Res Int.* 2020;2020:8857428. <https://doi.org/10.1155/2020/8857428>
 21. Hosseini FS, Noroozi Karimabad M, Hajizadeh MR, Khoshdel A, Khanamani Falahati-Pour S, Mirzaei MR, et al. Evaluating of induction of apoptosis by cornus mass l. extract in the gastric carcinoma cell line (AGS). *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(1):123-30. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.1.123>
 22. Desta KT, Kim GS, Abd El-Aty AM, Raha S, Kim M-B, Jeong JH, et al. Flavone polyphenols dominate in *Thymus schimperii* Ronniger: LC-ESI-MS/MS characterization and study of anti-proliferative effects of plant extract on AGS and HepG2 cancer cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017;1053:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.035>
 23. Pagliara V, Nasso R, Di Donato P, Finore I, Poli A, Masullo M, et al. Lemon peel polyphenol extract reduces interleukin-6-induced cell

- migration, invasiveness, and matrix metalloproteinase-9/2 expression in human gastric adenocarcinoma MKN-28 and AGS Cell Lines. *Biomolecules*. 2019;9(12):833. <https://doi.org/10.3390/biom9120833>
24. Hallmann E, Kazimierczak R, Marszalek K, Drela N, Kiernozek E, Toomik P, et al. The nutritive value of organic and conventional white cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. capitata) and anti-apoptotic activity in gastric adenocarcinoma cells of sauerkraut juice produced thereof. *J Agric Food Chem*. 2017 sep;65(37):8171-83. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01078>
25. Chen D-L, Sheng H, Zhang D-S, Jin Y, Zhao B-T, Chen N, et al. The circular RNA circDLG1 promotes gastric cancer progression and anti-PD-1 resistance through the regulation of CXCL12 by sponging miR-141-3p. *Mol Cancer*. 2021 dic 15;20(1):166. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01475-8>
26. Liu ML, Zhang SJ. Effects of resveratrol on the protein expression of survivin and cell apoptosis in human gastric cancer cells. *J BUON Off J Balk Union Oncol*. 2014;19(3):713-7.
27. Yang Y, Huang X, Chen S, Ma G, Zhu M, Yan F, et al. Resveratrol induced apoptosis in human gastric carcinoma SGC-7901 cells via activation of mitochondrial pathway. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018;14(5):e317-24. <https://doi.org/10.1111/ajco.12841>
28. Yang T, Zhang J, Zhou J, Zhu M, Wang L, Yan L. Resveratrol inhibits Interleukin-6 induced invasion of human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2018;99:766-73. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.153>
29. Nowdijeh AA, Moosavi MA, Hosseinzadeh S, Soleimani M, Sabouni F, Hosseini-Mazinani M. Anti-oxidant and selective anti-proliferative effects of the total cornicabra olive polyphenols on human gastric MKN45 cells. *Iran J Biotechnol*. 2019;17(1):e1967. <https://doi.org/10.21859/ijb.1967>
30. Liu B, Li Z. Black currant (*Ribes nigrum* L.) extract induces apoptosis of MKN-45 and TE-1 cells through MAPK- and PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathways. *J Med Food*. 2016;19(4):365-73. <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.3521>
31. Arcone R, Palma M, Pagliara V, Graziani G, Masullo M, Nardone G. Green tea polyphenols affect invasiveness of human gastric MKN-28 cells by inhibition of LPS or TNF-alpha induced Matrix Metalloproteinase-9/2. *Biochim Open*. 2016;3:56-63. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2016.10.002>

32. Jing X, Cheng W, Wang S, Li P, He L. Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep.* 2016;35(1):472-8. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4384>
33. Zhang Q, Wang X, Cao S, Sun Y, He X, Jiang B, et al. Berberine represses human gastric cancer cell growth in vitro and in vivo by inducing cytostatic autophagy via inhibition of MAPK/mTOR/p70S6K and Akt signaling pathways. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2020 ago;128:110245. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110245>
34. Mieszala K, Rudewicz M, Gomulkiewicz A, Ratajczak-Wielgomas K, Grzegorzolka J, Dziegiel P, et al. Expression of genes and proteins of multidrug resistance in gastric cancer cells treated with resveratrol. *Oncol Lett.* 2018/02/12 ed. 2018;15(4):5825-32. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8022>
35. Venancio VP, Cipriano PA, Kim H, Antunes LMG, Talcott ST, Mertens-Talcott SU. Cocosplum (*Chrysobalanus icaco* L.) anthocyanins exert anti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells. *Food Funct.* 2017 oct;8(1):307-14. <https://doi.org/10.1039/c6fo01498d>
36. Emanuele S, Notaro A, Palumbo Piccionello A, Maggio A, Lauricella M, D'Anneo A, et al. Sicilian litchi fruit extracts induce autophagy versus apoptosis switch in human colon cancer cells. *Nutrients.* 2018 oct 12;10(10):1490. <https://doi.org/10.3390/nu10101490>
37. Kim D-H, Park K-W, Chae IG, Kundu J, Kim E-H, Kundu JK, et al. Carnosic acid inhibits STAT3 signaling and induces apoptosis through generation of ROS in human colon cancer HCT116 cells. *Mol Carcinog.* 2016 jun;55(6):1096-110. <https://doi.org/10.1002/mc.22353>
38. Signorelli P, Fabiani C, Brizzolari A, Paroni R, Casas J, Fabrias G, et al. Natural grape extracts regulate colon cancer cells malignancy. *Nutr Cancer.* 2015;67(3):494-503. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1004591>
39. Chalons P, Courtaut F, Limagne E, Chalmin F, Cantos-Villar E, Richard T, et al. Red wine extract disrupts Th17 lymphocyte differentiation in a colorectal cancer context. *Mol Nutr Food Res.* abril de 2020;e1901286. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201901286>
40. Jiang T, Wang H, Liu L, Song H, Zhang Y, Wang J, et al. CirclL4R activates the PI3K/AKT signaling pathway via the miR-761/TRIM29/PHLPP1 axis and promotes proliferation and metastasis in colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2021

- dic 18;20(1):167. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01474-9>
41. Sharma N, Sharma A, Bhatia G, Landi M, Brestic M, Singh B, et al. Isolation of phytochemicals from *Bauhinia variegata* L. bark and their in vitro antioxidant and cytotoxic potential. *Antioxid Basel Switz.* 2019 oct;8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100492>
42. Gao Y, Li W, Jia L, Li B, Chen YC, Tu Y. Enhancement of (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3-3'-digallate induced apoptosis by ascorbic acid in human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells and esophageal carcinoma Eca-109 cells via MAPK pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 ago;438(2):370-4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.078>
43. Stavrou IJ, Christou A, Kapnissi-Christodoulou CP. Polyphenols in carobs: a review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact. *Food Chem.* 2018 dic 15;269:355-74. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.152>
44. Ruskovska T, Maksimova V, Milenkovic D. Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability - an overview and perspective. *Br J Nutr.* 2020 feb 14;123(3):241-54. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002733>
45. Mutungi MM, Muema FW, Kimutai F, Xu Y-B, Zhang H, Chen G-L, et al. Antioxidant and antiproliferative potentials of ficus glumosa and its bioactive polyphenol metabolites. *Pharm Basel Switz.* 2021 mar 15;14(3). <https://doi.org/10.3390/ph14030266>
46. Merighi S, Travagli A, Tedeschi P, Marchetti N, Gessi S. Antioxidant and antiinflammatory effects of epilobium parviflorum, melilotus officinalis and cardiospermum halicacabum plant extracts in macrophage and microglial cells. *Cells.* 2021 oct 8;10(10). <https://doi.org/10.3390/cells10102691>
47. Mangmool S, Kunpukpong I, Kitphati W, Anantachoke N. Antioxidant and anticholinesterase activities of extracts and phytochemicals of syzygium antisepticum leaves. *Mol Basel Switz.* 2021 may 30;26(11). <https://doi.org/10.3390/molecules26113295>
48. Fonseca-Hernández D, Lugo-Cervantes EDC, Escobedo-Reyes A, Mojica L. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polyphenolic extract exerts antioxidant and antiaging potential. *Mol Basel Switz.* 2021 nov 6;26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216716>

49. Song S, Lee Y-M, Lee YY, Yeum K-J. Oat (*Avena sativa*) extract against oxidative stress-induced apoptosis in human keratinocytes. *Mol Basel Switz*. 2021 sep 13;26(18). <https://doi.org/10.3390/molecules26185564>
50. Zhu K-X, Lian C-X, Guo X-N, Peng W, Zhou H-M. Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chem*. 2011;126(3):1122-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.144>
51. Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003 ago;87(2-3):241-6. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(03\)00156-9](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(03)00156-9)
52. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 dic;65(1-2):55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
53. Wang Y, Chu F, Lin J, Li Y, Johnson N, Zhang J, et al. Erianin, the main active ingredient of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl, inhibits precancerous lesions of gastric cancer (PLGC) through suppression of the HRAS-PI3K-AKT signaling pathway as revealed by network pharmacology and in vitro experimental verification. *J Ethnopharmacol*. 2021 oct 28;279:114399. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114399>
54. Deng P, Li K, Gu F, Zhang T, Zhao W, Sun M, et al. LINC00242/miR-1-3p/G6PD axis regulates Warburg effect and affects gastric cancer proliferation and apoptosis. *Mol Med Camb Mass*. 2021 ene 29;27(1):9. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00259-y>
55. Quintana-Castillo JC, Ávila-Gómez IC, Ceballos-Ruiz JF, Vargas-Muñoz LJ, Estrada-Gómez S. Efecto citotóxico de fosfolipasas A2 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Colombia. *Rev Investig Salud Univ Boyacá*. 2017;4(1):16-37. <https://doi.org/10.24267/23897325.194>
56. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986;89(2):271-7. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
57. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*. 2017;22(2):306-23. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1333-3>
58. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 jun;2018(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

59. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*. 2015 feb;8:47. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>
60. Abel SDA, Baird SK. Honey is cytotoxic towards prostate cancer cells but interacts with the MTT reagent: Considerations for the choice of cell viability assay. *Food Chem*. 2018 feb;241:70-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.083>
61. Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2022 ago;27(7-8):482-508. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01735-y>
62. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1180:31-43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_3
63. Errami Y, Naura AS, Kim H, Ju J, Suzuki Y, El-Bahrawy AH, et al. Apoptotic DNA fragmentation may be a cooperative activity between caspase-activated deoxyribonuclease and the poly(ADP-ribose) polymerase-regulated DNAS1L3, an endoplasmic reticulum-localized endonuclease that translocates to the nucleus during apoptosis. *J Biol Chem*. 2013 feb 1;288(5):3460-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.423061>
64. Jamali T, Kavooosi G, Safavi M, Ardestani SK. In-vitro evaluation of apoptotic effect of OEO and thymol in 2D and 3D cell cultures and the study of their interaction mode with DNA. *Sci Rep*. 2018 oct 25;8(1):15787. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34055-w>
65. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017 ago;24(8):1380-9. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>
66. Kesavardhana S, Malireddi RKS, Kanneganti T-D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. *Annu Rev Immunol*. 2020 abr 26;38:567-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-073119-095439>
67. Cheng K-C, Wang C-J, Chang Y-C, Hung T-W, Lai C-J, Kuo C-W, et al. Mulberry fruits extracts induce apoptosis and autophagy of liver cancer cell and prevent hepatocarcinogenesis in vivo. *J Food Drug Anal*. 2020;28(1):84-93. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.06.002>

68. Qin Y, Ma Z, Dang X, Li W, Ma Q. Effect of resveratrol on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells may involve inhibition of the Hedgehog signaling pathway. *Mol Med Rep.* noviembre de 2014;10(5):2563-7. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2511>
69. Xu S, Yao J, Ainiwaer M, Hong Y, Zhang Y. Analysis of bacterial community structure of activated sludge from wastewater treatment plants in winter. *BioMed Res Int.* 2018;2018:1-8. <https://doi.org/10.1155/2018/8278970>
70. Xu J, Liu D, Niu H, Zhu G, Xu Y, Ye D, et al. Resveratrol reverses Doxorubicin resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through modulating PTEN/Akt signaling pathway in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR.* enero de 2017;36(1):19. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0487-8>



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons
Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional