

Efecto citotóxico de una especie nativa de Colombia *Bauhinia picta* (Fabaceae) en un modelo de línea celular de Glioblastoma

Cytotoxic effect of a native specie from Colombia *Bauhinia picta* (Fabaceae) in a Glioblastoma Cell Line Model

Diana Katherine Garzón-Perdomo¹, Diego Anibal León², Andrea Catalina Rubio³,
Laura Alejandra Lozano Trujillo⁴, Liliana Francis Turner⁵

Resumen

Introducción. El Glioblastoma multiforme es uno de los tipos de tumor más maligno del sistema nervioso central, por lo que se requiere de la búsqueda de nuevas terapias específicas y efectivas. Los tratamientos actuales como resección quirúrgica seguida de radioterapia y quimioterapia adyuvante con temozolomida, no generan los resultados clínicos esperados en el paciente; por lo cual, las terapias basadas en productos naturales han ganado interés por ser un tratamiento efectivo y menos tóxico. En esta investigación, se evaluó el efecto citotóxico de la especie *Bauhinia picta*, una especie nativa de Colombia la cual es reconocida por su utilidad en trastornos del sistema circulatorio, propiedades antidiabéticas, antiinflamatorias y antioxidantes, pero aún se desconoce su efecto en la actividad anticancerígena. **Objetivo.** Evaluar el efecto citotóxico de la especie *B. picta* sobre la línea celular de Glioblastoma. **Resultados.** Nuestros resultados demuestran que la concentración de 500 µg/mL de esta especie es capaz de disminuir la viabilidad, reducir entre el 55-60% de la integridad de la membrana y aumentar el área nuclear de la línea celular T98G. **Conclusión.** La concentración de 500 µg/mL disminuye la viabilidad de la línea celular T98G

1 Grupo de Investigación Modelos Experimentales para las Ciencias Zoo-Humanas. Facultad de ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué-Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5101-3261>
CvLAC: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0001613671

2 Facultad de ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué-Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5513-2858>

3 Grupo de Investigación Modelos Experimentales para las Ciencias Zoo-Humanas. Facultad de ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué-Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7544-7008>

4 Grupo de Investigación Modelos Experimentales para las Ciencias Zoo-Humanas. Facultad de ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué-Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9226-2926>

5 Grupo de Investigación Modelos Experimentales para las Ciencias Zoo-Humanas. Facultad de ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué-Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9189-0402>

Correspondencia: dkgarzonp@ut.edu.co

y es posible que el mecanismo de acción esté relacionado con la pérdida de integridad de membrana a través de la interacción que realizan los flavonoides presentes en esta especie con los componentes de esta estructura celular.

Palabras clave: *Bauhinia picta*, efecto citotóxico, glioblastoma, T98G.

Abstract

Introduction. Glioblastoma multiforme is one of the most malignant tumor types of the central nervous system, which makes the search for new, specific, and effective therapies essential. Current treatments, such as surgical resection followed by radiotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide, do not achieve the expected clinical outcomes; therefore, natural product-based therapies have gained interest as potentially effective and less toxic alternatives. In this study, we evaluated the cytotoxic effect of *Bauhinia picta*, a species native to Colombia that is known for its use in circulatory disorders and for its antidiabetic, anti-inflammatory, and antioxidant properties, although its anticancer activity remains unknown. **Objective.** To evaluate the cytotoxic effect of *B. picta* on a glioblastoma cell line. **Results.** Our findings show that the concentration of 500 µg/mL reduces the viability of the T98G cell line. Our results show that a concentration of 500 µg/mL of this species is capable of decreasing viability, reducing membrane integrity by 55-60%, and increasing the nuclear area of the T98G cell line. **Conclusion.** The concentration of 500 µg/mL decreases the viability of T98G cells, and the mechanism of action may be related to the loss of membrane integrity through interactions between the flavonoids present in this species and the components of the cell membrane.

Keywords: *Bauhinia picta*, cytotoxic effect, glioblastoma, T98G.

Introducción

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es uno de los tipos más malignos de tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) (1–4), es poco frecuente, con una incidencia global de 3,23 por cada 100,000 personas, con una

tasa de supervivencia de 15 meses después del diagnóstico (1,5–8); típicamente caracterizado por un incremento de angiogénesis, invasión de tejidos normales del cerebro, necrosis, y con el peor pronóstico (9). En Colombia se registra un comportamiento epidemiológico similar, con una incidencia anual ajustada por edad de 3,4 por cada

100.000 hombres y 2,5 por cada 100.000 mujeres (4).

El tratamiento principal consiste en la resección quirúrgica seguida de radioterapia y quimioterapia adyuvante con temozolomida, pero la eficacia de la quimioterapia disminuye aún más por la presencia de la barrera hematoencefálica que limita la administración de quimioterapéuticos al cerebro (10–13).

Por lo tanto, es indispensable la búsqueda de terapias que sean específicas y efectivas; en la última década, la terapia basada en productos naturales ha ganado popularidad como un tratamiento efectivo y potencialmente menos tóxico (14,15). Se ha reconocido una amplia gama de compuestos naturales por su naturaleza antioxidante y por su potencial quimiopreventivo del cáncer (16).

Por ejemplo, el género *Bauhinia* ha mostrado tener diversas propiedades, entre las que se encuentra la propiedad antioxidante y anticancerígena; atribuidas a compuestos como flavonoides y fenoles (7,17–22).

La especie *B. picta* perteneciente a la familia Fabaceae, subfamilia Caesalpinioideae es una especie nativa de Colombia, Panamá y Venezuela; que se utiliza para tratar trastornos del sistema circulatorio (23,24), ha mostrado tener propiedades antidiabéticas (25), antiinflamatorias y antioxidantes (26). Sin embargo, no ha sido evaluada la

propiedad anticancerígena de esta especie, que se ha reportado en especies del mismo género. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación, es evaluar el efecto citotóxico de la especie *Bauhinia picta* sobre la línea celular de GBM.

Materiales y métodos

Colecta de Bauhinia picta

Las muestras de la especie *Bauhinia picta* se colectaron dentro de las instalaciones de la Universidad del Tolima (Coordenadas: 4°25'40"N 75°12'46"W), en la ciudad de Ibagué, a 1.181 msnm con el permiso de colecta otorgado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) mediante la resolución 02252 del 14 de noviembre del 2019. Un ejemplar fue depositado en el Herbario Toli de la Universidad del Tolima con el número de registro es 29301.

Preparación de extractos etanólicos de Bauhinia picta

Las muestras foliares de *Bauhinia picta* se secaron en una estufa industrial a 40°C. Luego, se maceró el material vegetal con un mortero hasta obtener partículas finas, las cuales se filtraron con un tamiz de poro fino y se pesaron 200g de esta en una balanza analítica. El material se resuspendió en una proporción 1:10 de etanol (2 litros de etanol) a una temperatura no superior a los 40°C hasta el agotamiento (método

percolación). Después se concentraron las muestras utilizando un rotavapor (Buchi®, R-300). Para finalmente almacenar los extractos en botellas ámbar, que se almacenaron a 4°C hasta el momento del ensayo.

El rendimiento del extracto se determinó con base al porcentaje de sólidos extraídos y se expresó como porcentaje considerando g del extracto/ g de la materia seca como se muestra en la siguiente ecuación:

Al momento de su uso, cada extracto se disolvió en Dimetilsulfóxido (DMSO) y para alcanzar una concentración <0,2% de DMSO, la mezcla se diluyó en agua desionizada para su posterior adición en el medio de cultivo a concentraciones finales de 30 a 500 µg/ml.

Análisis fitoquímico cualitativo de la hoja de *B. picta*

A los extractos etanólicos obtenidos se les evaluó la presencia o ausencia de fitoconstituyentes tales como esteroides (prueba Lieberman-Burchard), triterpenos (prueba Salkowski), taninos (pruebas de gelatina y cloruro férrico), saponinas (Rosenthaler y espuma), fenoles (reactivo de Folin-Ciocalteu), flavonoides (ensayo de Shinoda y reacción con hidróxido sódico), alcaloides (pruebas Dragendorff, Mayer, Tanred y Valser), antocianinas (reactivo hidróxido sódico 2N), antraquinonas (reactivo de

Borntrager), carbohidratos totales, (reactivo de Molisch) y carbohidratos reductores (reactivo de Benedict), con referencia a la técnica descrita por Pharmacognosie & Phytochimie (27).

Condiciones del cultivo y línea celular

Se utilizaron células T98G (ATCC® CRL-1690) y se siguieron los protocolos de bioseguridad del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad del Tolima (PNT 021- Metodología de descongelamiento celular, PNT 10 -Establecimiento de cultivo celular). Las células se descongelaron en baño de agua a 37 ° C. Inmediatamente, se agregaron las células en un tubo Falcon con Medio Eagle modificado de Dulbecco bajo en glucosa (DMEM) con rojo fenol (Sigma-Aldrich®), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco®) y 1% de penicilina-estreptomina (P / E) (Biowest). Las células se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos, se suspendieron en medio y se sembraron (Caja de 75 cm² - NEST®) a una densidad celular de 5,0 x 10⁵. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: la incubadora humidificada (Binder C150) se ajustó a 37 ° C y 5% de CO₂. Una vez que se alcanzó 80-100% de confluencia en la caja, las células se separaron usando Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco®) y se re-sembraron en la densidad deseada dependiendo del experimento en el que se iban a utilizar.

Para los ensayos experimentales, las células se sembraron en placas de 96 pozos, a una densidad celular de 2×10^3 para el ensayo de viabilidad celular y 1×10^3 para la tinción con DAPI y con Naranja de acridina (NA)/ Yoduro de propidio (IP). Después de 24 horas se reemplazó el medio y las células se usaron en enfoques experimentales una vez que la confluencia alcanzó el 80% en el pozo.

Ensayo de viabilidad celular

Las concentraciones utilizadas fueron 30, 60, 125, 250 y 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ del extracto de *B. picta*. Las células fueron expuestas a efectos de los extractos de esta especie durante 6, 12 y 24 h, incluido el grupo de control (células sin extracto). Pasado el tiempo de cada ensayo, se retiraron los medios de cultivo, se lavaron las células y se añadió MTT ((bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) (Calbiochem®) disuelto en medio de cultivo a una concentración de trabajo de 0,05 mg/mL, en cada pozo, y se incubaron durante 4 h.

Posteriormente, se retiró el medio y se añadieron 80 μl de DMSO al 99,9% para disolver los cristales de formazán. La absorbancia se determinó en un lector de microplacas (Multiskan Go, Thermo-Fisher Scientific) a longitud de onda de 570 nm. Para todas las mediciones, se resta el valor en blanco (solo DMSO).

Cálculo del IC_{50}

El valor de IC_{50} se determinó a partir de los datos de viabilidad obtenidos en el ensayo MTT. Las curvas dosis–respuesta se ajustaron mediante un modelo sigmoidal de cuatro parámetros (4PL). El análisis se realizó en RStudio y se emplearon los paquetes (drc, tidyverse, ggplot2 y readxl), normalizando los datos con respecto al control. Se reportó el IC_{50} junto con su intervalo de confianza al 95%. Para cada tiempo de exposición (6, 12 y 24 horas), se generaron curvas dosis–respuestas individuales mediante el modelo ajustado. Además, se incorporaron líneas verticales que señalan los valores estimados de IC_{10} , IC_{20} e IC_{50} .

Determinación de proceso de muerte celular

Integridad de la membrana

La evaluación de análisis de membrana se realizó a las 12 y 24 horas. La tinción se inició con NA durante 5 min, posteriormente se lavó con PBS 1X y se colocó IP (1:1000) por 20 minutos el cual se encontraba en medio RPMI (Sigma-Aldrich®). Después se lavó el IP y se dejaron las células en medio RPMI mientras se hacía el registro fotográfico en el FLoid® (Invitrogen™). El conteo celular se realizó con el software ImageJ, versión 1.37c, a partir de las imágenes obtenidas del ensayo de viabilidad celular. En cada campo se distinguieron células

viables con membrana plasmática íntegra, que presentaron fluorescencia verde (NA^+/IP^-), de células con pérdida de integridad de membrana, que mostraron fluorescencia roja (NA^-/IP^+). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células teñidas viables (NA^+/IP^-) y de células con pérdida de integridad de membrana (NA^-/IP^+) respecto del total de células contadas en cada imagen.

Intensidad de fluorescencia y área nuclear

La tinción nuclear con DAPI se realizó a 12, 24 y 48 horas. Este último tiempo de exposición (48 h) fue incluido debido a que, en los ensayos preliminares de viabilidad (MTT) y de integridad de membrana (NA/IP), los tiempos tempranos no evidenciaron cambios marcados en la muerte celular. Por ello, se extendió la evaluación hasta 48 h con el fin de determinar si la exposición prolongada al extracto generaba alteraciones nucleares detectables mediante este marcador.

Para cada tiempo de exposición se retiraron los tratamientos y las células se fijaron con metanol por 5 minutos. Luego, se realizó un lavado con PBS 1X y se agregó DAPI 1:1000. (Life technologies D1306) durante 3 minutos, para finalmente realizar 2 lavados con PBS 1X.

Los resultados fueron revisados en el microscopio de fluorescencia FLoid® (Invi-

trogen™), donde se tomaron las fotografías a 20X, las cuales se analizaron para evaluar el área y la intensidad de fluorescencia nuclear mediante el software FIJI. Para calcular el área, se midió una escala conocida y se calibró el software. Posteriormente, se ajustó el umbral de las imágenes para analizar partículas utilizando el algoritmo para generar los datos (rango de tamaño de partícula 0,8-8 μm).

Análisis estadístico

Para todos los ensayos se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por grupo. La normalidad de los datos se determinó mediante la prueba de Shapiro-Wilks; dado que los datos no siguieron una distribución normal y no se aplicaron transformaciones, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, y como post-hoc se aplicó el test de Dunnett para las comparaciones múltiples frente al grupo control.

En el ensayo de viabilidad (MTT), los valores de absorbancia se normalizaron respecto al control y se expresaron como porcentaje de viabilidad. En los ensayos de integridad de membrana (NA/IP), los datos se expresaron como el porcentaje de células viables (NA^+/IP^-) y el porcentaje de células con pérdida de integridad de membrana (NA^-/IP^+). Las imágenes se procesaron mediante segmentación y umbralización estandarizada en FIJI/ImageJ, aplicando filtros de tamaño y

morfología para asegurar la correcta discriminación entre ambos fluorocromos; los valores obtenidos por imagen se promediaron a nivel de pozo antes de realizar el análisis estadístico.

Para el análisis nuclear mediante DAPI, tanto el área nuclear como la intensidad media de fluorescencia se reportaron en unidades arbitrarias (UA) obtenidas tras la calibración de escala y el análisis de partículas en FIJI.

Asimismo, se evaluó la relación entre la concentración del extracto y el efecto biológico mediante coeficientes de correlación de Pearson y Spearman. El valor de IC₅₀ se calculó mediante regresión no lineal ajustando un modelo sigmoidal de cuatro pa-

rámetros (4PL), obteniéndose los intervalos de confianza al 95% cuando el modelo permitió convergencia. Finalmente, se realizó un análisis de potencia estadística post hoc para estimar la sensibilidad del diseño experimental para detectar diferencias entre grupos. Todos los análisis se realizaron en GraphPad Prism 8.0.1 considerando diferencias significativas con $p < 0,05$.

Resultados

Metabolitos secundarios presentes en la hoja de *B.picta*.

Los resultados del análisis fitoquímico cualitativo de la especie *B. picta* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes o ausentes en la hoja de *B. picta* +++: Contenido relativo alto. ++: Contenido relativo medio. +Contenido relativo bajo. -Ausencia del metabolito.

Metabolito	Prueba	Presencia
Carbohidratos	Antrona, Molisch	-
Polifenoles	Folin-Ciocalteu	+++
Flavonoides	Shinoda, Zn/HCl	+
Taninos	Cloruro férrico	+
Terpenos	Salkowski, Lieberman	+
Alcaloides	Dragendorff, Wagner, Mayer, Tanred	-
Saponinas	Espuma, Rosenthaler	-

Rendimiento de *B.picta*

$$\%R = \frac{22 \text{ g extracto}}{200 \text{ g materia seca}} \times 100$$

$$\%R = 11\% \text{ p/pc}$$

El rendimiento de *B.picta* corresponde a 11%.

Evaluación de la viabilidad celular

De las concentraciones analizadas se observó una correlación directa entre la viabilidad y la concentración del extracto de la especie *Bauhinia picta*. Por lo tanto, para las

concentraciones de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($104 \pm 2,1$ a las 6 h; $97,3 \pm 1,9$ a las 12 h; y $103,5 \pm 0,9$ a las 24 h) y 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($100,1 \pm 1,5$ a las 6 h; $93,7 \pm 1,3$ a las 12 h; y $106,8 \pm 1,2$ a las 24 h) no mostraron un efecto significativo sobre la viabilidad respecto al grupo control (Figura 1). A diferencia de las anteriores, la concentración 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($97,4 \pm 1,7$ a las 6 h; $93,4 \pm 1,5$ a las 12 h; y $97,8 \pm 1,8$ a las 24 h) presentó diferencia significativa respecto al grupo control a las 12 horas ($p=0,0465$), la concentración 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$

($96,2 \pm 1,9$ a las 6 h; $87,9 \pm 1,5$ a las 12 h; y $106,2 \pm 3,9$ a las 24 h) mostró diferencia significativa a las 12 horas ($p<0,0001$).

Mientras tanto, la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró una reducción significativa de la viabilidad en los tres tiempos evaluados ($77,4 \pm 4,0$ a las 6 h; $49,1 \pm 2,8$ a las 12 h; y $61,3 \pm 2,2$ a las 24 h) mostró diferencia significativa respecto al grupo control ($p<0,0001$) (Figura 1).

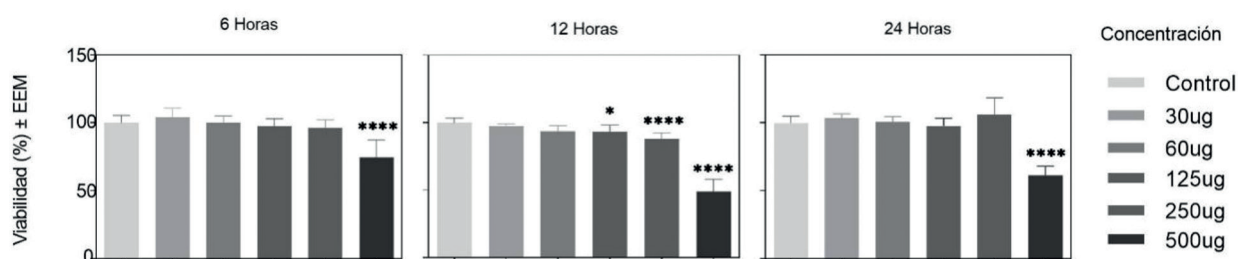


Figura 1. Efecto citotóxico del extracto de *Bauhinia picta* sobre la viabilidad de células T98G a las 6, 12 y 24 h, evaluado mediante el ensayo MITT. Cada barra representa el porcentaje de viabilidad celular para cada concentración evaluada (30, 60, 125, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incluyendo el control. Los datos se presentan como media \pm EEM. Las diferencias significativas respecto al control se indican con asteriscos en la gráfica: * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Determinación del IC_{50} del extracto de *Bauhinia picta*

El análisis dosis–respuesta no mostró el comportamiento sigmoidal esperado, ya que únicamente la concentración más alta (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) redujo de forma evidente la viabilidad celular (Figura 2). Las concentraciones inferiores (30–250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no generaron un descenso progresivo que per-

mitiera ajustar un modelo 4PL de manera adecuada. En consecuencia, la regresión no lineal no alcanzó convergencia estadística válida y no fue posible obtener un IC_{50} robusto dentro del rango evaluado, por lo que el valor real del IC_{50} se ubica por encima de la concentración máxima probada ($\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{g}/\text{mL}$), este mismo comportamiento impidió la estimación de parámetros estadísticamente válidos. Por esta razón, no se

reporta un valor p , y los valores de IC_{50} presentados deben interpretarse como estimaciones descriptivas.

de viabilidad cercanos al 50%, se estimó un IC_{50} con fines únicamente descriptivos (Tabla 2).

No obstante, dado que a las 12 h la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produjo valores

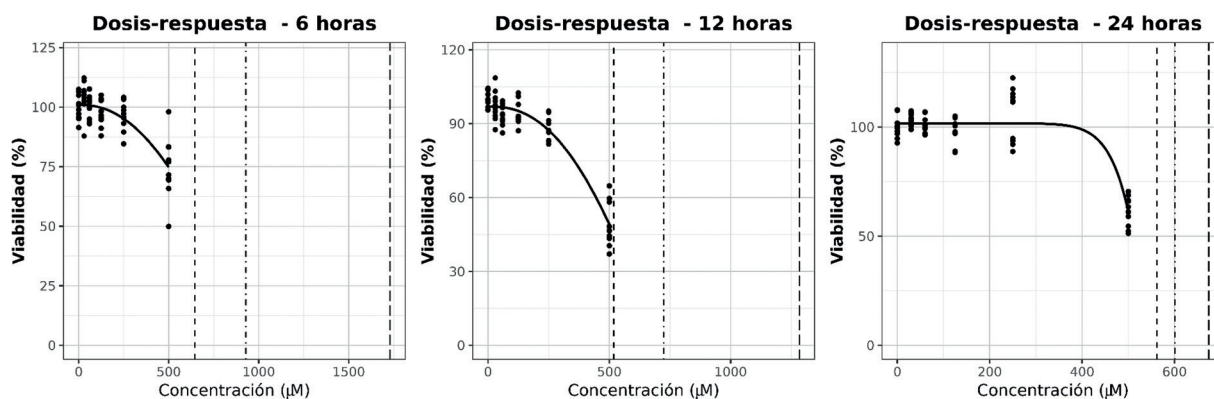


Figura 2. Curvas dosis–respuesta para las células tratadas durante 6, 12 y 24 horas. Los puntos representan los valores experimentales de viabilidad celular, mientras que las líneas muestran el ajuste mediante un modelo log-logístico de cuatro parámetros. Las líneas verticales indican los valores de IC_{10} , IC_{20} e IC_{50} estimados para cada tiempo.

Hora	IC_{10} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC_{20} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) – Estimado
6h	645.7615	928.8873	1729.335
12h	517.8652	723.8871	1283.2943
24h	561.9840	600.9906	674.0457

Tabla 2. Valores de IC_{10} , IC_{20} e IC_{50} estimados mediante ajuste log-logístico para cada tiempo de tratamiento.

Determinación de proceso de muerte celular

Integridad de la membrana

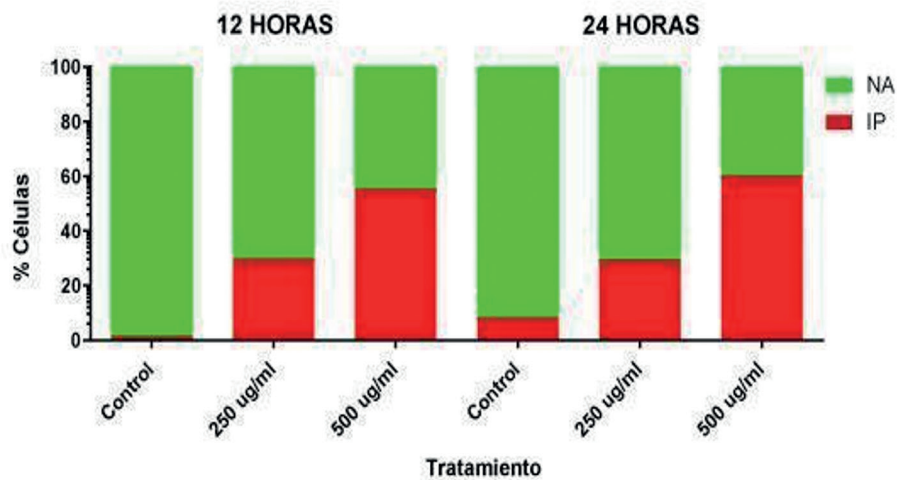
Se evaluó la integridad de la membrana mediante el ensayo de NA/IP a las 12 y 24 h para determinar el efecto de los extractos de *B. picta* sobre este componente celular.

Las concentraciones bajas e intermedias (30, 60 y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no generaron alteraciones apreciables en la integridad de la membrana en ninguno de los tiempos evaluados, lo que sugiere un efecto limitado o nulo en este rango de dosis. Se observó una disminución en la integridad de la membrana de 30,2% con la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 55,6 % con la concentración

de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 12 h (Figura 3). Valores similares se observaron a las 24 h, con una disminución en la integridad de membrana

de 29,8% con la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 60,5% con la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3).

A.



B.

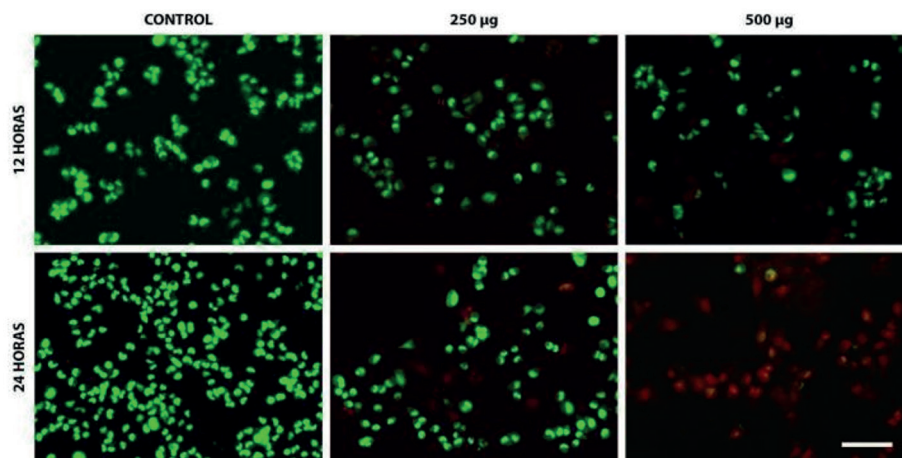


Figura 3. Efecto del extracto de *B. picta* sobre la integridad de membrana en células T98G. **A.** Porcentaje de células NA+/IP- y NA-/IP+ tras los tratamientos con el extracto a 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 12 y 24 h. Los datos se presentan como el porcentaje de células teñidas con NA/IP. **B.** Imágenes representativas del grupo control y de las células tratadas con 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto, teñidas con NA/IP a las 12 y 24 h. Las micrografías fueron adquiridas a una magnificación de 20X; barra de escala = 10 μm .

Área nuclear

Para validar la posible muerte celular en el modelo planteado, se evaluó el área nuclear en la célula sometida a tratamiento con los extractos de *B. picta*. Se mostró un aumento significativo del área nuclear entre la concentración de 500 µg/mL respecto al grupo control a las 12 h ($p < 0,001$) y a las 24 h ($p < 0,0001$). El área nuclear promedio para

el control fue de $2,18 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ y para las células tratadas con 500 µg/mL de *B. picta* fue de $2,60 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ a las 12 h. Los mismos resultados se validaron para las células control ($2,25 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$) y para las células tratadas con la concentración de 500 µg/mL ($2,84 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$) a las 24 h (Figura 4).

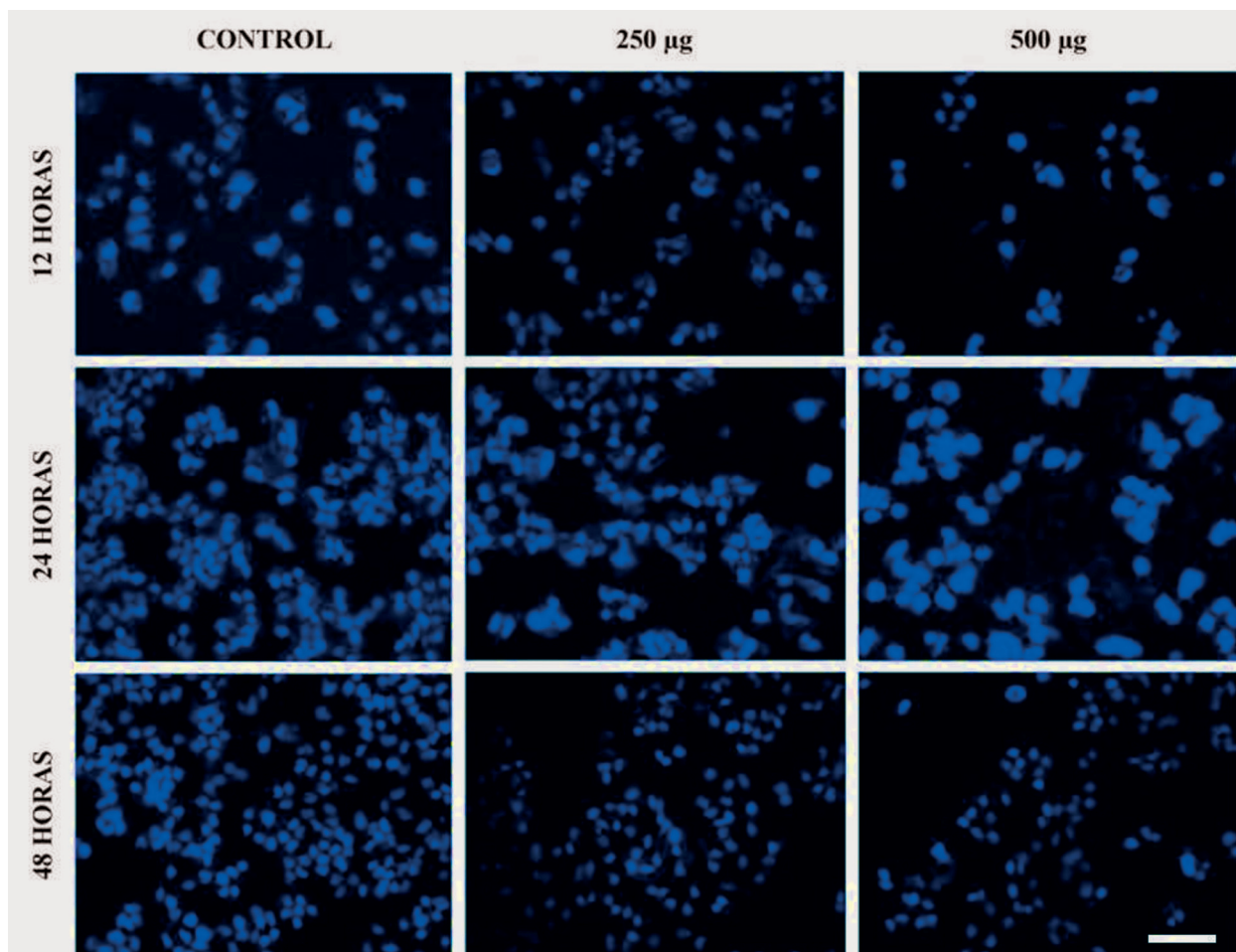


Figura 4. Tinción con DAPI (azul) de células T98G pertenecientes al grupo control y tratadas con el extracto de *B. picta* a 250 y 500 µg/mL durante 12, 24 y 48 h. Las micrografías fueron obtenidas con una magnificación de 20X; barra de escala = 10 µm.

Fluorescencia media de los núcleos

No observamos un aumento significativo en la fluorescencia media en los núcleos de las células tratadas con el extracto de la especie *B.picta* ($77,41 \pm 1,84$, $77.84 \pm 1,29$) para el tratamiento de $250 \mu\text{g/mL}$,

($79,57 \pm 1,01$; $81,05 \pm 0,75$) ni para el tratamiento de $500 \mu\text{g/mL}$ contra el control ($73,95 \pm 2,10$; $79,78 \pm 1,10$) a las 12 y 24 h respectivamente (Figura 5).

Intensidad de Fluorescencia Media

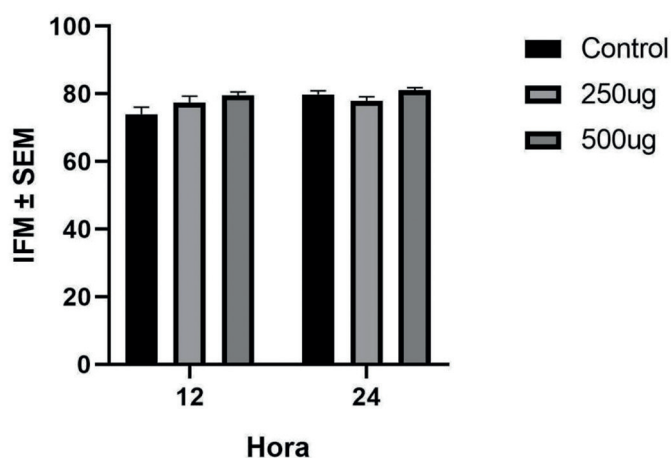


Figura 5. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de la tinción DAPI en células T98G tratadas con el extracto de *B. picta* a 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ durante 12 y 24 h, comparadas con el control. Los datos se presentan como media \pm SEM.

Discusión

El cáncer es un trastorno complejo caracterizado por una proliferación celular descontrolada y que representa un desafío global para la salud pública (28,29). El GBM, es la forma más agresiva de tumor cerebral en adultos, impone una carga social y médica significativa debido a su naturaleza incurable y sus complicaciones neurológicas. A pesar de las investigaciones en curso, no se han logrado mejoras en la supervivencia (8,30,31).

Los tratamientos modernos, aunque eficaces, conllevan problemas como resistencia a múltiples fármacos, efectos secundarios y costes elevados. Por tanto, existe una necesidad urgente de intervenciones más eficaces y menos tóxicas, incrementando significativamente la demanda de productos naturales como medio para la prevención de este tipo de enfermedades debido a la presencia de valiosos compuestos bioactivos (32). La terapia natural se ha

propuesto como una alternativa a las terapias convencionales (33–36), dentro de las plantas utilizadas, se ha reportado el efecto citotóxico y anticancerígeno en el género *Bauhinia* (37–40).

Lo que coincide con nuestros resultados, en los que la especie nativa de Colombia, *B. picta* tiene un efecto citotóxico sobre la línea celular T98G. La concentración de 500 µg/mL de *B. picta* evaluada, mostró los mejores resultados teniendo en cuenta que desde las 6 h, el extracto causó una pérdida en la viabilidad significativa de las células T98G en comparación al grupo control. Esta misma concentración, evaluada en la especie *Bauhinia tomentosa* indicó tener actividad anticancerígena sobre la línea celular de cáncer de hígado HePG2 (41). De igual manera la concentración 500 µg/mL de *Bauhinia pauletia* Pers mostró tener actividad citotóxica sobre la línea celular de cáncer de mama MCF7 (42), igualmente los extractos metanólicos de *Bauhinia variegata* y *Bauhinia racemosa* evidenciaron actividad citotóxica sobre las líneas HELA (cáncer cervical) y KB (Cáncer oral) (43).

En cuanto al rendimiento de *B. picta* en esta investigación corresponde a un 11% p/p, un porcentaje superior al 6,39% p/p reportado para el extracto metanólico (44) y al 4,47% p/p reportado para el extracto etanólico (45) de *B. variegata*.

Por otro lado, la prueba de NA/IP mostró que alrededor del 60% de las células tratadas con el extracto de 500 µg/mL de *B. picta* tenían una disminución en la integridad de la membrana en comparación con las células que no fueron tratadas con esta especie. Esto indica que el mecanismo de acción probable de *B. picta* está afectando la membrana celular.

El género *Bauhinia* se caracteriza por la presencia de fenoles y flavonoides (42,46). Estos últimos forman interacciones con las membranas que incluyen: interacciones flavonoide-lípido y flavonoide-proteína, que pueden alterar las propiedades de la membrana, como la estructura, las características físicas, propiedades eléctricas y fluidez, y / o enzimas moduladas, transducción de señales y cambio de interacción de ligandos con receptor (47,48). Los flavonoides a concentraciones muy bajas pueden alterar las funciones de la membrana y las proteínas (49,50). Por lo tanto, es posible que el mecanismo de acción del extracto de esta especie sea mediante la interacción de los flavonoides con los componentes de la membrana entre ellos los lípidos.

Se ha demostrado que los flavonoides poseen numerosas funciones biológicas, como la antioxidación, la prevención de la angiogénesis, la acción antiinflamatoria, la inhibición de la proliferación de células cancerosas, la protección de las células nerviosas,

pueden inducir la apoptosis y la autofagia en las células de GBM (10). Por esa razón, los flavonoides han sido probados en diferentes modelos *in vitro* de GBM, disminuyendo la proliferación, activando vías de señalización y redireccionando la actividad celular a vías alternas que evoquen apoptosis y reparación celular (51).

Por otra parte, se evaluó el efecto del compuesto gluococinina, aislado del extracto metanólico de hojas *Bauhinia variegata*, observando en este un potencial anticancerígeno dado a las interacciones biológicas que ocurren entre flavonoides, compuestos fenólicos o polifenoles de esta especie, con enzimas, que inhiben el crecimiento de las células cancerígenas (22).

Además, se ha informado que ciertos flavonoides interfieren con la capacidad de autorrenovación e invasividad de las células madre de GBM al regular negativamente la vía de señalización de c-Met (19). Sin embargo, estas propiedades anticancerígenas, están asociadas al tipo de cáncer, línea celular, cantidad de flavonoides y duración a la exposición, pero al controlar los niveles de ROS, los flavonoides son capaces de dificultar el inicio, la promoción y la progresión del cáncer (52).

En este estudio, se observó un incremento significativo en el área nuclear de las células tratadas con el extracto de 500 µg/mL de *B. picta* a las 12 y 24 h. Este aumento en

el tamaño del núcleo es una característica morfológica típica durante la muerte celular necrótica (53,54). Este hallazgo difiere con mecanismos apoptóticos clásicos, en los que generalmente se observa una reducción del área nuclear acompañada de condensación de la cromatina.

Es importante mencionar que los efectos apoptóticos han sido relacionados con la disminución de los parámetros de morfología nuclear (área, perímetro) y con niveles elevados en la intensidad de fluorescencia (55), lo que indica condensación nuclear. Sin embargo, en este estudio no se revelaron características, que indiquen muerte celular por apoptosis. Esta aparente contradicción podría explicarse si se considera que se utilizaron extractos crudos, este tipo de extracto contiene diversos metabolitos capaces de activar diferentes vías de muerte celular. Razón por la cual se sugiere evaluar otros parámetros que determinen el mecanismo biológico que esté generando la disminución de la viabilidad de las células de GBM, para así contribuir al uso promisorio de *B. picta* en el tratamiento quimioterapéutico y quimiopreventivo del cáncer, tal como se ha demostrado en otros medicamentos clínicamente útiles, derivados de plantas como lo son la vincristina y el paclitaxel (43).

Asimismo, no se observó incremento en la intensidad de fluorescencia DAPI, marcador asociado a la condensación del ADN

en etapas tardías de apoptosis; la ausencia de este comportamiento en nuestras pruebas indica que el extracto no desencadenó un proceso apoptótico típico (56,57). Por lo tanto, es posible considerar que las células podrían estar siguiendo un mecanismo de muerte no programada que no involucra condensación nuclear; o que los cambios apoptóticos podrían manifestarse en tiempos superiores a los evaluados; o que los metabolitos fenólicos presentes en el extracto podrían interferir con la unión del DAPI al ADN, atenuando la señal de fluorescencia; o que el extracto podría estar ejerciendo efectos citostáticos sin comprometer la integridad nuclear. Además, no se descarta que algunos compuestos del extracto actúen como agentes antioxidantes o produzcan fenómenos de *quenching* que disminuyan la intensidad observable del fluoróforo. Por todo esto, la interpretación de estos hallazgos debe integrarse con otros marcadores de viabilidad y muerte celular, ya que apuntan a un proceso de muerte predominantemente necrótico o no apoptótico en las células T98G.

Finalmente, es importante señalar que este estudio presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, no se emplearon métodos moleculares que discriminen entre apoptosis y necrosis (caspasas, PARP, Bcl-2, Bax) (56). Además, la ausencia de un análisis químico detallado del extracto de *B. picta* mediante HPLC-MS limita la comprensión de las posibles interacciones entre estos compuestos,

las membranas lipídicas y otras estructuras celulares. Tampoco se evaluaron otros rasgos morfológicos asociados a apoptosis o necrosis, como fragmentación nuclear, formación de blebs o alteraciones del citoesqueleto. Por lo cual, se recomienda para futuros estudios integrar abordajes moleculares, bioquímicos y estructurales que permitan esclarecer con precisión el mecanismo de muerte celular inducido por *B. picta*.

Conclusión

El extracto de la especie *B. picta* demostró actividad citotóxica en células T98G. Además, nuestros resultados evidencian que la concentración de 500 µg/mL es capaz de disminuir la viabilidad de las células T98G, y que su mecanismo de acción, posiblemente sea afectando la integridad de la membrana celular mediante interacciones entre compuestos de esta especie como los flavonoides y componentes de la membrana como los lípidos. Es necesario realizar estudios adicionales para dilucidar completamente el mecanismo de muerte celular para determinar el uso promisorio de la especie nativa de Colombia *B. picta* como alternativa terapéutica para el tratamiento de GBM.

Agradecimientos

Al Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima (GI-PRONUT) donde se preparó los extractos.

Conflictos de interés

Todos los autores declaran que no existen relaciones financieras y personales con otras personas u organizaciones que puedan influir (sesgo) de manera inapropiada en este trabajo y / o estado descrito en este trabajo.

Financiación

Al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (MinCiencias) [convocatoria 812 de 2018].

Referencias

1. Kaya-Aksoy E, Cingoz A, Senbabaoglu F, Seker F, Sur-Erdem I, Kayabolun A, et al. The pro-apoptotic Bcl-2 family member Harakiri (HRK) induces cell death in glioblastoma multiforme. *Cell Death Discov.* 2019;5(1):12.
2. Ortiz B, Jimenez MJ, Correa LN. Caracterización molecular del glioblastoma multiforme de un paciente con larga supervivencia. *Acta Neurológica Colombiana.* 2021;37(1).
3. Reséndiz-Castillo LJ, Minjarez B, Reza-Zaldívar EE, Hernández-Sapiéns MA, Gutiérrez-Mercado YK, Canales-Aguirre AA. The effects of altered neurogenic microRNA levels and their involvement in the aggressiveness of periventricular glioblastoma. *Neurología (English Edition).* 2022;37(9).
4. Torres Rodríguez MP, Murcia García KA, Cruz Baquero CA, Infante Cruz A del P. Inmunopatología del Glioblastoma Multiforme y su importancia en el ámbito clínico. *Revista Ciencias Biomédicas.* 2022;11(2).
5. Aguirre-Cruz L, Rodríguez-Pérez CE, De la Cruz-Aguilera DL, Acosta-Castillo GI, Ruano-Calderón LÁ, Martínez-Moreno M, et al. Epidemiología descriptiva y cambios en la frecuencia de tumores astrocíticos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México. *Salud Publica Mex.* 2020;62(3, may-jun).
6. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2017;18(1):3–9.
7. Lozano-Trujillo LA, Garzón-Perdomo DK, Vargas ACR, de los Reyes LM, Avila-Rodriguez MF, Gay OTG, et al. Cytotoxic Effects of Blue Scorpion Venom (*Rhopalurus junceus*) in a Glioblastoma Cell Line Model. *Curr Pharm Biotechnol.* 2020;22(5).
8. Rodríguez-Mendoza B, Figueroa-González A, Cano-Herrera G, Gutiérrez-Rosas LE, Romero-Torres CI, Victoria-García LO, et al. Glioblastoma and its interaction with neurogenesis. Vol. 79, *Revista de Neurología.* Revista de Neurología; 2024. p. 279–87.
9. Singh S, Dey D, Barik D, Mohapatra I, Kim S, Sharma M, et al. Glioblastoma at the crossroads: current understanding and future therapeutic horizons. Vol. 10, *Signal Transduction and Targeted Therapy.* Springer Nature; 2025.
10. Liu X, Xiao X, Han X, Yao L, Lan W. Natural flavonoids alleviate glioblastoma multiforme by regulating long non-coding RNA. *Biomedicine & Pharmacotherapy [Internet].* 2023 May 1 [cited 2025 Nov 15];161:114477. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223002652>
11. Rieger D, Renovanz M, Kurz S, Bombach P, Paulsen F, Roder C, et al. Glioblastom – aktuelle Therapiekonzepte. *Die Onkologie.* 2024;30(2).
12. Sahin E, Orhan C, Erten F, Saiyed Z, Azari EK, Durkee S, et al. The effect of oral administration of undenatured type II collagen on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in young and old rats. *Sci Rep.* 2023 Dec 1;13(1).

13. Xie Y, Hou T, Liu J, Zhang H, Liu X, Kang R, et al. Autophagy-dependent ferroptosis as a potential treatment for glioblastoma. Vol. 13, *Frontiers in Oncology*. 2023.
14. Rayati M, Mansouri V, Ahmadbeigi N. Gene therapy in glioblastoma multiforme: Can it be a role changer? Vol. 10, *Heliyon*. 2024.
15. Vengoji R, Macha MA, Batra SK, Shonka NA. Natural products: A hope for glioblastoma patients. *Oncotarget*. 2018;9(31):22199–224.
16. Galicia Moreno M. Compuestos antioxidantes naturales: una alternativa terapéutica ante el cáncer de hígado. *Quimiofilia*. 2023;2(2).
17. Abdel-Razakh HH, Bakari GG, Park JS, Pan CH, Hoza AS. Phenolic Contents and Antioxidant Properties of *Bauhinia rufescens*, *Ocimum basilicum* and *Salvadora persica*, Used as Medicinal Plants in Chad. *Molecules*. 2024 Oct 1;29(19).
18. Chávez-Bustos EA, Morales-González A, Anguiano-Robledo L, Madrigal-Santillán EO, Valadez-Vega C, Lugo-Magaña O, et al. *Bauhinia forficata* Link, Antioxidant, Genoprotective, and Hypoglycemic Activity in a Murine Model. *Plants*. 2022 Nov 1;11(22).
19. Forni C, Rossi M, Borromeo I, Feriotta G, Platamone G, Tabolacci C, et al. Flavonoids: A myth or a reality for cancer therapy? *Molecules*. 2021 Jun 2;26(12).
20. Gudavalli D, Pandey K, EDE VG, Sable D, Ghagare AS, Kate AS. Phytochemistry and pharmacological activities of five species of *Bauhinia* genus: A review. *Fitoterapia* [Internet]. 2024;174:105830. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X24000133>
21. Muzaffar S, Shahzad H, Saeed S, Khan Z, Atif M, Saleem S, et al. Antioxidants from *Bauhinia* and Future Research Gap. *Annals of Experimental and Molecular Biology*. 2023 Feb 27;5(1):1–8.
22. Shamran DJ, Alwan Al-Jumaili EF, Tawfeeq AT. Cytotoxicity Effect of Glucokinin Isolated from *Bauhinia variegata* Against Several Cancer Cell Lines. *Iraqi Journal of Biotechnology*. 2020;19(1):69–74.
23. Royal Botanical Gardens. Royal Botanical Gardens Kew. 2020. p. 1 *Plants of the world online*. Available from: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:481565-1>
24. Universidad EIA. Catalogo flora valle aburra. 2020. p. 1 *Bauhinia picta*. Available from: <https://catalogofloravalleaburra.eia.edu.co/species/27>
25. Murillo E, Tique MM, Ospina LF, Lombo Ó. Evaluación preliminar de la actividad hipoglucemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in Vitro de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. *Rev colomb ciencias quim farm*. 2006;35(1):64–80.
26. Montealegre P, Francis Turner L. Anti-inflammatory and antioxidant action of *Bauhinia kalbreyeri* Harms in an acute intestinal inflammation model used in rats. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012;17(4):343–59.
27. Bruneton J. *Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes Médicinales: TECHNIQUE & DOC*. Vol. 36, *Phytochemistry*. 1993.
28. Azizi T. *Mathematical Modeling of Cancer Progression*. *AppliedMath*. 2024 Sep 1;4(3):1065–79.
29. Cueva P, Tarupi W, Caballero H. Incidencia y mortalidad por cáncer en Quito: información para monitorear las políticas de control del cáncer. *Colomb Med*. 2022;53(1).
30. Nam J, Groot J. Treatment of Glioblastoma. *J Oncol Pract*. 2017 Oct 1;13:629–38.
31. Rončević A, Koruga N, Soldo Koruga A, Rončević R, Rotim T, Šimundić T, et al. Personalized Treatment of Glioblastoma: Current State and Future Perspective. Vol. 11, *Biomedicines*. MDPI; 2023.
32. Macedo C, Costa PC, Rodrigues F. Bioactive compounds from *Actinidia arguta* fruit as a new strategy to fight glioblastoma. *Food Research International* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 Nov 15];175:113770. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996923013182?pes=vor&utm_source=mendeley&getft_integrator=mendeley

33. Giammona A, Commisso M, Bonanomi M, Remedios S, Avesani L, Porro D, et al. A Novel Strategy for Glioblastoma Treatment by Natural Bioactive Molecules Showed a Highly Effective Anti-Cancer Potential. *Nutrients*. 2024 Aug 1;16(15).
34. Li Y, Qu S, Zuo J, Long H, Cao F, Jiang F. Progress on the functions and mechanisms of natural products in anti-glioma therapy. *Chin J Nat Med* [Internet]. 2025 May 1 [cited 2025 Nov 15];23(5):541–59. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1875536425608156>
35. Soumya SJ, Arya KR, Abhinand CS, Sunitha P, Athira AP, Nair AS, et al. Multi-target and natural product-based multi-drug approach for anti-VEGF resistance in glioblastoma. *Exploration of Drug Science*. 2024 Sep 13;567–82.
36. Xu F, Yang YH, Yang H, Li W, Hao Y, Zhang S, et al. Progress of studies on natural products for glioblastoma therapy. Vol. 26, *Journal of Asian Natural Products Research*. 2024.
37. Sebastian D, Gowri Shankar K, Ignacimuthu S, Sophy AJR, Vidhya R, Anusha JR. *Bauhinia acuminata* L. attenuates lung cancer cell proliferation: in vitro, in vivo and in silico approaches. *Phytomedicine Plus*. 2022;2(1).
38. Sebastian D, Sophy R. *Bauhinia acuminata*: A brief review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian J Pharm Pharmacol*. 2020 Jul;6(3):164–70.
39. 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. *Antioxidants*. 2019;8(10):1–19.
40. Vaghela H, Shah R, Pathan A. Palladium Nanoparticles Mediated Through *Bauhinia variegata*: Potent In vitro Anticancer Activity Against MCF-7 Cell Lines and Antimicrobial Assay. *Current Nanomaterials*. 2019;3(3):168–77.
41. Solomon S, Muruganantham N, Senthamilselvi MM. Anticancer Activity of *Abelmoschus Esculentus* (Flowers) Against Human Liver Cancer. *Int J Pharm Biol Sci*. 2016;5(1):154–7.
42. Sierra A, Nicxy H, Moya D De, Charris AG, De C, Torres R. Control de calidad de hojas y correlación entre actividad antioxidante y citotóxica de *Bauhinia pauletia* Pers Quality control of leaves and correlation between antioxidant and cytotoxic activity of *Bauhinia pauletia* pers. 2018;100–13.
43. Badgajar N V., Mistry KN, Chudasama PN, Patel JS. In vitro antioxidant and cytotoxic effects of methanol extracts of vitex negundo, lantana camara, bauhinia variegata and bauhinia racemosa on human cancer cell lines. *Indian J Pharm Sci*. 2017;79(3).
44. Garduño Escobedo Adán. Concentración letal media (CL50), dosis letal media (DL50) y fitoquímica de los extractos de las hojas de *Bauhinia variegata* L. [Internet] [Tesis de pregrado]. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019 [cited 2025 Dec 2]. Available from: <https://tesiunamdocumentos.dgb.unam.mx/ptd2019/abril/0788090/0788090.pdf>
45. Kadyan P, Saini J, Singh P, Arasu PT, Kataria SK. Unveiling antidiabetic and antioxidant activities of biogenically synthesized red fluorescent graphene quantum dots using *Bauhinia variegata* L. leaves. *Discover Sustainability*. 2025 Dec 1;6(1).
46. Nair DK, Shanthy B, Simon SA, Kalaiselvi VS. Phytochemical and GCMS Analysis of Methanolic Leaf Extract of *Bauhinia Variegata*. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2022;15(2):1161–5.
47. Atrahimovich D, Avni D, Khatib S. Flavonoids-macromolecules interactions in human diseases with focus on alzheimer, atherosclerosis and cancer. Vol. 10, *Antioxidants*. 2021.
48. Wang R, Tu L, Pan D, Gao X, Du L, Cai Z, et al. A Comparative Study of Binding Interactions between Proteins and Flavonoids in *Angelica Keiskei*: Stability, -Glucosidase Inhibition and Interaction Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 1;24(7).
49. Jomova K, Alomar SY, Valko R, Liska J, Nepovimova E, Kuca K, et al. Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2025 May 25 [cited 2025 Oct 11];413:111489. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000927972500119X?via%3Dihub>

50. Y. Aboul-Enein H, Berczynski P, Kruk I. Phenolic Compounds: the Role of Redox Regulation in Neurodegenerative Disease and Cancer. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013;13(3):385–98.
51. Alcázar-Arzuza JP, Rojas-Gil AP, Francis-Turner L. Uso de los flavonoides en modelos experimentales de glioblastoma multiforme. *Actualidades Biológicas* [Internet]. 2025;47(123). Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/359946>
52. Slika H, Mansour H, Wehbe N, Nasser SA, Iratni R, Nasrallah G, et al. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. Vol. 146, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022.
53. Kwon HK, Lee JH, Shin HJ, Kim JH, Choi S. Structural and functional analysis of cell adhesion and nuclear envelope nano-topography in cell death. *Sci Rep*. 2015;5:1–15.
54. Singh NP. A Simple Method For Accurate Estimation of Apoptotic Cells. *Exp Cell Res*. 2000;256:328–37.
55. Mandelkow R, GüMBEL D, Ahrend H, Kaul A, Zimmermann U, Burchardt M, et al. Detection and quantification of nuclear morphology changes in apoptotic cells by fluorescence microscopy and subsequent analysis of visualized fluorescent signals. *Anticancer Res*. 2017;37(5):2239–44.
56. Costigan A, Hollville E, Martin SJ. Discriminating Between Apoptosis, Necrosis, Necroptosis, and Ferroptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Curr Protoc*. 2023;3(12).
57. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, et al. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. Vol. 13, *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.

© 2026 – Diana Katherine Garzón-Perdomo, Diego Anibal León, Andrea Catalina Rubio, Laura Alejandra Lozano Trujillo, Liliana Francis Turner



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). Use, distribution, or reproduction in other forums is permitted, provided that the original author and copyright owner are credited and the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution, or reproduction is permitted that does not comply with these terms.