



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Citotoxicidad de los extractos de *Grias neuberthii* y *Grias peruviana* sobre
líneas celulares tumorales**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Samaniego Romero, Jimmy Patricio

DIRECTOR: Guamán Ortiz, Luis Miguel, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Luis Miguel Guamán Ortiz

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Citotoxicidad de los extractos de *Grias neuberthii* y *Grias peruviana* sobre líneas celulares tumorales, realizado por Samaniego Romero Jimmy Patricio, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre de 2017

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Samaniego Romero Jimmy Patricio, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Citotoxicidad de los extractos de *Grias neuberthii* y *Grias peruviana* sobre líneas celulares tumorales, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Luis Miguel Guamán Ortiz director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f.

Autor: Samaniego Romero Jimmy Patricio

Cédula: 1104729395

DEDICATORIA

A mi padre y mi madre, que me han ayudado a cumplir con mi carrera profesional.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, que me han ayudado en el proceso de aprendizaje.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a mis padres, por su apoyo y comprensión a lo largo de la carrera.

Al Ph.D. Luis Guamán, por sus instrucciones y enseñanza a lo largo del desarrollo de este trabajo de titulación.

A la Ph.D. Natalia Bailón, por permitirme realizar el presente trabajo de titulación en el laboratorio de Biología Celular y Genotoxicología.

A la Mgtr. María Isabel por sus conocimientos impartidos.

A la técnica de laboratorio Gabriela González y a las compañeras de laboratorio Stephania y Daysi por su ayuda mientras se realizó el presente trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Cáncer.....	6
1.2. Causas del Cáncer	6
1.3. Cáncer de Colon:	8
1.4. Cáncer de mama	10
1.5. Astrocitoma Cerebral o Cáncer Cerebral	11
1.6. Cáncer de Pulmón	13
1.6.1. Cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP).....	13
1.6.1.1. Cáncer de células escamosas (epidermoide).....	13
1.6.1.2. Adenocarcinoma.....	14
1.6.1.3. Carcinomas indiferenciados.....	14
1.7. Cáncer de Próstata.....	15
1.8. Tratamientos antiproliferativos de células tumorales.....	16
1.8.1. Quimioterapia.....	16
1.8.2. Antineoplásicos de origen vegetal.....	17
1.8.2.1. Alcaloides de la vinca.....	17
1.8.2.1.1. Vincristina.....	17
1.8.2.1.2. Vinblastina.....	17
1.8.2.1.3. Vinorelbina.....	18
1.8.2.2. Taxanos.....	18
1.8.2.2.1. Paclitaxel.....	18
1.8.2.2.2. Docetaxel.....	18
1.9. Familia Lecythidaceae	19
1.10. Género Grias.....	20
1.10.1. Grias peruviana.....	20
1.10.2. Grias neuberthii.....	21
1.11. Métodos para el estudio de la actividad citotóxica.....	21

1.11.1. Marcaje con Azul de tripán:	21
1.11.2. Ensayo clonogénico:	22
1.11.3. Ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH):	22
1.11.4. Ensayo de citotoxicidad por MTS:	22
CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO	24
2.1. Objetivo General	25
2.2. Objetivos Específicos	25
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	26
3.1. Obtención de los extractos:	27
3.2. Cultivo celular:	28
3.3. Viabilidad mediante el ensayo MTS:	28
3.4. Concentración Inhibitoria del 50% de células (CI ₅₀):	28
3.5. Análisis morfológico:	29
3.6. Análisis Estadístico	29
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	30
4.1. Evaluación de la actividad de los extractos <i>Grias peruviana</i> y <i>Grias neuberthii</i> sobre las líneas celulares tumorales humanas.	31
4.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀).	37
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

LISTA DE FOTOS

Foto 1: Células RKO y células SW613-B3, ambas en cultivo.....	9
Foto 2: Células MCF-7 en cultivo.....	11
Foto 3: Células D-384 y células U-251, ambas en cultivo.....	13
Foto 4: Células A-549 en cultivo.....	14
Foto 5: Células PC-3 en cultivo.....	15
Foto 6: Árbol de A) <i>G. peruviana</i> y B) <i>G. neuberthii</i>	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de MTS tetrazolio y su producto formazán.....	22
Figura 2: Viabilidad de la línea celular RKO.....	31
Figura 3: Viabilidad de la línea celular SW613-B3.....	32
Figura 4: Viabilidad de la línea celular MCF-7.....	33
Figura 5: Viabilidad de la línea celular D-384.....	33
Figura 6: Viabilidad de la línea celular U-251.....	34
Figura 7: Viabilidad de la línea celular A-549.....	35
Figura 8: Viabilidad de la línea celular PC-3.....	35
Figura 9: Viabilidad de cada una de las líneas celulares expuestas durante 48 horas a 50 µg/mL del extracto GNTM.....	36
Figura 10: Viabilidad de la línea celular RKO expuesta a concentraciones crecientes de: A) extracto GPU2H, B) extracto GNTM.....	38
Figura 11: Viabilidad de la línea celular SW613-B3 expuesta a concentraciones crecientes del extracto GNTM.....	39
Figura 12: Viabilidad de la línea celular MCF-7 expuesta a concentraciones crecientes del extracto GNTM.....	39
Figura 13: Viabilidad de la línea celular D-384 expuesta a concentraciones crecientes de: A) extracto GPHJM, B) extracto GNTM, C) extracto GNHM.....	40
Figura 14: Viabilidad de la línea celular U-251 expuesta a concentraciones crecientes de: A) extracto GPHVM, B) extracto GPHJM, C) extracto GNTM.....	41
Figura 15: Viabilidad de la línea celular A-549 expuesta a concentraciones crecientes del extracto GNTM.....	41
Figura 16: Viabilidad de la línea celular PC-3 expuesta a concentraciones crecientes de: A) extracto GNTM, B) extracto GNHM.....	42
Figura 17: Líneas celulares tumorales humanas expuestas a la respectiva CI_{50} del extracto GNTM y control negativo	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Extractos de <i>Grias peruviana</i> y <i>Grias neuberthii</i>	27
Tabla 2. Viabilidad de las líneas celulares tumorales humanas expuestas a los 20 extractos de <i>Grias peruviana</i> y <i>Grias neuberthii</i>	37
Tabla 3. Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) de los extractos que poseen actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales humanas.....	42
Tabla 4. Metabolitos secundarios detectados en los extractos con actividad citotóxica de <i>Grias peruviana</i> y <i>Grias neuberthii</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS

RKO: Cáncer colorrectal.

SW613-B3: Cáncer colorrectal con p53 mutado.

MCF-7: Adenocarcinoma mamario.

D-384: Astrocitoma cerebral.

U-251: Astrocitoma cerebral grado IV.

A-549: Cáncer pulmonar.

PC-3: Cáncer pancreático grado IV con p53 mutado.

RESUMEN

Al ser el cáncer una de las principales causas de muerte en el mundo, es necesario conocer el efecto antiproliferativo que pueden presentar algunos productos etnofarmacológicos, los cuales pueden eliminar o detener las células cancerígenas y así evitar su diseminación. Muchos de los antineoplásicos empleados en la quimioterapia son de origen vegetal; es por ello la importancia de la conservación, protección y el estudio de los recursos vegetales con usos farmacológicos. En el presente trabajo se estudió las especies *Grias peruviana* y *Grias neuberthii*, las cuales pertenecen a la familia Lecythidaceae, debido a su utilización en la medicina tradicional, se propuso evaluar la capacidad antiproliferativa que presentan diferentes extractos obtenidos a partir de estas dos especies. En el siguiente trabajo se utilizó siete líneas celulares tumorales humanas, a las cuales se las expuso a diferentes dosis de 20 extractos de *G. peruviana* y *G. neuberthii*, a través del ensayo de citotoxicidad MTS, determinando así que varios extractos poseen un interesante nivel antiproliferativo, especialmente el extracto metanólico de tallo de *Grias neuberthii*, el cual mostró un potente efecto citotóxico en todas las líneas celulares utilizadas, de los cuales conciernen la línea celular SW613-B3, correspondiente a cáncer colorrectal y la línea celular PC-3, correspondiente a carcinoma protático de grado IV, ya que ambas presentan mutaciones a nivel del gen de p53.

ABSTRACT

To be the cancer one of the principals causes of death in the world. Is necessary to know the antiproliferative effect that some ethnopharmacological products can present. Those of them can remove or stop the carcinogenic cells, so it could avoid its dissemination. Much of antineoplastic used in the chemotherapy are of vegetable origin; therefore the importance of conservation, protection and the study of vegetables resources with pharmacological uses. In the present work was studied *Grias Peruvian* and *Grias neuberthii*, both of them belong to Lecythidaceae family, due to their use in traditional medicine, it purpose to evaluate the antiproliferative capacity that presents different extracts obtained from both species. In the next investigation was used seven human tumor cell lines, which was exposed to different doses of 20 extracts of *G. Peruvian* and *G. neuberthii*, through of the essay of cytotoxicity MTS, also determinate that some extracts have an interest antiproliferative level, specially the methanolic extract of the stem of *Grias neuberthii*, which indicate a powerful cytotoxic effect in all the cellular lines utilized, which of them concern the SW613-B3 cellular line, corresponding to colorectal cancer and the cellular line PC-3, corresponding to prostatic carcinoma grade IV, so both have mutations at the level of the gen p53.

INTRODUCCIÓN

La palabra cáncer, la cual hace referencia a los tumores malignos o neoplasias malignas, se caracteriza por el crecimiento incontrolado de células anormales en un órgano o tejido específico, que se expanden más allá del límite normal desde su punto de origen (Jaramillo, 2017; OMS, 2017), es considerado como una de las principales causas de muerte en todo el mundo, la cual en el 2012 fue responsable de aproximadamente 14 millones de muertes y se estima que aumentará dentro de las siguientes dos décadas (OMS, 2017). Cuando se desarrolla esta enfermedad las células cancerosas adquieren 10 diferentes características para su supervivencia, proliferación y evasión de la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2011). Los cánceres más predominantes varían de acuerdo a la zona o país, por ejemplo, en el Ecuador, los 5 tipos más comunes de cáncer entre ambos sexos son: próstata, estómago, mama, cérvicouterino y colorrectal, los cuales causaron alrededor de 10000 defunciones en el 2012 según lo reporta la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (Globocan, 2012).

El cáncer tiene causas multifactoriales, pudiendo ser ambientales, genéticas o biológicas (Pérez, et al. 2016). Conjuntamente se conoce que para cada tipo de cáncer existen diferentes factores de riesgo tales como: el género, grupo étnico, la edad, mutaciones heredadas, alimentación y estilo de vida (Hanahan y Weinberg, 2011; ACS, 2017); de tal manera que, cuando una persona desarrolla cáncer se deben considerar todos estos factores para someterse a los tratamientos que sirvan para combatir los distintos síntomas que éste produce. Uno de estos métodos es la quimioterapia, la cual utiliza fármacos o antineoplásicos que destruyen o hacen más lento el crecimiento de las células cancerosas (NIH, 2015), considerándose que aproximadamente el 50 % de los antineoplásicos empleados en la quimioterapia son de origen vegetal (Kingham, et al. 2016). Por lo tanto, las investigaciones con respecto a la búsqueda de fármacos contra el cáncer se inclinan por aquellos que se obtienen a partir de productos naturales de origen vegetal (NIH, 2015).

Tal es el caso de la familia Lecythidaceae, la cual posee 20 géneros con alrededor de 300 especies, siendo el objeto de nuestro estudio el género *Grias*. La familia presenta un papel importante como fuente de alimento (Prance y Mori, 1979; León, 1987), entre las que podemos destacar a las especies *Grias peruviana* y *Grias neuberthii*, las cuales se emplean como antiparasitarios, poseen propiedades diuréticas (Orellana, 2014), combaten la sinusitis, son antihemorrágicos (Alva, et al. 2002), poseen propiedades antibacterianas y desinfectantes (Moya, 2012), y son utilizados como antitumorales (Tropicos, 2017).

Es por ello que, para el presente trabajo de fin de titulación, nos enfocamos en la propiedad antiproliferativa que presentan los extractos de las especies *G. peruviana* y *G. neuberthii*; ya que, aunque el género *Grias* ha sido empleado por décadas como recurso

etnofarmacológico (Huamán, 2015), poco se sabe sobre la capacidad que presentan para inhibir el crecimiento de células tumorales humanas.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Cáncer

Se utiliza el término cáncer para referirse a un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo; además, son conocidos con otros nombres como tumores malignos o neoplasias malignas, los cuales se caracterizan por el crecimiento incontrolado de células anormales en un órgano o tejido específico formando una masa tumoral que se expanden más allá del límite normal del cuerpo, capaz de diseminarse llegando a invadir partes adyacentes y/o distantes formando tumores secundarios (OMS, 2017).

Al tiempo que se desarrolla la neoplasia, las células cancerosas adquieren diversas características para su supervivencia, proliferación y evasión de la muerte celular. De dicho modo, las células pueden: replicarse desmedida o ilimitadamente, invadir a tejidos sanos mediante metástasis, mantener la señalización proliferativa (oncogenes activos), reprogramar el metabolismo energético, evadir a los supresores de crecimiento (genes supresores del crecimiento inactivos), formar tumores debido a inflamaciones repetidas, generar inestabilidad del genoma para la acumulación de mutaciones, evadir el sistema inmunitario, estimular la angiogénesis y desarrollar resistencia a la muerte celular inducida por fármacos quimioterapéuticos (Hanahan y Weinberg. 2011). Se conoce que el proceso canceroso es el resultado de la combinación de las diversas características antes mencionadas, en las cuales intervienen interacciones recíprocas entre las células cancerosas, las células estromales y células pro y antiinflamatorias, de tal manera que, para poder identificar esta proliferación desregulada, un abordaje *in vitro* del cáncer otorga una visión completa del proceso canceroso y permite conocer qué genes se encuentran involucrados según el tipo de células estudiadas (Kocatürk y Versteeg, 2015).

Además, el desarrollo de un tumor primario, en la mayoría de los casos, no es la razón principal de muerte de la persona, sino la migración e invasión (metástasis) de las células cancerosas del tumor primario a otro sitio a través de la circulación sanguínea o el sistema linfático, de ahí la importancia de un pronto diagnóstico que advierta a las personas de la existencia y desarrollo de un tumor en su organismo (Kocatürk y Versteeg, 2015).

1.2. Causas del Cáncer

El cáncer tiene causas multifactoriales, por consiguiente se puede dar por diversos factores que pueden ser ambientales, genéticos o biológicos, los cuales pueden desencadenar un proceso carcinógeno de forma individual o combinado, siendo además muchos de ellos factores evitables (Pérez, et al. 2016). Dentro de estos factores se encuentran los biológicos como el género, la raza, grupo étnico y la edad, pero también se encuentran factores genéticos que no pueden evitarse como son las mutaciones heredadas de los padres, por lo que es importante que se conozcan dichos errores genéticos mediante exámenes de detección precoz que ayuden a dar un tratamiento oportuno y eficaz a quienes los padecen

(Hanahan y Weinberg, 2011; ACS, 2017). Un ejemplo bien conocido de genes mutados que predisponen al cáncer es p53 o *TP53*, el cual se localiza en el locus 17p13.2; está conformado por 11 exones de los cuales del exón 5 al 8 conforman al dominio de unión al ADN, siendo el más propenso a sufrir mutaciones (López, et al. 2001; Rivlin, et al. 2015). Se sabe que *TP53* pertenece al grupo de genes implicados en el control del ciclo celular (López, et al. 2001; Vousden y Prives, 2009) ejerciendo funciones como la de supresor de tumores induciendo principalmente a la detención de la división celular, activación de la apoptosis, estimulación de la reparación del ADN y la inhibición de la angiogénesis (Vousden y Prives, 2009; Rivlin, et al. 2015). No obstante, estos procesos podrían modular otros diferentes que resultan en enfermedades u otras derivaciones desfavorables como la isquemia, la neurodegeneración y el envejecimiento (López, et al. 2001; Vousden y Prives, 2009; Rivlin, et al. 2015). Aproximadamente el 60 % de los distintos tipos de cáncer se originan por alguna mutación en el gen de p53. Dicha mutación puede darse por una delección de uno o ambos alelos de p53 o por mutaciones puntuales que generan cambios en la secuencia del gen, provocando modificaciones de los aminoácidos que conforman a la proteína (López, et al. 2001; Muller y Vousden, 2013). Adicionalmente, al ser p53 una de las proteínas supresoras tumorales más intensamente estudiadas, existe evidencia que sugiere que la restauración o reactivación de su función tendrá un beneficio terapéutico significativo en el tratamiento del cáncer (Muller y Vousden, 2014). Sin embargo, existen otros factores relacionados con la inactivación del gen de p53; tal es el caso de infecciones por el virus del papiloma humano (VPH), el cual genera proteínas oncogénicas que además de inhibir la función de p53, interviene en la función de otro supresor de tumor conocido como retinoblastoma (Rb) (Jave-Suárez, 2015).

Los factores ambientales afectan las tasas de mutagénesis, causando daños en el ADN, que a través de la acumulación de alteraciones genéticas durante la división celular aumenta el riesgo de desarrollar cáncer, mediante agentes carcinógenos físicos, como la radiación ultravioleta (UV) o la radiación ionizante, y agentes carcinógenos químicos, como el arsénico, los componentes del humo de tabaco, el amianto, etc. (Hanahan y Weinberg, 2011; Pérez, et al. 2016; Wu, et al. 2016; OMS, 2017).

Particularmente, en los cánceres de mama y próstata, al tratarse de ambientes o espacios geográficos diferentes, se han observado variaciones en las tasas de incidencia, como en Europa Occidental que posee 5 veces más incidencia de cáncer de mama que en Asia oriental o África media y Australia que tiene casi 25 veces mayor incidencia de cáncer de próstata que el sur de Asia central (Wu, et al. 2016). Una evidencia más clara se observa cuando los inmigrantes que se trasladan de países con menor incidencia de cáncer a países con mayores tasas de cáncer pronto adquieren un mayor riesgo del tipo de cáncer del país en el que se encuentran (Wu, et al. 2016). El cáncer colorrectal se considera que es

causado en gran medida por el ambiente, con un 75 % o más del riesgo de cáncer colorrectal atribuible a la dieta, el melanoma es atribuido a la exposición al sol en alrededor del 65 – 86 % (Hanahan y Weinberg, 2011; Pérez, et al. 2016; Wu, et al. 2016), y para el cáncer de piel no basal y escamoso no melanómico el 90 % es atribuible a la radiación UV. Al menos el 75 % del cáncer de esófago, o cáncer de cabeza y cuello, es causado por el tabaco y el alcohol (Pérez, et al. 2016; Wu, et al. 2016). También es bien sabido que ciertos patógenos pueden aumentar notablemente el riesgo de cáncer, por ejemplo, el nombrado anteriormente VPH puede causar el 90 % de los casos de cáncer cervical y 70 % de los casos de cáncer orofaríngeo; la hepatitis B y C pueden representar aproximadamente el 80 % de los casos de carcinoma hepatocelular (Pérez, et al. 2016; Wu, et al. 2016); y *Helicobacter pylori* puede ser responsable de 65 – 80 % de los casos de cáncer gástrico, además ha aumentado el riesgo de cáncer de pulmón más de 15 veces en los últimos 80 años, atribuible a ambientes cambiantes por el tabaco y los contaminantes del aire (Hanahan y Weinberg, 2011; Pérez, et al. 2016; Wu, et al. 2016). Todo lo mencionado indica que los factores ambientales juegan un papel importante en la incidencia del cáncer y son modificables a través de cambios en el estilo de vida y/o vacunas (Pérez, et al. 2016; Wu, et al. 2016).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, en el 2012 se reportaron cerca de 14 millones de muertes a nivel mundial y se estima que aumentarán a 22 millones en las próximas dos décadas (OMS, 2017). En el Ecuador se presentaron más de 23 mil nuevos casos de cáncer en el 2012, de los cuales cerca del 60 % terminaron en defunciones. Según la agencia Globocan, los 5 tipos de cáncer más prevalentes en el país en el 2012, entre ambos sexos en orden descendente fueron: cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer cervicouterino y cáncer colorrectal y los 5 tipos de cánceres más mortales, de igual manera en orden descendente, fueron: cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de hígado y cáncer cervicouterino (Globocan, 2012). En la ciudad de Loja, en el periodo comprendido entre enero y agosto de 2013, se atendieron 593 nuevos casos de pacientes oncológicos, los cuales fueron diagnosticados principalmente con cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer cervicouterino, cáncer de estómago y cáncer de piel (SOLCA, 2013).

En base a lo expuesto anteriormente, se ha propuesto utilizar para el presente estudio los siguientes tipos de cáncer:

1.3. Cáncer de Colon

El cáncer colorrectal es el tercer tipo más común en el mundo, al cual se le atribuyeron alrededor de 8,2 millones de muertes en el 2012, con una incidencia de 9,7 %, siendo la cuarta causa principal de muerte por cáncer en hombres y mujeres con un porcentaje de 8,5

(Globocan, 2012; OMS, 2017). En Europa es una de las principales causas de defunciones. Además, el 70 % de todas las muertes a causa de éste tipo de cáncer registradas en 2012 se produjeron en África, Asia, América Central y Sudamérica (Siegel, 2014). En el Ecuador, los datos reportados por Globocan (2012) presentan una incidencia y mortalidad relativamente alta ocupando el quinto lugar con 6,4 % y 6,8 % respectivamente.

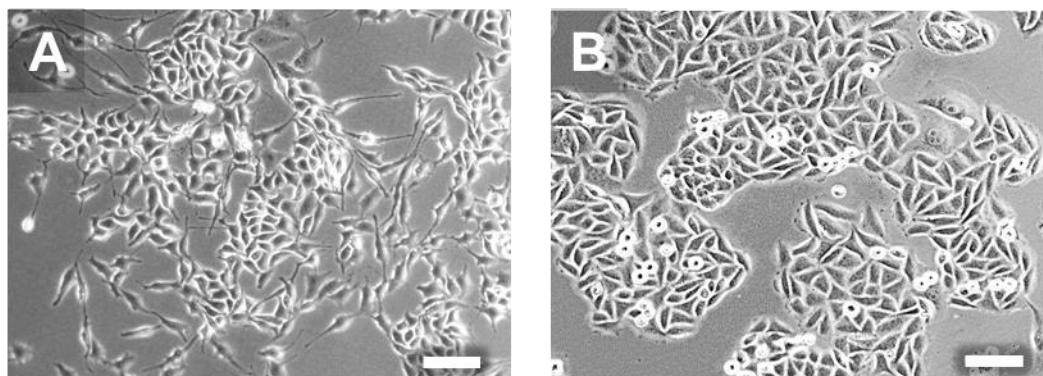


Foto 1: A) Células RKO y B) Células SW613-B3, ambas en cultivo, observadas en microscopio Axioskop 2 plus (ZEISS) en aumento 40x. Barra de escala 50 µm.

Fuente y elaboración: Autor.

El cáncer colorrectal se forma a partir de un crecimiento anormal de tejido, que comúnmente es un pólipo no canceroso en el revestimiento interno del colon o del recto, el pólipo es un tumor benigno, no canceroso. Dependiendo de qué pólipo se trate, por ejemplo: pólipos adenomatosos (adenomas), lesiones dentadas, pólipos inflamatorios, etc. (Gundín, et al. 2017), será la probabilidad de transformarse en cáncer (Torres, 2016). Como modelo biológico para nuestro estudio se utilizó dos tipos de líneas celulares provenientes de carcinomas colorectales. La primera es la línea celular RKO (**Foto 1A**), la cual expresa el receptor uroquinasa (u-PAR), contiene p53 normal, carece de receptor nuclear endógeno del receptor tiroideo humano (h-TRbeta1), presenta una morfología epitelial y crece en monocapa (ATCC, 2016). La segunda línea celular es SW613-B3 (**Foto 1B**), tiene forma epitelial, posee p53 no funcional debido a la mutación por transición de CGT a CAT en el codón 273 del gen de p53, bloqueando la transcripción de dicho gen (Guamán-Ortiz, et al. 2014). Éstas células son menos tumorigénicas, ya que poseen una baja amplificación y expresión del gen *c-Myc* (Donzelli, 1999).

Para conocer los múltiples factores que influyen en el riesgo de presentar cáncer de colon se han realizado numerosos estudios, de los cuales se han destacado como modificables: la dieta rica en grasas, el consumo de carnes rojas, blancas y de pescado, dieta pobre en vegetales, fibras y vitaminas A, C y E, inactividad física, consumo de alcohol y obesidad (Pérez, et al. 2016; Cuevas, et al. 2016). También se conocen factores como: la historia

familiar de cáncer de colon, pólipos adenomatosos, antecedentes de enfermedades inflamatorias intestinales y edad superior a los 40 años (Pérez, et al. 2016).

1.4. Cáncer de Mama

El cáncer de mama posee una mayor incidencia a nivel mundial en comparación a otros cánceres, ocupando el segundo lugar a nivel mundial con 11,9 %, en cambio en índices de mortalidad ocupa el quinto lugar con un porcentaje de 6,4 afectando principalmente a mujeres. Mientras que en el Ecuador el nivel de incidencia de este cáncer lo establece en el tercer lugar con 9,8 % y con una mortalidad de 5,4 % ocupando el séptimo lugar (Globocan. 2012).

El cáncer de mama es definido como la proliferación desmesurada de células en el tejido mamario (Martínez, et al. 2007). La mama se encuentra formada por un sistema de conductos que permiten la unión de las glándulas mamarias con el exterior y por tejido fibroadiposo (Eurocytology, 2014). El cáncer en éste tejido se origina a partir de células que constituyen el revestimiento interno de las glándulas de la secreción externa (NIH, 2015), comprometiendo la membrana basal del epitelio de la mama (Ramírez, 2014). La línea celular utilizada en nuestro estudio es MCF-7 (**Foto 2**), que procede de epitelio mamario diferenciado, expresa el receptor de estrógeno y el oncogén *WNT7B*, es deficiente de caspasa 3 (Yang, et al. 2001; ATCC, 2016). La línea MCF-7 conserva varias características, incluyendo la capacidad de procesar estradiol a través de receptores de estrógeno citoplasmáticos y la capacidad de formar cúpulas (ATCC, 2016).

La probabilidad de padecer un cáncer de mama aumenta con la edad, pero tiende a ser más agresivo cuando ocurre en mujeres jóvenes, relacionándose con un diagnóstico tardío; puede darse por mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, los cuales constituyen un 25 % de los cánceres de mama hereditarios y cerca de 5 a 10 % de todos los tumores de mama; además puede ser heredado si algún pariente de primer grado como madres, hermanas, hermanos e hijos, se les ha sido diagnosticado cáncer de mama o de ovarios, en especial si ha sido detectado antes de los 50 años (Pérez, et al. 2016). La edad de la menarquia es un factor de riesgo, esto se debe al aumento de exposición de estrógenos a lo largo de la vida de una mujer y de la biodisponibilidad de hormonas en el tejido glandular mamario (Tamimi, et al. 2012; Pérez, et al. 2016). Adicionalmente, fármacos como el etinilestradiol aumentan la cantidad del estrógeno de cuatro a dieciocho veces (Navarro-Ibarra, et al. 2015), dos postulados se han dado a conocer para entender el por qué los estrógenos aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama, el primero es a través de la estimulación de la transcripción mediada por receptor de estrógeno que da como resultado la proliferación celular y el segundo es la carcinogénesis directa mediante la activación metabólica y la

unión directa del ADN, estos dos mecanismos pueden actuar de manera aditiva o incluso sinérgica para inducir la carcinogénesis mamaria (Casey, et al. 2008).

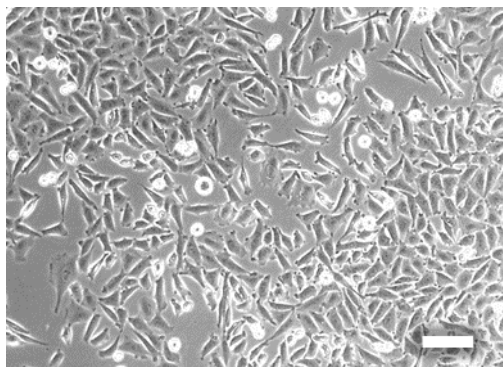


Foto 2: Células MCF-7 en cultivo, observadas en microscopio Axioskop 2 plus (ZEISS) en aumento 40x. Barra de escala 50 μ m.

Fuente y elaboración: Autor.

No obstante, el sobrepeso, bebidas alcohólicas, lo que incluye cerveza, vino y licor, aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama, así como también el riesgo de que el cáncer reaparezca después de haber recibido algún tipo de tratamiento (Rodríguez, et al. 2013). La exposición a radiación ionizante a edades tempranas, por ejemplo, radiación terapéutica en el tórax por linfoma de Hodgkin, puede aumentar el riesgo en la mujer de contraer cáncer de mama. Por otro lado, la cantidad mínima de radiación que recibe una mujer durante la mamografía anual no se ha relacionado con un aumento del riesgo de desarrollarlo (Tamini, et al. 2012).

1.5. Astrocitoma Cerebral o Cáncer Cerebral

El cáncer cerebral, o del sistema nervioso, tiene una incidencia relativamente menor en el mundo con un porcentaje de 1,9 en comparación con otros cánceres, así mismo posee una baja mortalidad de 2,3 % (Globocan, 2012). En el Ecuador se presenta una incidencia de 2,7 %, la cual es relativamente baja con respecto a otros tipos de cánceres, ocupando el onceavo lugar y presenta una mortalidad de 3,4 %, lo cual lo ubica en el décimo lugar (Globocan, 2012). Se conoce al cáncer cerebral como la proliferación de células anormales en los tejidos que se encuentran recubriendo al cerebro, este crecimiento se produce en el tejido conjuntivo cerebral conocido como glía, existiendo 3 tipos de células gliales: los astrocitos, a través de su estrecha asociación con las sinapsis, pueden controlar y alterar la función sináptica, dan lugar a astrocitomas; los oligodendrocitos, cuya función es la sintetización de mielina y la protección de los axones neuronales encerrándolos con múltiples capas de su membrana plasmática, la cual es muy rica en mielina, dicha función permite maximizar y mantener la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos para

que el sistema nervioso central (SNC) trabaje apropiadamente, generan oligodendrogliomas; y las células endoteliales, que conforman el recubrimiento de las cavidades de fluido del cerebro y originan ependimomas (Cueva, 2014; Chung, et al. 2015). En nuestro estudio se decidió utilizar dos líneas celulares de este tipo: D-384 (**Foto 3A**) y U-251 (**Foto 3B**), ambas proceden de células gliales, concretamente de astrocitoma del SNC y poseen una morfología fibroblástica que crecen en monocapa (COSMIC, 2017; Kerafast, 2017).

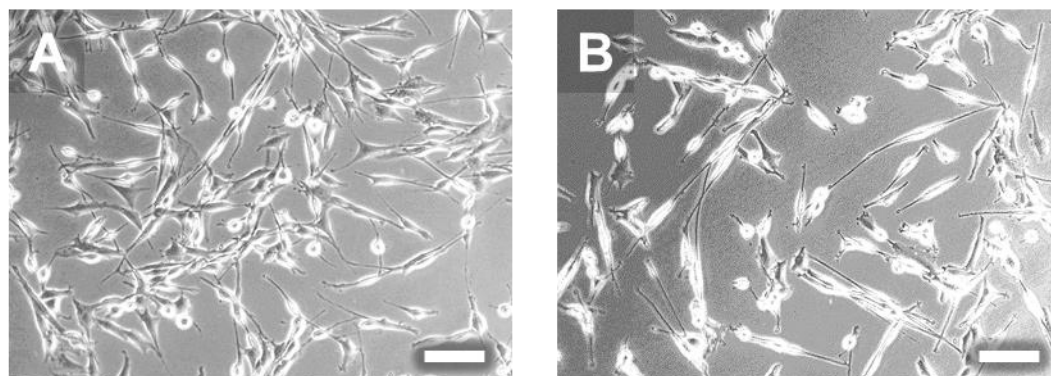


Foto 3: A) Células D-384 y B) Células U-251, ambas en cultivo, observadas en microscopio Axioskop 2 plus (ZEISS) en aumento 40x. Barra de escala 50 μ m.

Fuente y elaboración: Autor.

Para el desarrollo de los tumores cerebrales deben existir factores de predisposición, entre los cuales destacan los síndromes o enfermedades hereditarias multifactoriales; sin embargo, solo el 4 % de tumores se relacionan con ellos. Entre los síndromes hereditarios con mayor predisposición tumoral en el SNC se encuentran: neurofibromatosis I y II, esclerosis tuberosa, enfermedad de von Hippel-Lindau, síndrome de poliposis familiar y síndrome carcinomatoso de células basales nevoides (González, et al. 2008; Mendelsohn, et al. 2014). Otro factor de riesgo considerable es el sexo, que según datos estadísticos se presenta mayormente en hombres que en mujeres; además, existe evidencia ambigua sobre la influencia de la edad del padre durante la concepción, el uso domiciliario de pesticidas y el fumar pasivamente durante el embarazo (González, et al. 2008). Por otro lado, existe evidencia concluyente acerca de la exposición del padre en la fabricación de pintura, de igual forma ha sido demostrado que las radiaciones ionizantes como la irradiación craneal, incluso a pequeñas dosis, aumenta la incidencia de tumores primarios en el SNC, con un periodo de latencia que oscila entre 10 a más de 20 años después de exposición, de esta manera se presentarán en edades adultas (González, et al. 2008; Mendelsohn, et al. 2014).

1.6. Cáncer de Pulmón

La incidencia del cáncer de pulmón a nivel mundial se encuentra ocupando el primer lugar con un 13 %. A la par, este cáncer se muestra como el principal causante de defunciones con una mortalidad de 19,4 %. En relación a esto, la incidencia en el Ecuador se encuentra en 4,4 %, ubicándolo en el séptimo lugar; en cambio, con 7,6 %, ocupa el tercer lugar como uno de los cánceres que produce más muertes en el país (Globocan, 2012). El desarrollo del cáncer pulmonar se da por la proliferación de células anormales en la mucosa interna que recubre tanto a los pulmones como a los bronquios que, considerando su origen y comportamiento, dará lugar a dos tipos de cánceres:

1.6.1. *Cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP):* Casi todos los casos son atribuibles al tabaquismo, poseyendo en su mayoría un tiempo de duplicación más rápida, una fracción de crecimiento más alta y un desarrollo más temprano de metástasis, además es altamente sensible a la quimioterapia inicial y radioterapia; sin embargo, la mayoría de los pacientes mueren ya que el CPCP es muy agresivo y representa el 25 % de todos los cánceres pulmonares (Kalemkerian, et al. 2013).

1.6.2. *Cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP):* constituye el 75 % de los cánceres pulmonares, con una tasa de supervivencia de 5 años de sólo el 15 % (Velasco y Zarco, 2009; Skrypnik, et al. 2013), En etapa temprana es potencialmente curable por cirugía, pero su supervivencia a largo plazo está limitada por recidivas locales o distales. La mejor terapia para CPCNP inoperable y/o en etapa tardía es la radioterapia con o sin quimioterapia (Skrypnik, et al. 2013). Éste tipo de cáncer se divide a su vez en tres subtipos que afectan a los pulmones:

1.6.2.1. *Cáncer de células escamosas (epidermoide):* Se caracteriza por un lento crecimiento y metástasis tardía. En la mayoría de los casos se localiza en el árbol bronquial, manifestándose como atelectasias obstructivas o neumonías y hemoptisis; en cambio, al localizarse periféricamente, antes de desarrollar síntomas, puede desarrollarse hasta tener un tamaño importante. Está asociado a un pronóstico de mayor supervivencia y figura con un 30 % de todos los casos de cáncer (Velasco y Zarco, 2009).

1.6.2.2. *Adenocarcinoma:* Casi siempre se manifiesta como un nódulo periférico, el cual puede generar una invasión ganglionar (hiliar y mediastinal) o metástasis (cerebro y glándulas suprarrenales), los cuales son frecuentemente encontrados poco tiempo después del diagnóstico que suele ser por medio de radiografías o tomografías de tórax. Es el tipo más común en personas no fumadoras, manteniéndose en primer lugar con una frecuencia

epidemiológica de 50 %. Este cáncer surge de células mucoproduktoras (Velasco y Zarco, 2009).

- 1.6.2.3.** *Carcinomas indiferenciados:* Se asocia al tabaquismo y muestra un pronóstico menor de supervivencia, representa alrededor del 5 % de los casos, entre ellos el carcinoma de células grandes, el cual puede surgir en cualquier parte del pulmón (Velasco y Zarco, 2009).

Como modelo biológico para el presente estudio se utilizó la línea celular A-549 (**Foto 4**), la cual procede de tejido carcinomatoso pulmonar humano, posee una morfología epitelial, con propiedad de cultivo adherente, estas células son positivas para la queratina mediante tinción con inmunoperoxidasa y según los estudios de Lieber, et al. (1979) las células A-549 podrían sintetizar lecitina con un alto porcentaje de ácidos grasos desaturados utilizando la vía de difenocolina de citidina (ATCC, 2016).

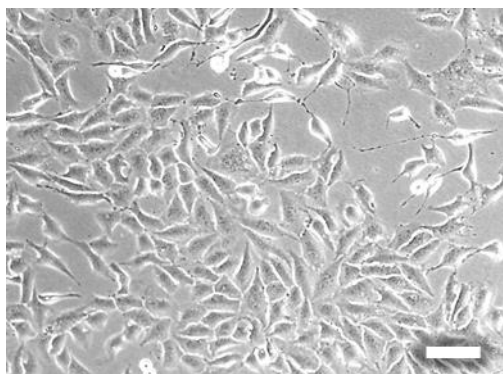


Foto 4: Células A-549 en cultivo, observadas en microscopio Axioskop 2 plus (ZEISS) en aumento 40x. Barra de escala 50 μm .

Fuente y elaboración: Autor.

Entre los factores de riesgo para desarrollar cáncer pulmonar se encuentran la exposición al asbesto y radiación, exposición al humo de la leña y al humo de cigarrillo principalmente (Pérez, et al. 2016). Entre todos los casos de cáncer pulmonar se conoce que nueve de cada diez casos son causados por fumar cigarrillos; además, debido a la composición y la forma en que se fabrican, tienen un mayor riesgo de padecerlo hoy en día que en años anteriores. Genéticamente, si existen familiares en primer grado que padezcan cáncer pulmonar, el riesgo aumenta para padecer esta enfermedad a una edad temprana. Existen mutaciones y polimorfismos genéticos como los encontrados en el homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata de Kirsten (*KRAS*) o en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), que son marcadores de mal pronóstico (Horn, et al. 2014; Pérez, et al. 2016).

1.7. Cáncer de Próstata

A nivel mundial el cáncer de próstata es el cuarto cáncer más incidente en varones con un porcentaje de 7,8 y con una baja mortalidad a diferencia de otros cánceres con 3,7 %, ocupando el octavo lugar, aunque en el Ecuador el cáncer de próstata ocupa el primer lugar en incidencia en varones con el 15,6 % y es el segundo más mortal en el país con un porcentaje de 9,8 (Globocan. 2012). La próstata se encuentra ubicada frente al recto y por debajo de la vejiga, cuyo tamaño puede cambiar con la edad, detrás de la próstata se encuentran las glándulas conocidas como vesículas seminales, las cuales producen la mayor parte del líquido del semen, y la uretra que pasa por el centro de la próstata (ACS, 2017; CTCA, 2017).

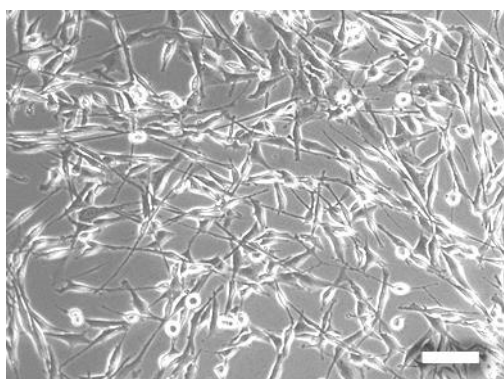


Foto 5: Células PC-3 en cultivo, observadas en microscopio Axioskop 2 plus (ZEISS) en aumento 40x. Barra de escala 50 μ m.

Fuente y elaboración: Autor.

Se define al cáncer prostático como el aumento descontrolado de células anormales que se originan en la glándula prostática (AMA, 2004), siendo casi todos los cánceres de éste tipo adenocarcinomas, se forman en el revestimiento interno de las glándulas secretoras de moco (CTCA, 2017). La línea celular utilizada para éste estudio es PC-3 (**Foto 5**), la cual procede de un adenocarcinoma prostático humano de grado IV, las células presentan una morfología epitelial, con propiedad de cultivo adherente, expresan los antígenos HLA (human leukocyte antigens) A1 y A9, los cuales se relacionan con procesos inflamatorios; además, las células exhiben baja actividad de fosfatasa ácida y de testosterona-5- α reductasa (ATCC. 2016) y también presentan mutaciones en el gen de p53 por una delección en el codón 138 que genera un punto de terminación de la traducción (Carrol, et al.1993).

El cáncer de próstata tiene diversos factores de riesgo, uno de ellos es la edad, ya que se ha observado que la probabilidad de padecer éste cáncer aumenta después de los 50 años (Pérez, et al. 2016). Otro factor es la raza, debido a que los hombres de raza negra tienen más del doble de probabilidades de fallecer debido al cáncer de la próstata que los hombres

de raza blanca, suceso que ocurre con menos frecuencia en los hombres asiático-americanos (CTCA, 2017). Por otro lado, ciertos cambios genéticos heredados incrementan el riesgo de padecer cáncer de próstata, aunque es un grupo más pequeño, tal es el caso de mutaciones del gen *BRCA2*, que también lo aumenta 20 veces más que la población en general (CTCA, 2017; Pérez, et al. 2016). De similar manera, los hombres con el síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis o HNPCC), una afección causada por cambios genéticos hereditarios, tienen un mayor riesgo de padecer varios tipos de cáncer, incluyendo principalmente el cáncer de próstata (CTCA, 2017).

Son varios los tipos de cánceres existentes que pueden afectar a cualquier parte del organismo; cada tipo de cáncer difiere de otro debido al tejido del cual se origina, por ende, para poder contrarrestar el crecimiento de células tumorales se deben considerar aspectos específicos de cada tipo celular; de ello dependerán las principales formas de eliminar y/o evitar el desarrollo del tumor con las diferentes terapias existentes.

1.8. Tratamientos antiproliferativos de células tumorales

Dentro de los métodos que se usan para evitar la proliferación descontrolada de células tumorales, eliminar las ya existentes y evitar su diseminación se encuentran los procesos quirúrgicos, la radioterapia y principalmente la quimioterapia, siendo esta última la más utilizada, aunque las tres se pueden combinar de acuerdo a al tipo y a la gravedad con la que se presenta el cáncer (Kun, et al. 2013).

1.8.1. Quimioterapia

La quimioterapia es uno de los métodos que se utiliza para contrarrestar el cáncer, en el cual se administra fármacos antineoplásicos que destruyen (citotóxico) o hacen más lento el crecimiento (citostático) de las células cancerosas (NIH, 2015); de tal manera que, dependiendo del tipo de cáncer y la correcta administración farmacológica, la quimioterapia puede curar el cáncer, disminuir la velocidad de su expansión o para detenerlo y reducir las posibilidades de que recidiva. Es por ello que se administran diversos quimioterapéuticos en secuencia con el fin de vencer la resistencia de las células tumorales a los fármacos aislados (un solo fármaco), dicha resistencia se ha observado en un 50 % de los tumores recién diagnosticados debido a diferentes factores, tal es el caso de mutaciones a nivel del gen *MDR1* (gen de resistencia a multidroga) el cual codifica una proteína del mismo nombre encargada de la eliminación de múltiples fármacos hacia fuera de la célula, incluyendo los antineoplásicos; la sobreexpresión de ésta proteína se ha observado en muchos tipos de cáncer de mama y de próstata (Fernández-Plaza, et al. 2004; Housman, et al. 2014); sin embargo, es imposible prever si un tumor en concreto podrá responder a un citostático o citotóxico específico; por lo cual la agrupación de varios fármacos amplifica las

probabilidades de respuesta antitumoral y retrasa la resistencia a los mismos (Fernández-Plaza, et al. 2004). Los fármacos seleccionados tienen que presentar actividad particular frente a determinado tumor con las siguientes características: “escasa superposición de efectos tóxicos y actividad sinérgica o aditiva, es decir, que no presenten resistencias cruzadas” (NIH, 2015; Fernández-Plaza, et al. 2004).

1.8.2. Antineoplásicos de origen vegetal

En la actualidad se han reportado que varios de los fármacos antineoplásicos que se administran en la quimioterapia son de origen vegetal, siendo desarrollados aproximadamente el 50 % con este principio. Los antineoplásicos de origen vegetal lo representan dos familias principalmente: los alcaloides de la vinca y los taxanos (Benedí y del Río, 2006).

1.8.2.1. Alcaloides de la vinca

Los alcaloides antitumorales de la vinca son la vinblastina y la vincristina, los cuales se extraen de la planta *Catharanthus rose*, más conocida como “vinca”. Estos alcaloides ejecutan sus efectos citotóxicos obstruyendo los microtúbulos durante la metafase, dichos microtúbulos constituyen los haces mitóticos, de tal manera que se interrumpe el ciclo celular. Los alcaloides se acoplan a las subunidades α y β de la tubulina en la fase S del ciclo celular; como consecuencia, la tubulina no consigue polimerizarse para lograr formar los microtúbulos que actúan en distintas funciones celulares, como la formación del huso mitótico, necesario para la división celular (Fernández-Plaza, et al. 2004; Benedí y del Río, 2006). A continuación se describen los antineoplásicos que pertenecen a este grupo.

1.8.2.1.1. Vincristina: Es un medicamento altamente tóxico, su mecanismo de acción se realiza interrumpiendo el ciclo celular uniéndose a las subunidades α y β de la tubulina en la fase S, la tubulina al no poder polimerizarse para formar los microtúbulos, desemboca agregándose para formar protofilamentos que experimentan una desintegración creciente (Benedí y del Río, 2006; Moudi, et al. 2013), en otro aspecto la vincristina está aprobada para tratar la leucemia aguda, cáncer de pulmón, rabdomiosarcoma, neuroblastoma, tumor de Wilm, enfermedad de Hodgkin y otros linfomas, pero en cambio posee efectos secundarios como: neuropatía periférica, supresión de la actividad de la médula ósea, estreñimiento, toxicidad del sistema nervioso, náuseas y vómitos (Benedí y del Río, 2006; Moudi, et al. 2013).

1.8.2.1.2. Vinblastina: Tiene una estructura y mecanismo de acción parecido a la vincristina, con una menor toxicidad y su espectro de acción incluye el

tratamiento para el carcinoma testicular, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de mama y tumores de células germinales. Entre sus efectos secundarios destaca la toxicidad para los glóbulos blancos y efectos débiles como náuseas, vómitos, estreñimiento, disnea, dolor torácico o tumoral, sibilancias y fiebre (Benedí y del Río, 2006; Moudi, et al. 2013).

- 1.8.2.1.3. Vinorelbina:** Es un producto semisintético de la vinblastina, que además disminuye la estabilidad de las membranas de la bicapa lipídica y posee una toxicidad similar (Benedí y del Río, 2006; Moudi, et al. 2013). Tiene una actividad antitumoral significativa llegando a afectar células tumorales óseas como el osteosarcoma, también es usado para tratar el cáncer de mama y ha sido aprobado para el tratamiento inicial de pacientes con cáncer de pulmón avanzado (Moudi, et al. 2013). Como efectos secundarios se encuentran la disminución a la resistencia de infecciones, moretones o sangrados, anemia, estreñimiento, diarrea, náuseas, fatiga y entumecimiento u hormigueo en manos y pies (Moudi, et al. 2013). Los efectos secundarios menos comunes incluyen pérdida del cabello y reacción alérgica (Benedí y del Río, 2006; Moudi, et al. 2013).

1.8.2.2. Taxanos

Son compuestos citostáticos con actividad antitumoral importante en el cáncer de mama, el mecanismo de acción es inverso al conocido de los alcaloides de la vinca, ya que consiste en fomentar la formación de microtúbulos uniéndose a la β -tubulina. La formación de estructuras microtubulares excesivamente estables impide su despolimerización para la formación del huso mitótico (Benedí y del Río, 2006). Dentro de este subgrupo podemos mencionar:

- 1.8.2.2.1. Paclitaxel:** Es obtenido a partir de la corteza del tejo americano (*Taxus brevifolia*), con un espectro de acción que incluye al cáncer de mama, ovario y pulmón (Benedí y del Río, 2006; de Weger, et al. 2014). Se administra sólo por vía intravenosa y con el uso de premedicación (fármacos utilizados antes de un procedimiento con el fin de provocar sedación) para impedir reacciones de hipersensibilidad, además se conoce que su metabolismo esta mediado por las enzimas CYP2C8 y CYP3A del citocromo P450 (de Weger, et al. 2014). Por otro lado los efectos secundarios que puede producir luego de la administración intravenosa pueden ser reacciones de hipersensibilidad, neurotoxicidad y alopecia (Benedí y del Río, 2006; de Weger, et al. 2014).

1.8.2.2.2. Docetaxel: Es un derivado semisintético del tejo europeo (*Taxus baccata*), con una elevada actividad en el cáncer de mama diseminado. A diferencia del paclitaxel, el docetaxel sólo es metabolizado por el CYP3A4 del citocromo P450 y puede administrarse en una infusión corta, con bajo peligro de reacciones de hipersensibilidad, pudiendo ser más mielotóxico (Benedí y del Río, 2006; de Weger, et al. 2014).

Es así que, los fármacos que más se emplean en la quimioterapia son aquellos que provienen de productos naturales de origen vegetal; de tal manera que, la necesidad de estudiar las distintas especies que se usan en la medicina tradicional es de gran interés, ya que se puede aprovechar aún mucho más las propiedades fitofarmacológicas que éstas representan, principalmente como agentes antitumorales.

1.9. Familia Lecythidaceae

En la actualidad se conoce que muchos de los fármacos utilizados en la medicina convencional tienen su origen en la medicina tradicional; de este modo, existen aún especies vegetales que requieren su estudio para poder ampliar su uso. Tal es el caso de la familia Lecythidaceae, en la cual las distintas especies se la conoce con diversos nombres como: membrillo, olleto, guasco, machimango etc. Es una familia de árboles que ocupan estratos superiores, ubicados primordialmente en zonas geográficas tropicales húmedas, tales como la Amazonía ecuatoriana, donde presentan una gran abundancia y diversidad de especies, con buena estructura y curso de conservación (León, 1987; Tropicós, 2017), la mayor parte de esta familia son exclusivas de bosques antiguos, posee 20 géneros y aproximadamente 300 especies (Tropicós, 2017).

Morfológicamente, la familia Lecythidaceae presenta árboles o arbustos pequeños o grandes, con corteza interna fibrosa, hojas alternas, simples, sin estípulas o con estípulas pequeñas y de hoja caduca, bordes enteros, crenulados o serrulados, venas pinadas, en racimos y panículas (Prance y Mori, 1979; Ramírez, 2014); sus flores raras veces se presentan solitarias, caulifloras axilares o terminales, además son hermafroditas, actinomorfas, diclamídeas o zigomórficas; con 2 a 6 sépalos triangulares u ovados; 4, 6, u 8 pétalos; estambres numerosos, ovario inferior, anátropo; fruto en pixideo, ligeramente carnoso indehiscente (*Grias* y *Gustavia*) o pericarpio leñoso (*Couroupita*); semillas aladas en cariniana y couratari, sus frutos en pixidio, sin alas en otros géneros, con o sin arilo, sin embrión diferenciado o cotiledones plano-convexos o foliáceos (Mori, 2002; Tropicós, 2017).



Foto 6: Árbol de A) *G. peruviana* y B) *G. neuberthii*.

Fuente: Biocuenas, (2014) (A); López y Ezazo, (2015) (B).

Elaboración: Autor

Tienen un papel significativo como fuente de alimento, ya que la pulpa y las semillas de algunas especies tienen alto valor nutricional, otras se utilizan económicamente como especies maderables (Prance y Mori, 1979; León, 1987), y los frutos de muchas especies, conocidos como mangos silvestres, son utilizados en medicina tradicional para tratar múltiples enfermedades (Prance y Mori, 1979).

1.10. Género *Grias*

Dentro de la familia Lecythidaceae podemos encontrar al género *Grias*, la cual corresponde a un grupo de plantas que hasta la actualidad contempla 12 especies diferentes. Éste género es originario del noroeste de América del Sur, América Central y Jamaica (Cornejo y Mori, 2012). La mayor parte de las especies de éste género han sido empleadas por décadas en la medicina tradicional de las zonas antes mencionadas debido a que poseen altas propiedades farmacológicas (Huamán, 2015), principalmente dos de ellas las cuales se describen a continuación.

1.10.1. *Grias peruviana*

La especie *G. peruviana* se la encuentra generalmente en bosques húmedos entre los 800 y 1600 msnm (Cárdenas y Ordoñez, 2015). Es nativa de la vertiente oriental del Perú (Patiño, 2002) y del sur del Ecuador (Patiño, 2002; Cárdenas y Ordoñez, 2015). Tiene una altura de 7 a 12 m; posee hojas largas obovadas en espiral y agrupadas en el ápice de las ramas; tiene flores amarillas con pétalos carnosos que crecen a nivel del tronco; su fruto es ovoide y marrón con una semilla grande y de pulpa amarillenta (Cárdenas y Ordoñez, 2015) **(Foto**

6A). En medicina tradicional, mediante la cocción del fruto, se lo emplea como un antiparasitario y para el tratamiento del estreñimiento (Orellana, 2014), la semilla se utiliza como enema, la cáscara es hervida en agua para ser bebida con el fin de regular la menstruación y según la comunidad Quichua la semilla es utilizada como antitumoral (Huamán, 2015; Tropicos. 2017), además ha demostrado tener propiedades diuréticas y ha sido utilizado para la prevención de la arterosclerosis (EcuRed, 2016).

1.10.2. *Grias neuberthii*

La especie *G. neuberthii* es nativa del sur de Colombia, Ecuador y del norte del Perú (Lozano, 2013). Es un árbol de 20 a 25 m de altura y 30 a 40 cm de diámetro. El tronco es recto y columnar, poco ramificado. Las hojas son simples y están agrupadas en la parte terminal del tronco o de las ramas y sésiles; posee flores hermafroditas fragantes, cáliz de 4 a 6 sépalos de color verde, corola de 4 pétalos de color blanco o amarillentos, fruto elipsoidal con una sola semilla grande (Lozano, 2013). **(Foto 6B).** En medicina tradicional es utilizada de diversas maneras: la semilla se usa como antidisentérico y cocida se utiliza como enema, el mesocarpio cuando es rallado y mezclado junto con agua es purgativo, cuando se instila el jugo de la semilla en las fosas nasales combate la sinusitis, además de ello la pulpa cocida en agua y es usada como bebida laxante y la infusión de la corteza se utiliza para detener la hemorragia uterina (Alva, et al. 2002); incluso posee propiedades antibacterianas y desinfectantes (Moya, 2012).

1.11. Métodos para el estudio de la actividad citotóxica

Para evaluar el posible potencial antitumoral que pueden presentar los fármacos, o bien extractos y/o moléculas aisladas de componentes vegetales, se han desarrollado diversas técnicas *in vitro* que emplea el cultivo de células tumorales humanas. El uso de cada una de las técnicas depende de las ventajas y desventajas que ofrecen para evaluar el efecto antiproliferativo, citotóxico o citostático de un determinado agente (Martinez-Torres, et al., 2016). A continuación describimos algunos que se utilizan de forma amplia:

1.11.1. Marcaje con azul tripán:

La solución azul tripán (ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil- 4,4'-diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfónico) es un colorante que no se absorbe por células vivas, de tal manera que, cuando una célula sufren algún daño o está muerta, su membrana deja de ser impermeable, permitiendo el ingreso del colorante en la célula, haciendo que ésta se tiña de azul, lo que distingue a las células muertas de las vivas para poder ser identificadas y contabilizadas. Es un método de tinción por exclusión que se

aplica en ensayos de citotoxicidad y proliferación celular (Gordillo, et al. 2016; Martinez-Torres, et al, 2016).

1.11.2. Ensayo clonogénico:

Es un ensayo de supervivencia celular basado en la capacidad de las células para crecer en colonias, por medio de este ensayo se puede determinar la muerte celular reproductiva, midiendo la tasa de crecimiento y la tasa de supervivencia, además puede ser utilizado para comprobar la eficacia de agentes citotóxicos incluso luego de eliminarlo del medio de cultivo permitiendo elucidar si el efecto que induce del agente es de tipo reversible o irreversible (Gordillo, et al. 2016).

1.11.3. Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH):

La enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentra en todas las células, de tal manera que, cuando la membrana plasmática sufre daños, la LDH se libera velozmente en el medio de cultivo, por lo cual puede ser detectada y cuantificada. Su fundamento se basa en que la NAD^+ (Nicotinamida adenina dinucleótido) se reduce a NADH/H^+ (Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno + hidrógeno) por la conversión catalizada de LDH de lactato a piruvato, luego un catalizador contenido en la mezcla de reacción (diaforasa), transfiere H/H^+ de NADH/H^+ a la sal de tetrazolio INT (2 - [4-yodofenil] - 3 - [4-nitrofenil] - 5 - cloruro de feniltetrazolio), la cual se reduce a formazán, el cual puede ser evaluado mediante espectrofotometría (Gordillo, et al. 2016; Martinez-Torres, et al. 2016).

1.11.4. Ensayo de citotoxicidad por MTS:

Es un ensayo colorimético que determina la cantidad de células en estudios de proliferación, citotoxicidad o quimiosensibilidad. La reacción se basa en el metabolismo de la sal de tetrazolio [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio], o reactivo MTS por las enzimas mitocondriales NADH o NADPH de las células vivas a formazán otorgando una coloración marrón (Promega, 2012; Uribe-Clavijo, et al. 2012; Lindsey, et al. 2013). Las células son sembradas generalmente en placa de 96 pocillos, luego de un determinado tiempo las células son expuestas a agentes citotóxicos o citostáticos y después del tiempo de aplicación del tratamiento se coloca una pequeña cantidad (de 15 a 20 μL) directamente a los pocillos de cultivo, el reactivo es metabolizado por las células vivas por un tiempo aproximado de 1 – 4 horas, seguido la absorbancia es monitoreada por un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm (Lindsey, et al. 2013; Promega, 2012). El reactivo contiene la sal interna de tetrazolio y un reactivo de ensamble de electrones, etosulfato de fenazina (PES), esta unión permite mejorar la

estabilidad química, haciendo de la combinación una solución estable (Costa, 2015; Promega, 2012).

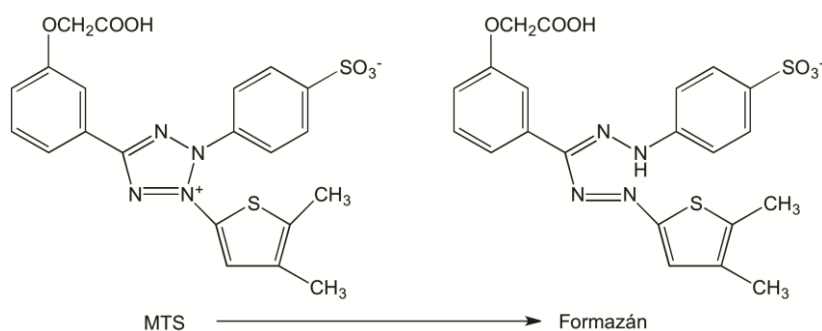


Figura 1: Estructura de MTS tetrazolio y su producto formazán.

Fuente: Promega, 2016.

Elaboración: Autor

El ensayo de MTS otorga diversos beneficios, simplifica el ensayo viabilidad colorimétrica, ya que mediante la adición del reactivo permite en un solo paso, "Añadir-incubar-medir", de esa manera los ensayos son homogéneos con una detección con alto rendimiento, además descarta los pasos de solubilización que son normalmente requeridos para los ensayos con MTT, no es radiactivo, por lo cual no requiere la eliminación de residuos radiactivos que tiene el MTT, ya que no tiene incorporado [3H] -timidina (Promega, 2016)

En resumen, el estudio de compuestos de origen vegetal con propiedades antiproliferativas es de suma importancia para el desarrollo de nuevos antineoplásicos, como se pudo conocer. Cada tipo de cáncer tiene características diferentes, ya sea por distinto origen tisular, mutaciones que presentan, por ejemplo en genes que intervienen en el ciclo celular, en las vías de muerte o en genes supresores de tumores como p53, factores hereditarios o ambientales, etc. Es por ello que, para el presente Trabajo de Fin de Titulación se consideran dos especies del género *Grias*: *G. peruviana* y *G. neuberthii*; las cuales se las evalúa en términos de citotoxicidad en cultivos celulares mediante el ensayo de MTS; ya que poco se sabe sobre su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales humanas.

CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO

2.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad citotóxica de 20 extractos de *Grias peruviana* y *Grias neuberthii* sobre las líneas celulares tumorales humanas: RKO, A-549, D-384, PC-3, MCF-7, SW613-B3, U-251.

2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad antiproliferativa de 20 extractos de *Grias peruviana* y *Grias neuberthii* expuestas durante un periodo de 48 horas a 50 µg/mL sobre las líneas celulares tumorales humanas.
- Calcular y determinar la CI_{50} de los extractos de *Grias peruviana* y *Grias neuberthii* que ejercieron un potente efecto citotóxico sobre las líneas celulares tumorales humanas.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Obtención de los extractos

Se utilizaron 20 extractos 7 de *Grias peruviana* y 13 de *Grias neuberthii*, los cuáles fueron otorgados por el Ph.D. Juan Carlos Romero, docente del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL, los mismos que se describen en la **Tabla 1**. Brevemente, las partes aéreas de *Grias peruviana* y *Grias neuberthii* fueron secadas a 30° C, molidas por separado y maceradas a temperatura ambiente durante 72 horas, usando como disolvente hexano, acetato de etilo y metanol en secuencia, procedimiento que se repitió tres veces. Una vez macerados los extractos se filtraron, luego fueron concentrados de manera individual en un evaporador rotatorio modelo R-210 marca Buchi, finalmente fueron almacenados a 4° C protegidos de la luz hasta su uso.

Tabla 1. Extractos de *Grias peruviana* y *Grias neuberthii*

<i>Grias peruviana</i>	GPU1H	<i>Grias peruviana</i> unión 1 Hexano
	GPU2H	<i>Grias peruviana</i> unión 2 Hexano
	GPU3A	<i>Grias peruviana</i> unión 3 Acetato de etilo
	GPU4A	<i>Grias peruviana</i> unión 4 Acetato de etilo
	GPU5M	<i>Grias peruviana</i> unión 5 Metanol
	GPHVM	<i>Grias peruviana</i> hoja vieja Metanol
	GPHJM	<i>Grias peruviana</i> hoja joven Metanol
<i>Grias neuberthii</i>	GNFH	<i>Grias neuberthii</i> fruto Hexano
	GNFA	<i>Grias neuberthii</i> fruto Acetato de etilo
	GNFM	<i>Grias neuberthii</i> fruto Metanol
	GNTM	<i>Grias neuberthii</i> tallo Metanol
	GNHM	<i>Grias neuberthii</i> hoja Metanol
	GNEmM	<i>Grias neuberthii</i> epicarpio maduro Metanol
	GNMmA	<i>Grias neuberthii</i> mesocarpio maduro Acetato
	GNEM	<i>Grias neuberthii</i> epicarpio Metanol
	GNEBA	<i>Grias neuberthii</i> embrión Acetato
	GNEBM	<i>Grias neuberthii</i> embrión Metanol
	GNU1H	<i>Grias neuberthii</i> unión 1 Hexano
	GNU2A	<i>Grias neuberthii</i> unión 2 Acetato
	GNU3M	<i>Grias neuberthii</i> unión 3 Metanol

20 extractos, 7 extractos de *Grias peruviana* y 13 extractos de *Grias neuberthii*, utilizados en pruebas biológicas.

Fuente: Departamento de Química y Ciencias Exactas.

Elaboración: Autor.

Los extractos fueron diluidos en DMSO (Sigma-Aldrich) a una concentración stock de 10 mg/mL o 20 mg/mL, luego fueron mantenidos a -20°C hasta su uso. A partir de la concentración stock se procedió a diluir cada extracto a la concentración deseada en medio RPMI suplementado.

3.2. Cultivo celular

Como se explicó en el marco teórico varias líneas celulares tumorales humanas fueron utilizadas como modelos biológicos para el presente estudio, éstas son: RKO y SW613-B3 (colon), MCF-7 (mama), D-384 y U-251 (astrocitoma cerebral), A-549 (pulmón) y PC-3 (próstata), las cuáles fueron cultivadas en medio RPMI suplementado: 10 % de suero fetal bovino (SFB), 1 % de antibiótico-antimicótico (penicilina G 100 U/mL, estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ y anfotericina B 25 $\mu\text{g/mL}$) (Gibco – Invitrogen), L-Glutamina 2 mM (todos los reactivos son marca Gibco – Thermo Fisher Scientific) y mantenidas a 37°C con 5 % de CO_2 en atmósfera húmeda.

3.3. Viabilidad mediante el ensayo MTS

Con el fin de determinar los extractos con un alto efecto antiproliferativo y las líneas celulares más susceptibles se procedió a realizar un *screening* general aplicando una única concentración. Cada línea celular se sembró a una densidad de 1500 o 2000 células/100 μL /pocillo en un multiplato de 96 pocillos. Luego de 24 horas de incubación las células fueron expuestas durante 48 horas a cada uno de los 20 extractos a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$; además, en cada ensayo se aplicó un control negativo (medio de cultivo) y un control positivo, en éste último se utilizó la doxorrubicina (DOX, Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 μM , debido a que es un fármaco antitumoral con amplio espectro de acción utilizado en el tratamiento de varios tipos de cánceres (Tacar, et al. 2013). Dos horas antes de finalizar el tiempo de exposición se aplicó 20 μL del reactivo MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Culminado el tiempo de tratamiento se obtuvieron las absorbancias en un espectrofotómetro (Sunrise™), a través del software Magellan, a una longitud de onda de 492 nm. Los datos de absorbancias fueron procesados y transformados en porcentajes considerando al control negativo como el 100 % de viabilidad celular.

3.4. Concentración Inhibitoria del 50 % de Células (CI_{50})

Para establecer la CI_{50} se utilizaron concentraciones crecientes de los extractos que tuvieron un efecto citotóxico menor al 50 % de viabilidad en el procedimiento anterior considerando la línea celular. De manera similar, cada línea celular se sembró a una densidad de 1500 o 2000 células/100 μL /pocillo en un multiplato de 96 pocillos, después de 24 horas de

incubación las células fueron expuestas a los siguientes extractos en concentraciones crecientes: GPU2H (10, 25, 50, 75 $\mu\text{g/mL}$), GPHVM (40, 50, 60, 70 $\mu\text{g/mL}$), GPHJM (según la línea celular: 40, 50, 60, 70 $\mu\text{g/mL}$ o 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$), GNTM (dependiendo de la línea celular: 0,5, 10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ o 5, 20, 35, 50 $\mu\text{g/mL}$), GNHM (40, 50, 60, 70 $\mu\text{g/mL}$). Seguidamente se incubó por 48 horas. Dos horas previo a finalizar el tratamiento se adicionó el reactivo MTS y se procedió como se explica previamente.

3.5. Análisis morfológico

Para observar el efecto inducido por el extracto que mostró mayor nivel de citotoxicidad en las líneas celulares se procedió a sembrar 50000 células por duplicado en cajas Petri de 6 cm de diámetro. Luego de 24 horas cada línea celular fue expuesta a la CI_{50} del extracto con mayor actividad antiproliferativa, además del control negativo. Luego de 48 horas las células fueron observadas empleando el microscopio óptico (Axioskop 2 plus, ZEISS) con aumento 40x. Las imágenes tanto del control negativo como de las células tratadas fueron capturadas a través del software Comet Assay IV empleando una cámara Basler scA1300-32fm.

3.6. Análisis Estadístico

Todos los ensayos de citotoxicidad fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes. Los resultados de viabilidad y de CI_{50} se muestran a partir de valores medios con sus respectivas desviaciones estándar, los cuales fueron calculados empleando el software estadístico GraphPad Prism® 5.0, a través del análisis estadístico ANOVA, utilizando la prueba de rango múltiple de Dunnet para comparar los resultados entre el control negativo y los diferentes extractos; y la prueba de comparación múltiple de Tukey para comparar entre el resultado de cada línea celular (si lo requiere).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Varios experimentos fueron ejecutados con el fin de determinar el porcentaje de células viables luego de ser tratadas con los extractos de *G. neuberthii* y *G. peruviana* a una única concentración. Los extractos que mostraron un efecto inferior al 50 % de viabilidad fueron luego evaluados para establecer su CI_{50} .

4.1. Evaluación de la actividad de los extractos *Grias peruviana* y *Grias neuberthii* sobre las líneas celulares tumorales humanas

Con los resultados obtenidos mediante MTS, lo primero que se determinó fue actividad antiproliferativa de cada extracto en cada línea celular.

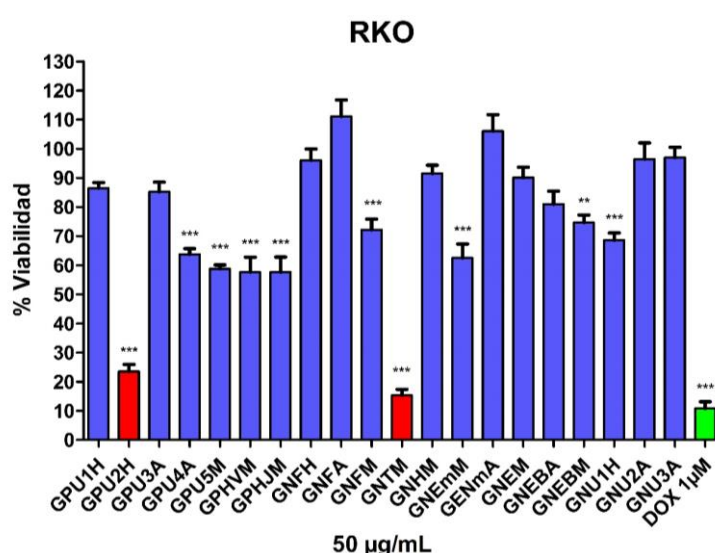


Figura 2: Viabilidad de la línea celular RKO expuestas durante 48 horas a 50 µg/mL de cada extracto, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Color de barras: rojo, potente efecto antiproliferativo (<50 % de viabilidad); azul, efecto débil o sin efecto antiproliferativo (>50 % de viabilidad); verde, control positivo DOX 1 µM. Análisis mediante Anova post test Dunnet y Bonferroni: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$.

Fuente y elaboración: Autor.

Como se muestra en la **Figura 2** en la línea celular RKO, los extractos GPU2H y GNTM, a la concentración 50 µg/mL, poseen una viabilidad de 23.5 ± 4.2 % y 15.3 ± 3.6 %, respectivamente. Estos resultados se detallan en la **Tabla 2** donde se observa que los extractos descritos presentan porcentajes de viabilidad que se acercan al nivel de citotoxicidad del control positivo, conjunto a esto la mayoría de extractos junto con la DOX muestran una diferencia significativa con respecto al control negativo y sólo GNEBM posee una diferencia significativa menor.

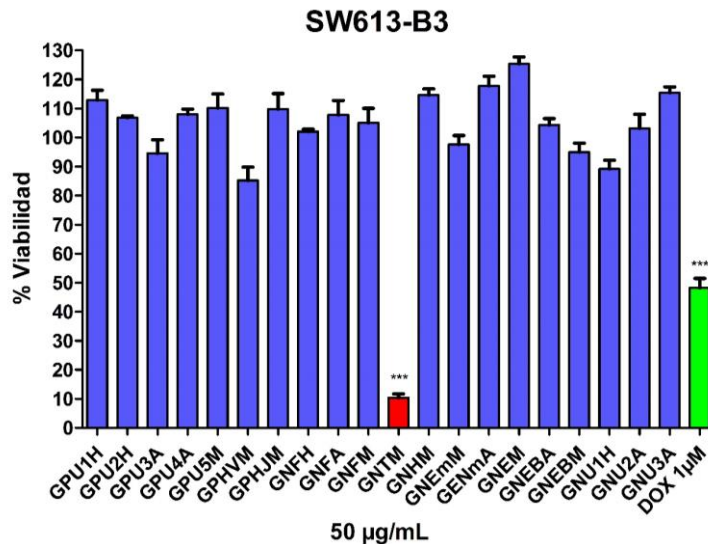


Figura 3: Viabilidad de la línea celular SW613-B3 expuestas durante 48 horas a 50 µg/mL de cada extracto, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Color de barras: rojo, potente efecto antiproliferativo (<50 % de viabilidad); azul, efecto débil o sin efecto antiproliferativo (>50 % de viabilidad); verde, control positivo DOX 1 µM. Análisis mediante Anova post test Dunnet y Bonferroni: ***p<0.0001.

Fuente y elaboración: Autor.

En cambio en la **Figura 3**, la cual corresponde a la línea celular SW613-B3 que posee p53 mutado, el extracto que presentó actividad antiproliferativa fue GNTM mostrando una viabilidad de 10.4 ± 2.2 %, incluso menor al observado en el control positivo, denotando que tanto GNTM como la DOX poseen una diferencia significativa con respecto al control negativo (**Figura 3 y Tabla 2**). De manera similar en la línea celular MCF-7 (**Figura 4**), el extracto GNTM mostró mayor actividad citotóxica con un porcentaje de viabilidad de 15.8 ± 7.6 , que el control positivo que tuvo una viabilidad mayor, en el caso de esta línea celular los extractos GNFM y GNTM, junto con la DOX presentaron una diferencia significativa considerable con respecto al control negativo (**Figura 4 y Tabla 2**).

En los casos de las líneas celulares procedentes de astrocitomas cerebrales, se muestra que en ambos casos 3 extractos poseyeron actividad antiproliferativa, en la línea celular D-384 (**Figura 5**), GPHJM, GNTM y GNHM, mostraron un porcentaje de viabilidad de 33.9 ± 3.4 , 9.7 ± 3.5 y 45.6 ± 4.8 , respectivamente (**Tabla 2**), y en las células U-251 (**Figura 6**), GPHVM, GPHJM y GNTM, exhibieron una viabilidad de 30.8 ± 6.3 %, 35.0 ± 1.8 % y 25.5 ± 8.8 %, respectivamente (**Tabla 2**).

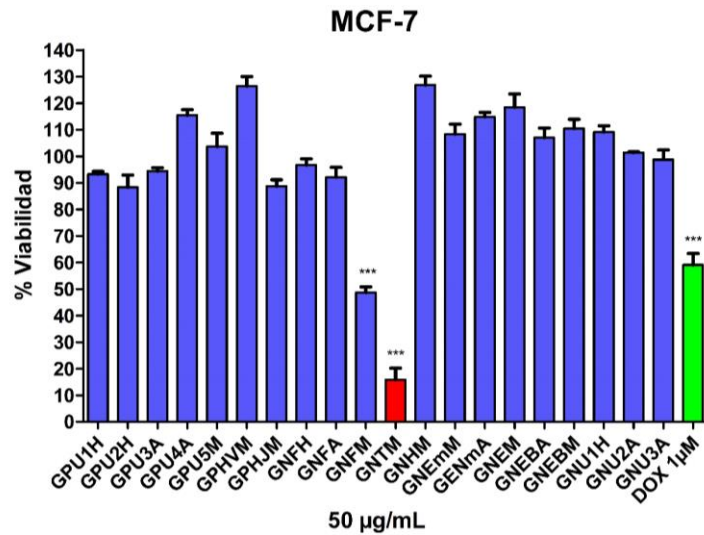


Figura 4: Viabilidad de la línea celular MCF-7 expuestas durante 48 horas a 50 µg/mL de cada extracto, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Color de barras: rojo, potente efecto antiproliferativo (<50 % de viabilidad); azul, efecto débil o sin efecto antiproliferativo (>50 % de viabilidad); verde, control positivo DOX 1 µM. Análisis mediante Anova post test Dunnet y Bonferroni: ***p<0.0001.

Fuente y elaboración: Autor.

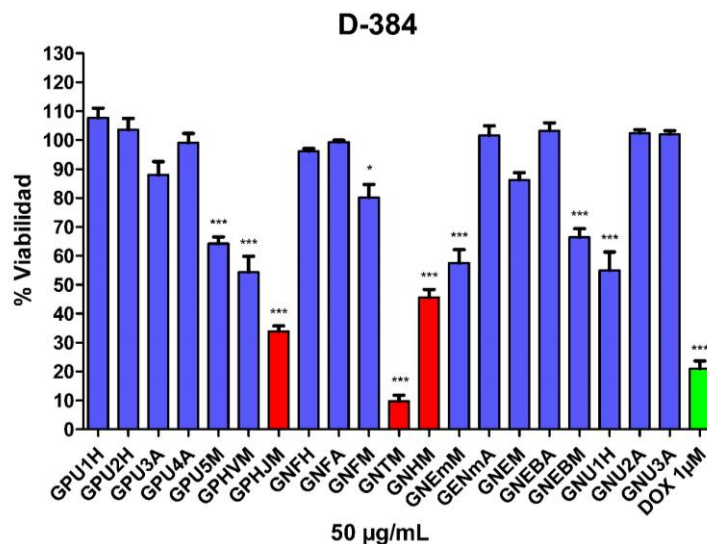


Figura 5: Viabilidad de la línea celular D-384 expuestas durante 48 horas a 50 µg/mL de cada extracto, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Color de barras: rojo, potente efecto antiproliferativo (<50 % de viabilidad); azul, efecto débil o sin efecto antiproliferativo (>50 % de viabilidad); verde, control positivo DOX 1 µM.

DOX 1 μ M. Análisis mediante Anova post test Dunnet y Bonferroni:
 *** $p < 0.0001$, * $p < 0.01$.

Fuente y elaboración: Autor.

En las células D-384 el extracto GNTM resultó ser el más citotóxico, incluso mayor al control positivo, mientras que en las células U-251 el efecto citotóxico fue similar entre los extractos GPU2H, GPHVM, GPHJM, GNTM, GNTBA, GNEBM, GNU1H junto con el control positivo. Mediante el análisis estadístico se puede manifestar que gran parte de los extractos utilizados muestran una diferencia significativa con respecto al control negativo y una diferencia significativa menor la presenta el extracto GNFM (**Figura 5 y Tabla 2**), aparte en las células U-251 los extractos nombrados anteriormente presentaron una diferencia significativa destacable con respecto al control negativo (**Figura 6 y Tabla 2**).

Al tratarse de la línea celular A-549, solo el extracto GNTM mostró actividad antiproliferativa (**Figura 7**), exhibiendo un porcentaje de viabilidad de 13.7 ± 8.6 (**Tabla 2**), siendo superior en comparación al control positivo (**Tabla 2**). Además posee una superior diferencia significativa al control negativo, seguido de GPU4A y al final los extractos GPU2H, GPU3A, GPUJM que poseen una menor diferencia significativa.

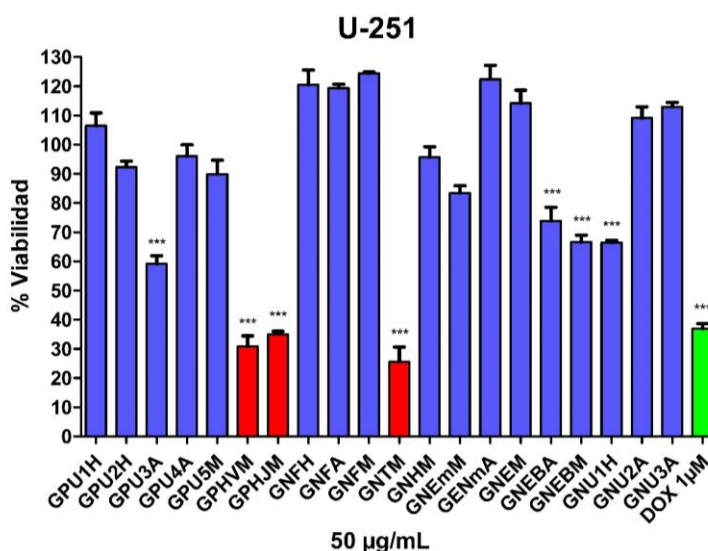


Figura 6: Resultados de viabilidad de la línea celular U-251 expuestas durante 48 horas a 50 μ g/mL de cada extracto, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Color de barras: rojo, potente efecto antiproliferativo (<50 % de viabilidad); azul, efecto débil o sin efecto antiproliferativo (>50 % de viabilidad); verde, control positivo de DOX 1 μ M. Análisis mediante Anova post test Dunnet y Bonferroni: *** $p < 0.0001$.

Fuente y elaboración: Autor.

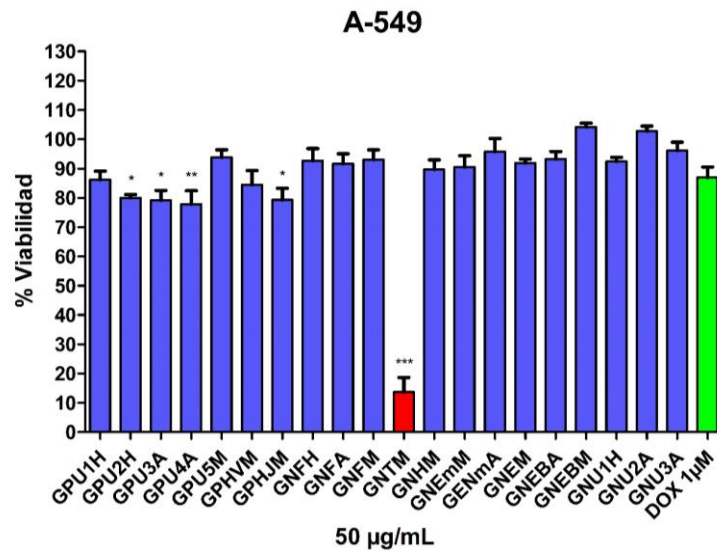


Figura 7: Resultados de viabilidad de la línea celular A-549 expuestas durante 48 horas a 50 µg/mL de cada extracto, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Color de barras: rojo, potente efecto antiproliferativo (<50 % de viabilidad); azul, efecto débil o sin efecto antiproliferativo (>50 % de viabilidad); verde, control positivo de DOX 1 µM. Análisis mediante Anova post test Dunnet y Bonferroni: *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$.

Fuente y elaboración: Autor.

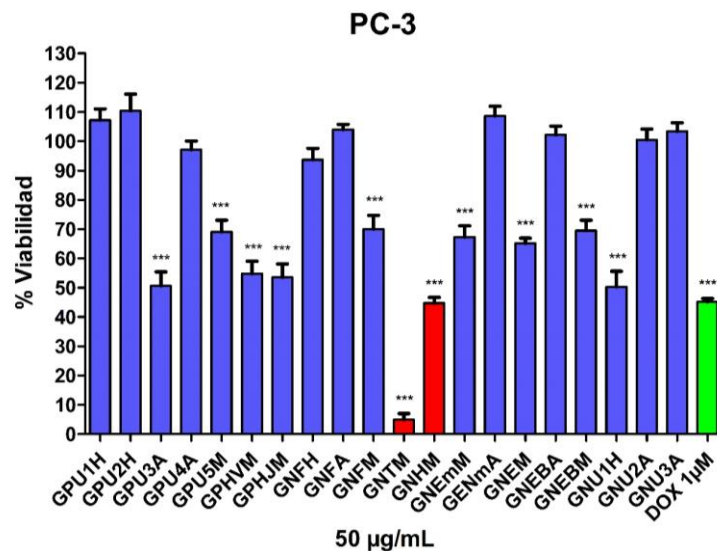


Figura 8: Resultados de viabilidad de la línea celular PC-3 expuestas durante 48 horas a 50 µg/mL de cada extracto, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Color de barras: rojo, potente efecto antiproliferativo (<50 % de viabilidad); azul, efecto

débil o sin efecto antiproliferativo (>50 % de viabilidad); verde, control positivo de DOX 1 μ M Análisis mediante Anova post test Dunnet y Bonferroni: *** $p < 0.0001$.

Fuente y elaboración: Autor.

En la línea celular PC-3, también posee p53 mutado, luego de realizarse el tratamiento con 50 μ g/mL con los 20 extractos, dos de ellos mostraron capacidad citotóxica, dándose a notar en la **Figura 8**, GNTM posee un porcentaje de viabilidad de 4.9 ± 3.7 y GNHM un porcentaje de 44.7 ± 3.4 (**Tabla 2**), mostrando porcentajes incluso menores al control positivo, siendo el extracto GNTM el que ostenta una mayor capacidad citotóxica, al mismo tiempo la mayoría de extractos muestran una gran diferencia significativa con respecto al control negativo (**Figura 8**).

Al realizarse el ensayo de viabilidad MTS con los extractos de *G. peruviana* y *G. neuberthii*, se puede notar la actividad del extracto GNTM, el cual a la concentración de 50 μ g/mL muestra una gran capacidad antiproliferativa, produciendo una disminución de la viabilidad celular en todas las líneas celulares (**Figura 9 y Tabla 2**). Mediante el análisis estadístico Tukey se muestra que no existe una considerable diferencia significativa del efecto antiproliferativo del extracto GNTM entre las distintas líneas celulares, a excepción de la línea celular U-251 y PC-3 donde se observa que existe diferencia significativa entre el efecto citotóxico producido en estas dos líneas celulares.

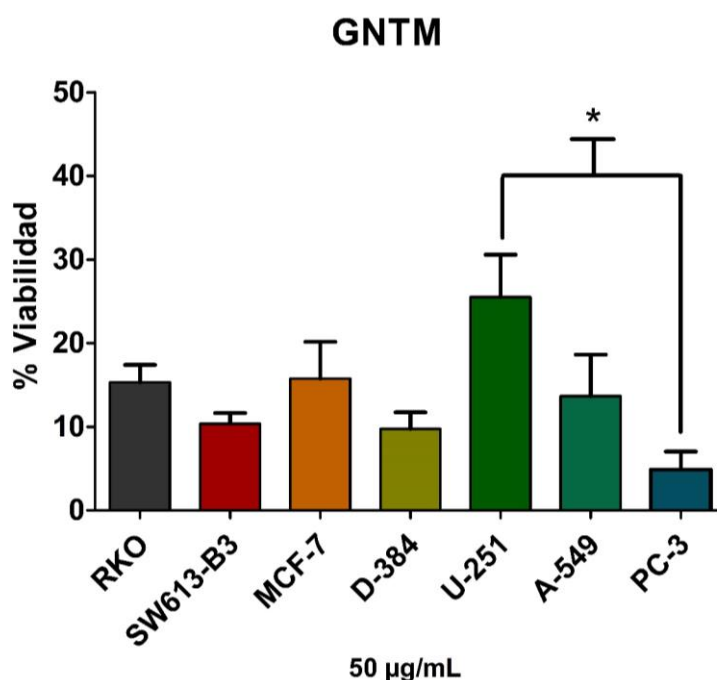


Figura 9: Viabilidad de cada una de las líneas celulares expuestas durante 48 horas a 50 μ g/mL del extracto GNTM, expresados en porcentajes de la media de

tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Análisis mediante Anova post test Tukey: * p<0.05.

Fuente y elaboración: Autor.

Tabla 2. Viabilidad de las líneas celulares tumorales humanas expuestas a los 20 extractos de *Grias peruviana* y *Grias neuberthii*.

EXTRACTO	RKO	SW613-B3	MCF-7	D-384	U-251	A-549	PC-3
GPU1H	86.5 ± 3.3	SE	93.3 ± 1.7	SE	SE	86.2 ± 5.1	SE
GPU2H	23.5 ± 4.2	SE	88.3 ± 7.9	SE	92.2 ± 3.6	80.0 ± 2.0	SE
GPU3A	85.2 ± 5.8	94.6 ± 8.0	94.4 ± 2.1	88.0 ± 8.0	59.1 ± 4.8	79.2 ± 5.9	50.6 ± 8.3
GPU4A	63.8 ± 3.4	SE	SE	99.0 ± 5.6	96.0 ± 6.8	77.8 ± 8.0	97.1 ± 5.2
GPU5M	58.8 ± 2.3	SE	SE	64.2 ± 4.0	89.9 ± 8.2	93.8 ± 4.5	69.2 ± 6.7
GPHVM	57.6 ± 8.9	85.2 ± 7.9	SE	54.3 ± 9.5	30.8 ± 6.3	84.5 ± 8.4	54.8 ± 7.3
GPHJM	57.6 ± 9.0	SE	88.7 ± 4.2	33.9 ± 3.4	35.0 ± 1.8	79.3 ± 6.9	53.5 ± 8.1
GNFH	96.0 ± 6.8	SE	96.7 ± 4.1	96.1 ± 2.0	SE	92.7 ± 7.1	93.7 ± 6.7
GNFA	SE	SE	92.1 ± 6.4	99.2 ± 1.3	SE	91.6 ± 5.9	SE
GNFM	72.2 ± 6.4	SE	48.7 ± 3.8	80.2 ± 8.0	SE	93.1 ± 5.7	70.1 ± 8.2
GNTM	15.3 ± 3.6	10.4 ± 2.2	15.8 ± 7.6	9.7 ± 3.5	25.5 ± 8.8	13.7 ± 8.6	4.9 ± 3.7
GNHM	91.5 ± 5.0	SE	SE	45.6 ± 4.8	95.7 ± 6.2	89.6 ± 5.7	44.7 ± 3.4
GNEmM	62.5 ± 8.4	97.6 ± 5.4	SE	57.5 ± 8.0	83.4 ± 4.3	90.5 ± 6.7	67.8 ± 6.6
GNEmA	SE	SE	SE	SE	SE	95.8 ± 7.7	SE
GNEM	90.1 ± 6.3	SE	SE	86.2 ± 4.4	SE	91.9 ± 2.4	65.2 ± 3.1
GNEbA	81.0 ± 7.8	SE	SE	SE	73.8 ± 8.1	93.3 ± 4.4	SE
GNEbM	74.7 ± 4.4	95.0 ± 5.3	SE	66.4 ± 5.1	66.6 ± 4.1	SE	69.5 ± 6.1
GNU1H	68.6 ± 4.4	89.1 ± 5.3	SE	55.0 ± 10.9	66.4 ± 1.4	92.4 ± 2.6	50.7 ± 9.3
GNU2A	96.5 ± 9.5	SE	SE	SE	SE	SE	SE
GNU3A	97.0 ± 6.2	SE	98.7 ± 6.3	SE	SE	96.2 ± 4.8	SE
DOX 1µM	10.8 ± 4.0	48.2 ± 5.6	59.1 ± 7.4	21.0 ± 4.6	36.9 ± 3.0	86.9 ± 6.2	45.2 ± 1.9

Porcentajes de viabilidad de todas las líneas celulares expuestas durante 48 horas a 50 µg/mL de cada extracto, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar; SE = sin efecto.

Fuente y elaboración: Autor.

4.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀)

Con los resultados obtenidos anteriormente con 50 µg/mL de cada extracto, se procedió a calcular la Concentración Inhibitoria del 50 % de la población celular (CI₅₀), para lo cual se aplicó diferentes concentraciones crecientes de acuerdo al efecto mostrado de los extractos en cada línea celular, contando con un rango desde 0.5 hasta 100 µg/mL.

Como se demostró en el ensayo anterior, existen 2 extractos con gran actividad antiproliferativa sobre la línea celular RKO: GPU2H y GNTM, para el extracto GPU2H se utilizaron concentraciones altas (**Figura 10A**), como se evidencia en la **Tabla 3**, el análisis estadístico otorgó una CI_{50} de $42.0 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$, en cambio para el extracto GNTM se utilizaron concentraciones más bajas debido a su potencial citotóxico: (**Figura 10B**), otorgando una CI_{50} de $31.8 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$ (**Tabla 3**).

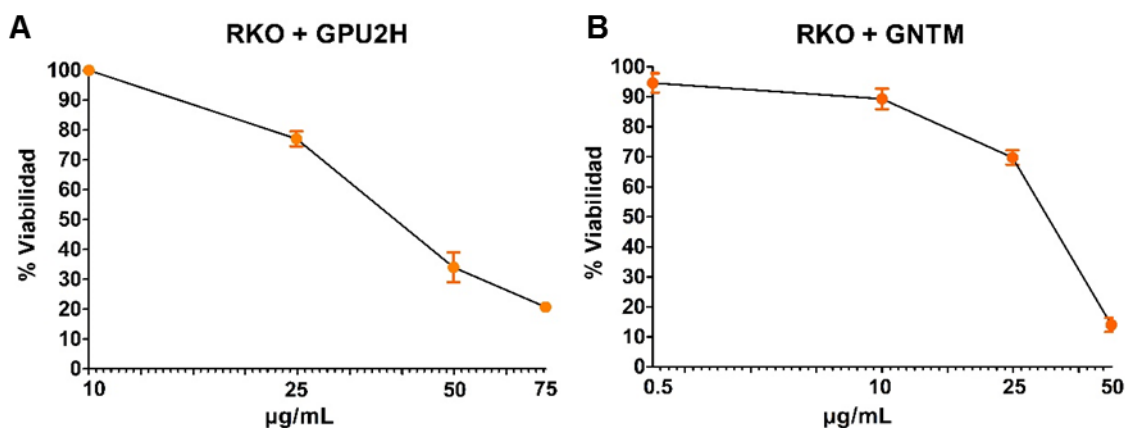


Figura 10: Viabilidad de la línea celular RKO expuesta a concentraciones crecientes de: A) extracto GPU2H, B) extracto GNTM, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Fuente y elaboración: Autor.

En cuanto a la línea celular SW613-B3, solo un extracto mostró alta actividad citotóxica, GNTM, para el cual se inició con concentraciones más elevadas con respecto a las otras líneas celulares: (**Figura 11**), la CI_{50} fue de $28.0 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ (**Tabla 3**). De similar manera a SW613-B3, el extracto con actividad antiproliferativa en la línea celular MCF-7 fue GNTM, que como exhibe la **Figura 12**, otorga como resultado una CI_{50} de $39.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ (**Tabla 3**).

Al tratarse las células D-384, debido a la actividad citotóxica que ejercen varios extractos las concentraciones son diferentes (**Figura 13**); en el extracto GPHJM (**Figura 13A**), GNTM (**Figura 13B**) y GNHM (**Figura 13C**), se obtuvieron como resultado las CI_{50} de $53.8 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$; $21.7 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ y $48.7 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Tabla 3**).

De forma similar existió actividad antiproliferativa de tres extractos en la línea celular U-251, el extracto GPHVM (**Figura 14A**); GPHJM (**Figura 14B**) y GNTM (**Figura 14C**); nos muestra como resultado las respectivas CI_{50} de $51.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$, $46.0 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ y $18.5 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ (**Tabla 3**).

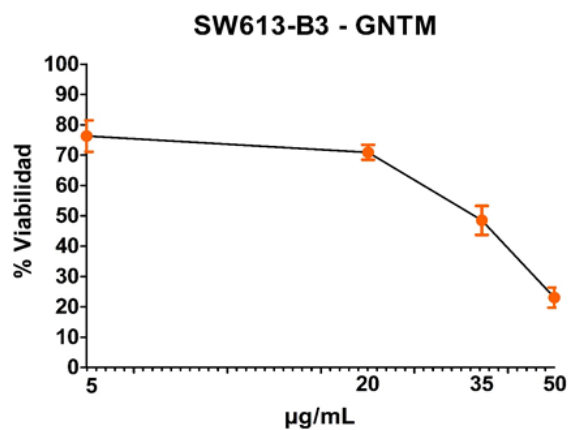


Figura 11: Viabilidad de la línea celular SW613-B3 expuesta a concentraciones crecientes del extracto GNTM, expresado en porcentaje de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Fuente y elaboración: Autor.

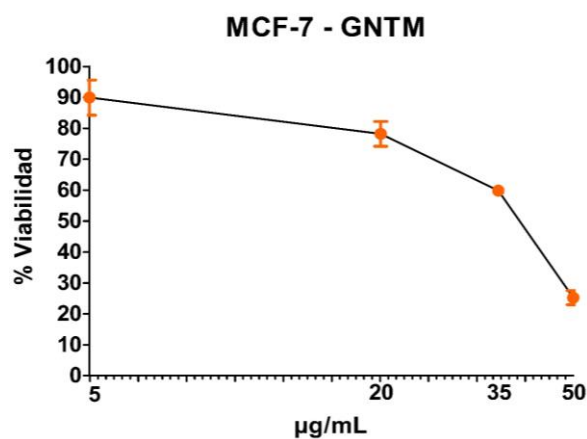


Figura 12: Viabilidad de la línea celular MCF-7 expuesta a concentraciones crecientes del extracto GNTM, expresado en porcentaje de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Fuente y elaboración: Autor.

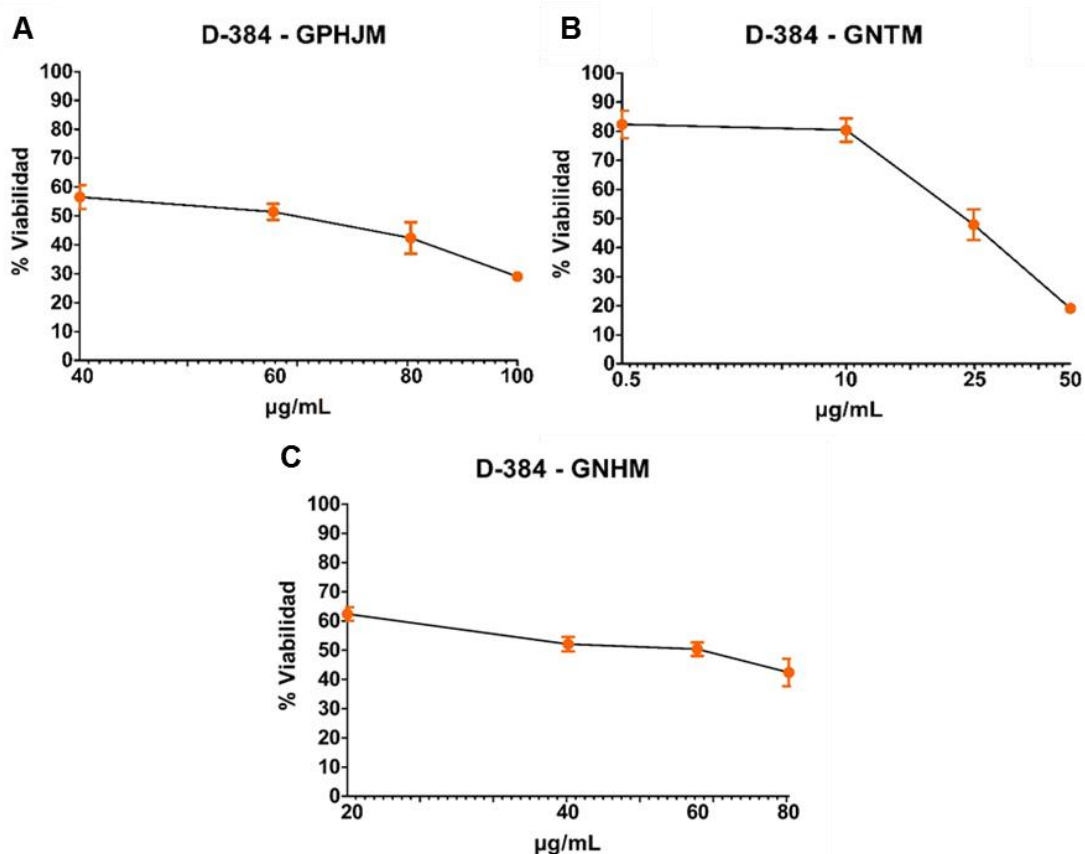


Figura 13: Viabilidad de la línea celular D-384 expuesta a concentraciones crecientes de: A) extracto GPHJM, B) extracto GNTM, C) extracto GNHM, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Fuente y elaboración: Autor.

En cambio en la línea celular PC-3, dos extractos manifestaron actividad citotóxica, para los cuales se aplicaron diferentes concentraciones, el extracto GNTM (**Figura 16A**); mediante el cálculo estadístico exhibe una CI_{50} de $17.4 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ (**Tabla 3**), y el extracto GNHM (**Figura 16 B**) muestra una CI_{50} de $64.3 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$ (**Tabla 3**).

Como se puede observar en las figuras de las CI_{50} , los extractos ejercen una acción dosis – respuesta; es decir, a mayor concentración utilizada existe mayor actividad antiproliferativa. Únicamente en la **Figura 13A y 13C**, de la línea celular D-384 utilizando los extractos GPHJM y GNHM, respectivamente; y en la **Figura 16B**, de la línea celular PC-3, utilizando el extracto GNHM, se observó que aunque se aplica mayores concentraciones con respecto a los demás extractos, no hay un mayor efecto antiproliferativo.

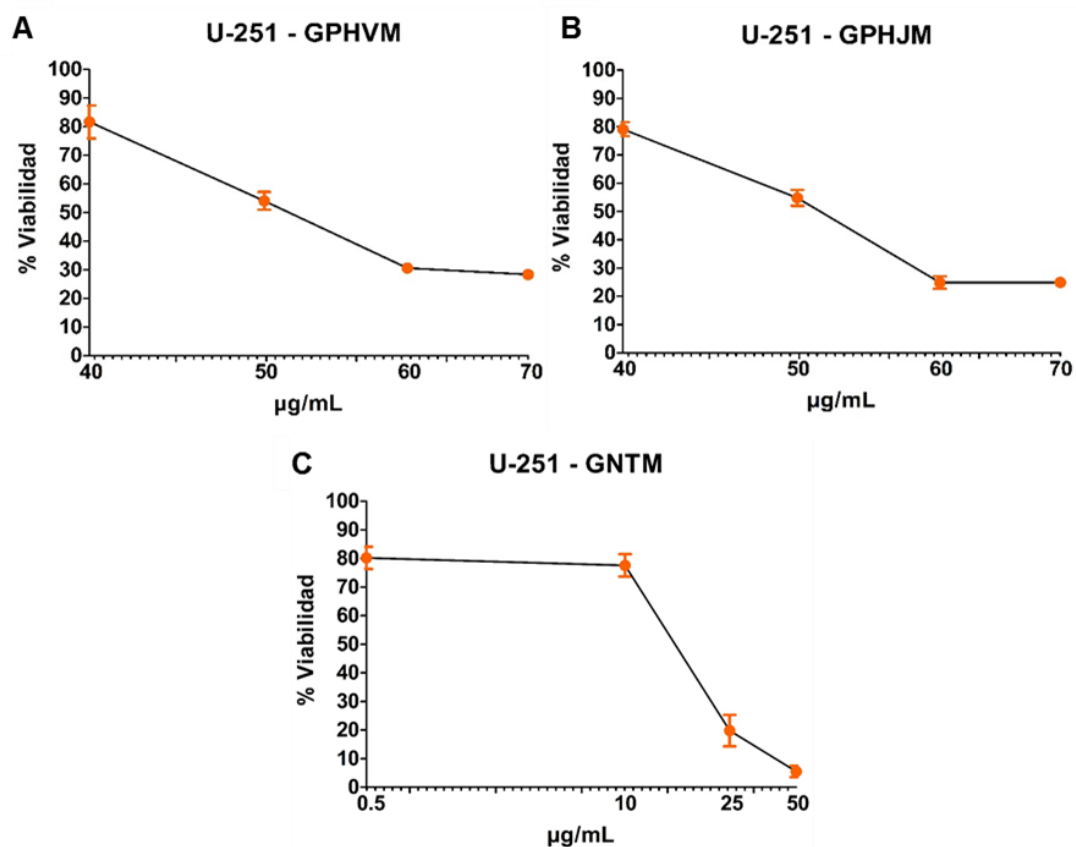


Figura 14: Viabilidad de la línea celular U-251 expuesta a concentraciones crecientes de: A) extracto GPHVM, B) extracto GPHJM, C) extracto GNTM, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Fuente y elaboración: Autor.

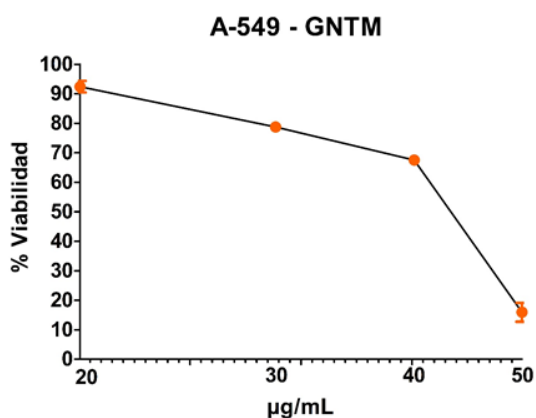


Figura 15: Viabilidad de la línea celular A-549 expuesta a concentraciones crecientes del extracto GNTM, expresado en porcentaje de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Fuente y elaboración: Autor.

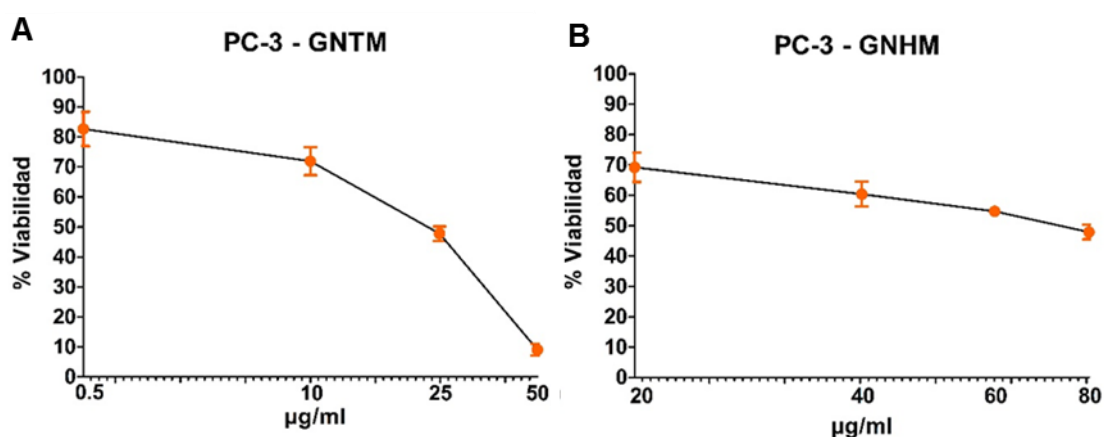


Figura 16: Viabilidad de la línea celular PC-3 expuesta a concentraciones crecientes de: A) extracto GNTM, B) extracto GNHM, expresados en porcentajes de la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

Fuente y elaboración: Autor.

Tabla 3. Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de los extractos que poseen actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales humanas.

Extracto	RKO	SW613-B3	MCF-7	D-384	U-251	A-549	PC3
GPU2H	42.0 ± 0.1	-	-	-	-	-	-
GPHVM	-	-	-	-	51.1 ± 0.1	-	-
GPHJM	-	-	-	53.8 ± 0.0	46.0 ± 0.1	-	-
GNTM	31.8 ± 0.0	28.0 ± 0.1	39.1 ± 0.1	21.7 ± 0.1	18.5 ± 0.1	55.4 ± 0.1	17.4 ± 0.1
GNHM	-	-	-	48.7 ± 0.0	-	-	64.3 ± 0.0

Resultados correspondientes a la CI₅₀ de las líneas celulares expuestas a concentraciones crecientes de los extractos con mayor efecto citotóxico, expresados en µg/mL de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar obtenida mediante el software GraphPad Prism® 4.0.

Fuente y elaboración: Autor.

Se destaca la actividad antiproliferativa del extracto GNTM de *Grias neuberthii*, el cual produjo un efecto antiproliferativo en todas las líneas celulares tumorales estudiadas, como se puede observar en la **Gráfica 1**, utilizando un control negativo y las concentraciones inhibitorias del 50 % de viabilidad celular (**Tabla 3**), se puede observar y enfatizar la gran capacidad citotóxica que presenta el extracto GNTM.

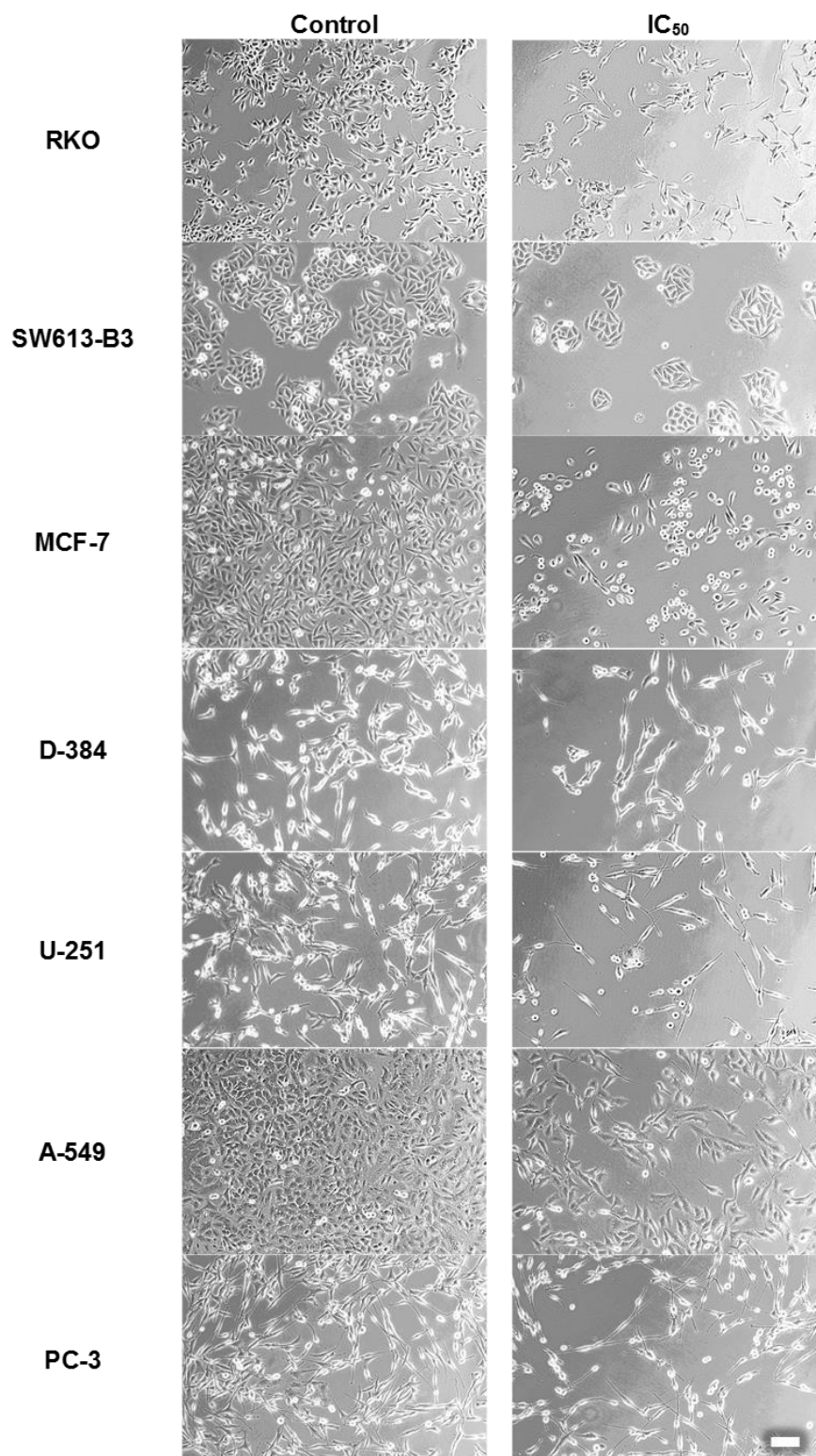


Figura 17: Líneas celulares tumorales humanas expuestas a la respectiva CI_{50} del extracto GNTM y control negativo, observadas en microscopio Axioskop 2 (ZEISS) plus, aumento 40x a través del software Comet Assay IV empleando una cámara Basler SCA1300-32fm. Barra de escala 50 μ m

Fuente y elaboración: Autor.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

Como se mencionó previamente, las especies *G. peruviana* y *G. neuberthii* han sido objeto de uso en la medicina tradicional debido a sus propiedades farmacológicas. De este modo, en conjunto con el laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL, se propuso evaluar el efecto antiproliferativo en líneas celulares tumorales humanas de 20 extractos obtenidos de estas dos especies. En estudios previos mediante pruebas colorimétricas se determinó la presencia o ausencia de algunos tipos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *G. peruviana* y *G. neuberthii* (**Tabla 1 y 4**), dicha información nos permite deducir qué tipo de compuestos químicos podrían estar proporcionando el efecto citotóxico observado.

Tabla 4. Metabolitos secundarios detectados en los extractos con actividad citotóxica de *Grias peruviana* y *Grias neuberthii*.

Test	<i>Grias peruviana</i>			<i>Grias neuberthii</i>	
	Hex	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH
	GPU2H	GPHJM	GPHVM	GNTM	GNHM
Alcaloides	+++	++	++	-	+
Saponinas	-	++	+	+++	+
Taninos	-	-	-	-	+
Flavonoides	-	-	-	-	+
Quinonas	-	-	-	-	++

Metabolitos secundarios de los extractos de *G. peruviana* y *G. neuberthii*, extraídos de hojas o tallos empleando hexano o metanol como solvente. Hex = extracto de hexano, MeOH = extracto de metanol, +++ = alta presencia, ++ = mediana presencia, + = baja presencia, - = ausencia.

Fuente: Departamento de Química y Ciencias Exactas, UTPL.

Elaboración: Autor.

El extracto hexanico de *G. peruviana* que se destacó por su actividad citotóxica fue: GPU2H (extracto de hojas en diferentes estadíos), el cual mostró en su constitución gran cantidad de alcaloides; y los extractos metanolicos: GPHVM y GPHJM (extractos de hojas viejas y jóvenes, respectivamente), cuyos componentes fitoquímicos principales son alcaloides y saponinas. Por otro lado, los extractos de la especie *G. neuberthii* que mostraron capacidad antiproliferativa son: GNTM, extraído del tallo en metanol, el cual contiene una muy alta cantidad de saponinas; y GNHM, extraído de las hojas en metanol, el cual posee alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y una mayor concentración de quinonas. De acuerdo a los resultados observados, se podría atribuir dicho efecto citotóxico a la presencia de éstos componentes en cada uno de los extractos, los cuales podrían estar actuando de manera individual o sinérgica.

Se puede observar una composición y concentración distinta de los extractos de acuerdo a la parte de la planta utilizada y al tipo de solvente empleado, en la especie *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng, que también pertenece a la familia Lecythidaceae, cuya composición de saponinas, fenoles y la actividad antioxidante que presenta, dependía de la parte de la planta utilizada; así, según Musman (2010), el extracto metanólico de la semilla contiene saponinas y flavonoides, en cambio según Dalilah, et al. (2015), los extractos metanólicos de *B. racemosa* de las ramas produjeron un mayor contenido de fenoles, mientras que en las cortezas se obtuvo una mayor concentración de flavonoides utilizando el mismo solvente, las propiedades antioxidantes que se observaron fueron distintas entre los extractos obtenidos a partir de hojas jóvenes y hojas viejas. Además, el extracto de *B. racemosa* que mostró un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares tumorales humanas, fue a base de acetato de etilo, mostrando una mayor cantidad de flavonoides y carotenoides obtenidas a partir de las hojas, en contraste, mediante un estudio realizado por Thomas, et al. (2002), verificó la eficacia del extracto metanólico de semilla de *B. racemosa* ya que ejercía un efecto antitumoral en ratones con 1 millón de células de linfoma ascítico de Dalton (DLA), siendo la dosis óptima 6 mg/kg, dicha dosis protegía a los animales inoculados con las células tumorales. En nuestro caso, el efecto antiproliferativo se observó en los extractos hexánicos (GPU2H) y metanólicos (GPHVM, GPHJM y GNHM) de las hojas y en el extracto metanólico de tallos (GNTM).

Otra especie de la familia Lecythidaceae es *Barringtonia asiatica* Kurz, la cual según Sparg, et al. (2004) y Cheok, et al. (2014), presenta entre sus constituyentes químicos gran cantidad de saponinas triterpénicas, entre los que poseen propiedades antitumorales se encuentran: el ácido betulínico, el escualeno, y β -sitosterol, que son obtenidos a partir de la corteza, en el estudio realizado por Ragasa, et al. (2014), la actividad citotóxica es realizada por la mezcla obtenida de corteza, ácido betulínico junto con O-tigloilcamelliagenina A, y palmitato de germanicol extraído de las hojas. Es así que, de acuerdo a los componentes fitoquímicos que se observan *G. peruviana* y *G. neuberthii* en mayor proporción: alcaloides, saponinas y quinonas, y en menor proporción flavonoides (**Tabla 4**), presentes en los extractos que ejercieron un importante efecto antiproliferativo frente a determinadas líneas tumorales humanas es conveniente conocer sus propiedades antitumorales (**Tabla 2 y 3**).

Algunos alcaloides inhiben a las tirosina quinasas, enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el trifosfato de adenosina a las proteínas diana, mecanismo que ha permitido el tratamiento de varios tipos de cánceres; además, en algunos casos una transformación química estructural de los productos naturales no alcaloides en estructuras similares a alcaloides mejora significativamente la propiedad anticancerígena (Kittakoop, et al. 2014). De similar manera, las quinonas heterocíclicas naturales y sintéticas tienen importante actividad biológica, antitumoral, antiprotozoaria y antibiótica (Valderrama, et al.

2014) y curiosamente, la presencia de un anillo arilo en éstas potencia los efectos anticancerígenos y antibióticos (Mussak y Bechtold, 2009), en cambio las quinonas no modificadas están presentes en muchos fármacos como la doxorubicina, mitomicina, mitoxantrona y saintopina, que se utilizan clínicamente en la terapia de cánceres sólidos (Tsizin, 1978; Bass, et al. 2013). Los flavonoides se encuentran entre la subdivisión de los polifenoles, los cuales poseen actividad antioxidante, ya que revierten y previenen el estrés oxidativo confiriéndoles propiedades antiinflamatorias, protegiendo así las células de una posible carcinogénesis (Chauhan, et al. 2016; Hassimotto, et al. 2005; Shama, et al. 2012). Al igual que los flavonoides, las saponinas son antioxidantes que previenen el daño al ADN causado por los radicales libres (Ubwa, et al. 2011), provocando una lenta proliferación de las células cancerosas o deteniendo su replicación (Bruneton, 1994; Trease y Evans, 2009; Ubwa, et al. 2011), por lo que se lo considera como antimutagénico y antitumoral (Ubwa, et al. 2011). Las saponinas se dividen en dos clases principales, cuya caracterización de la estructura varía por el número de unidades de azúcar unidas a un resto triterpenoide (C30) o glucósido esteroideo (C27) (Sparg, et al. 2004; Cheok, et al. 2014).

Como se puede ver en la **Tabla 3**, algunos de los extractos de *G. peruviana* extraídos de hojas en hexano poseen una CI_{50} baja ($<50 \mu\text{g/mL}$), como GPU2H, que posee $42.0 \mu\text{g/mL}$ en RKO; o como el extraído en metanol GPHJM con $46.0 \mu\text{g/mL}$ en U-251. De igual manera el extracto de hojas de *G. neuberthii* en metanol GNHM con $48.7 \mu\text{g/mL}$ en U-251. Estos resultados pueden ser comparados con *B. racemosa* que también posee concentraciones de CI_{50} bajas en su estudio, además su actividad está limitada a determinadas líneas celulares tumorales; de similar manera el extracto de hojas en etanol de *B. racemosa* según Mackeen, et al. (1997) tiene actividad citotóxica contra células de carcinoma cervical humano HeLa con una CI_{50} de $10 \mu\text{g/mL}$; no obstante, según el estudio realizado por Emylia, et al. (2008) el extracto de hoja de metanol de *B. racemosa* posee una CI_{50} de 3.5 mg/mL en las mismas células ensayadas.

Enfocándonos en el extracto metanólico de tallos de *G. neuberthii*, GNTM, el efecto antiproliferativo fue observado en todas las líneas celulares de nuestro estudio (**Gráfica 1**), mostrando valores de CI_{50} desde $17.4 \mu\text{g/mL}$ en PC-3, siendo la línea celular más sensible al tratamiento, hasta $55.4 \mu\text{g/mL}$ en A-549. Se puede destacar la actividad citotóxica de este extracto en las líneas celulares PC-3 y SW613-B3 que presentan *TP53* mutado, ya que se conoce que, las alteraciones generadas en las vías donde participa este gen son asociadas con tumores agresivos y terapéuticamente resistentes y, a diferencia de sus similares *B. racemosa* y *B. asiática*, en las cuales aún no se han desarrollado ensayos en células con mutaciones en *TP53*, el extracto GNTM al poseer actividad antiproliferativa en las células antes mencionadas, podría sugerir que el proceso de muerte celular podría ser independiente de p53 (Guamán-Ortiz, et al. 2014).

Finalmente, todos estos hallazgos son considerables para la determinación y el análisis de los metabolitos secundarios presentes que proporcionan el efecto observado. Por ejemplo, en *B. asiática*, estudiada por Ragasa, et al (2014), se determinó que los extractos de diclorometano de la corteza contenía ácido betulínico, el cual mostró un alto efecto citotóxico en las líneas celulares HCT-116 (cáncer de colon) y A-549, siendo también altamente estudiado (Kabir, et al. 2013; Cháirez-Ramírez, et al. 2016); por lo cual, GNTM y los demás extractos con efecto citotóxico, bien podría presentar uno o varios metabolitos secundarios que posean una estructura similar a los que se han encontrado en ésta familia de plantas, los cuales podrían ser estudiados a fondo por el gran espectro de acción que poseen los extractos.

CONCLUSIONES

La evaluación de la capacidad citotóxica de los 20 extractos de *G. peruviana* y *G. neuberthii* en las distintas líneas celulares tumorales da a conocer que, los extraídos de hojas de *G. peruviana* que poseen una concentración inhibitoria efectiva en determinadas líneas celulares, son GPU2H en RKO con 42,0 µg/mL; GPHVM en U-251 con 51,1 µg/mL; GPHJM en D-384 con 53,8 µg/mL y U-251 con 46,0 µg/mL; de similar manera el extracto de hojas de *G. neuberthii* posee un bajo espectro de actividad antiproliferativa, actuando GNHM en las líneas celulares PC-3 con 64,3 µg/mL y D-384 con 48,7 µg/mL.

En cuanto al extracto metanólico de tallos de *G. neuberthii*, GNTM, posee un amplio espectro de acción citotóxica, ya que actúa inhibiendo la proliferación celular en todas las líneas celulares tumorales estudiadas y se puede destacar la acción ejercida sobre la línea celular PC-3 y SW613-B3, la cuales poseen como principal característica mutaciones en el gen de p53, dando una CI_{50} de 17,4 y 28,0 µg/mL, respectivamente.

RECOMENDACIONES

Debido a que el extracto GNTM posee una gran capacidad antiproliferativa en las líneas celulares estudiadas, incluyendo las células SW613-B3 las cuales poseen p53 mutado, se recomendaría realizar ensayos de Western Blot e inmunofluorescencia, con el fin de conocer la ruta de muerte que siguen las células al ser tratadas con el éste extracto, además se recomienda realizar el estudio de citotoxicidad con los componentes ya aislados, a fin de descubrir qué componente del extracto es responsable del efecto antiproliferativo observado.

Debido a que el estudio fue realizado en células tumorales, es recomendable realizar estudios de citotoxicidad sobre líneas celulares normales, esto con el fin de discernir si el efecto antiproliferativo es exclusivo a células cancerígenas.

Con los resultados obtenidos de citotoxicidad, se recomienda realizar ensayos de genotoxicidad como cometa o aberraciones cromosómicas, con el fin de conocer si se produce o no un daño a nivel de ADN.

Los mismos análisis se podrían aplicar al resto de extractos que mostraron un alto efecto citotóxico, de tal manera que, se puede conocer los mecanismos de muerte, su genotoxicidad y si son específicos de células tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alva, A., Vásquez, O., Cuniberti, R., del Castillo, A., Guerra, W. (2002). Extracción y caracterización de ácidos grasos de la especie *Grias neuberthii* Macht (Sachamango). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 2(1), 103-106.
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknaes, M., Hektoen, M., Lind, G., E., Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71.
- American Brain Tumor Association (ABTA). 2012. Glioblastoma y astrocitoma maligno. Recuperado de www.abta.org/resources/spanish-language.../glioblastoma-y-astrocitoma-maligno.pdf
- American Cancer Society (ACS). 2017. Cancer. Recuperado de <https://www.cancer.org>
- American Medical Association (AMA). 2008. Cáncer de Próstata. Recuperado de <https://sites.jamanetwork.com/spanish-patient-pages/2008/hoja-para-el-paciente-de-jama-080709.pdf>
- Aqil F., Gupta A., Munagala R., Jeyabalan J., Kausar H., Sharma R.J., Gupta R.C., 2012. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). *Nutrition and Cancer* 64(3), 428-438.
- ATCC. 2016. RKO. Recuperado de <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2577.aspx>
- ATCC. 2016. MCF-7. Recuperado de <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>
- ATCC. 2016. A-549. Recuperado de <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-185EMT.aspx>
- ATCC. 2016. PC-3. Recuperado de <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx>
- Bailon-Moscoso, N., González-Arévalo, G., Velásquez-Rojas, G., Malagon, O., Vidari, G., Zentella-Dehesa, A., Ratovitski, E., Ostrosky-Wegman, P. (2015) Phytometabolite Dehydroleucodine Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and DNA Damage in Human Astrocytoma Cells through p73/p53 Regulation. *PLOS ONE*. 10(8): e0136527. doi: 10.1371/journal.pone.0136527
- Bass, P. D., Gubler, D. A., Judd, T. C., Williams, R. M. (2013). Mitomycinoid alkaloids: mechanism of action, biosynthesis, total syntheses, and synthetic approaches. *Chemical reviews*, 113(8), 6816-6863.
- Benedí, J., del Río, M. Á. (2006). Fármacos antineoplásicos (I): revisión. *Farmacia Profesional*, 20(2), 60-64.
- Benedí, J., del Río, M. Á. (2006). Fármacos antineoplásicos (y II): revisión. *Farmacia Profesional*, 20(3), 42-46.

- Biocuencias. 2014. *Grias peruviana* (Sachamangua). Recuperado de http://www.conservation.org/global/peru/biocuencias/Documents/Presentaciones%20BioCon/BioCuencas_etnobotanica.pdf
- Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., Woods, C. M. (1995). Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer research*, 55(11), 2325-2333.
- Bruneton, J. (1994). Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. 2nd Edition, Lavoisier Publishing, New York, pp.1-880.
- Cancer Treatment Centers of America (CTCA). 2017. Prostate cancer. Recuperado de <http://www.cancercenter.com/prostate-cancer/>
- Cárdenas, J. I., y Ordóñez, M. B. (2015). Análisis del uso gastronómico de diez plantas tradicionales de la comunidad Shuar del Tiink, parroquia Bomboiza cantón Gualaquiza provincia de Morona Santiago. (Tesis de Licenciado en Gastronomía y Servicios de Alimentos y Bebidas). Universidad de Cuenca. Cuenca.
- Carroll, A. G., Voeller, H. J., Sugars, L., Gelmann, E. P. (1993). p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 23(2), 123-134.
- Casey, P. M., Cerhan, J. R., Pruthi, S. (2008). Oral contraceptive use and the risk of breast cancer. *In Mayo Clinic Proceedings*, 83(1), 86-91.
- Castro, S. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Iseria laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Bogotá (Tesis de Bióloga). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Cháirez-Ramírez, M. H., Moreno-Jiménez, M. R., González-Laredo, R. F., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E. (2016). Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. *EXCLI journal*, 15, 758. doi: <http://doi.org/10.17179/excli2016-642>
- Chan, E. W. C., Baba, S., Chan, H. T., Kainuma, M., Inoue, T., Wong, S. K. (2017). Ulam herbs: A review on the medicinal properties of *Anacardium occidentale* and *Barringtonia racemosa*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(02), 241-247.
- Chauhan, E. S., Tiwari, A., Singh, A. (2016). Phytochemical screening of red cabbage (*Brassica oleracea*) powder and juice-A comparative study. *Journal of Medicinal Plants*, 4(5), 196-199.
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59(1), 16-40.
- Chung, W. S., Allen, N. J., Eroglu, C. (2015). Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9), a020370
- COSMIC. Catalogue of somatic mutations in cancer. 2017. D384MG. Recuperado de <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/sample/overview?name=D384MG>

- Cornejo, X., Mori, S. A. (2012). *Grias angustipetala* and *G. ecuadorica*, two new species of Lecythidaceae from western Ecuador. *Brittonia*, 64(3), 318-324.
- Costa, D. F. (2015). Implementación de protocolos de aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical como base para estudios de regeneración de tejidos (Tesis de Biólogo). ESPOL. Guayaquil.
- Cruz, M. D., Mendiola, A. V., Cruz, I. S. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), 98-107.
- Rodríguez, C., Despaigne Biset, A. E., Beltrán Mayeta, Y. (2013). Factores de riesgo de cáncer de mama en mujeres pertenecientes a un consultorio médico del Centro Urbano "José Martí". *Medisan*, 17(9), 4089-4095.
- Cueva, R. (2014). Determinación del Tipo de Muerte Celular Inducido por la Dehidroleucodina en células de Astrocitoma Cerebral D-384. (Tesis de Bioquímico Farmacéutico). UTPL. Loja.
- Cuevas, R., Rojas, A., Berni, R. (2016). CARACTERIZACIÓN DE CANCER DE COLON. *Cirugía Paraguaya*, 41(1), 8-13.
- Dalila, Z. D., Hafsah, J., Manaf, A. A. (2014). Antioxidant properties and total phenolic content in different development stages of *Barringtonia racemosa* and *Barringtonia spicata* leaves. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 12(5), 449-458.
- de Weger, V. A., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. (2014). Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel—a review. *Anti-cancer drugs*, 25(5), 488-494.
- Delgado, R. C., Rojas, A., Rodrigo, B. (2016). CARACTERIZACIÓN DE CANCER DE COLON. *Revista Virtual de Posgrado-FMUNI*, 1(2).
- DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., Jemal, A. (2014). Breast cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(1), 52-62.
- Donzelli, M., Bernardi, R., Negri, C., Prosperi, E., Padovan, L., Lavielle, C., Brison, O., Scovassi, A. (1999) Apoptosis-prone phenotype of human colon carcinoma cells with a high level amplification of the c-myc gene. *Oncogene*. 18(2). 439–448.
- EcuRed. 2016. Sacha mango. Recuperado de https://www.ecured.cu/Sacha_Mango
- Emyilia, Z. K., Nurulsyuhada, R.S., Izani, N, J, N., Hasmah, A. (2008) Antiproliferative activity of four species of Malaysian 'ulams' towards selected cancer cell lines. *Malay J Med Sci. Suppl*: 147.
- Eurocytology. 2014. Anatomía e histología de la mama. Recuperado de <http://www.eurocytology.eu/es/course/346>
- Fernández-Plaza, S., Sevilla, J., Madero, L. (2004). Tratamiento del cáncer en pediatría: estado actual y expectativas futuras. *Pediatr integral*, 8(6), 501-510.

- Gerth, K., Bedorf, N., HÖFLE, G., Irschik, H., Reichenbach, H. (1996). Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). *The Journal of antibiotics*, 49(6), 560-563.
- González-Sarriás, A., Miguel, V., Merino, G., Lucas, R., Morales, J. C., Tomás-Barberán, F., Álvarez, A. I., Espín, J. C. (2013). The gut microbiota ellagic acid-derived metabolite urolithin A and its sulfate conjugate are substrates for the drug efflux transporter breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP). *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(18), 4352-4359.
- González, M. J., Ribes, A. G., Axpe, C. G. (2008). Tumores cerebrales infantiles: diagnóstico y semiología neurológica. In *Protocolos de neurología. Protocolos de la AEP* (pp. 203-209). Ediciones AEP Madrid.
- Gordillo, G. A., Silva, C. M., Giraldo, C., Ocampo, H. G., Giraldo, J. C., Alegría, L. F., Criollo, W. D. (2016). Citotoxicidad in vitro de la resina Filtek X 350 de la 3M ESPE sobre fibroblastos gingivales humanos. *Ciencia y Salud*, 4(15), 33-41.
- Guamán-Ortiz, L., Tillhon, M., Parks, M., Dutto, I., Prosperi, E., Savio, M., Arcamone, A., Buzzetti, F., Lombardi, P., Scovassi, A. (2014). Multiple effects of berberine derivatives on colon cancer cells. *BioMed research international*, doi:10.1155/2014/924585.
- Gundín, J. S., Suárez, A. I. T., Carballido, A. M. F., Valdivieso, L. M., Hernández, D. B. (2017). Cáncer colorrectal: prevención y tratamiento. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 83(2).
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hassimotto, N. M. A., Genovese, M. I., Lajolo, F. M. (2005). Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2928-2935.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792.
- Hu, L., Song, W., Meng, Y., Guo, D., Liu, X., Hu, L. (2012). Synthesis and structure–activity relationship studies of cytotoxic vinorelbine amide analogues. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 22(24), 7547-7550.
- Huamán, L. K. (2015). Importancia cultural de especies arbóreas empleadas por la comunidad nativa Shampuyacu (San Martín, Perú). (Tesis de Biólogo). Universidad Nacional mayor de San Marcos. Lima.
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). 2015. Quimioterapia. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>

- Jaramillo, A. (2017). Actividad citotóxica y mecanismos de muerte celular de distintas horchatas expendidas en los principales mercados de la ciudad de Loja. (Tesis de Bioquímico Farmacéutico). UTPL. Loja.
- Jave-Suárez, L. F., Ratkovich-González, S., Olimón-Andalón, V., Aguilar-Lemarroy, A. (2015). Modulación de la apoptosis por el virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 53(2). 200-205.
- Kabir, M. Z., Rahman, S. M., Islam, M. R., Paul, P. K., Rahman, S., Jahan, R., Rahmatullah, M. (2013). A Review on a Mangrove Species from the Sunderbans, Bangladesh: *Barringtonia racemosa* (L.) Roxb. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 7(5), 356-372.
- Kalemkerian, G. P., Akerley, W., Bogner, P., Borghaei, H., Chow, L., Downey, R. J., Gandhi, L., Ganti, A., Govindan, R., Greco, J. C., Hayman, J., Suk, R., Horn, L., Jahan, T., Koczywas, M., Loo, B. W., Merritt, R. E., Moran, C. A., Niell, H. B., O'Malley, J., Patel, J. D. (2013). Small cell lung cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11(1), 78-98.
- Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., Matsuoka, T. A. (2010). Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*. Vol (2010). Article ID 453892. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/453892>
- Kerafast. 2017. U-251 MG Glioblastoma Cell Line. Recuperado de <https://www.kerafast.com/product/1790/u-251-mg-glioblastoma-cell-line>
- Kinghorn, A. D., de Blanco, E. J. C., Lucas, D. M., Rakotondraibe, H. L., Orjala, J., Soejarto, D. D., Oberlies, N. H., Pearce, C. J., Wain, M. C., Stockwell, B. R., Burdette, J. E., Swanson, S. M., Fuchs, F. R., Pjelps, M. A., Xu, L., Zhang, X., Shen, Y. Y. (2016). Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. *Anticancer research*, 36(11), 5623-5637.
- Kittakoop, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S. (2014). Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(2), 239-252.
- Kocatürk, B., Versteeg, H. H. (2015). Orthotopic injection of breast cancer cells into the mammary fat pad of mice to study tumor growth. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (96), 51967. doi: <http://doi.org/10.3791/51967>
- Kun, E., Mendeleyev, J., Basbaum, C., Lemjabbar-Alaoui, H. (2013). Treatment of cáncer. U.S. Patent No. 8,377,985. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Jin, Z. (2016). Muscarine, imidazole, oxazole and thiazole alkaloids. *Natural product reports*, 33(11), 1268-1317.

- Lee, A. V., Oesterreich, S., Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7). doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/djv073>
- León J. (1987). Botánica de los cultivos tropicales. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*, San Jose, Costa Rica. (No. 84).
- Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International journal of cancer*, 17(1), 62-70.
- Lindsey, C. Y., Brown, J. E., Torabazar, N. R., Smith, L. A. (2013). EL4 cell-based colorimetric toxin neutralization activity assays for determination of neutralizing antiricin antibodies. *Journal of AOAC International*, 96(1), 147-154.
- Lipińska, L., Klewicka, E., Sójka, M. (2014). The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(3), 289-299.
- López, J., Erazo, M. (2014). Identificación y usos de las principales especies forestales y agrícolas del resguardo indígena Inga Yurayaco. Colombia: Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10596/3447>.
- López, J., Erazo, M. (2015). Identificación y usos de las principales especies forestales y agrícolas del resguardo indígena Inga Yurayaco. (Tesis de Ingeniero Ambiental). UNAD. Iquitos.
- López, M., Anzola, M., Cuevas-Salazar, N., Aguirre, J. M., de Pancorbo, M. M. (2001). p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta médica de Bilbao*, 98(1), 21-27.
- Loraine, S., Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.
- Lozano, P. (2013). Germinación de semillas de *Grias neuberthii* JF Macbride sachamango, sometidos a diferentes tratamientos pre-germinativos. (Tesis de Ingeniero Agrónomo). UNAP. Iquitos.
- Luna, C. (2016). Efecto citotóxico del extracto acuoso de hojas de *Annona cherimola* en una línea celular de cáncer de colon humano en medio de cultivo con pH ácido (Tesis de Licenciado en Laboratorio Clínico). Universidad Nacional de Loja. Loja.
- Moya, G. (2012). Etnobotánica de las comunidades de Puerto Bolívar, Tarapuya, Aboquëhuira y Sototsiaya de la nacionalidad Siona, provincia de Sucumbios, Ecuador. 2004-2005. (Tesis de Ciencias Biológicas y Ambientales). UCE. Quito.
- Mackeen, M. M., Ali, A. M., El-Sharkawy, S. H., Manap, M. Y., Salleh, K. M., Lajis, N. H., Kawazu, K. (1997). Antimicrobial and cytotoxic properties of some Malaysian traditional vegetables (ulam). *International Journal of Pharmacognosy*, 35(3), 174-178.

- Martínez, J. L., Dueñas González, A., Martínez Cedillo, J., Rivera Rubí, L. M. (2007). Cáncer de mama. *Boletín de Práctica Médica Efectiva*. Recuperado de <http://www.insp.mx/nls/bpme>
- Martínez-Torres, A.C., Uscanga-Palomeque, A.C., Rodríguez-Padilla, C. (2016). Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. *OmniaScience*, 269-312.
- Markowitz, S. D., Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449-2460.
- Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W., Thompson, C. B. (2014). *The molecular basis of cancer*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier.
- Mori, S.A. 2002. Lecythidaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S., Bittrich, V., Kameyama, C. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, 2(1), 131-134.
- Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y. S., Nazre, M. (2013). Vinca Alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(11), 1231–1235.
- Muller, P. A., Vousden, K. H. (2013). p53 mutations in cancer. *Nature cell biology*, 15(1), 2-8.
- Muller, P. A., Vousden, K. H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell*, 25(3), 304-317.
- Mussak, R., Bechtold, T. (2009). *Handbook of Natural Colorants*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons. United Kingdom.
- Navarro-Ibarra, M. J., Caire-Juvera, G., Ortega-Vélez, M. I., Bolaños-Villar, A. V., Saucedo-Tamayo, M. (2015). Influencia de los factores reproductivos, la lactancia materna y la obesidad sobre el riesgo de cáncer de mama en mujeres mexicanas. *Nutrición Hospitalaria*, 32(1), 291-298.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H. (2009). Ellagitannins renewed the concept of tannins. In *Chemistry and biology of ellagitannins: An underestimated class of bioactive plant polyphenols*, pp: 1-54.
- OMS. (2017). Cáncer. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Orellana, J. (2014). Estudio de plantas útiles empleadas en la comunidad Shuar El Kiim-Yacuambi de la provincia de Zamora Chinchipe. (Tesis de Ingeniero en Gestión Ambiental). UTPL. Loja. .
- Pérez, et al. M. D. F., Betancourt, S. M. R., Fernández, M. T. (2016). Factores de riesgo modificables en algunos tipos de cáncer. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 41(11).
- Pfeiffer, B., Hauenstein, K., Merz, P., Gertsch, J., Altmann, K. H. (2009). Synthesis and SAR of C12–C13-oxazoline derivatives of epothilone A. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 19(14), 3760-3763.

- Powell, R. G., Weisleder, D., Smith, C. R. (1972). Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*: structure and activity. *Journal of pharmaceutical sciences*, 61(8), 1227-1230.
- Prance, G. T., Mori, S. A. (1979). Lecythidaceae-Part I. The actinomorphic-flowered New World Lecythidaceae (*Asteranthos*, *Gustavia*, *Grias*, *Allantoma* and *Cariniana*). *Flora Neotropica Mon.* No. 21, pp 270.
- Promega. CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. 2012. Technical Bulletin. www.promega.com
- Ragasa, C. Y., Espineli, D. L., Shen, C. C. (2014). Cytotoxic Triterpene from *Barringtonia asiatica*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48(8), 529-533.
- Ramírez Vásquez, P. (2014). Diversidad de la familia Lecythidaceae y su preferencia de bosque en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana, Loreto-Perú. (Tesis de Ingeniero en Ecología). UNAP. Iquitos.
- Ramírez, J. 2014. Patología Maligna de la mama. Recuperado de <http://www.uv.es/~jvramire/apuntes/curs%202011-12/TEMA%20G-15.pdf>
- Rivlin, N., Koifman, G., Rotter, V. (2015). p53 orchestrates between normal differentiation and cancer. *In Seminars in cancer biology*, 32(1), 10-17.
- Sánchez, V. M., Pedraza, N. T., Gonzales, L. L., Silva, C. A., Torres, I. C., Jaimes, K. C., Navarro, M. D. (2015). Conocimientos, actitudes y prácticas de prevención del cáncer de mama. *Ciencia y Cuidado*, 9(2), 43-51.
- Santiak, T., Mario, Y., Tukup, T., Ilda, S. (2013). *Plantas medicinales y su utilidad en el tratamiento de la diarrea en la comunidad Shuin Mamus/Tsuak nupajai tsuamati iija sunkur, írutkamu Shuin Mamusnum* (Tesis de Licenciado en Ciencias de la Educación). Universidad de Cuenca. Cuenca.
- Shama SN, Alekhyia T, Sudhakar K. (2012). Pharmacognostic and phytochemical evaluation of *brassica oleracea* linn var *capitata* f *rubra* (The red cabbage). *Pharm boil*, 2(2):43-46.
- Selvanet. 2010. SachaMango, Mango Silvestre: Grias peruviana. Recuperado de <http://selvanet20.blogspot.com/2010/09/sachamango-mango-silvestre-grias.html>
- Siegel, R., DeSantis, C., Jemal, A. (2014). Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(2), 104-117.
- Sparg, S., Light, M. E., Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2), 219-243.
- Skrypnik, N., Chen, X., Hu, W., Su, Y., Mont, S., Yang, Gangadhariah, M., Wei, S., Falck, J., Jat, J., Zent, R., Capdevila, J., Pozz, A. (2013). PPAR α Activation Can Help Prevent and Treat Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer research*. 74(2), 621–631.

- SOLCA. Sociedad de lucha contra el cáncer Núcleo de Loja. Datos publicados en el 2013: <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/index.jsp>
- Song, W., Hu, L., Meng, Y., Ma, L., Guo, D., Liu, X., Hu, L. (2012). The effect of vindoline C-16 substituents on the biomimetic coupling reaction: Synthesis and cytotoxicity evaluation of the corresponding vinorelbine analogues. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 22(10), 3485-3487.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157-170.
- Tamimi, R. M., Colditz, G. A., Hazra, A., Baer, H. J., Hankinson, S. E., Rosner, B., Marotti, J., Connolly, J. L., Schnitt, S. J., Collins, L. C. (2012). Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 131(1), 159-167.
- Thomas, T. J., Panikkar, B., Subramoniam, A., Nair, M. K., Panikkar, K. R. (2002). Antitumour property and toxicity of *Barringtonia racemosa* Roxb seed extract in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 82(2), 223-227.
- Torres Llanos, Y. X. (2011). *Actividad biológica y aplicaciones terapéuticas en cáncer del compuesto natural pentagaloilglucosa*. (Tesis de Bacteriólogo). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Trease, E.C. and Evans, W.C. 2009 Pharmacognosy. 16th Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, pp.365-650.
- Tropicos. Missouri Botanical Garden. 2017. *Grias neuberthii* J.F. Macbr. Recuperado de <http://www.tropicos.org/Specimen/2636460>.
- Tropicos. Missouri Botanical Garden. 2017. *Lecythidaceae*. Recuperado de <http://www.tropicos.org/Name/42000105?projectid=7>
- Tsizin, Y. S. (1978). New methods for the synthesis of heterocyclic quinones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 14(9), 925-940.
- Ubwa, S.T., Anhwange, B.A. and Chia, J.T. (2011) Chemical Analysis of *Tacca leontopetaloides* Peels. *American Journal of Food Technology*, 6(1), 932-938. <http://dx.doi.org/10.3923/ajft.2011.932.938>
- Ulloa, X. A., Endara, A. (2016). Diversidad de flora vascular del Chocó Andino en el área de Selva Virgen, Ecuador. *Enfoque UTE*, 7(2), 82 - 96.
- Uribe-Clavijo, M., Álvarez-Gómez, Á. M., Arango, V., Cortes-Mancera, F. M., Cadavid-Jaramillo, Á. P., Cardona-Maya, W. D. (2012). Efecto in vitro del extracto vegetal de *Ananas comosus* sobre espermatozoides humanos. *Tecnológicas*, 28(1), 55-70.

- Valderrama, J. A., Ibacache, J. A., Theoduloz, C. (2014). Synthesis and antiproliferative evaluation of new isomeric ellipticine quinones. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(6), 566-574.
- Vázquez-Flores, A. A., Álvarez-Parrilla, E. M., López-Díaz, J. A., Wall-Medrano, A., de la Rosa, L. A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*, 6(2), 84-93.
- Velasco, C. R., Zarco, M. P. (2009). Cáncer de pulmón. *In Anales de Radiología, México*, 8(1), 33-45.
- Velásquez, M. (2013). Determinación del efecto citostático de la Dehidroleucodina en la línea celular de Astrocitoma Cerebral (D-384). (Tesis de Bioquímico Farmacéutico). UTPL. Loja.
- Vélez, P., Oswaldo, K. (2013). Composición florística, estructura y endemismo de un bosque siempre verde de tierras bajas de la Amazonía, en el cantón Taisha, Morona Santiago. (Tesis de Ingeniero Forestal). Universidad Nacional de Loja. Loja.
- Verma, R. P. (2006). Anti-cancer activities of 1, 4-naphthoquinones: a QSAR study. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 6(5), 489-499.
- Vousden, K. H., Prives, C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431.
- Wang, D., Ge, B., Li, L., Shan, J., Ding, Y. (2014). Transition Metal-Free Direct C–H Functionalization of Quinones and Naphthoquinones with Diaryliodonium Salts: Synthesis of Aryl Naphthoquinones as β -Secretase Inhibitors. *The Journal of organic chemistry*, 79(18), 8607-8613.
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W., Hannun, Y. A. (2016). Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 529(7584), 43-47.
- Yang, X., Phillips, D. L., Ferguson, A. T., Nelson, W. G., Herman, J. G., Davidson, N. E. (2001). Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)- α by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER- α -negative breast cancer cells. *Cancer research*, 61(19), 7025-7029.