



Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de Obstetricia y Puericultura
Campus Central

**EFFECTO DE EXTRACTOS DE MITIQUE
(*PODANTHUS MITIQUE*) SOBRE LA VIABILIDAD EN
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA Y
CERVICOUTERINO**

**Tesis para obtener el Grado de Licenciado/a en Obstetricia y
Puericultura**

PROFESOR GUIA: JOAN VILLENA

YARA ESPÍNDOLA MORALES.

MARÍA JAVIERA LÓPEZ ARANCIBIA.

FERNANDA ROBLES ESTRADA.

VALENTINA ROJAS YAÑEZ.

JAVIERA SALINAS TORRES.

SOLANGE VACARREZA CASTRO.

Valparaíso, Chile

2017

Agradecimientos

Queremos enfatizar nuestros agradecimientos a nuestros padres, hermanos, parejas e hijos, quienes fueron y son nuestro pilar fundamental durante el periodo de formación como profesionales, agradecemos su apoyo y confianza. A nuestro tutor Joan Villena, quien nos confió este proyecto, nos guió para llevarlo a cabo, y estuvo presente en todo momento, orientándonos y entregándonos su comprensión y paciencia en los momentos difíciles y construyendo mano a mano un proyecto efectivo. A nuestros docentes académicos de la Universidad de Valparaíso, quienes nos han brindado sus conocimientos, logrando inspirar y reforzar nuestro amor por la Obstetricia, Ginecología y Neonatología a lo largo de los años. Por último, agradecimientos especiales a cada Matrona y Matrón que nos guió como docente clínico en los distintos servicios asistenciales por los que hemos pasado. Destacamos a cada uno de estos profesionales como admirables guías en la hermosa labor, que es la Matronería.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	8
Introducción	10
Pregunta de investigación	14
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos específicos	14
Relevancia y Factibilidad	15
Marco teórico:	17
Cáncer de mama	20
Cáncer cervicouterino	24
Planta: Podanthus mitique	27
Materiales y Métodos	30
Materiales	30
Metodología	30
Diseño de estudio	31
Población: Universo y Muestra	32
Variables	33
Criterios de inclusión y exclusión	35
Técnicas de medición	35
Procedimientos	35
Etapas de investigación	35
Recolección de información	36
Análisis estadístico	36
Limitaciones	37
Resultados	38
Discusión	58
Conclusión	60

Bibliografía

61

Anexos

65

Índice de tablas y gráficos

Resultados	38
Gráfico 1: Histograma con la distribución de los datos correspondientes a MCF-7.	38
Gráfico 2: Histograma con la distribución de los datos correspondientes a HELA	39
Gráfico 3: Histograma con la distribución de los datos correspondientes a CON	39
Prueba Kruskal- Wallis	40
Figura 4: Diagrama caja-bigote de porcentaje de viabilidad de MCF7	40
Figura 5: Diagrama caja-bigote de porcentaje de viabilidad de HELA	41
Figura 6: Diagrama caja-bigote de porcentaje de viabilidad de CON	42
Análisis Descriptivo	42
Gráfico 4: Viabilidad porcentual de células MCF7	43
Gráfico 5: Viabilidad porcentual de células HELA	44
Gráfico 6: Viabilidad porcentual de células CON	45
Prueba Friedman Anova & Kendall's Concordance	46
Figura 7: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en MCF7 expuestas a extracto Hexano	46
Figura 8: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular MCF7 expuestas a extracto Diclorometano	47
Figura 9: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular MCF7 expuestas a extracto Acetato de Etilo	48

Figura 10: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular MCF7 expuestas a extracto Etanol	49
Figura 11: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en HELA expuestas a extracto Hexano	50
Figura 12: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular HELA expuestas a extracto Diclorometano	51
Figura 13: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular HELA expuestas a extracto Acetato de Etilo	52
Figura 14: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular HELA expuestas a extracto Etanol	53
Figura 15: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en CON expuestas a extracto Hexano	54
Figura 16: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular CON expuestas a extracto Diclorometano	55
Figura 17: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular CON expuestas a extracto Acetato de Etilo	56
Figura 18: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular CON expuestas a extracto Etanol	57
Anexos	65
Tabla 1: Promedio, desviación estándar y p Value de Viabilidad porcentual de células MCF7 expuestas a distintas concentraciones de extractos	70
Tabla 2: Promedio, desviación estándar y p Value de Viabilidad porcentual de células HELA expuestas a distintas concentraciones de extractos	71
Tabla 3: Promedio, desviación estándar y p Value de Viabilidad porcentual de células CON expuestas a distintas concentraciones de extractos	72

EFFECTO DE EXTRACTOS DE MITIQUE (*PODANTHUS MITIQUE*)
SOBRE LA VIABILIDAD EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE
MAMA Y CERVICOUTERINO

PROFESOR GUIA: JOAN VILLENA

YARA ESPÍNDOLA MORALES.

MARÍA JAVIERA LÓPEZ ARANCIBIA.

FERNANDA ROBLES ESTRADA.

VALENTINA ROJAS YAÑEZ.

JAVIERA SALINAS TORRES.

SOLANGE VACARREZA CASTRO.

VALPARAÍSO, CHILE

RESUMEN

- **Antecedentes:** La planta *Podanthus mitique* conocida como palo negro, endémica de la zona central de Chile, desde Coquimbo hasta Concepción, que es usada tradicionalmente por la medicina del pueblo Mapuche para enfermedades relacionadas con las vías urinarias, estómago y riñones, y también se utiliza como remedio contra la gonorrea.
- **Hipótesis:** El extracto de la planta *Podanthus mitique* disminuye la viabilidad celular de las líneas celulares HELA de cáncer cervicouterino y MCF7 de cáncer de mama, resultando beneficioso como tratamiento complementario al convencional.
- **Materiales y métodos:** Se evaluó la disminución en la viabilidad celular en cultivos de células HeLa y MCF7, siendo respectivamente de cáncer cervicouterino y de mama, expuestos a los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol.
- **Resultados:** La citotoxicidad más elevada en la línea celular HeLa la presentó el extracto diclorometano a una concentración de 50 µg/ml, mientras que en la línea celular MCF7 los extractos, Diclorometano y Acetato de Etilo presentan los mejores resultados a bajas concentraciones. La citotoxicidad más baja en ambas líneas fue el etanol en sus distintas concentraciones. Se utilizó una línea de control de células de epitelio de colon no tumorales, CCD 841 CON, en la cual los extractos acetato de etilo y hexano presentan citotoxicidad en las mayores concentraciones (50µg/ml, 25µg/ml y 12,5µg/ml), en el extracto diclorometano a la concentración de 2,5 µg/ml se observa una baja viabilidad. Extracto etanol no presenta citotoxicidad en las diferentes concentraciones.
- **Conclusiones:** El tratamiento con *Podanthus Mitique* disminuyó la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino. A pesar de cumplir con la hipótesis establecida, se demostró que presentaba citotoxicidad en células cancerígenas y a su vez en las células control.

PALABRAS CLAVES:

- **MCF-7:** Línea celular de cáncer epitelial usada ampliamente, derivada del adenocarcinoma de pecho.
- **HELA:** Linaje celular humano más antiguo de cáncer cervicouterino, pertenece a una paciente llamada Henrietta Lacks, y el acrónimo de la línea celular se debe a las iniciales de su nombre.
- **CCD 841 CON:** Línea celular de origen epitelial, correspondiente a tejido de colon.
- **Podanthus Mitique:** Planta endémica de la zona central de Chile, más conocida como “Palo negro”, es un arbusto con abundantes inflorescencias amarillas que puede alcanzar hasta los dos metros y medio de altura.

Nuestro país, al igual que el resto de la población mundial, ha experimentado un proceso de envejecimiento demográfico acelerado y sin precedentes históricos (INE,2017), la esperanza de vida al nacer es mayor que la de hace un siglo, e incluso sigue aumentando año a año en países en vías de desarrollo. Según datos demográficos aportados por el INE actualmente Chile tiene una esperanza de vida de 82,2 años, siendo la mayor de América latina. Estas cifras seguirán en aumento, llegando a los 83,36 años de vida, en el año 2020. Es por esto, que también el perfil epidemiológico de la población, en la mayoría de los países, ha cambiado, la población se ha ido envejeciendo provocando un aumento en las enfermedades crónicas, características de la tercera edad (*Vio F, Albala C. 2000*).

De igual forma, las enfermedades han ido evolucionando a lo largo de la historia, mientras unas ya han sido erradicadas, otras prevalecen en el tiempo. Un ejemplo de estas, es el cáncer, enfermedad que se ha convertido en una amenaza constante para todos los seres humanos, influyendo de manera significativa la calidad de vida de la población afectada. Si bien el cáncer es una patología que no discrimina edad, afecta en mayor medida a la población adulta y adulta mayor.

Esta patología es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, en el año 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos y se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones. Pese a esto y a los avances tecnológicos, aún no se ha podido dar solución, siendo una de cada seis defunciones en el mundo atribuibles a esta enfermedad (OMS, 2017)

Hay que tener en cuenta el aspecto psicosocial que rodea a los pacientes con cáncer, ya que significa un gran cambio en sus vidas. El impacto del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de este, provoca una serie de respuestas psicológicas y sociales en el paciente que varían en grado e importancia, y que están relacionadas

con determinadas variables personales y clínicas. Dentro de los problemas que los pacientes oncológicos refieren con mayor frecuencia, se encuentran la ansiedad, depresión, falta de energía, disfunciones sexuales, dificultades laborales, y sentimientos de soledad (Leinster, 1994; Derogatis, Morrow, Fetting, Penman, Piasetsky, Schemale A. M et al.1983; Holland, 1989; Tross, Holland 1989; Spiegel, 1990; Maher, Mackenzie, Young y Marks, 1996). Sumado a esto, los tratamientos existentes son invasivos, costosos y sus efectos colaterales afectan en múltiples ámbitos la calidad de vida de la persona por ende deben ser tomados en cuenta.

Es por esto, que surge la necesidad de reinventarse e ir descubriendo nuevas formas de combatir y evitar las diferentes patologías. Es bien conocida la dependencia absoluta de la farmacia con respecto a su entorno natural y lo que éste le puede brindar. Desde tiempos inmemoriales las plantas han sido utilizadas con fines medicinales, a pesar de que el descubrimiento de sus propiedades curativas haya sido, en muchos casos, mera coincidencia. Es importante recalcar que, en la actualidad, la medicina tradicional ha desplazado en gran medida el uso de plantas medicinales en el tratamiento de diversas patologías, incluido el cáncer, enfocándose en el uso de sus principios activos.

Gran parte los medicamentos utilizados actualmente provienen indirectamente de los recursos brindados por la naturaleza. Y decimos indirectamente porque si bien el arsenal terapéutico actual está conformado por productos procedentes de los tres reinos de la naturaleza; vegetal, animal y mineral, con predominio del primero, la farmacia actual ha sido capaz de extraer los principios activos de plantas medicinales, dejando de lado, el uso de las plantas como tal, ya sea en infusiones, ungüentos, aceites, etc (*de Sagrera, J. E, 2005*).

Como no siempre se dispone de la tecnología necesaria para obtener los fármacos que existe en el entorno, y no todos son ricos en plantas medicinales que puedan ser explotadas, se hace imprescindible, que las sociedades en fases de mayor desarrollo intercambien medicamentos de sus respectivos territorios, para ampliar el gran arsenal farmacológico mundial.

En consecuencia, no se aprovechan al máximo las posibilidades farmacéuticas del entorno, y aún queda mucho por investigar, descubrir, y desafortunadamente muchas enfermedades que curar. En Chile, carecemos de la economía y por ende de la tecnología para fomentar el desarrollo científico, por lo que existe un vacío de conocimientos sobre los beneficios escondidos en nuestros ecosistemas. Teniendo la ventaja, incluso, de contar con diferentes climas, y por ende variedad de entornos (Belov, M. 2005-2012).

Si reconsideramos los beneficios medicinales de la flora, como país nos vemos favorecidos por ello, ya que, la flora en Chile es diferente si se compara con la de otros países. Se estima que en Chile hay solamente 5000 ó 6000 especies diferentes, lo que hace que Chile parezca pobre en biodiversidad en comparación con algunas de sus contrapartes tropicales, como Brasil. Pero esta primera impresión no es correcta, ya que la adaptabilidad, singularidad y utilidad de las plantas chilenas las hace destacar a nivel mundial (Belov, M. 2005-2012).

En resumen, el entorno es capaz de modular la farmacia y está de transformar la sociedad. Cuanto más rica es la farmacia, más aumenta la longevidad, mejora la calidad de vida, y se producen cambios demográficos, económicos y sociales de gran trascendencia. Así como también, lo hacen los nuevos estilos de vida adoptados por la sociedad a nivel mundial. Cambios que han facilitado la permanencia del ser humano en la tierra, al aumentar las comodidades, tecnología y por ende la calidad y esperanza de vida (de Sagrera, J. E, 2005).

De acuerdo a lo mencionado, surge la siguiente pregunta, ¿Chile tendrá entre sus recursos, una planta medicinal que tenga la propiedad de curar esta temida enfermedad?, o al menos tener beneficios que sean complementarios a las terapias convencionales del cáncer. Para poder dar respuesta procuraremos determinar si la planta chilena de nombre común mitique "*Podanthus mitique*" podría responder a nuestras expectativas, viendo su efecto en líneas celulares de cáncer de mama y cérvicouterino.

En Chile se ha comenzado a comercializar esta planta en forma de infusiones, aludiendo a que posee efectos contra algunos tipos de cáncer, pero se desconoce una fuente confiable que asegure y demuestre resultados favorables.

Con respecto a esta investigación, es importante saber por qué trabajar con el cáncer de mamas y el cáncer cervicouterino. Ambas patologías están en aumento, afectando en gran medida la salud de las mujeres y son los profesionales matronas y matrones quienes poseen las competencias necesarias para atender y mejorar la salud sexual y reproductiva de la mujer a lo largo de todo su ciclo vital. Teniendo un rol importante a la hora de aplicar medidas de detección, control y seguimiento de cánceres ginecológicos. Es por esto que como futuros profesionales no podemos quedar exentos a la hora de mejorar la calidad de vida de las mujeres que los padecen.

A pesar de que existen muchos estudios e investigaciones sobre el cáncer en general y específicamente los tipos de cáncer incluidos en esta tesis, estos incluyen los mismos tratamientos convencionales. Se pueden encontrar datos de otros tipos de tratamientos alternativos, siendo las plantas medicinales las más estudiadas. Sin embargo sólo con datos empíricos y sin un estudio real sobre ello.

Actualmente, existen pocos estudios enfocados en esta temática. Por esta razón, esta investigación significaría un gran avance, ya que los resultados y conclusiones que se obtendrán serán un aporte de nuevos conocimientos en los tratamientos utilizados actualmente en el cáncer de mama y cervicouterino y pueden hacer de esta investigación un impulsor para nuevos estudios similares.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Qué propiedades tiene el extracto natural de *Podanthus Mitique* en líneas celulares de Cáncer de Mamas y Cáncer Cervicouterino?

HIPÓTESIS:

El extracto de la planta *Podanthus mitique* disminuye la viabilidad celular de las líneas celulares HELA de cáncer cervicouterino y MCF7 de cáncer de mama, resultando beneficioso como tratamiento complementario al convencional.

OBJETIVO GENERAL

Investigar los efectos de los extractos de *Podanthus mitique* sobre el crecimiento de las líneas celulares de Cáncer de mama y Cáncer cervicouterino (líneas MCF7 y HELA respectivamente).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudiar los efectos de cada extracto *Podanthus mitique* sobre las líneas celulares de Cáncer de mama y Cáncer cervicouterino (líneas MCF-7 y HELA respectivamente).
- Determinar la concentración de extracto de *Podanthus mitique* con mayor efectos beneficiosos sobre las líneas celulares MCF-7 en Cáncer de mama y HELA en Cáncer cervicouterino.
- Contrastar los efectos de la planta *Podanthus mitique* sobre el crecimiento de las líneas celulares de Cáncer de mama y Cáncer cervicouterino (líneas MCF-7 y HELA respectivamente) con los tratamientos entregados por GES; cirugía, radioterapia y quimioterapia.

RELEVANCIA

Nuestra investigación se realiza en líneas celulares MCF-7 y HELA siendo células de cáncer de mama y cervicouterino respectivamente, resultando importante evidenciar si la planta *Podanthus Mitique* presenta efectos positivos en estas células, debido al importante número de casos existentes de estos cánceres. Si bien hoy en día existen diversos tratamientos farmacológicos que buscan erradicar, atenuar o impedir que el cáncer se expanda, nuestra intención es encontrar un tratamiento que se pueda complementar con los tratamientos convencionales. Y es por esto, que se ha decidido estudiar la *P. mitique* ya que los estudios realizados anteriormente sobre esta planta son escasos. Además queremos incentivar a realizar más estudios de esta temática, con la finalidad de encontrar nuevos tratamientos mejorando la calidad de vida de estas personas, incluso prolongando su vida.

FACTIBILIDAD

Viabilidad legal: Esta investigación no requiere aprobación desde el Comité de Ética, debido a que los datos han sido recopilados a través de la experimentación en líneas celulares humana de utilización frecuente en investigación científica para estudiar el comportamiento celular.

Técnica: Es un tipo de estudio que no requiere la realización de terapia ni intervención directa hacia los pacientes por parte de los realizadores de la tesis, sino más bien requiere de experimentación in vitro sobre las líneas celulares. En esta investigación se utilizan variables capaces de ser definidas y medidas con precisión. Además de conocimientos y manejos de programas de análisis estadístico como el Statistica 7, Excel, entre otros.

Recursos: No hay intereses monetarios y se cuenta con el tiempo suficiente para la realización del estudio. Se cuenta con la disponibilidad de laboratorio perteneciente

a la Universidad de Valparaíso, la cual nos otorga los materiales y lugar físico para poder desarrollar la investigación. Además se dispone de terceras personas, profesionales del laboratorio, para preparar las líneas celulares utilizadas posteriormente en el estudio.

Gestión: Es la conexión entre las alumnas de IV año de Obstetricia y Puericultura con el profesor guía y a su vez la coordinación con personal del laboratorio del Edificio Bruno Günther, perteneciente a las dependencias de la Universidad de Valparaíso.

Institucional: Aporte a la carrera y a la Universidad de Valparaíso fortaleciendo y fomentando el área de investigación.

MARCO TEÓRICO:

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas en las que se observa un proceso descontrolado en la división de algunas células del cuerpo. Puede comenzar de manera localizada y diseminarse a otros tejidos circundantes (NCI, 2015).

El proceso por el cual las células del cáncer se diseminan a otras partes del cuerpo se llama metástasis. En la metástasis, las células cancerosas se separan del sitio donde se formaron inicialmente (cáncer primario), se desplazan por medio del sistema vascular o linfático, y forman nuevos tumores (tumores metastásicos) en otras partes del cuerpo (Muñoz, A. 1997)

Con el paso de los años el aumento exponencial de la morbi-mortalidad causada por el cáncer ha sido tal, que esta patología, y cualquiera de sus variedades, es la primera causa de muerte en el mundo, según la OMS, constituyendo un gran problema de salud pública para las naciones (IARC, 2014).

Existe evidencia científica, de momias egipcias afectadas por tumores malignos, siendo estos su causa de muerte. Es decir, el cáncer ha estado presente durante la mayor parte de la historia de la humanidad, sin embargo, recién ahora, hace unos cuantos años, es que la población le ha tomado el peso y la importancia que merece tal afección.

En Chile, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades del sistema circulatorio, con 24.582 defunciones durante el 2011 y una tasa de mortalidad de 142,52 por cada 1.000 ciudadanos. (*Indicadores Básicos de Salud, IBS 2013*).

El cáncer es una enfermedad causada por cambios en los genes que controlan la forma como funcionan nuestras células, especialmente la forma como crecen y se dividen. Los cambios en el material genético que causan cáncer pueden heredarse de los padres (Los que corresponden al 5-10% de los cánceres). Pueden suceder

también en la vida de una persona como resultado de errores que ocurren al dividirse las células o por el daño del ADN causado por algunas exposiciones del ambiente. Los factores ambientales que causan cáncer son los compuestos químicos como los presentes en el humo de tabaco, en las radiaciones de los rayos ultravioleta del sol y en algunos vectores biológicos (NCI, 2015).

Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer tienden a afectar tres tipos principales de genes y su regulación. (Muñoz, A. 1997)

- Los proto-oncogenes se asocian al crecimiento y división celular normal. Sin embargo, cuando estos genes se alteran en ciertas maneras o son más activos de lo normal, pueden convertirse en genes causantes de cáncer (u oncogenes), al permitir a las células que crezcan y sobrevivan cuando no deberían.
- Los genes supresores de tumores se dedican a controlar el crecimiento y la división celular. Las células con algunas alteraciones en los genes supresores de tumores pueden dividirse de forma descontrolada.
- Los genes reparadores del ADN se asocian a la recuperación del ADN dañado. Las células con alteraciones en estos genes tienden a formar mutaciones adicionales en otros genes. Juntas, estas mutaciones pueden causar que las células se vuelvan cancerosas.

Los distintos tipos de cáncer reciben, en general, el nombre de los órganos o tejidos en donde se forman. También pueden clasificarse o describirse según el tipo de célula que afecta, células epiteliales o células escamosas (NCI, 2015).

Los carcinomas son los tipos más comunes de cáncer. Se forman en las células epiteliales, las cuales cubren las superficies internas y externas del cuerpo. A su vez los carcinomas que empiezan en diferentes tipos de células epiteliales tienen nombres específicos:

- El adenocarcinoma es un cáncer que se forma en las células epiteliales que producen fluidos o mucosidad.

- El carcinoma de células escamosas es un cáncer que se forma en las células epiteliales que están debajo de la superficie exterior de la piel.

Además, es importante saber que los tratamientos que se entregan públicamente en Chile, es decir, que están cubiertos por el plan GES, son sólo tres; cirugía para extirpar el tumor, radioterapia y quimioterapia para atacar a las células cancerígenas. Estas terapias son altamente invasivas, inmunodeprimentes, y dejan grandes secuelas en el cuerpo a nivel sistémico, generando desgaste físico y mental, y por ende un gran impacto emocional para la persona y su entorno familiar.

Es el cáncer originado en las células de las mamas, comúnmente formando tumores. Y se puede clasificar según su origen; ductales o lobulillares. El carcinoma ductal inicia en los conductos presentes en la mama, donde puede ser carcinoma ductal in situ (CDIS) el cual se limita a los conductos lácteos y carcinoma ductal invasivo (CDI) o infiltrante, en el cual se invaden tejidos mamarios fuera del conducto, se puede propagar a los ganglios linfáticos y así llegar a otras partes del organismo. Siendo este último, el más común de los cánceres de mama. El carcinoma lobulillar comienza en los lobulillos los cuales producen la leche. El carcinoma lobulillar o lobular in situ (CLIS) existe proliferación celular, pero no se extiende más allá del lobulillo. El carcinoma lobulillar invasivo (CLI) se expande fuera de los lobulillos de la mama, invadiendo tejido circundante, siendo este, el segundo tipo más común después del carcinoma ductal invasivo. (*Organización del Cáncer de Mama, 2016*).

El cáncer de mama constituye un problema de salud pública y es la primera causa de incidencia y mortalidad por cáncer en la mujer adulta en Latino-américa y en el mundo (Knaul, et al 2009). Según la OMS, el 2012 generó 153.000 muertes a nivel mundial. Sobre su incidencia, en cambio, 1 de cada 8 mujeres tendrá cáncer de mama a lo largo de su vida. (*Asociación Española Contra el Cáncer*).

A pesar de los datos, las políticas públicas parecen no ser suficientes para abordar de manera efectiva el problema, ya que la mortalidad por esta causa ha ido en aumento, más que en disminución. Así, se conmemoró el 19 de Octubre como el día del Cáncer de Mama a nivel mundial y a Octubre como el mes para hacer un llamado a concientizar a las personas sobre su relevancia, quienes muchas veces ven esta enfermedad como algo distante, no realizándose los exámenes de pesquisa a tiempo, lo que también es una causa importante de alta mortalidad.

La tasa de Años de Vida Potenciales Perdidos (AVPP) por cáncer de mama en la mujer es de 100 por 100.000, ocupando el segundo lugar después de cáncer cervicouterino. (*Guía Clínica Minsal, Cáncer de Mamas, 2010*).

Otra forma de clasificación es según los receptores activos que poseen sus células cancerígenas:

- RE +: Contienen receptores de estrógeno, y son referidos ,a menudo, como cánceres positivos para receptores de estrógeno y por tanto su crecimiento se ve favorecido por esta hormona.
- RP +: Son aquellos con receptores de progesterona, y se les denominan cánceres positivos para receptores de progesterona y su crecimiento se debe a la acción de prostágenos.
- Receptor Hormonal Positivo: Este término se aplica para cualquiera de los sucesos anteriores, siendo sólo de uno o de ambos. Tienen buen pronóstico, ya que pueden tratarse con hormonoterapia durante muchos años, impidiendo el progreso del cáncer.
- HER 2/ neu +: Los que contienen una cantidad muy elevada de una proteína promotora del crecimiento llamada HER2/neu. El gen HER2/neu instruye a las células a producir esta proteína. Esto no se da en el CDIS.
- Triple positivo: El cáncer de mama es positivo para receptores HER 2/neu, receptores de estrógenos y receptores de prostágenos.
- Triple negativo: En este cáncer no existen receptores de ningún tipo mencionado anteriormente. Tienen peor pronóstico, pues avanzan muy rápidamente. (*American Cancer Society, 2016*).

Para pesquisar esta patología, en Chile, se realizan según el GES, mamografías cada dos años a mujeres entre 50 y 74 años. Esto excluye completamente a mujeres que pueden tener antecedentes familiares por la línea materna de cáncer de mama a edades tempranas, además, de las mujeres de más de 74 años, que de igual forma necesitan realizarse un examen preventivo. Esto dificulta un diagnóstico

temprano y por ende un buen pronóstico. (*Guía Clínica Minsal, Cáncer de Mamas, 2010*).

Estadios del cáncer de mama

Los estadios del cáncer de mama van del estadio 0 al IV, los cuales tienen subclasificaciones, donde a medida que se avanza en los estadios, aumenta la gravedad del cáncer. En el **estadio 0** se encuentran los cánceres de mama considerados no invasivos: CDIS y CLIS, los cuales no se han propagado a ganglios linfáticos o áreas distantes. El **estadio I** se subdivide en IA, en el cual el tumor mide hasta 2 cm, sin propagarse a ganglios linfáticos y IB donde el tumor no se detecta y los ganglios presentan pequeñas células cancerígenas o presenta un tumor menor a 2 cm, con presencia de células cancerígenas en ganglios linfáticos, pero sin extensión a otras partes del organismo. El **estadio II** se divide en IIA y IIB, donde puede o no presentarse tumor, el cual mide entre 2 a 5 cm, y pueden o no estar presentes células cancerígenas en ganglios, pero sin propagarse a sitios distantes. El **estadio III** se divide en IIIA, IIIB y IIIC, en este estadio puede o no haber tumor, el cual puede ser de tamaño variable, se involucran una mayor cantidad de ganglios axilares y puede propagarse a la pared torácica o a la piel de la mama. El **estadio IV** el cáncer se ha diseminado, afectando más allá de la mama y ganglios linfáticos cercanos, se ha propagado a otros sitios del organismo. (*Organización del Cáncer de Mama, 2016*)

Los tratamientos utilizados actualmente contra el cáncer de mamas son:

- Cirugía conservadora: tumorectomía o mastectomía parcial.
- Mastectomía total.
- Quimioterapia adyuvante.
- Radioterapia adyuvante post cirugía conservadora.
- Disección axilar en presencia de ganglios centinelas (es el primer o primeros ganglios o linfonodos que reciben drenaje linfático desde el tumor (*Acevedo*)).

- Terapia endocrina adyuvante, utilizándose tamoxifeno, siendo un antiestrogénico, el cual bloquea los receptores de estrógeno, previniendo la unión de este al receptor (Vademecum, 2015). Es administrado en mujeres de alto riesgo de cáncer de mama por un periodo de cinco años, en los distintos estadios del cáncer y también puede ser administrado como tratamiento paliativo.
- Terapia anti-HER2 con trastuzumab. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante, obtenido por medio de ingeniería genética (Minsal, 2016). Este tratamiento ha sido eficaz en pacientes HER2 positivo y cuando hay una sobreexpresión de HER2.
- Supresión ovárica con terapia endocrina en mujeres premenopáusicas HER2 (-) y receptores hormonales (+) utilizada en cáncer diseminado.

(Minsal, Cáncer de Mama, 2015)

El cáncer cervicouterino comienza en las células de la superficie del cuello del útero, la parte inferior del útero que desemboca en la parte superior de la vagina. Este es el segundo cáncer más frecuente en mujeres en el mundo, con 86% de los casos y 88% de las muertes en países en vías de desarrollo. Es la causa más importante de años de vida perdidos (por cáncer) entre las mujeres de América Latina y el Caribe, donde se concentra 13% de los casos y 12% de las muertes que ocurren anualmente en el mundo. Números altos a pesar de que hoy en día se puede prevenir y tratar (*Reyes, Y, et al, 2014*).

En Chile, el año 2012 fallecieron 584 mujeres, ocupando el cuarto lugar entre las muertes por cáncer en la mujer. De acuerdo a las estadísticas oficiales del Ministerio de Salud, la tasa de mortalidad ajustada en el año 2012 fue de 5,58 por 100.000 mujeres. (*Guía Clínica Minsal, Cáncer Cervicouterino, 2015*). Además representa el primer lugar en tasa de años de vida potencialmente perdidos con 129 por 100.000 mujeres (*Guía Clínica Minsal, Cáncer Cervicouterino, 2010*).

Existen 2 tipos de células en la superficie del cuello uterino: escamosas, ubicadas en el exocérvix y glandulares, en el endocérvix. Aproximadamente un 80% a 90% de los cánceres de cuello uterino son carcinomas de células escamosas, la mayoría de los casos restantes son adenocarcinomas, es decir, en células glandulares. Con poca frecuencia se generan carcinomas adenoescamosos o carcinomas mixtos, los que presentan características de ambas células ubicadas en el cérvix. (*American Cancer Society, 2016*.)

El virus del papiloma humano (VPH) ha sido reconocido como agente causal del cáncer cervicouterino, el cual se transmite principalmente por contacto sexual (*Organización Mundial de la Salud, 2016*). Este virus presenta más de 120 tipos, solo algunos de estos pueden provocar cáncer, como lo son los virus del papiloma humano de alto riesgo (HR-VPH) los que son clasificados como potencialmente oncogénicos, debido a que han sido asociados al 99% de las cánceres cervicales.

Otras pueden causar verrugas genitales e incluso no ocasionar ningún problema. El desarrollo del cáncer cervical generalmente es lento, presenta una fase pre-maligna, la cual se puede detectar por medio de una prueba citológica de células del cérvix exfoliadas: Papanicolaou (PAP). Esta fase pre- maligna se puede clasificar mediante la anormalidad histológica que presenta, displasia leve, moderada y severa o carcinoma in situ. (*Zaldívar Lelo de Larrea, et al. 2012*)

Sin embargo, la mortalidad por cáncer cérvico uterino disminuyó un 67,28 % entre 1990 y 2012 por su lenta evolución y el aumento en los exámenes de papanicolau. Se espera que siga disminuyendo aún más, gracias a la vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH) del tipo 16 y 18, cepas del virus más agresivas y generadores de cáncer, que se administra de manera gratuita a todas las niñas de 4° y 5° básico (primera y segunda dosis), edades escogidas para asegurar que no estén ya contagiadas, pues no han iniciado actividad sexual. (*Guía Clínica Minsal, Cáncer Cervicouterino, 2015*).

Estadios del Cáncer Cervicouterino según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

Los estadios según la FIGO van del I al IV, presentando divisiones dentro de cada etapa: En el **estadio I**, el carcinoma se encuentra en el cuello uterino, sin expandirse fuera del útero, ni ganglios linfáticos, ni a otro sitios. El estadio I se divide en IA: IA1 y IA2, IB: IB1 y IB2, en donde IA no supera los 5 mm de profundidad y 7 mm de ancho y IB donde se puede observar sin microscopio la lesión menor o mayor a 4 cm. En el **estadio II** el carcinoma se ha extendido más allá del cuello uterino, pero sin alcanzar la pared pélvica, afectando los dos tercios superiores de la vagina. Se divide en IIA y IIB, IIA no están comprometidos los parametrios, es decir los tejidos que sostienen el útero (*Jiménez, et al. 2004*) y IIB hay un compromiso evidente de los parametrios. En el **estadio III** el carcinoma se extiende a la pared pélvica, afecta el tercio inferior de la vagina, se incluyen los casos que presentan hidronefrosis o falla de función renal. Se divide en IIIA, en el cual no se extiende a la pared pélvica pero si al tercio inferior de la vagina, y IIIB que se extiende a pared pélvica, presenta hidronefrosis o falla de función renal. Y el **estadio IV** se ha

expandido fuera de la pelvis verdadera o compromete mucosa vesical o rectal. Se divide en IVA en el cual el cáncer se ha diseminado a órganos pélvicos adyacentes y IVB se encuentra diseminado a órganos distantes. (*Schorge, et al. 2008*)

Tratamientos (Guía Clínica Minsal, CaCu, 2015).

- Histerectomía.
- Se puede agregar linfadenectomía (extirpación de los ganglios linfáticos cercanos al área del tumor).
- Traquelectomía (Cirugía para extirpar el cuello del útero, el tejido y los ganglios linfáticos cercanos, así como la parte superior de la vagina).
- Braquiterapia o radioterapia interna en contraindicación de cirugía.
- Conización (cirugía para extraer una muestra de tejido anormal del cervix).
- Radio-quimioterapia con cisplatino.
- Tratamientos paliativos (analgesicos, radioterapia paliativa).

(*Guía clínica AUGE, Cáncer Cervicouterino MINSAL 2015*) (*NIH-Instituto Nacional de Cáncer, EE.UU, Traquelectomía y Linfadenectomía Definición*) (*Medline Plus, Biblioteca Nacional Médica de los EE.UU, definición conización*)

*Los medicamentos en quimioterapia que se utilizan con más frecuencia para tratar el cáncer de cuello uterino avanzado según *American Cancer Society* incluyen:

- Cisplatino: Inhibe la síntesis del ADN produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas de ADN. La síntesis de proteínas y ARN es inhibida en menor grado, también ofrece propiedades inmunosupresoras, radiosensibilizantes y antibacterianas. (*Vademecum 2015*)
- Carboplatino: fármaco antineoplásico relacionado con el cisplatino, con un perfil más favorable que éste en lo que se refiere a las reacciones adversas. (*IQB, instituto químico biológico 2013*).
- Topotecán: actúa produciendo la inhibición de la enzima topoisomerasa-I que está implicada en el desenrollamiento del ADN, dificultando así la división y multiplicación de las células neoplásicas. (*Vademecum 2015*)
- Paclitaxel.

A partir de los tratamientos expuestos anteriormente, es necesario hablar sobre la planta que se expone como una alternativa para tratar estas patologías. Nos hemos querido centrar en una planta chilena para investigar su posible propiedad curativa sobre el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino, considerando que se le conocen muchas otras propiedades sanadoras; la *Podanthus mitique*, planta endémica de la zona central de Chile que crece desde Coquimbo hasta Concepción. Florece entre Septiembre y Enero. Crece en zonas expuestas al sol y puede alcanzar una altura de hasta dos metros y medio, es un género de plantas fanerógamas, lo que quiere decir que producen semillas (*Chileflora*, 2006). Pertenece a la familia Podanthus, que abarca a la *Podanthus Ovatifolious* (Ovatifolia) y *Mitiqui* (Mitique).

Se escogió esta planta porque de acuerdo a estudios hechos anteriormente, se ha demostrado que el extracto de *P. mitique* muestra actividad antitumoral y antibacteriana, el componente químico presente en esta especie de planta, lactona sesquiterpénica, tipo de compuesto químico terpenoide (compuesto orgánico derivado del isopreno) presente en algunos taxones de plantas, del tipo germacreno, clase de hidrocarburos orgánicos volátiles, específicamente sesquiterpénicos, en una investigación presentó actividad antineoplásica y efectos citotóxicos mediante la modificación de la cinética de proliferación de las células de los eritrocitos medulares de ratón (*Bhakuni et al. 1074, Bhakuni et al. 1976, Silva et al. 1999*).

Posee características antibióticas, antihelmínticas, es un diurético natural y ayuda a los trastornos urinarios (*Montenegro et al 1994*). En la medicina originaria del pueblo mapuche, la *P. mitique* o “palo negro”, como es conocida, es usada principalmente para enfermedades relacionadas con las vías urinarias, estómago y riñones, y también se utiliza como remedio eficaz contra la gonorrea. (*Roa, 2013*)

A pesar de que se conocen varias de sus propiedades, aún es poco para confirmar que esta planta podría ser una alternativa de tratamiento para los tumores en

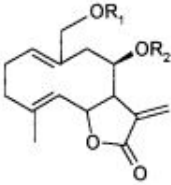
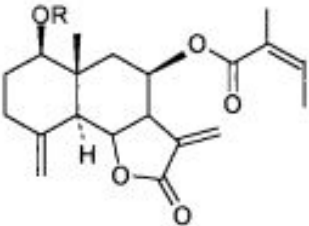
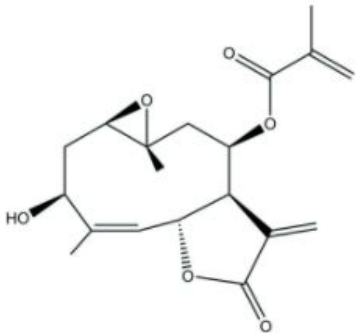
estudio. Una investigación realizada en nuestro país perteneciente a la Universidad de Concepción, arrojó resultados favorables sobre el compuesto Acetato de Ovatifolina de la *Podanthus Ovatifolia*.

Estos resultados mostraron que el Acetato de Ovatifolina es un agente citotóxico con capacidad de modificar la proliferación de células de médula ósea y es un agente clastogénico capaz de inducir micro núcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón. (Alarcón M, Weigert G, Duk S, García M d I A , 1992).

En un estudio anterior al mencionado en el primer párrafo, se investigaron las lactonas sesquiterpénica de nuestra planta en estudio, se encontraron dos nuevos tipos que dieron el pie para investigar más estas lactonas: diacetylovatifolin (Ver figura 1) y arturin (Ver figura 2), las cuales mostraron actividad citotóxica (*Hoeneisen et al. 1980*), entonces podemos decir que esto fue el punto de partida para pensar que los extractos de *P. mitique* pueden tener alguna propiedad antineoplásica y por consiguiente ser una buena alternativa de tratamiento para el cáncer cervicouterino y de mama, partiendo de la base que los tratamientos actuales son altamente invasivos, ofreciendo una opción más natural y que no deteriore tanto a la persona ni a su calidad de vida.

Otra lactona presente en esta planta es la erioflorin (Ver figura 3), la cual además ha sido aislada de otra planta familia de *P. mitique*, *Podanthus Ovatifolius*. Esta lactona tiene una poderosa actividad citotóxica por la estabilización del supresor tumoral Pdc4 mediante la inhibición de su interacción con el E3-ligasa β TrCP 1 e interfiere con el ciclo de progresión y proliferación celular de las células tumorales (*Blees et al., 2012*).

En nuestra investigación trabajaremos con células tumorales y células control no tumorales. Las primeras pertenecientes a cáncer de mama y cervicouterino y las últimas de colon. Esto nos permitirá ver el efecto citotóxico del extracto de mitique sobre células tumorales y células control, y así poder comparar nuestros resultados basados en la viabilidad.

 <p>ovatifolin 3 ($R_1 = \text{Ac}$; $R_2 = \text{H}$) ovatifolin acetate 4 (R_1 and $R_2 = \text{Ac}$) deacetylovatifolin 5 (R_1 and $R_2 = \text{H}$)</p>	 <p>Arturin 1 ($R = \text{H}$) Arturin acetate 2 ($R = \text{Ac}$)</p>	<p>..</p> 
<p>FIGURA 1: ESTRUCTURA MOLECULAR DACETYLOVATIFOLIN.</p>	<p>FIGURA 2: ESTRUCTURA MOLECULAR ARTURIN.</p>	<p>FIGURA 3: ESTRUCTURA MOLECULAR ERIOFLORIN.</p>

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

- Hexano
- Diclorometano
- Acetato de Etilo
- Etanol
- Planta Podanthus Mitique
- Matraces
- Tubos eppendorf
- Placas de 96 pocillos
- Pipetas de diversa capacidad
- Puntas de pipeta estériles
- Parafilm
- Guantes
- Pipeta graduada
- DMSO
- Balanza analítica
- Agitador vortex
- Agua Miliq estéril
- Ácido tricloracético al 50%
- Agua destilada
- Sulforodamina
- Trisbase

Metodología:

Protocolo de trabajo para el análisis de productos naturales. (Ver Anexo 1).

- 1) Para generar los extractos de la planta se utilizaron distintos solventes; hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol. Se colocó la planta en cada uno de los solventes por al menos 3 días, posterior a esto se evaporó el solvente en un matraz a una temperatura de 40-50 °C, formándose una película en el matraz que corresponde al extracto.
- 2) Cada extracto se diluyó a una concentración de 50 mg/ml de DMSO, siendo ésta la solución madre, la cual se congeló para su adecuada mantención.
- 3) Se preparó la solución de trabajo cada vez que se utilizó, diluyendo 100 veces la solución madre, obteniendo una concentración de 0,5 mg/ml en la que ya no existe citotoxicidad celular. Para ello se descongeló la solución madre y se extrajo 3µl para diluirse en 297µl de agua estéril Miliq.

- 4) Se trabajó con líneas celulares HELA, MCF7 y CON, cada una en su placa. Se utilizaron placas de 96 pocillos, cada uno con 3000 células.
- 5) Se destinó tres columnas por cada solución de trabajo proveniente de un extracto y las filas de la siguiente forma:
 - **A:** Células Control.
 - **B:** Control solvente (DMSO al 1% 10 μ l en 100 ml de medio, es decir, diluido 10 veces más).
 - **C:** 10 μ l = 50 μ g/ml extracto en el medio.
 - **D:** 5 μ l = 25 μ g/ml extracto en el medio.
 - **E:** 2,5 μ l = 12,5 μ g/ml extracto en el medio.
 - **F:** 1,25 μ l = 6,25 μ g/ml extracto en el medio.
 - **G:** 0,5 μ l = 2,5 μ g/ml extracto en el medio.
 - **H:** Células Control
- 6) Así a cada pocillo se le adicionó la cantidad de solución de trabajo indicada anteriormente.
- 7) Luego la placa se dejó en cultivo por 72 horas.
- 8) Tras el tratamiento las células se fijaron con 50% ácido tricloroacético (25 μ l/pocillo) a 4°C durante 1h.
- 9) Las células se lavaron con agua destilada, 3 veces por inmersión.
- 10) Se tiñeron las células con 0.1% sulforodamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelto en 1% ácido acético (50 μ l/pocillo) durante 30 min y lavadas 3 veces con ácido acético al 1% (100-150 μ l/pocillo) para eliminar el colorante no unido.
- 11) El colorante unido a proteína se solubilizó con 100 μ l de 10 mM Tris base no tamponado.
- 12) La densidad celular se analizó en un lector de placas a 540 nm.
- 13) Los datos son expresados como absorbancia, luego transformados a viabilidad celular porcentual y por último analizados como media \pm desviación estándar.

Se diseñó un estudio de tipo experimental, en el cual se analizarán los efectos de los extractos de *P. mitique* sobre las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y HELA (cáncer cervicouterino).

POBLACIÓN: UNIVERSO Y MUESTRA

UNIVERSO:

Se utilizarán líneas celulares MCF-7 de Cáncer de Mama y líneas celulares HELA de Cáncer Cervicouterino para realizar el estudio.

MUESTRA

Corresponde a las células que se sembrarán, 3000 células por cada pocillo. Son líneas celulares usadas comúnmente para este tipo de investigaciones, la primera es la línea celular HELA, es la más antigua y común línea celular usada en humanos. La línea derivó de unas células de cáncer cervicouterino obtenidas el 8 de Febrero de 1951 de Henrietta Lacks, es por esta razón que el nombre de esta línea celular lleva sus iniciales.

La otra línea celular, MCF7, corresponde a un adenocarcinoma de mama. En 1970 se obtuvo de una mujer caucásica de 69 años y su nombre es el acrónimo de Michigan Cancer Foundation-7, el instituto en Detroit donde la línea celular fue establecida en 1973 por Herbert Soule y colaboradores.

VARIABLES

1. Estudiar los efectos de cada extracto *Podanthus mitique* sobre las líneas celulares de Cáncer de mama y Cáncer cervicouterino (líneas MCF7 y HELA respectivamente).

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Efectividad del extracto de <i>Podanthus Mitique</i> sobre líneas celulares de Cáncer de mama	Efectos del extracto de <i>Podanthus mitique</i> sobre líneas celulares de Cáncer de mama, MCF7.	Concentración del extracto Acción frente a línea celular MCF7.	50 µg/ml 25 µg/ml 12,5 µg/ml 6,25 µg/ml 2,5 µg/ml Favorable. Desfavorable. Ninguna.	Microgramo por mililitro. Viabilidad celular (%)
Efectividad del extracto de <i>Podanthus Mitique</i> sobre líneas celulares de Cáncer cervicouterino	Efectos de extracto de <i>Podanthus mitique</i> sobre líneas celulares de Cáncer Cervicouterino (HELA).	Concentración del extracto. Acción frente a líneas celulares HELA.	50 µg/ml 25 µg/ml 12,5 µg/ml 6,25 µg/ml 2,5 µg/ml Favorable. Desfavorable. Ninguna.	Microgramo por mililitro. Viabilidad celular (%)

2. Determinar el extracto de *Podanthus mitique* con mayor efectos beneficiosos sobre las líneas celulares MCF7 en Cáncer de mama y HELA en Cáncer cervicouterino.

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Extracto de <i>podanthus mitique</i> que genera efectos beneficiosos en	El extracto de <i>Podanthus mitique</i> que sea beneficiosa en líneas celulares MCF7 en Cáncer de	Extractos que actuaron en los casos favorables.	Más beneficiosa entre los extractos (Hexano, Diclorometano, Etanol, Acetato de	Frecuencia en porcentaje(%).

líneas celulares	mama.		Etilo)	
Concentración con mayor efecto de los extractos de podanthus mitique beneficiosos en líneas celulares.	Concentración de Podanthus mitique que genera un mayor efecto, de los extractos beneficiosos, en líneas celulares MCF7 en Cáncer de mama.	Concentración de extracto que actuaron en los casos favorables	Más beneficiosa entre las concentraciones (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 2,5 µg/ml)	Frecuencia en porcentaje (%)
Extracto de podanthus mitique que genera efectos beneficiosos en líneas celulares	El extracto de Podanthus mitique que sea beneficiosa en líneas celulares HELA en Cáncer cervicouterino.	Extractos que actuaron en los casos favorables.	Más beneficiosa entre los extractos (Hexano, Diclorometano, Etanol, Acetato de Etilo)	Frecuencia en porcentaje (%).
Concentración con mayor efecto de los extractos de podanthus mitique beneficiosos en líneas celulares.	Concentración de Podanthus mitique que genera un mayor efecto, de los extractos beneficiosos, en líneas celulares HELA en Cáncer cervicouterino.	Concentración de extracto que actuaron en los casos favorables	Más beneficiosa entre las concentraciones (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 2,5 µg/ml)	Frecuencia en porcentaje (%)

3. Contrastar los efectos de la planta *Podanthus mitique* sobre el crecimiento de las líneas celulares de Cáncer de mama y Cáncer cervicouterino (líneas MCF7 y HELA respectivamente) con los tratamientos entregados por GES; cirugía, radioterapia y quimioterapia.

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Eficacia del extracto de <i>P. mitique</i> en comparación con los tratamientos entregados por GES.	Resultados más satisfactorios del extracto de <i>P. mitique</i> en comparación con los tratamientos entregados por GES.	<ul style="list-style-type: none"> • Menor • Igual • Mayor 	Viabilidad celular	

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

- **Inclusión**

- Líneas celulares HELA, MCF-7 y CON.

- **Exclusión**

- Células contaminadas
- Células con confluencia de 90-100%
- Suspensión con un porcentaje elevado de células teñidas con azul de tripan.

TÉCNICAS DE MEDICIÓN:

Absorbancia a 540 nm: Medida que refleja cómo se atenúa la radiación cuando atraviesa un elemento. La absorbancia puede expresarse mediante un logaritmo que surge a partir del vínculo entre la intensidad que sale y la intensidad que ingresa a la sustancia.

Es una medida indirecta del número de células viables.

Viabilidad porcentual: Mide la proporción de células vivas, luego de realizarles un procedimiento. Se utilizan pruebas para determinar rompimiento de la integridad de la membrana celular.

PROCEDIMIENTOS

ETAPAS DE INVESTIGACIÓN

Etapas I formulación y logística: Formulación de proyecto de tesis enfocado en el desarrollo del área de investigación en el área de la ginecología. Creación del perfil del proyecto incluyendo el problema de fondo, la pregunta de investigación, hipótesis y objetivos. Recolección de información a partir de investigaciones previas relacionadas con las temáticas que se abordan.

Etapa II Trabajo de campo: Obtención de datos a partir de la lectura de placas de líneas celulares expuestas a extractos de *P. mitique*. Posteriormente un análisis estadístico de la muestra en cuanto a la variación de la viabilidad celular en las líneas celulares estudiadas

Etapa III Resultados: Entrega de resultados del análisis realizado en la etapa anterior. Discusión y conclusiones de resultados obtenidos.

RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Como se mencionó anteriormente la obtención de datos, se realizó a partir de la lectura de placas de líneas celulares tratadas con extractos naturales de la planta *P. mitique*. Datos numéricos correspondientes a absorbancia, posteriormente estos datos fueron digitalizados por las investigadoras en una planilla Excel 2010, transformados a viabilidad celular porcentual, para su análisis y estudio

Fuentes de información

- Unidad de estudio: Células de líneas celulares HELA, MCF-7 y CON tratadas con extractos de *P. mitique*
- Unidad informante: Planilla Excel con datos obtenidos a partir de la lectura de placas de líneas celulares mencionadas.
- Unidad referencial: Espacio físico y equipos del laboratorio Bruno Günther.

Instrumento de recolección

- Lector de micro-placas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para el proceso de análisis estadístico se utilizaron los programas Microsoft Excel 2010 y STATISTICA 7. Los datos recolectados a partir de la lectura de placas de las líneas celulares (n= 666 datos), expresados en absorbancia fueron convertidos a viabilidad celular porcentual. Estos últimos datos, fueron ordenados en una planilla de excel, y según los criterios de exclusión se eliminaron datos erróneos. A partir de

esta planilla se obtuvieron gráficos de barra por línea celular con los valores de la media y desviación estándar, de cada extracto y sus concentraciones.

Se realiza un análisis para determinar si los datos son paramétricos o no paramétricos. En este estudio, los resultados de todas las líneas fueron no paramétricos, por lo tanto se utilizó el test de Kruskal-Wallis para determinar la significancia (p) de las variables en cuestión. Una vez obtenidas las significancias, se usó la caja bigote para determinar la media, la desviación estándar y el error estándar. Finalmente se reordenaron los datos por concentración, en esta etapa se utilizó el test de Friedman ANOVA and Kendall's Concordance y la caja bigote nuevamente para determinar la media, la desviación estándar y el error estándar.

LIMITACIONES

Dentro de las limitaciones o dificultades en la realización de este proyecto se encuentran:

Durante la revisión de los datos obtenidos, se observó que algunas cifras no concordaban con el resto de los datos, por lo que se decidió eliminar datos muy alejados de la media. **(Ver anexo 2)**

Las causas de estos "errores" se podría explicar por la poca experticia del manejo en laboratorio por parte de las investigadoras y colaboradores de esta tesis, lo cual podría significar la contaminación de células. Por otro lado, se realizó una corrección de los datos, producto del mal rótulo de algunas placas utilizadas. Al querer corroborar el rótulo de las placas, se observó que éstos se encontraban ilegibles, probablemente debido a la manipulación de éstas.

A pesar de la eliminación de datos en las placas, nuestra muestra continuó siendo considerable para obtener resultados significativos.

RESULTADOS

El total de la muestra analizada correspondió a 666 datos de viabilidad celular porcentual, donde cada línea celular cuenta con 222 datos.

En el primer análisis de datos, se pretende determinar si la distribución de los datos de cada línea celular se comporta de forma paramétrica o no paramétrica, de acuerdo a este resultado, se utilizan determinados test. Así, se realizó el test Chi cuadrado y como se observa en los gráficos 1, 2 y 3, el valor de P resulta menor a 0,05, por lo tanto, nuestras variables correspondientes a las líneas celulares trabajadas: MCF-7, HeLa y CoN se comportan no paraméricamente.

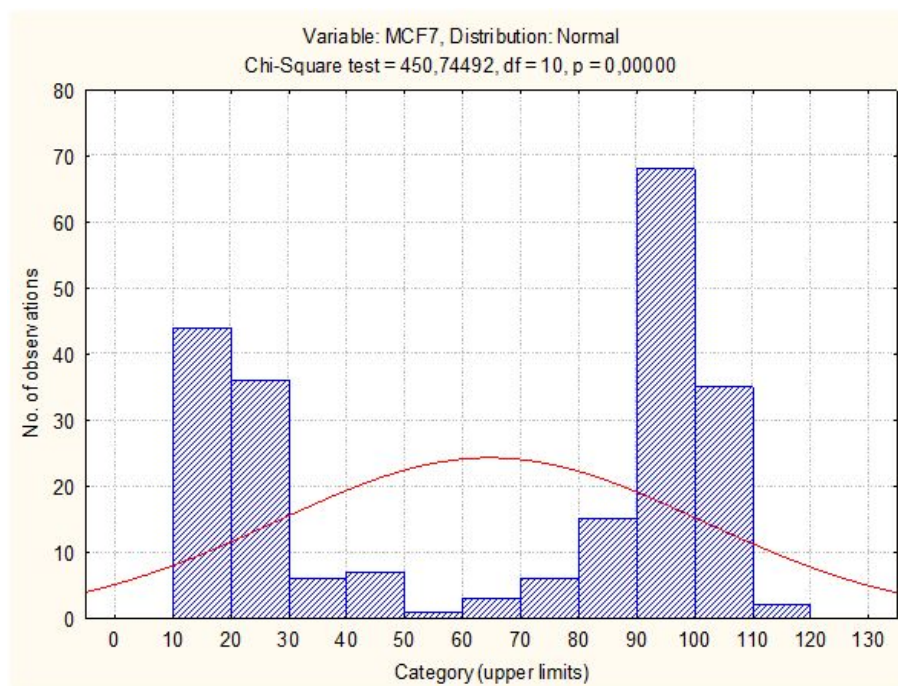


Gráfico 1: Histograma con la distribución de los datos correspondientes a MCF-7. Con $P = 0,00000$ para una distribución no paramétrica.

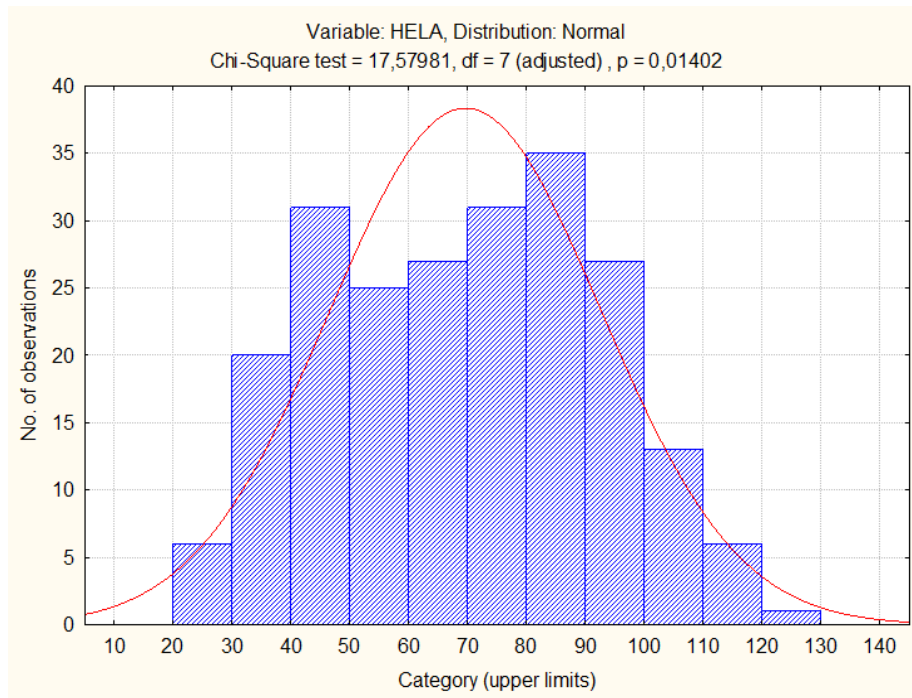


Gráfico 2: Histograma con la distribución de los datos correspondientes a HELA. Con $P=0,01402$ para una distribución no paramétrica.

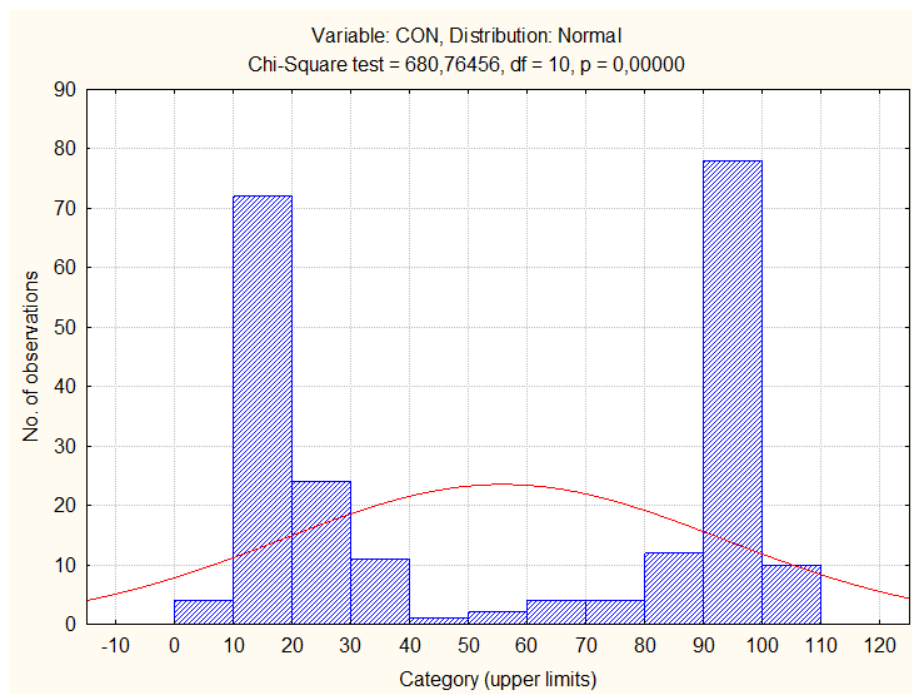


Gráfico 3: Histograma con la distribución de los datos correspondientes a CON. Con $P=0,00000$ para una distribución no paramétrica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir de las siguientes pruebas, se obtienen los diagramas de Caja-Bigotes (boxplots o box and whiskers), que son una presentación visual que describe características de los datos, como media aritmética (MEAN), desviación estándar ($MEAN \pm SE$) y error estándar ($MEAN \pm SD$) de los datos.

PRUEBA KRUSKAL- WALLIS

En los siguientes gráficos, el eje vertical corresponde a viabilidad porcentual, y en el eje longitudinal, se aprecia los distintos extractos utilizados; Hexano (1), Diclorometano (2), Acetato de Etilo (3) y Etanol (4).

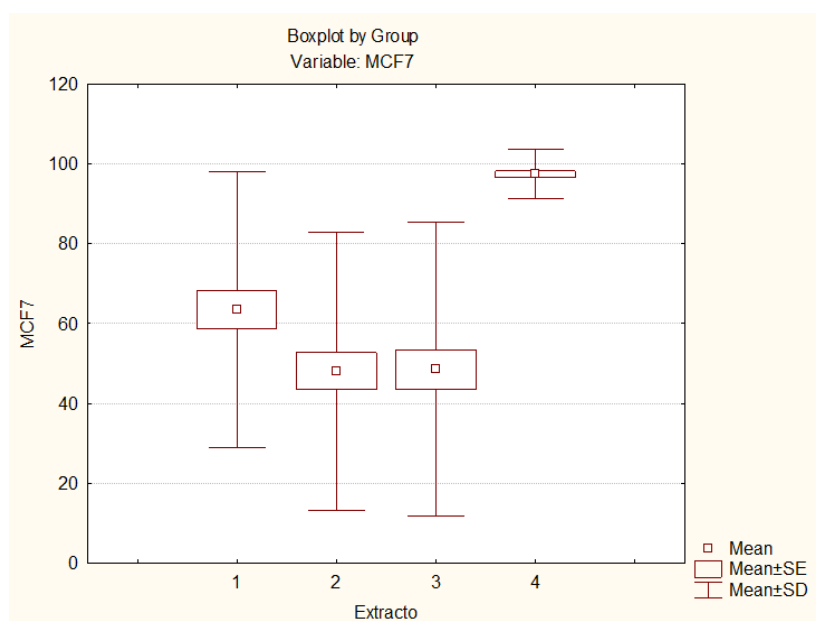


Figura 4: Diagrama caja-bigote de porcentaje de viabilidad de línea celular MCF7 expuestas a extracto Hexano (1), Diclorometano (2), Acetato de Etilo (3) y Etanol (4). $P: 0,0000$

En la *figura 4* se aprecian efectos estadísticamente significativos para los extractos 2 y 3. En relación a estos, el extracto 1 presenta menor efecto. Por el contrario el

extracto 4 no muestra efecto. Al comparar los extractos, se observan diferencias entre los extractos 1, 2 y 3 con el extracto 4. A su vez, los extractos 2 y 3 presentan una diferencia aún mayor en comparación con en el extracto 4.

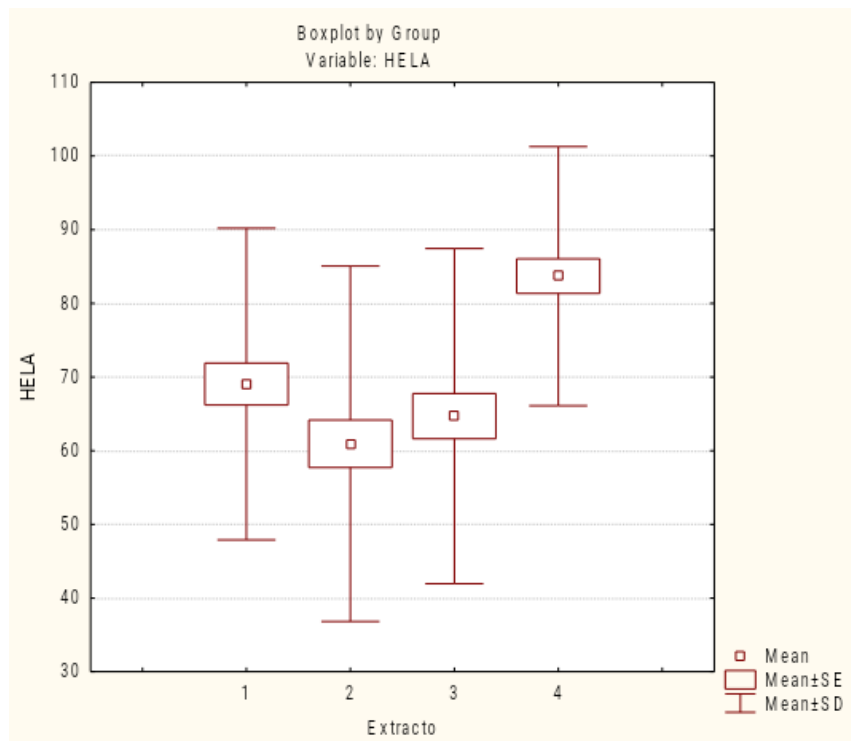


Figura 5: Diagrama caja-bigote de porcentaje de viabilidad de línea celular HELA expuestas a extractos Hexano (1), Diclorometano (2), Acetato de Etilo (3) y Etanol (4). $P: 0,0000$

A partir de la *figura 5* observamos que, el extracto 2 es el que disminuyó la viabilidad celular en mayor medida. Por lo tanto, es el extracto con mayor efecto en la línea celular HELA. Al mismo tiempo, extracto 1 y 3 presentan un efecto similar en las células. El extracto 4 no presenta efecto en las células.

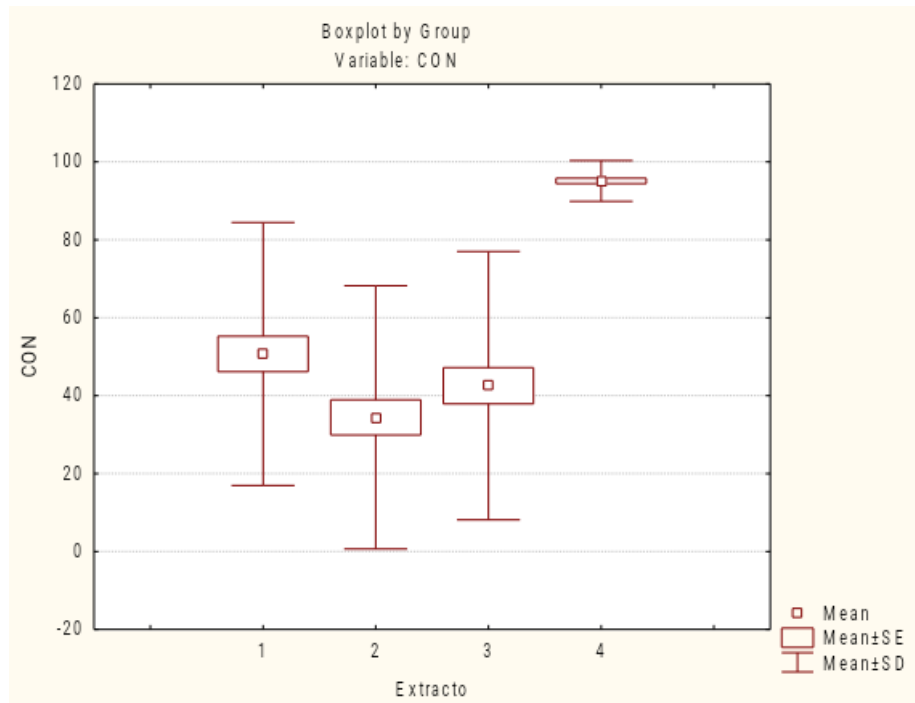


Figura 6: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad de línea celular CON expuestas a extracto Hexano (1), Diclorometano (2), Acetato de Etilo (3) y Etanol (4). P: 0,0000.

Al analizar la figura 6, se observa una disminución en la viabilidad celular de la línea CoN con los extractos 1, 2 y 3, siendo el 2 el de mayor efecto. En el extracto 4 no se aprecia efecto. Si comparamos extractos, los extractos 2 y 4, son los con mayor diferencia.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Para la representación de los datos obtenidos (Ver anexo 3) se utilizaron gráficos de barras. En estos se incluyen las medias aritméticas o promedios de viabilidad celular porcentual, correspondientes al eje Y, para cada concentración de cada extracto, en el eje X, utilizado en las líneas celulares correspondientes.

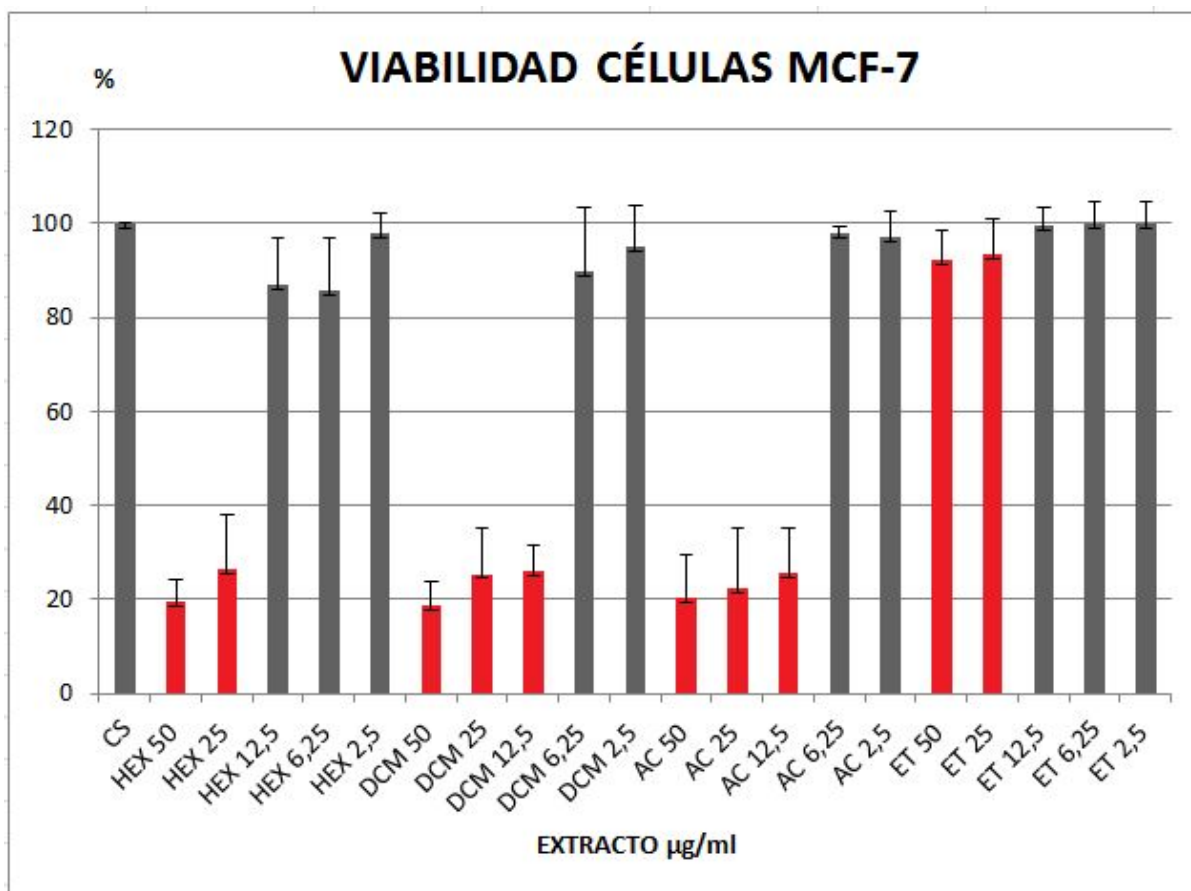


GRÁFICO 4: Viabilidad porcentual de células MCF7 expuestas a distintas concentraciones de extractos: Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol. Barras destacadas $P < 0,05$

En las placas de células MCF-7 tratadas con los distintos extractos a diferentes concentraciones (Ver gráfico 4), se logra la reducción considerable en la viabilidad celular con la utilización de los extractos hexano (Hex), diclorometano (Dcm) y acetato de etilo (AC). Sin embargo, estos actúan favorablemente a altas concentraciones, mientras que HEX tiene efectos positivos a 50 y 25 $\mu\text{g/ml}$, DCM y AC además siguen siendo efectivos a 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, no hay diferencia marcada entre los extractos nombrados anteriormente, por lo que el extracto con mayor poder citotóxico es el DCM a 50 $\mu\text{g/ml}$, el cual logra reducir viabilidad hasta un 18,9 %, es igual de efectiva que AC a 12,5 $\mu\text{g/ml}$, que logra reducir viabilidad hasta un 25,8 %. Por el contrario, el uso de los extractos a concentraciones 6,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$, no es efectiva para reducir viabilidad celular, y al exponer las células al

extracto de etanol (ET), estas no sufrieron cambios relevantes a ninguna de las concentraciones.

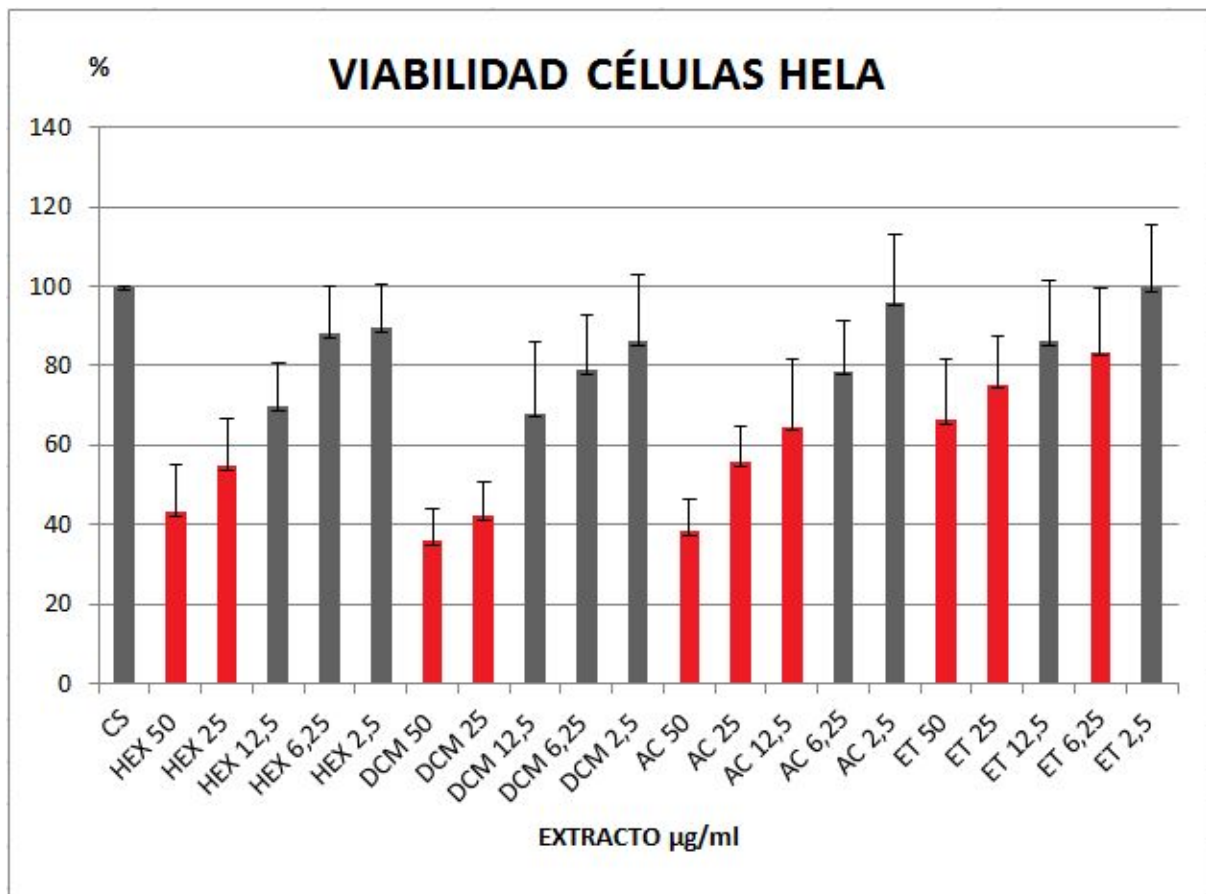


GRÁFICO 5: Viabilidad porcentual de células HELA expuestas a distintas concentraciones de extractos: Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol. Barras destacadas $P < 0,05$.

La viabilidad celular porcentual en la línea celular HELA (Ver gráfico 5), disminuye en mayor medida mientras mayor sea la concentración que se utiliza, esto es así, para todos los extracto a los que fueron expuestas las células. A su vez, los extractos con mejor efecto citotóxico, resultan ser el Diclorometano a 50 y 25 µg/ml y el Acetato de etilo a 50 µg/ml. Por su parte, hexano solo es efectivo a concentración 50 µg/ml. Todos igual de efectivos con valores de viabilidad cercanos al 40 %. Sin embargo, cabe destacar que el extracto con mejor citotoxicidad es DCM a 50 µg/ml, el cual logra reducir viabilidad a un 35,8 %. El uso del extracto etanol a todas sus concentraciones, no es citotóxico, es decir, no produce variación de la

viabilidad. Además los extractos a concentraciones menores a 12,5 $\mu\text{g/ml}$ no tienen efecto relevante para nuestra investigación.

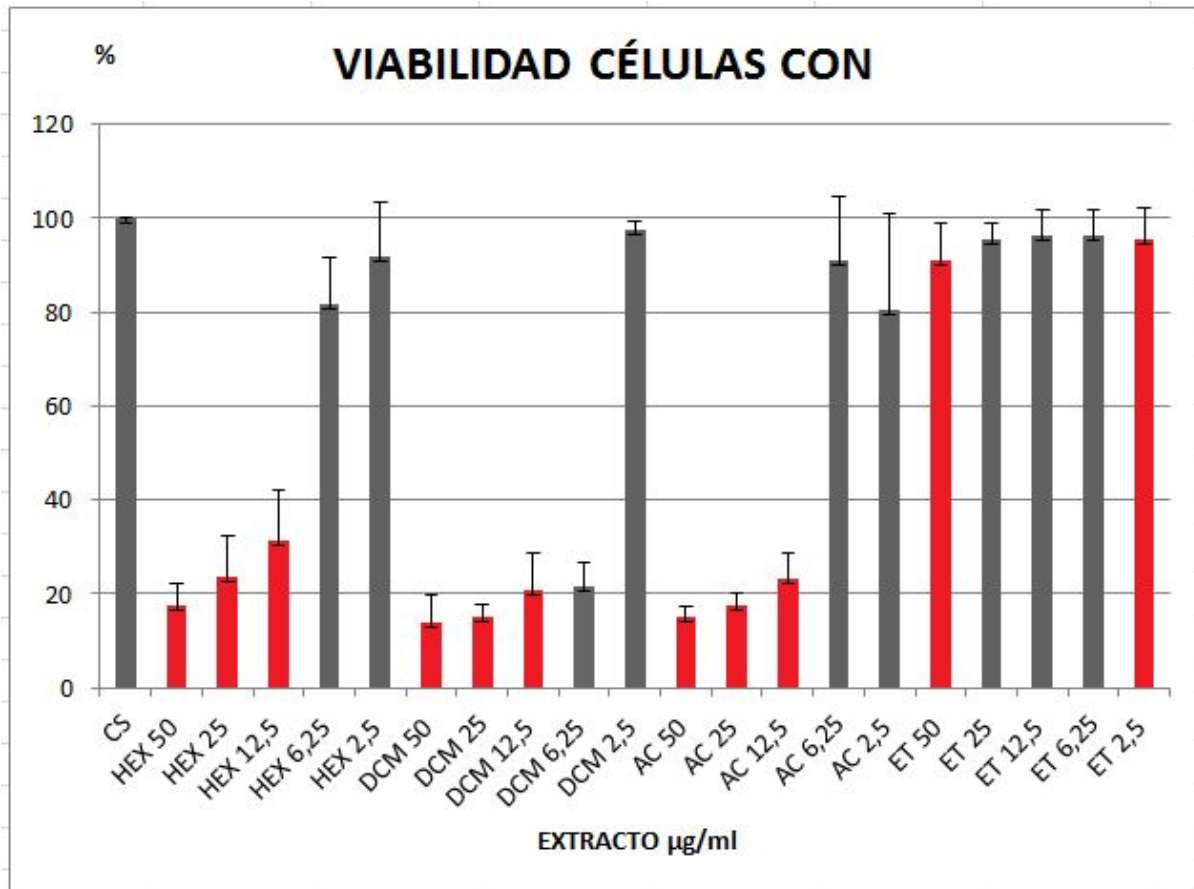


GRÁFICO 6: Viabilidad porcentual de células CON expuestas a distintas concentraciones de extractos: Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol. Barras destacadas $P < 0,05$.

Como se visualiza en el gráfico 6, el extracto con mejor poder citotóxico en células CON, es el DCM, incluso a concentración 6,25 $\mu\text{g/ml}$, disminuyendo viabilidad a 21,5 %. Sin embargo, en la concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, su poder citotóxico disminuye considerablemente. Por otro lado, Hexano y Acetato de etilo, también logran un poder citotóxico similar, pero a concentraciones mayores a 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Ningún extracto a concentración 2,5 $\mu\text{g/ml}$ tiene efecto en la viabilidad celular. Así mismo, el extracto etanol, a cualquier concentración, no presenta citotoxicidad en las células de colon, ya que mantiene los valores de viabilidad celular.

Es importante recalcar que la línea celular CoN, fue utilizada como control, ya que corresponde a células epiteliales no cancerígenas.

PRUEBA FRIEDMAN ANOVA & KENDALL'S CONCORDANCE

En los siguientes diagrama Caja-Bigote, el eje vertical corresponde a viabilidad porcentual, y en el eje longitudinal, se aprecia las distintas concentraciones a las que fueron expuestas las líneas celulares estudiadas, siendo; 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (5).

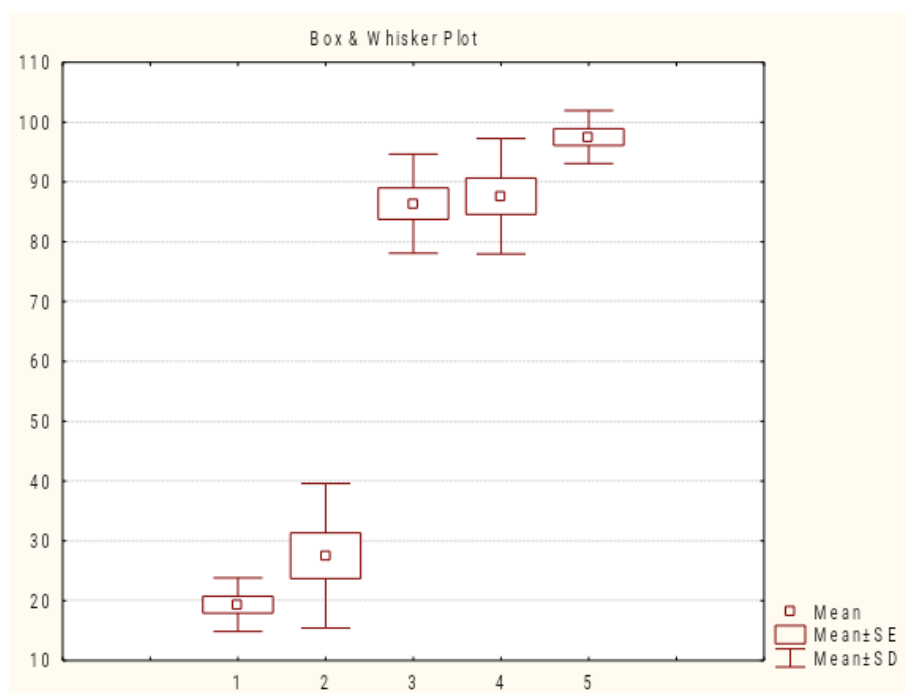


Figura 7: Diagrama de caja- bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular MCF7 expuestas a extracto Hexano a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (5). $P: 0,0000$.

Podemos observar que la figura 7 y en el gráfico 4 nos muestra los efectos en la línea celular MCF7 expuesto al extracto Hexano en diversas concentraciones, observándose efecto significativo a concentraciones altas, principalmente en 50 y 25

$\mu\text{g/ml}$, siendo mayor la citotoxicidad en la concentración más alta, reduciendo viabilidad hasta 19,69 % y 26,55 %, respectivamente. Las concentraciones 12,5, 6,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ no presentan efecto en esta línea celular. Si se compara el extracto en sus distintas concentraciones, las concentraciones 50 y 25 $\mu\text{g/ml}$ tienen efectos similares, como también lo tiene las concentraciones 12,5, 6,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$, presentando entre ambos grupos una gran diferencia.

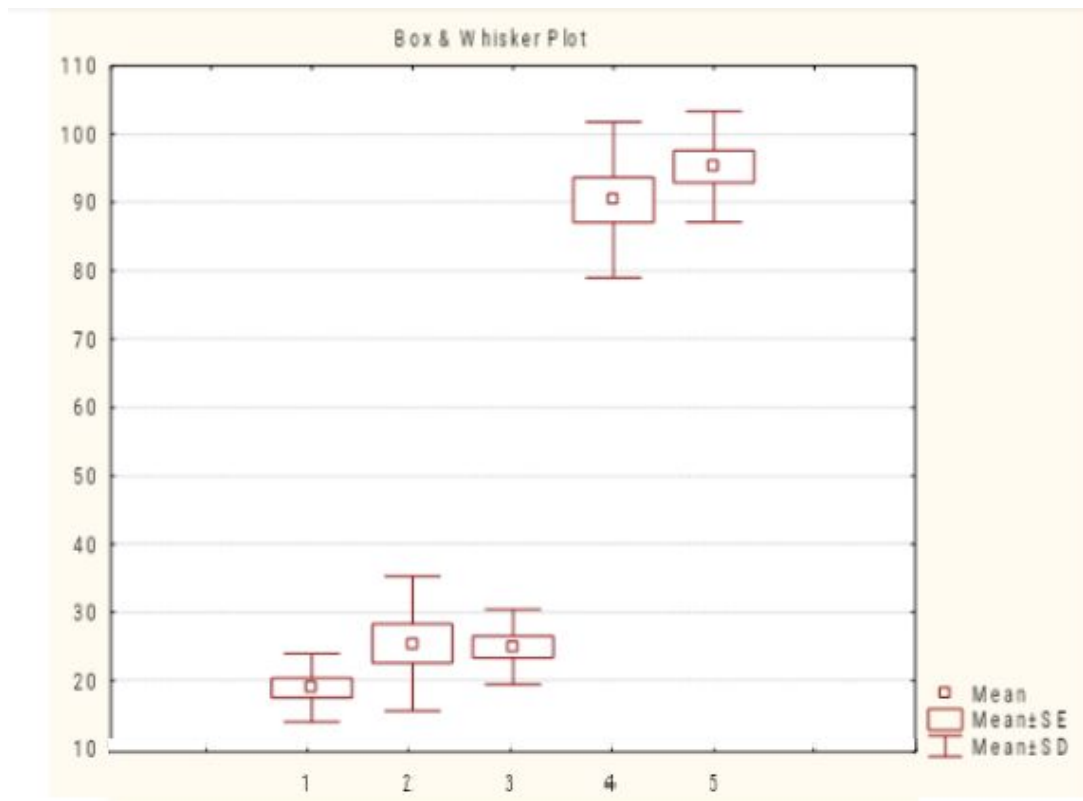


Figura 8: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular MCF7 expuestas a extracto Diclorometano a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (5). $P: 0,0000$.

La exposición a diferentes concentraciones de extracto de Diclorometano de las células MCF-7 presenta mayor efecto sobre la viabilidad celular, a mayor concentración, como se aprecia en el gráfico 4. A su vez, la figura 8 refleja que las concentraciones de 50, 25 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$ son altamente citotóxicas, ya que disminuyen la viabilidad celular significativamente. Mientras que las menores concentraciones de 6,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$, no resultan efectivas al momento de disminuir la viabilidad de las células de MCF7. Existe una diferencia importante entre los

efectos producidos por las concentraciones 50, 25 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$ versus las concentraciones 6,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

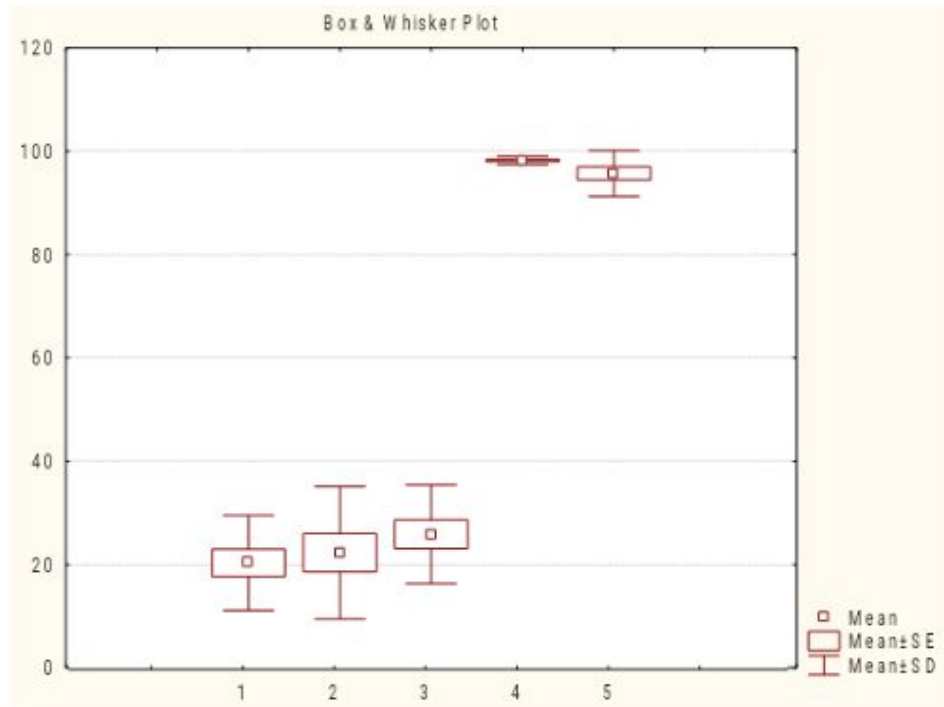


Figura 9: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular MCF7 expuestas a extracto Acetato de Etilo a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (5). $P: 0,00000$

Con respecto al efecto del extracto Acetato de Etilo en la línea celular MCF-7, visualizado en en el gráfico 4 y figura 9, la exposición a las concentraciones 50, 25 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$, resulta en una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa, alcanzando valores de viabilidad 20,32 %, 22,29 % y 25,84 %, respectivamente. Por el contrario, la exposición a las concentraciones 6,25 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ no produce efecto sobre las células, manteniendo los valores de viabilidad celular cercanos a los de las células control. Además se observa una diferencia entre las primeras 3 concentraciones con el resto.

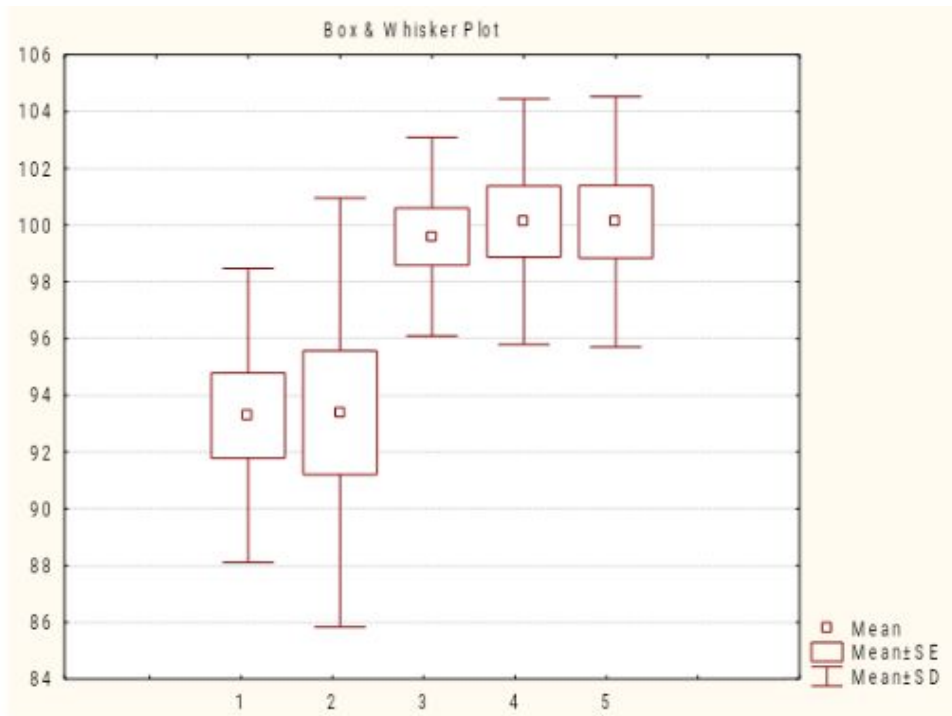


Figura 10: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular MCF7 expuestas a extracto Etanol a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). $P: 0,00004$.

Al utilizar el extracto de etanol sobre las células de la línea celular MCF-7 (Ver gráfico 4 y figura 10), este no refleja disminución de viabilidad celular a ninguna de las concentraciones utilizadas. Las primeras 2 concentraciones presentan una diferencia en comparación con las últimas 3, sin embargo, esta resulta mínima.

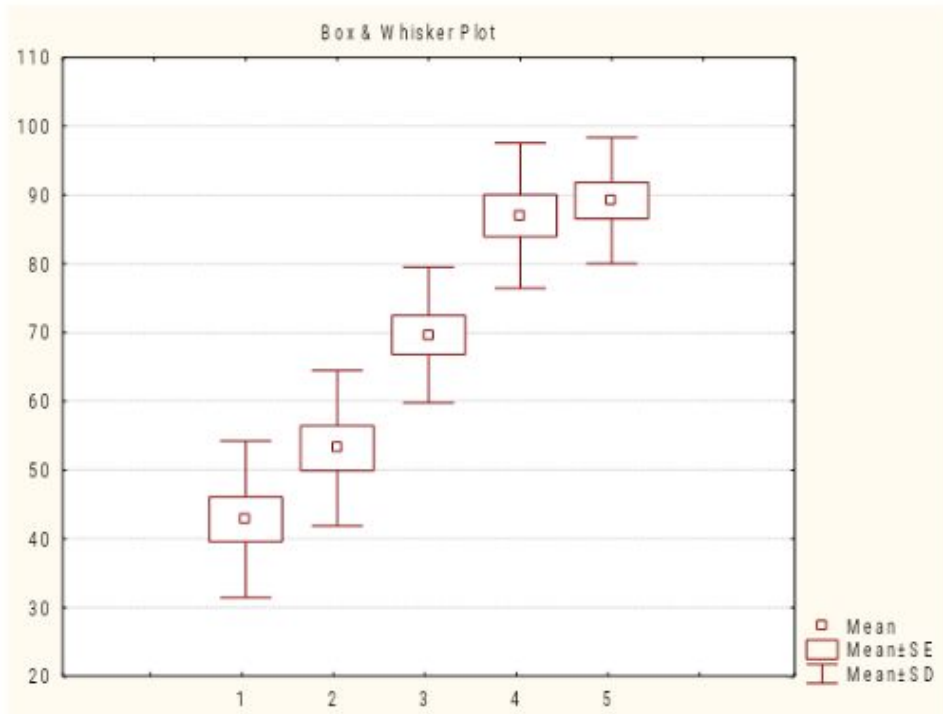


Figura 11: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular HELA expuestas a extracto Hexano a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). $P: 0,0000$.

Con respecto al uso en específico del extracto Hexano sobre las células HELA, la concentración de 50 µg/ml es la que presenta un mejor efecto al momento de disminuir la viabilidad de estas células cancerígenas, alcanzando valores de viabilidad de 43,12 %, como se observa en la columna HEX 50 del gráfico 5. Por el contrario, al someter a las células a las concentraciones de 6,25 y 2,5 µg/ml, estas provocan un mínimo efecto. Como se mencionó anteriormente, a medida que disminuye la concentración, mayor es la viabilidad celular. Todas las concentraciones tienen diferente efecto (Ver figura 11), el cual aumenta gradualmente a medida que la concentración se más alta.

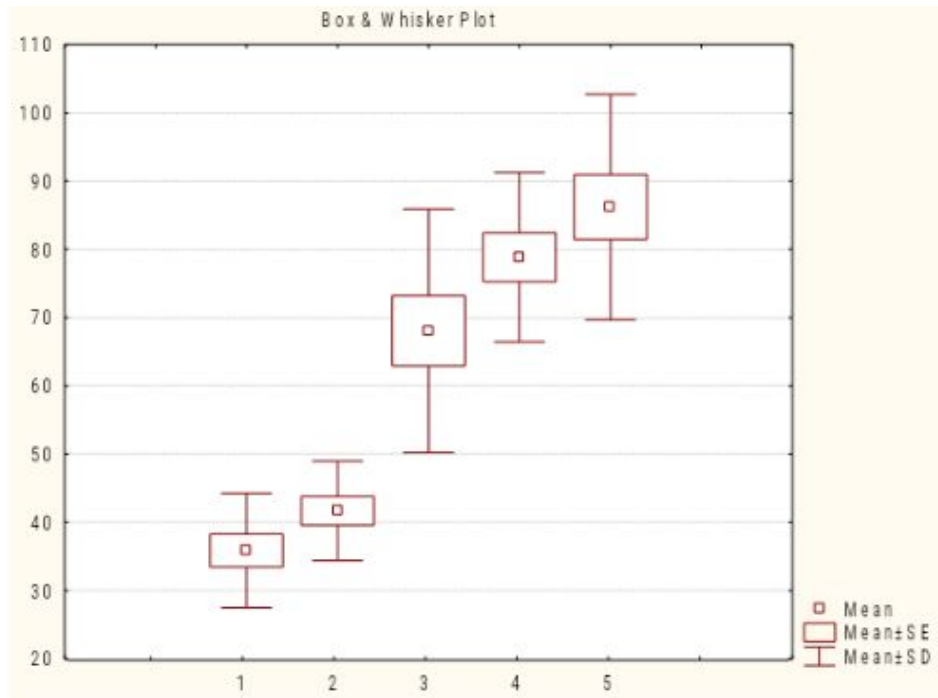


Figura 12: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular HELA expuestas a extracto Diclorometano a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5, (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). *P*: 0,0000.

En la figura 12, se ve el efecto del extracto de diclorometano sobre las células HELA. El uso de DCM a altas concentraciones (50 y 25 µg/ml) tiene un efecto citotóxico importante, reduciendo viabilidad celular a 35,9 % y 42,3 % respectivamente. La citotoxicidad en la concentración de 50 µg/ml es mayor, disminuyendo progresivamente a medida que la concentración aumenta. Las concentraciones menores, 12,5, 6,25 y 2,5 µg/ml no muestran significancia estadística.

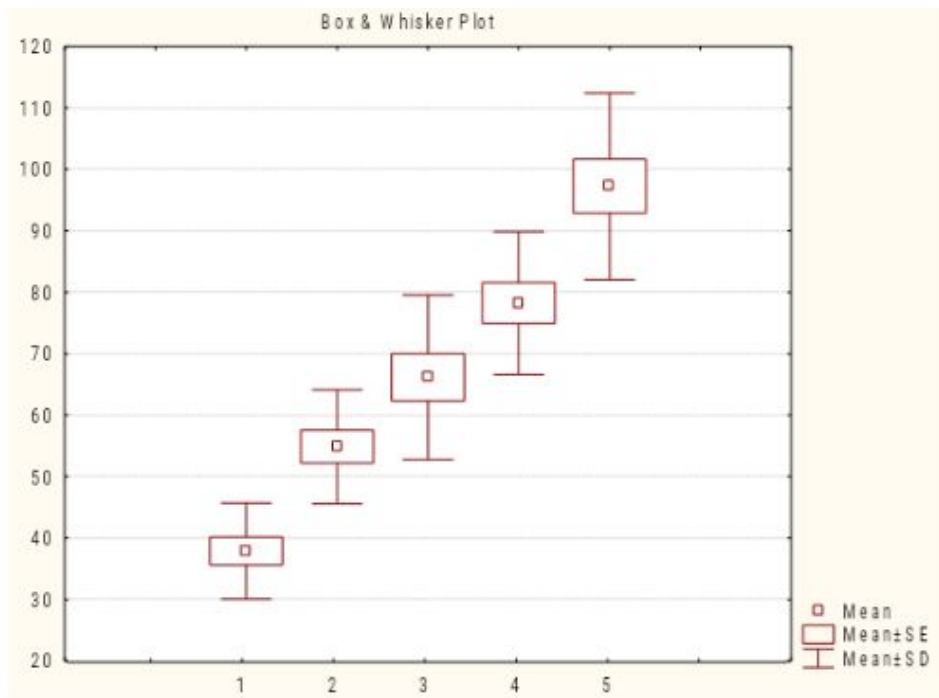


Figura 13: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular HELA expuestas a extracto Acetato de Etilo a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). P: 0,0000.

El extracto Acetato de Etilo frente a la línea celular HELA (Ver figura 13), muestra efecto sustancioso en la concentración 50 µg/ml, alcanzando una viabilidad celular de 38,3 %.

Se observa que la viabilidad celular es inversamente proporcional a la concentración utilizada, por lo tanto al disminuir la concentración, la viabilidad celular aumenta progresivamente.

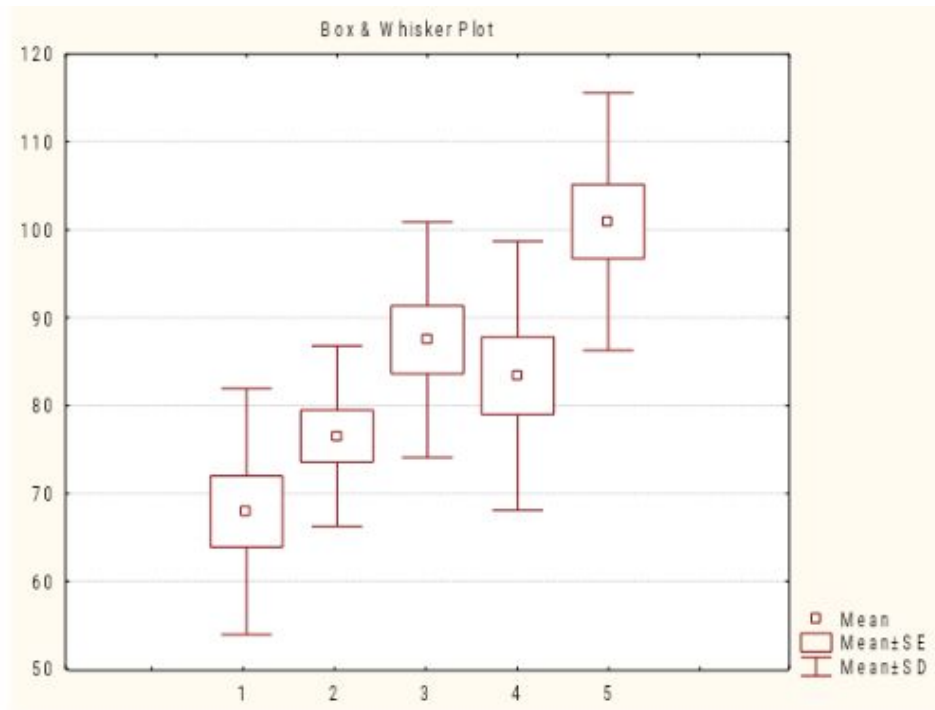


Figura 14: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular HELA expuestas a extracto Etanol a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). *P*: 0,00011.

En la figura 14, al ser las células expuestas al extracto Etanol, se puede observar que las cinco concentraciones actúan de forma diferente, sin embargo todas presentan una baja toxicidad, siendo la concentración de 50 µg/ml la de mayor efecto, llegando a una viabilidad celular de HELA de un 66,3 % (Ver gráfico 5).

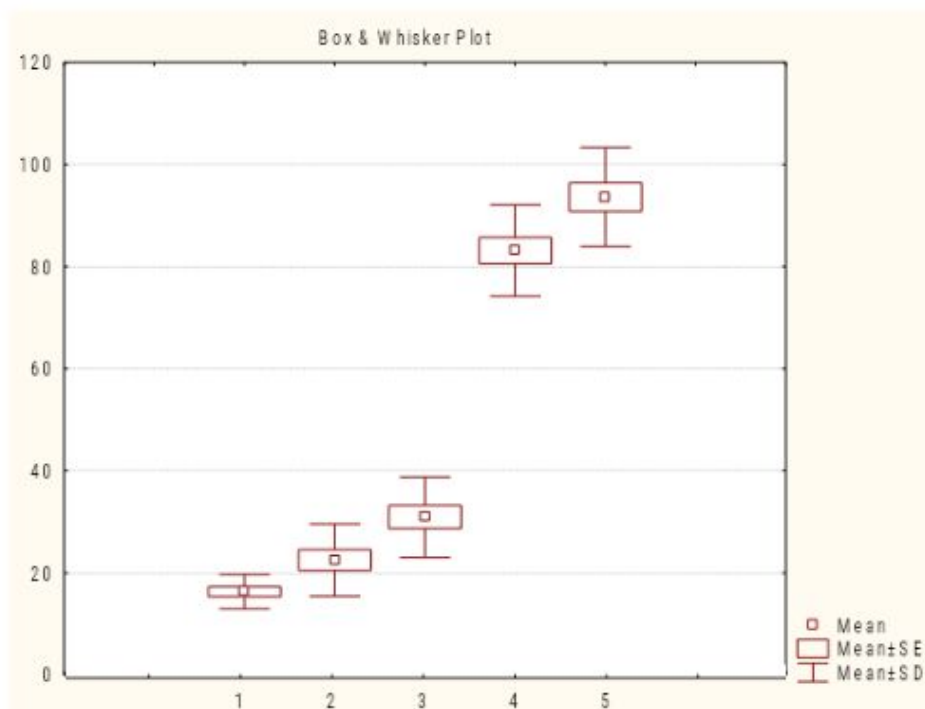


Figura 15: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular CON expuestas a extracto Hexano a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). $P: 0,0000$.

Se aprecia en la figura 15 que el extracto Hexano presenta efecto significativo en la línea celular de epitelio de colon no tumoral CoN a mayores concentraciones, 50 y 25 µg/ml, alcanzando una viabilidad de 17,5 % y 23,7 % respectivamente (Ver gráfico 6). De igual manera el extracto a 12,5 µg/ml logra disminuir viabilidad a un 31,3 %, aunque este resultado no es significativo. Además, a menores concentraciones (6,25 y 2,5 µg/ml) del extracto no existe un efecto significativo sobre las células CoN.

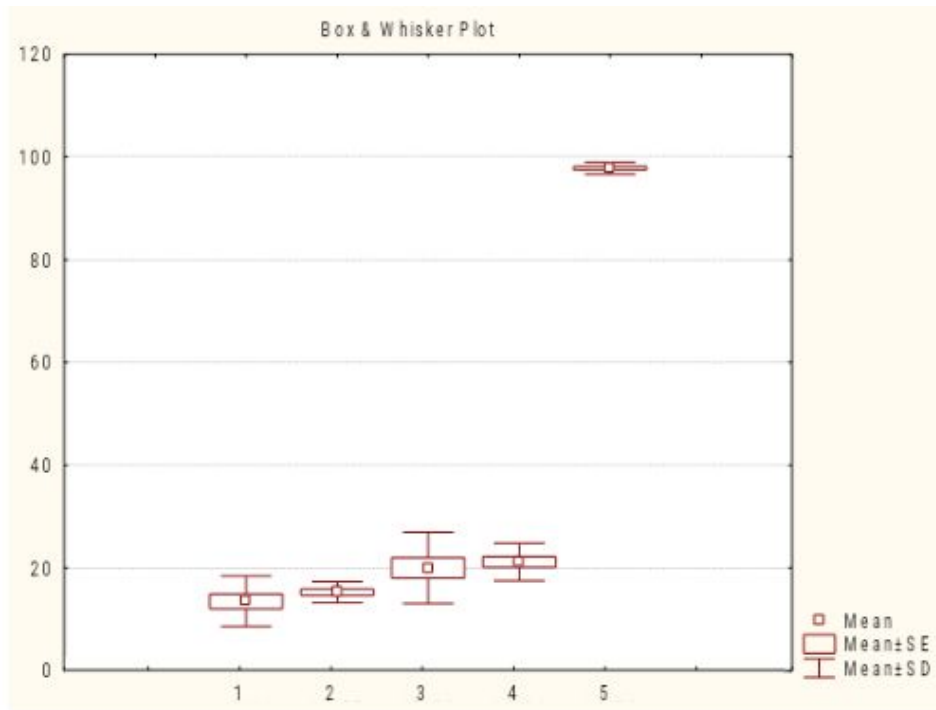


Figura 16: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular CoN expuestas a extracto Diclorometano a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). $P: 0,0000$.

El extracto Diclorometano en la línea celular de epitelio de colon no tumoral CoN, según la figura 16, muestra una citotoxicidad significativa en las concentraciones 50, 25, 12,5 y 6,25 µg/ml, observándose una viabilidad celular reducida, alcanzando valores de 14,1 %, 15,2 %, 20,1 % y 21,5 % respectivamente. De forma distinta se comporta la concentración de 2,5 µg/ml alcanzando 97,6 % de viabilidad, resultando sin efecto significativo.

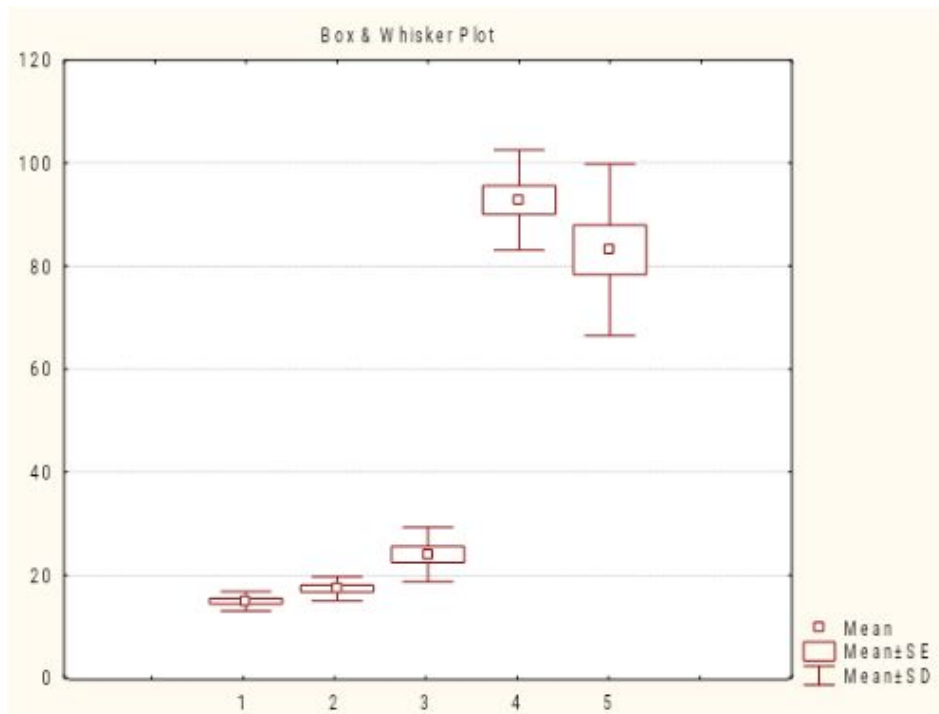


Figura 17: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular CON expuestas a extracto Acetato de Etilo a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). $P: 0,000$.

Se observa que en la línea celular CoN, tratadas con Acetato de Etilo (Ver figura 17 y gráfico 6) a mayor concentración, mayor es la citotoxicidad, evidenciando que en las concentraciones de 50 µg/ml la viabilidad es de 15,2 %, en la de 25 µg/ml de 17,5 % y en la de 12,5 µg/ml un 23,1 %, teniendo un efecto estadísticamente significativo que disminuye progresivamente, pero no se presentan grandes diferencias entre estas. Por otra parte las concentraciones menores no muestran significancia estadística, ya que la viabilidad disminuye a 90,9 % en la concentración de 6,25 µg/ml y a 80,5 % en la concentración 2,5 µg/ml.

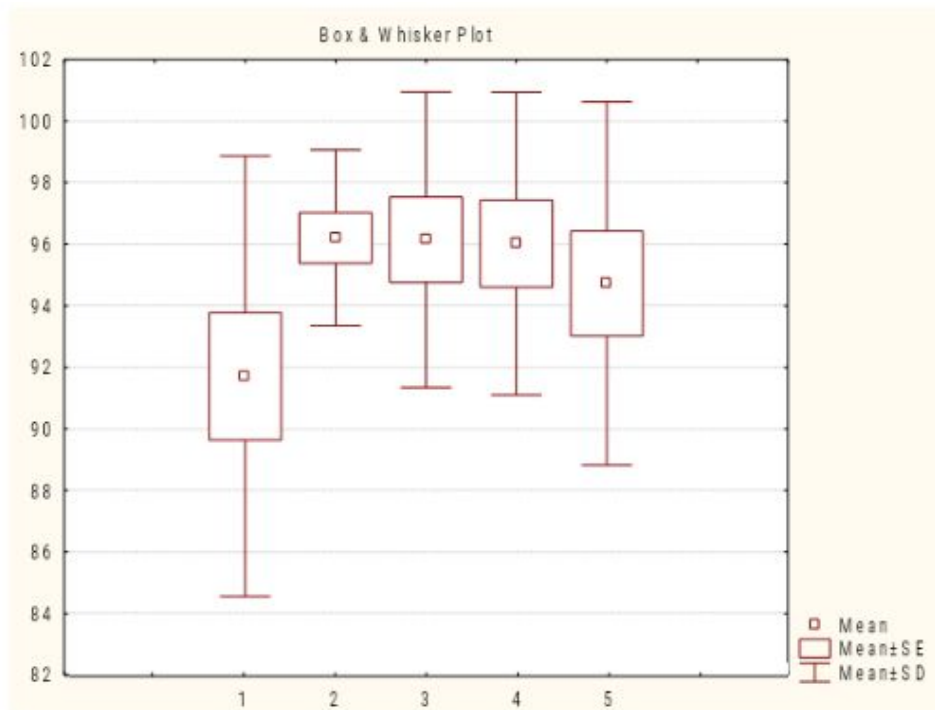


Figura 18: Diagrama de caja-bigote de porcentaje de viabilidad en línea celular CON expuestas a extracto de Etanol a distintas concentraciones: 50 (1), 25 (2), 12,5 (3), 6,25 (4), 2,5 µg/ml (5). P: 0,65177.

En la figura 18, se ve que el extracto de Etanol en sus distintas concentraciones no presenta un efecto significativo en la viabilidad de la línea celular CoN, resultando mínimamente citotóxico en las células de epitelio de colon no tumoral. La concentración de 50 µg/ml fue la que presentó una disminución de la viabilidad hasta un 91,2 %, siendo la de mayor efecto (Ver en gráfico 6).

DISCUSIÓN

Habiendo analizado los resultados se puede apreciar que el mitique (*Podanthus mitique*) reduce la viabilidad celular de las líneas celulares cancerígenas pero presenta mayor especificidad en las células de cáncer de mama, puesto que sus efectos son más visibles que en el cáncer cervicouterino.

En un estudio previo realizado en Chile, se utilizó el compuesto ovatifolina correspondiente a la planta *Podanthus ovatifolium* y *Podanthus mitique*, donde se observó un efecto inhibitor en la germinación y crecimiento de las plantas y además un efecto antioxidante. (Céspedes et al. 2001)

Según los objetivos de nuestra investigación pudimos determinar la concentración de extracto de *Podanthus mitique* con mayor efectos beneficiosos sobre las líneas celulares trabajadas. Nuestra investigación arrojó que en la línea celular MCF7 las concentraciones 50 como 12.5 µg/ml tenían una efectividad casi igual en diclorometano y acetato de etilo, en cambio en el extracto hexano solo las mayores concentraciones (50 y 25 µg/ml) poseían significancia en el estudio y en Et no se observó una efectividad significativa en las distintas concentraciones. En la línea celular HELA presenta mayor efectividad a mayor concentración de cada extracto (50 µg/ml), con mejores resultados en hexano, diclorometano y acetato de etilo; y etanol no mostrando efectividad significativa.

Existe una investigación publicada en México en el año 2008 que estudió la citotoxicidad en cultivos de células HeLa de los extractos etanólicos de tres especies de plantas: *Juniperus dep-peana*, *Solanum rostratum* y *Bidens odorata*, que se utilizan en dos regiones de México, para el tratamiento de heridas, úlceras, tumores y cáncer de útero. Se demostró que efectivamente dos de estas plantas presentaban un efecto citotóxico en estas células, la *J. deppeana* y *S. rostratum*, contribuyendo a corroborar las propiedades que tradicionalmente se atribuyen a estas plantas y destacan a estas dos especies de la flora medicinal mexicana como

fuentes de sustancias para el tratamiento del cáncer. (Villavicencio Nieto, M.A., et al. 2008).

Esto es un ejemplo de que tratamientos con extractos naturales de plantas se podrían utilizar en un tratamiento efectivo contra células neoplásicas. Es un gran aporte a nuestra investigación, ya que se trabajó en la línea celular HELA, al igual que en nuestra investigación. Se utilizó extracto etanólico a las siguientes concentraciones 9,2 - 18,4 - 36,8 - 92 - 184 - 276 - 368 µg/ml donde se obtuvo un resultado exitoso a la hipótesis de la citotoxicidad por parte de las plantas en México, a diferencia de nuestra investigación donde se utilizaron concentraciones de 2,5 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 µg/ml siendo mucho menores, lo cual explicaría la diferencia de los resultados en ambos estudios.

Uno de los estudios que nos incentivó a realizar esta investigación, el cual fue descrito en el marco teórico, en donde se estudió el principal producto natural de la planta *Podanthus mitique* y *Podanthus ovatifolius*, la ovatifolina, que tiene un efecto antitumoral y antibacteriano, además de efectos citotóxicos mediante la modificación de la cinética de proliferación celular, esto dio pie para que se pensara en un posible resultado beneficioso para el tratamiento de los cánceres en estudio. En nuestra investigación, se pudo comprobar efectos citotóxicos, sin embargo, no se discrimina el tipo de células, matando tanto células tumorales como sanas.

Sobre la línea celular HELA, para un posible tratamiento en este tipo de cáncer con los extractos de *Podanthus Mitique*, se tendría que utilizar la máxima concentración de este estudio, correspondiente a 50 µg/ml y aún así el efecto no significa un impacto en la viabilidad de las células tumorales, por lo que no sería un tratamiento exclusivo o de primera línea.

CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos se concluye que el tratamiento coadyuvante con *P. Mitique* no es el más idóneo, pues pese a disminuir la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino, como se esperaba y se planteaba en la hipótesis, este no es selectivo, ya que presenta citotoxicidad en células no tumorales.

También se puede concluir que el uso de los extractos en bajas concentraciones, no es suficiente para determinar su efectividad, por lo que es recomendable usar concentraciones mayores para tener un espectro más amplio de resultados favorables.

Nuestra investigación da pie a que se sigan estudiando los extractos de esta planta y su citotoxicidad, y también invita a nuestra carrera a introducirse en el área investigativa dándole versatilidad a nuestro perfil profesional.

BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO, D. J. C., Camus, M., & Schwartz, R. Linfonodo Centinela en Cáncer de Mama.
- Alarcón M, Weigert G, Duk S, García M d l A, Genotoxic effects of ovatifolin acetate, a sesquiterpene lactone isolated from Podanthus ovatifolius Lag. (Compositae). Revista Internacional de Contaminación Ambiental 1992873-76. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37080201>
- American Cancer Society. Tipos comunes de tratamiento para cáncer, disponible en <http://www.cancer.org/espanol/servicios/comocomprendersudiagnostico/fragmentado/despues-del-diagnostico-una-guia-para-los-pacientes-y-sus-familias-common-cancer-treatments>, fecha de acceso en octubre de 2016.
- Asociación Española Contra el Cáncer. Día contra el cáncer de mama, disponible en <https://www.aecc.es/TeAyudamos/informaryconcienciar/Campa%C3%B1as/Paginas/DiaMundialContraelCancerdeMama2014.aspx>, fecha de acceso en octubre de 2016.
- American Cancer Society, Cómo se clasifica el Cáncer de Seno, disponible en <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-early-classifying>, fecha de acceso en octubre de 2016
- American Cancer Society, ¿Como se determina la etapa del cáncer de seno?, disponible en <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-inicial-clasificacion>, fecha de acceso Octubre 2016.

- American Cancer Society, ¿Qué es el cáncer de cuello uterino?, disponible en <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdecuellouterino/recursosadicionales/fragmentado/cancer-de-cuello-uterino-prevencion-y-deteccion-temprana-what-is-cervical-cancer> , fecha de acceso Octubre 2016.
- Belov, M. (2005-2012). Introducción a la flora chilena, Chileflora, disponible en <http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/SFlora.htm>, fecha de acceso en octubre de 2016.
- Céspedes, C. L., Hoeneisen, M., Bittner, M., Becerra, J., & Silva, M. (2001). Comparative study of ovatifolin antioxidant and growth inhibition activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4243-4251.
- De Sagrera, J. E. (2005). Historia de la farmacia: los medicamentos, la riqueza y el bienestar.
- [Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11](#) Lyon, France: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer; 2013.
- Hoeneisen, M., Sicva, M., & Bohlmann, F. (1980). Sesquiterpene lactones of *Podanthus mitiqui*. *Phytochemistry*, 19(12), 2765-2766.
- IARC, 2014. Informe mundial sobre el cáncer.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). Población y Sociedad, Aspectos Demográficos [Internet]. www.ine.cl. 2008 [citado 30 marzo 2017]. p. 30- 31. Disponible en: <http://www.ine.cl/estadisticas/demograficas-y-vitales>.
- Instituto nacional del cáncer (NCI) 2015. Naturaleza del Cáncer. Disponible en <https://www.cancer.gov/espanol>.
- Jiménez, E., Jiménez, J., Rodríguez, A., Vásquez, A., Jiménez, E., & Riera, R. (2004). Evaluación de los parametrios uterinos. *Rev. Fac. Med.(Caracas)*, 27(1), 36-41.

- Knaul, F. M., López Carrillo, L., Lazcano Ponce, E., Gómez Dantés, H., Romieu, I., & Torres, G. (2009). Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud. *Salud pública de México*, 51, s138-s140.
- Ministerio de Salud, 2015. Guías Clínicas AUGE, Cáncer de Mama, Santiago, Chile.
- Ministerio de Salud, 2016. Orientaciones de manejo clínico con trastuzumab en personas con cáncer de mama que sobreexpresan el gen HER2. Santiago, Chile.
- Montenegro, G., Gómez, M. , Iturriaga, L. , & Timmermann, B. (1994). Potencialidad de la flora nativa chilena como fuente de productos naturales de uso medicinal. *Rojasiana*, 2, 49-66.
- Morón Rodríguez, F. J. , Levy Rodríguez, M. (2002). *Farmacología general*. La Habana. Editorial Ciencias Médicas.
- Muñoz, A. (1997). *Cáncer; genes y nuevas terapias*.
- Nieto, V., Pérez Escandón, B. E., Mendoza Pérez, E., & Maldonado Lagunas, V. (2008). Citotoxicidad en células Hela de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotánica*, (26), 137-147.
- Organización del Cáncer de Mama, Márgenes quirúrgicos, disponible en <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/margenes> , fecha de acceso, Octubre 2016.
- Organización Mundial de la Salud, Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino, disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/> , fecha de acceso Octubre 2016.
- Reyes Zuñiga, Y. I., Sanabria Negrín, J. G., & Marrero Fernández, R. (2014). Incidencia y mortalidad por cáncer cervicouterino. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 18(5), 753-766.

- Roa, K. (2013). Medicina originaria del pueblo mapuche.
- Schorge, J. O. W., Whitridge, J., & Schorge, J. O. (2008). Williams gynecology (No. 618.1). McGraw-Hill,.
- Serie Guías Clínicas Minsal, 2010. Guía Clínica, Cáncer Cervicouterino. Santiago, Chile.
- Serie Guías Clínicas Minsal, 2010. Guía Clínica, Cáncer de Mamas. Santiago, Chile.
- Stark, D., & Le Quesne, C. (2012). Enciclopedia de la Flora Chilena. URL <http://www.florachilena.cl/especies.php>.
- Vio F, Albala C. (2000) Nutrition policy in the Chilean Transition. Public Health Nutrition; 3:49-55.
- Zaldívar Lelo de Larrea, G., Martín Molina, F., Sosa Ferreyra, C. F., Ávila Morales, J., Lloret Rivas, M., Román Lara, M., & Vega Malagón, G. (2012). Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. Revista chilena de obstetricia y ginecología, 77(4), 315-321.

ANEXO 1: Protocolo de trabajo para el análisis de productos naturales en líneas celulares humanas.

- 1) Recepción producto natural (mg) con la siguiente información: peso molecular, estructura y peso en miligramos. Si es posible información sobre solubilidad, concentración de uso y alguna referencia bibliográfica y posible comparación con un fármaco clásico.
- 2) Filtrar por filtros especiales (millipore para DMSO o etanol) solución de trabajo.
- 3) Mantener protegido de la luz
- 4) Preparación solución de trabajo en fresco
- 5) Mantenimiento solución madre a -20°C y solución trabajo a 4°C
- 6) Disolver compuesto en DMSO o etanol (en general) a concentración 0,1 M, esta será la solución madre (1000x) a partir de la cual conseguir una solución 1 mM que será la solución de trabajo (10x). Se trabajará generalmente con 4 o 5 concentraciones diferentes (véase 12.5 – 25 – 50 – 75 -100 μM)
- 7) Filtrar por filtros especiales (Millipore para DMSO o etanol) para la solución de trabajo.
- 8) Buscar algún compuesto de referencia como control positivo, esto dependerá de la naturaleza de los compuestos a analizar aunque en general podrían ser: tamoxifeno, daunorubicina, fluorouracilo u oxaliplatino como antitumorales de uso clínico.
- 9) Para obtener las concentraciones experimentales indicadas en el apartado 6, tan solo hay que colocar 1.25 – 2.5 – 5 o 10 μl de la solución 10x por cada 100 μl de medio en los pocillos de cultivo.
- 10) Las células deben ser lavadas y tripsinizadas antes de llegar a 90-100% confluencia, si hubieran llegado a ese porcentaje serán desechadas para la realización de experimentos, aunque puedan ser sembradas.

- 11) Una suspensión celular homogénea 1:1 (suspensión celular: 0.4% (wt/vol) azul de tripan) será utilizada para determinar la concentración (nº células/ml). Si la suspensión celular presentase un porcentaje elevado de células teñidas con azul de tripan (+ 5-10%) se desecharía para la realización del experimento.
- 12) La densidad celular de siembra en los pocillos debe estar entre $3-5 \times 10^3$ cel/pocillo, dependiendo de la línea celular y la duración del ensayo (48-72h).
- 13) Las células son incubadas a 37°C en un incubador con atmósfera 5% CO_2 /95% O_2 y tratadas con los compuestos a las concentraciones indicadas durante 72 horas.
- 14) Tras el tratamiento las células son fijadas con 50% ácido tricloroacético (25 μl /pocillo) a 4°C durante 1h.
- 15) Las células son lavadas con agua destilada, 3 veces por inmersión.
- 16) Las células son teñidas con 0.1% sulforodamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelto en 1% ácido acético (50 μl /pocillo) durante 30 min y lavadas 3 veces con ácido acético al 1% (100-150 μl /pocillo) para eliminar el colorante no unido.
- 17) El colorante unido a proteína se solubiliza con 100 μl de 10 mM Tris base no tamponado.
- 18) La densidad celular se analiza en un lector de placas a 540 nm.
- 19) Los datos son expresados como media \pm desviación estándar de tres o cuatro pocillos para tres experimentos independientes.
- 20) Los datos obtenidos deben ser tiempo cero (T_0), control negativo (C-), control de solvente (DMSO o etanol) y diferentes concentraciones de compuesto (T_i). El porcentaje de viabilidad para cada dato como:
 - 21) $[(T_i - T_z)/(C - T_z)] \times 100$ for concentrations for which $T_i \geq T_z$
 - 22) $[(T_i - T_z)/T_z] \times 100$ for concentrations for which $T_i < T_z$.
- 23) Tres posibles parámetros se pueden calcular en cada caso: Inhibición del 50% del crecimiento (GI_{50}) calculado como $[(T_i - T_0)/(C - T_0)] \times 100 = 50$, y que representa la concentración de compuesto que provoca una reducción del

50% de la proteína (medida como tinción por SRB) en las células control tras el tratamiento.

24) La concentración de fármaco resultante en la inhibición del crecimiento total se calcula a partir de $T_i = T_z$.

25) La LC50 (concentración de fármaco que resulta en una reducción del 50% en la proteína medida al final del tratamiento farmacológico en comparación con la que al principio) indica una pérdida neta de células después del tratamiento se calcula a partir de $[(T_i - T_z)/T_z] \times 100 = -50$. Los valores se calculan para cada uno de estos tres parámetros si se alcanza el nivel de actividad; sin embargo, si el efecto no se alcanza o se excede, el valor para ese parámetro se expresa como mayor o menor que la concentración máxima o mínima probada.

ANEXO 2: Viabilidad porcentual de cada pocillo por placa celular tratada. Datos que fueron eliminados de la muestra según criterios de exclusión, se encuentran destacados.

1) Placas de células MCF-7

18-may	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	100,103	97,497	96,339	99,028	99,938	102,585	104,695	100,393	98,614	103,495	97,952	99,359
50	28,294	23,247	24,736	25,646	23,950	24,447	25,770	23,578	24,902	94,271	92,079	101,386
25	48,976	41,737	42,399	34,705	46,494	39,793	30,321	29,369	58,035	96,836	99,607	93,402
12,5	83,764	80,290	83,268	98,573	68,046	101,386	41,448	44,178	35,119	97,911	99,979	109,162
6,25	94,685	92,079	91,706	101,923	98,987	93,113	97,001	100,186	97,663	98,407	101,138	111,189
2,5	105,274	96,670	102,172	100,972	100,434	98,821	100,186	100,558	92,368	101,675	102,875	110,693

08-jun	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	100,397	99,746	98,991	100,843	100,878	100,054	99,951	99,677	99,025	99,368	101,118	99,951
50	19,071	16,670	16,601	13,377	13,652	13,103	43,321	10,873	11,662	37,387	29,979	25,760
25	18,522	16,533	18,008	15,504	17,322	17,253	12,588	12,074	11,868	98,305	92,645	91,891
12,5	34,198	97,379	31,831	16,670	19,483	19,345	21,609	16,533	17,630	10,462	97,722	95,149
6,25	97,036	67,606	78,960	23,153	23,564	23,290	97,653	97,962	98,099	96,144	96,110	97,756
2,5	97,002	93,537	91,822	72,854	58,482	41,263	21,849	15,915	19,174	98,648	97,550	97,928

19-jun	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	101,282	101,028	100,594	100,377	100,160	93,900	96,035	98,278	102,874	98,459	103,127	103,887
50	16,790	15,270	16,500	15,849	14,872	15,813	12,556	12,918	13,027	37,415	91,765	99,979
25	21,747	20,553	20,046	17,875	23,520	19,431	16,319	16,681	16,319	91,331	104,972	79,028
12,5	55,182	71,972	97,482	28,514	28,043	33,109	18,201	18,273	18,889	96,578	101,897	98,821
6,25	85,252	86,048	82,791	71,320	95,456	88,834	20,300	18,310	22,398	100,087	94,406	102,331
2,5	99,364	95,202	92,814	95,999	94,841	89,739	50,948	87,676	51,129	92,235	96,541	100,087

22-jun	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	98,893	99,002	100,594	98,495	99,617	100,449	97,265	99,943	98,785	100,124	99,689	96,541
50	26,668	17,550	25,872	19,793	24,787	22,037	23,375	21,566	20,300	89,485	87,314	82,791
25	26,668	17,550	25,872	22,471	25,221	25,872	21,458	23,448	18,961	94,913	97,916	79,824
12,5	24,461	95,999	29,672	27,899	30,793	29,346	24,425	27,283	26,524	99,147	99,074	100,703
6,25	54,350	100,051	65,712	101,969	48,994	67,195	34,376	30,974	54,060	100,703	101,245	101,969
2,5	101,318	100,449	100,775	102,114	100,341	96,288	100,558	49,573	101,101	100,884	101,933	100,305

2) Placas de células HELA

19-jun	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	95,047	96,620	103,586	108,192	111,450	100,328	90,329	96,283	83,925	100,889	109,990	103,361
50	35,615	31,121	33,480	36,513	38,311	38,311	25,503	36,289	39,996	77,521	89,093	108,979
25	47,748	41,457	47,299	35,727	43,142	35,053	44,153	48,422	46,175	79,094	77,296	152,121
12,5	63,590	71,229	75,948	52,018	56,849	74,937	121,000	37,862	46,512	88,082	91,003	102,912
6,25	77,408	90,553	86,509	68,421	114,708	81,790	69,769	87,969	55,276	81,790	76,847	90,778
2,5	88,082	83,700	96,845	78,869	68,084	84,824	79,431	108,192	84,824	69,881	97,407	283,120

29-jun	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	98,939	111,598	59,755	82,436	87,786	109,639	125,538	97,281	84,471	114,989	81,381	146,185
50	65,482	82,286	40,465	38,732	22,154	47,849	39,711	40,766	23,359	35,717	59,529	72,791
25	103,460	48,904	40,691	52,144	28,634	77,765	64,126	72,264	63,673	37,451	61,413	156,509
12,5	63,297	59,454	52,823	85,149	81,683	96,151	87,485	19,818	70,380	77,689	99,542	136,691
6,25	146,261	71,736	88,841	112,276	97,808	109,111	91,403	93,664	85,149	82,512	100,521	117,174
2,5	127,724	124,634	102,932	114,914	106,399	93,890	111,221	124,634	104,289	97,808	116,797	152,063

29-jun	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	53,521	72,575	79,636	80,774	82,520	115,392	118,580	116,607	123,970	119,491	78,801	158,132
50	47,751	30,063	52,306	26,874	45,474	40,008	43,424	33,631	48,434	118,504	51,850	86,696
25	64,528	61,112	59,214	54,356	69,842	70,374	50,484	64,756	57,620	94,363	42,285	90,492
12,5	100,133	65,819	74,929	58,835	83,507	83,887	114,861	22,243	67,489	107,649	123,059	196,849
6,25	105,675	47,675	82,369	69,994	84,646	97,020	74,170	114,025	69,918	52,837	81,002	165,269
2,5	73,031	75,232	96,793	94,743	84,115	91,630	161,625	118,049	107,041	106,586	109,015	124,198

03-jul	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	218,182	164,509	134,371	119,871	99,981	99,146	132,169	146,290	226,153	112,279	116,227	123,667
50	186,601	56,709	38,262	41,678	22,243	32,492	47,447	42,285	212,716	54,280	53,597	51,243
25	170,886	79,180	56,785	43,652	40,615	46,992	52,154	48,282	223,951	67,185	66,958	65,136
12,5	202,695	86,924	84,418	49,649	44,183	50,028	76,219	66,274	150,541	67,110	73,107	67,793
6,25	204,593	108,180	80,850	71,209	39,856	59,898	90,112	69,387	143,633	78,573	74,473	81,078
2,5	223,344	140,824	99,070	92,465	65,667	58,683	79,180	71,892	197,685	97,476	82,369	95,426

3) Placas de células CON

03-jul	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	101,319	100,273	102,770	98,754	97,978	98,855	99,632	100,307	100,172	99,058	100,543	100,340
50	31,050	15,559	15,694	10,024	9,653	9,045	13,568	14,850	13,331	98,282	90,485	53,528
25	35,944	25,245	22,883	15,053	14,783	13,568	15,188	17,517	19,272	99,092	97,472	53,900
12,5	35,371	18,057	18,057	16,740	12,758	15,390	29,768	29,329	31,725	99,598	97,843	86,604
6,25	78,301	92,713	97,168	19,542	16,200	99,125	95,075	99,125	91,363	98,822	100,914	86,604
2,5	84,545	96,797	96,898	94,569	24,334	97,742	97,607	96,830	96,493	95,581	93,253	81,744

25-may	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	99,849	98,508	100,501	98,291	98,798	98,725	99,342	100,538	100,755	101,226	97,602	105,865
50	13,772	14,896	14,352	16,962	16,454	17,976	15,476	14,062	13,265	57,554	96,080	98,399
25	11,960	16,962	19,752	16,889	15,766	18,266	15,838	14,932	17,868	98,907	97,674	94,956
12,5	38,707	35,880	42,223	25,080	23,268	25,406	18,049	19,607	19,354	100,393	99,160	104,379
6,25	71,181	80,314	85,606	65,020	64,512	71,688	19,934	24,500	101,226	100,646	95,464	104,995
2,5	100,284	96,986	99,378	99,342	97,457	98,689	57,264	60,997	43,056	100,791	100,973	104,126

22-jun	HEX	HEX	HEX	DCM	DCM	DCM	AC	AC	AC	ET	ET	ET
CS	107,531	98,736	102,586	97,906	95,251	103,117	102,055	96,745	98,139	98,471	98,504	100,960
50	16,096	20,345	25,456	13,607	7,866	24,891	18,453	19,083	14,537	83,602	77,529	93,990
25	98,769	32,956	54,396	16,860	10,189	82,772	14,304	19,415	22,801	95,019	90,041	91,733
12,5	70,891	68,900	86,722	18,984	11,749	36,673	21,705	16,262	22,535	93,691	92,297	91,468
6,25	73,878	67,804	88,680	20,610	20,942	30,102	94,554	30,301	64,187	95,749	90,572	92,729
2,5	94,919	65,946	55,989	27,447	22,535	33,852	97,342	57,250	52,239	97,209	95,185	91,169

ANEXO 3: Tablas de promedio y desviación estándar de viabilidad celular porcentual por cada línea celular trabajada.

TABLA 1: Promedio, desviación estándar y p Value de Viabilidad porcentual de células MCF7 expuestas a distintas concentraciones de extractos: Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol.

EXTRACTO	PROMEDIO	DESVEST	p Value
CS	100	0	
HEX 50	19,687	4,600	0,000000
HEX 25	26,551	11,303	0,000002
HEX 12,5	87,165	9,947	0,185712
HEX 6,25	85,629	11,283	0,176747
HEX 2,5	98,033	4,183	1,000000
DCM 50	18,944	4,989	0,000001
DCM 25	25,455	9,876	0,000117
DCM 12,5	25,911	5,837	0,000477
DCM 6,25	89,850	13,500	1,000000
DCM 2,5	95,240	8,687	1,000000
AC 50	20,321	9,213	0,000010
AC 25	22,287	12,846	0,000013
AC 12,5	25,843	9,565	0,000480
AC 6,25	98,094	1,093	1,000000
AC 2,5	97,075	5,668	1,000000
ET 50	92,384	6,198	0,030329
ET 25	93,389	7,562	0,042767
ET 12,5	99,649	3,667	1,000000
ET 6,25	100,124	4,333	1,000000
ET 2,5	100,113	4,413	1,000000

TABLA 2: Promedio, desviación estándar y p Value de Viabilidad porcentual de células HELA expuestas a distintas concentraciones de extractos: Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol.

EXTRACTO	PROMEDIO	DESVEST	p Value
CS	100	0	
HEX 50	43,125	11,949	0,000019
HEX 25	54,692	11,879	0,000381
HEX 12,5	69,843	10,878	0,279135
HEX 6,25	88,014	12,189	1,000000
HEX 2,5	89,461	11,273	1,000000
DCM 50	35,887	8,384	0,000000
DCM 25	42,257	8,307	0,000003
DCM 12,5	68,073	17,852	0,131107
DCM 6,25	78,848	13,818	1,000000
DCM 2,5	86,190	16,515	1,000000
AC 50	38,259	8,076	0,000000
AC 25	55,646	9,308	0,000058
AC 12,5	64,603	17,056	0,007879
AC 6,25	78,682	12,719	0,588673
AC 2,5	96,013	17,032	1,000000
ET 50	66,289	15,373	0,000046
ET 25	75,242	12,213	0,000683
ET 12,5	86,098	15,374	0,178162
ET 6,25	83,417	16,071	0,033691
ET 2,5	99,696	15,805	1,000000

TABLA 3: Promedio, desviación estándar y p Value de Viabilidad porcentual de células CON expuestas a distintas concentraciones de extractos: Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol.

EXTRACTO	PROMEDIO	DESVEST	p Value
CS	100	0	
HEX 50	17,486	4,559	0,000000
HEX 25	23,672	8,539	0,000000
HEX 12,5	31,382	10,606	0,000221
HEX 6,25	81,738	10,018	0,161042
HEX 2,5	91,969	11,575	1,000000
DCM 50	14,053	5,548	0,000000
DCM 25	15,172	2,487	0,000007
DCM 12,5	20,672	7,851	0,001695
DCM 6,25	21,479	5,173	0,084097
DCM 2,5	97,560	1,833	1,000000
AC 50	15,181	2,165	0,000000
AC 25	17,459	2,737	0,000002
AC 12,5	23,148	5,683	0,001339
AC 6,25	90,922	13,556	1,000000
AC 2,5	80,540	20,654	1,000000
ET 50	91,195	7,945	0,003334
ET 25	95,612	3,328	0,131107
ET 12,5	96,159	5,517	0,121479
ET 6,25	96,277	5,731	0,159308
ET 2,5	95,559	6,599	0,029333