



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Efectos del quintral (*Tristerix corymbosus*) extractos de hoja y de flor en la viabilidad y muerte celular de líneas celulares de cáncer de mama, próstata y gástrico *in vitro*”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Daniela Vidal Pérez

Director de Tesis: Dr. Joan Villena García

DICIEMBRE /2019



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Efectos del quintral (*Tristerix corymbosus*) extractos de hoja y de flor en la viabilidad y muerte celular de líneas celulares de cáncer de mama, próstata y gástrico *in vitro*”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Daniela Vidal Pérez

Director de Tesis: Dr. Joan Villena García

DICIEMBRE /2019



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Efectos del quintral (*Tristerix corymbosus*) extractos de hoja o de flor en la viabilidad y muerte celular de líneas celulares de cáncer de mama, próstata y gástrico *in vitro*”

Daniela Vidal Pérez

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Joan Villena García en el laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Iván Montenegro
Presidente Comisión

Dr. Ivo Carrasco
Profesor Informante

Dr. Alejandro Madrid
Profesor Informante

Dr. Juan Villena García
Director de Tesis

**Valparaíso, Chile
2019**

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

APAF1: factor de activación de la proteasa apoptótica 1

ATP11A: ATPasa A

ATP11C: ATPasa C

AKT: proteína quinasa B

Akt-mTOR: vía de transducción intracelular

Bcl-2: familia de proteínas Bcl-2

BH: dominio de homología a Bcl-2

(BH1, BH2, BH3, BH4): dominios de homología a Bcl-2

BAX: proteína X asociada a Bcl-2

BAK: Bcl-2 antagonista/asesino 1

BOK: proteína asesina ovárica relacionada con Bcl-2

BIM: proteína mediadora de la muerte celular que interactúa con Bcl-2

BID: proteína antagonista de la muerte celular que interacciona con BH3

BCL-XL: : proteína 1 de unión a Bcl-2

BCL-W: proteína 2 de unión a Bcl-2

BFL-1: proteína A1 de unión a Bcl-2

BMF: factor de modificación de Bcl-2

BSG: basigina

BRCA1: gen 1 supresor de tumor de cáncer de mama

BRAP: proteína asociada a BRCA1

BECN1: beclina 1

CYCS: citocromo C

CASP9: proteína caspasa nueve

CARD: dominio de reclutamiento de caspasas

CASP3: proteína caspasa tres

CASP7: proteína caspasa siete

CASP8: proteína caspasa ocho

CASP9: proteína caspasa nueve

CASP10: proteína caspasa diez

CAD: ADNasa activada por caspasa

Cdk: quinasa dependiente de ciclina
CO₂: dióxido de carbono
CS: control solvente
CN: compuestos naturales
C-: control negativo
c-Fos: protooncogén c-Fos
c-IAP1: inhibidor celular de la proteína de apoptosis 1
c-IAP2: inhibidor celular de la proteína de apoptosis 2
c-FLIP: proteína inhibidora de FLICE
DIABLO/SMAC: homólogo mitocondrial de diablo
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK2: MAP quinasa 1
ERBB2: receptor de tirosina quinasa 2
FDD: proteína FDD
FITC: isotiocianato de fluoresceína
GSDME: proteína gasdermina D
GLUT: transportador de glucosa
HRK: activador de la apoptosis harariki
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
IAP: proteínas inhibidoras de la apoptosis
IMP: proteína integral de membrana
ICAD: inhibidor de CAD
IL8: interleucina 8
IL-1 α : interleucina 1 alfa
IC₅₀: concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular
IS: índice de selectividad
JNK: quinasas c-Jun N-terminal
KRAS: interruptor de señalización celular
Kip1 / p27 y Cip / p21: familia de proteínas inhibidoras de la Cdk
LC8: dineína citoplasmática
M: molar
MOMP: pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa

MCL1: proteína Bcl-2 isoforma 1
MAPK: proteína MAP quinasa 1
mTOR: diana en mamíferos de rapamicina
mg: miligramos
NOXA: proteína 1 inducida por 6-forbol-12-miristato-13-acetato
NF- κ B: factor nuclear kappa Beta β
NPTN: neuroplastina
OMM: membrana mitocondrial interna
OPA1: proteína de unión a dinamina
OMA1: metaloproteasa de zinc
PARL: proteína presinilina romboidal asociada
PBS: buffer fosfato salino
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular
PKC: proteína quinasa C
PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PI3K: fosfoinositol-3-quinasa
PI3K / AKT: vía de transducción intracelular
PS: fosfatidilserina
PUMA: proteína moduladora de apoptosis regulada por p53
P65: factor de transcripción
RAS: proteína de unión a nucleótidos de guanosina
RB: proteína del retinoblastoma
RAF-MEK-ERK: Cascada de las MAP quinasa
ROS: especies reactivas de oxígeno
RIPK1: receptor que interactúa con la proteína serina/treonina quinasa 1
SASP: fenotipo secretor asociado a la senescencia
SBF: suero bovino fetal
SRB: sulforodamina B
TGF- β : factor de crecimiento transformante beta (β)
TNF: factor de necrosis tumoral
TRIS: hidrodimetil aminometano
TCA: ácido tricloroacético

μM : micromolar

μg : microgramos

VAD-FMK: carbobenzoxi-valil-alanil-aspartil- [O-metil] - fluorometilcetona

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

VDAC2: canal aniónico dependiente de voltaje variante 2

XIAP: inhibidor de la apoptosis ligado a X

XKR8: proteína 8 relacionada con XK

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	13
I.I Cáncer	13
i.i.i Autosuficiencia en señales de crecimiento	14
i.i.ii Potencial replicativo ilimitado	16
i.i.iii Insensibilidad a inhibidores del crecimiento	17
i.i.iv Inducción de la angiogénesis	18
i.i.v Capacidad de migrar e invadir los tejidos	19
i.i.vi Reprogramación del metabolismo energético	20
i.i.vii Evasión del sistema inmune	21
I.II Cáncer y muerte celular	22
i.ii.i Apoptosis extrínseca	24
i.ii.ii Apoptosis intrínseca	25
I.III Compuestos naturales	28
I.IV Muérdagos.....	29
I.V Quintral.....	31
II. HIPÓTESIS	34
III. OBJETIVOS	33
III.I OBJETIVO GENERAL	33
iii.i.ii Objetivos específicos	35
IV. METODOLOGÍA	36
IV.I Células y condiciones de cultivo.....	34
IV.II Extractos de quintral.....	34
IV.III Viabilidad	38
iv.iii.i Ensayo de citotoxicidad.....	35
IV.IV Muerte celular:.....	39
iv.iv.i Potencial de membrana mitocondrial	39
iv.iv.ii Caspasas.....	40
IV.V Análisis estadístico.....	41
V. RESULTADOS	42
V.I Viabilidad celular	42

V.I.I Línea celular de cáncer gástrico AGS.....	42
v.i.i.i Tratamiento con extractos de flor de quintral de álamo.....	42
v.i.i.ii Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de huayún.....	43
v.i.i.iii Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de maqui.....	45
V.I.II Línea celular de cáncer de próstata PC-3	47
v.i.ii.i Tratamiento con los extractos de flor de quintral de álamo	47
v.i.ii.ii Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de huayún	48
v.i.ii.iii Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de maqui.....	50
V.I.III Línea celular de cáncer mamario metastásico MCF-7.....	52
v.i.iii.i Tratamiento con los extractos de flor de quintral de álamo	52
v.i.iii.ii Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de huayún	53
v.i.iii.iii Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de maqui.....	55
V.I.IV Línea de células embrionarias renales HEK-293	57
v.i.iv.i Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de huayún.....	57
v.i.iv.ii Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de maqui.....	59
V.II Muerte celular	65
V.II.I Potencial de membrana mitocondrial.....	65
v.ii.i.i Línea celular de cáncer gástrico AGS.....	65
v.ii.i.ii Línea celular de cáncer de prostata PC-3	67
v.ii.i.iii Línea celular de cáncer mamario metastásico MCF-7	68
v.ii.i.iv Línea de células embrionarias renales HEK-293	69
V.II.II Activación de caspasas	71
v.ii.ii.i Línea celular de cáncer gástrico AGS.....	71
v.ii.ii.ii Línea celular de cáncer de prostata PC-3	72
v.ii.ii.iii Línea celular de cáncer mamario metastásico MCF-7	73
v.ii.ii.iv Línea celular HEK-293	74
VI. DISCUSIÓN	77
vi.i Metabolitos presentes en el quintral	79
vi.ii Compuestos fenolicos	81
vi.iii Flavonoides y cáncer.....	82
vi.iv Metabolitos del quintral y la maquinaria apoptótica.....	83
VII. CONCLUSIONES	86

RESUMEN

Se le ha denominado “muérdagos” a un grupo enigmático de plantas de hábito parasitario, sin relación filogenética entre ellas, pero con un pasado ligado a la historia de la humanidad.

El quintral (*Tristerix corymbosus*), es un tipo de muérdago perteneciente a la familia Loranthaceae que crecen sólo en América del Sur. Este muérdago ha sido utilizado tradicionalmente en medicina alternativa, por el pueblo mapuche. Un estudio reciente, en el que se describieron por primera vez sus componentes, reveló la presencia de compuestos a los que se le han atribuido importantes actividades biológicas, entre ellas efectos antitumorales.

Si bien otros tipos de muérdagos principalmente el muérdago europeo (*Viscum álbium*) ha sido producto de numerosas investigaciones y ensayos clínicos que avalan su actividad anticancerígena. La información y los conocimientos sobre este tipo de plantas en América del sur está en su etapa inicial.

Esta investigación tiene por objetivo estudiar el efecto de diferentes extractos del quintral sobre la viabilidad celular, utilizando un modelo *in vitro* de líneas celulares tumorales: MCF-7 (cáncer de mama), PC-3 (cáncer de próstata) y AGS (cáncer gástrico) y una línea celular no tumoral, HEK-293 (células embrionarias de riñón). Se evaluó el efecto de los extractos del quintral sobre la viabilidad celular, mediante el ensayo de la sulforodamina B. Posteriormente se analizó qué tipo de muerte celular se indujo, evaluando los cambios producidos sobre el potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasas.

Los extractos de quintral demostraron ser citotóxicos para las tres líneas de células tumorales. Los efectos más significativos fueron observados en la línea de células de adenocarcinoma gástrico (AGS). El quintral disminuyó el porcentaje de células viables y desencadenó la pérdida del potencial de membrana mitocondrial a bajas concentraciones. Proponemos que el *Tristerix corymbosus* podría ser una potente especie con efectos antitumorales, por lo que resulta necesario seguir investigándola.

Palabras claves: *Tristerix corymbosus*, quintral, cáncer, viabilidad celular, muerte celular, caspasas.

I. INTRODUCCIÓN

I.I Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y en el año 2018, se estima que alrededor de 18,1 millones de personas fueron diagnosticadas y fue la causa de muerte de 9,6 millones. A nivel mundial, casi 1 de cada 6 muertes se debe a cáncer. Las causas más comunes de muerte por cáncer son los cánceres de: Pulmón (1,8 millones de muertes), colorectal (881.000 muertes).hígado (782.000 muertes), y mama (627.000 muertes)(1).

La carcinogénesis es un proceso de varios pasos caracterizado por una progresión de cambios moleculares que en última instancia, permiten la reprogramación y transformación de una célula para someterse a una proliferación descontrolada (2).

Durante este proceso, las células normales evolucionan progresivamente a un estado neoplásico, adquiriendo una serie de capacidades biológicas distintivas (3). (Figura 1)

Hanahan y Weinberg (3,4), publicaron sus influyentes revisiones, que han logrado persistir en el centro de la literatura del cáncer, donde se organizaron las complejidades de la biología del cáncer en una serie de características que han servido como modelos para comprender los rasgos centrales de esta patología.

El objetivo de las características distintivas del cáncer, ha sido proporcionar un marco organizativo de las propiedades celulares descubiertas durante la transformación de células (fenotípicamente) normales, ya sea que dicha transformación se detenga en una etapa de crecimiento benigno o continúe en la dirección de una evolución hacia la malignidad. Guiados por las revisiones de Hanahan y Weinberg, otros autores han propuesto una definición más precisa de las características distintivas del cáncer como, características adquiridas, evolutivas y ventajosas que promueven complementariamente la transformación de células fenotípicamente normales en células

malignas, y promueven la progresión de las células malignas mientras se explota el tejido del huésped (5).

Tomando en consideración la organización de dichas características y las propuestas actuales, las características distintivas del cáncer se describen a continuación.



Figura 1: Capacidades distintivas de las células tumorales. Estas capacidades son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, potencial replicativo ilimitado, inducción de la angiogénesis, capacidad de migrar e invadir los tejidos, reprogramación del metabolismo energético y evasión del sistema inmune. Imagen extraída de *Hanahan et al* (3).

I.I.I Autosuficiencia en señales de crecimiento

El rasgo fundamental de las células cancerígenas es su capacidad para mantener la proliferación de forma continuada. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la

producción y liberación de señales promotoras del crecimiento, que instruyen la entrada y progresión a través del ciclo de crecimiento y división celular, asegurando así una homeostasis del número de células y por lo tanto el mantenimiento de la arquitectura y función del tejido normal. Las células cancerosas, al desregular estas señales se vuelven dueñas de sus propios destinos. Las señales de activación se transmiten en gran parte por factores de crecimiento, que se unen a los receptores de superficie celular. A menudo estas señales influyen en otras propiedades celulares y biológicas, como la supervivencia celular y el metabolismo energético (3).

Las células cancerígenas pueden adquirir la capacidad de sustentar la señalización proliferativa de varias maneras: pueden producir factores de crecimiento por sí mismas, y pueden responder a través de la expresión de receptores afines a ellas, dando como resultado la estimulación proliferativa autocrina. Alternativamente, las células cancerosas pueden enviar señales para estimular células del estroma de soporte asociado al tumor, que suministra recíprocamente diversos factores de crecimiento a las células cancerosas. De esta forma, las células crecen fuera de control, puesto que se dividen rápido y no mueren (6).

Actualmente se aprecia que en las células cancerosas, las vías de señalización para el crecimiento y proliferación celular albergan una o más alteraciones que las hace impulsoras del desarrollo tumoral, lo que les da una ventaja de supervivencia a dichas células. Estas alteraciones, incluyen factores de crecimiento, sus receptores o las moléculas de señalización citosólica (7).

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es un ligando anti-crecimiento convencional. Se ha demostrado que está implicado en la progresión tumoral tanto al estimular la desdiferenciación de las células cancerosas como al remodelar la EMT (5,6,8).

Otra de las alteraciones más comunes, se encuentran en el compartimiento aguas abajo. Un ejemplo es la proteína RAS, que sirve como un "centro de señalización" en esta red de vías de señalización. A menudo mediante mutaciones sin sentido en su gen o mutaciones inactivadoras en alguno de sus reguladores negativos (por ejemplo, NF1) o de las vías de señalización que median las funciones RAS, principalmente RAF-MEK-

ERK y PI3K-AKT-mTOR, cuyos componentes también son mutados de forma independientemente, han sido descritos en varios tipos de cáncer. Es importante destacar que las mutaciones en la familia de genes RAS, sus proteínas reguladoras o sus vías de señalización, producen una gran cantidad de efectos más allá del crecimiento y la proliferación celular. Estos efectos incluyen la supresión de la apoptosis, el cambio del metabolismo, la promoción de la angiogénesis y la evasión inmune, y así reflejan el hecho de que una sola cascada de señalización podría estar implicada en múltiples características del cáncer (9–11).

Incluso en condiciones fisiológicas, en presencia de señalización de crecimiento, la regulación estricta del ciclo celular es a través de proteínas reguladoras que mantiene los ciclos de división bajo control. Para que las células cancerosas crezcan, la desregulación del ciclo celular y la interrupción de los puntos de control de este son cruciales. Un regulador clave es la proteína retinoblastoma (RB), comúnmente inactivada en una multitud de tumores malignos. Como es el caso con RAS, se ha demostrado que la familia RB no se limita al control proliferativo, sino que está involucrada en múltiples roles, que afectan a varios otros distintivos, que incluyen el mantenimiento de la estabilidad genómica, la regulación de la apoptosis, el metabolismo celular, la senescencia, angiogénesis y supresión de invasión y metástasis (12,13). Otro regulador clave es p53 que actúa como un detector de estrés y responde, siendo sensible a una variedad de tensiones que incluyen estrés genotóxico, señalización excesiva, privación de nutrientes e hipoxia entre otros. Al detectar una mayor proliferación, p53 se involucra en el inicio de los mecanismos de reparación, o si el daño es irreparable, inicia la muerte celular o los estados de diferenciación terminal. La molécula también se ha relacionado con la reprogramación metabólica, la regulación de la autofagia y la homeostasis redox (5,14).

I.I.II Potencial replicativo ilimitado

Las células de los tejidos normales pueden atravesar solo un número limitado de ciclos sucesivos de división celular y crecimiento. Una vez que finalizan los ciclos, las células pueden entrar en estado de senescencia (proceso de salida del ciclo celular irreversible) o de crisis que lleva consigo, la muerte celular. Cuando las células emergen de una

población en crisis y exhiben un potencial replicativo ilimitado, se denomina inmortalización (3).

En el acortamiento de los telómeros, después del agotamiento del potencial replicativo, induce a la senescencia. Por el contrario, divisiones sucesivas conducirían a ciclos de fusión y rotura cromosómica, lo que provoca inestabilidad genómica y permite la acumulación de alteraciones (potencialmente transformadoras de malignidad). La longitud telomérica corta, es casi una característica universal de las lesiones detenidas tanto benignas como premalignas. En consecuencia, dicha detención es evitada en células completamente inmortalizadas. Esto se debe principalmente a la enzima telomerasa, aumentada en el 85-90% de los tumores humanos y capaz de reconstituir los extremos teloméricos, manteniendo una longitud suficiente para una mayor replicación. Cabe destacar, que del 10 al 20% de los tumores humanos utilizan vías alternativas para el alargamiento de los telómeros, pero sus mecanismos exactos aún están sujetos a investigación (15).

Sin embargo, el papel pasivo de las células senescentes ha sido desafiado en los últimos años, principalmente a través de la caracterización del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) que libera: factores de señalización solubles, proteínas insolubles y componentes de la matriz y proteasas por parte de las células senescentes, capaces de remodelar el microambiente que los rodea (5).

I.I.III Insensibilidad a inhibidores del crecimiento

Además de la capacidad distintiva de inducir y mantener señales estimuladoras del crecimiento que actúan positivamente, las células cancerosas también deben sortear programas poderosos que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de las acciones de los genes supresores de tumores. Se han descubierto docenas de supresores de tumores que operan de varias maneras para limitar el crecimiento y la proliferación celular (5).

Los dos genes supresores tumorales que codifican para las proteínas RB y TP53, funcionan como un centro dentro de dos circuitos reguladores celulares complementarios

claves que rigen en futuro de las células para proliferar o, alternativamente, activar programas de senescencia y apoptóticos (16).

La proteína RB integra señales de diversas fuentes extracelulares e intracelulares y, en respuesta, censa si una célula debe o no pasar por su ciclo de crecimiento y división. Por lo tanto, las células cancerosas con defectos en la función de la vía RB carecen de los servicios de un guardián crítico de la progresión del ciclo celular, cuya ausencia permite la proliferación celular persistente. Mientras que RB transduce señales inhibitoras del crecimiento que se originan en gran parte fuera de la célula, p53 recibe entradas de sensores de estrés y anormalidades que funcionan dentro de los sistemas operativos intracelulares, si el grado de daño al genoma es excesivo, o si las señales que promueven el crecimiento, la glucosa o la oxigenación no son optimas, p53 puede detener el avance del ciclo celular hasta que estas condiciones se hayan normalizado (16).

Alternativamente, ante las señales de alarma que indican un daño irreparable a dichos subsistemas celulares, p53 puede desencadenar la apoptosis. En particular, los diversos efectos de activación de p53 son complejos y altamente dependientes del contexto, varían según el tipo de célula, así como por la gravedad y persistencia de las condiciones de estrés celular y daño genómico (17).

Aunque los dos supresores canónicos de la proliferación (p53 y RB) tienen una importancia crucial en la regulación de la proliferación celular, varias líneas de evidencia indican que cada uno opera como parte de una red más grande que está conectada para redundancia funcional (5).

Para que las células cancerosas crezcan, la desregulación del ciclo celular y la interrupción de los puntos de control del ciclo son cruciales. Los genes codificantes de RB y p53, se encuentran comúnmente inactivados en una multitud de tumores malignos. En particular p53 es el gen mutado en más del 50% de los tumores secuenciados (18).

I.I.IV Inducción de la angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de brotación, división celular, migración y ensamblaje de células endoteliales de vasos preexistentes, para la formación de uno nuevo. Se utiliza durante la embriogénesis para la expansión y remodelación de las redes vasculares

primitivas, y es parte de eventos postnatales que incluyen la curación de heridas, el ciclo reproductivo femenino y la inflamación crónica. En estos eventos, sin embargo, la angiogénesis se apaga o puede ser prolongada pero autolimitada, a diferencia de las neoplasias en las que el proceso se activa continuamente. La regulación de la angiogénesis implica factores pro y antiangiogénicos; su equilibrio determina el estado del "interruptor angiogénico". Solo cuando un disparador inclina el equilibrio hacia factores pro-angiogénicos (como en el caso de malignidad) se activa el interruptor y los tejidos vasculares quiescentes muestran signos de angiogénesis (3,5,19).

El desencadenante más importante de la angiogénesis es la hipoxia. Las células endoteliales poseen una serie de mecanismos de detección de oxígeno, principalmente aquellos que interactúan con la familia del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), que regulan la expresión de una multitud de genes no solo involucrados en la angiogénesis, sino que también en la supervivencia celular, en el metabolismo y en la inflamación. En respuesta a la hipoxia, el factor inducible por hipoxia (HIF) inicia una respuesta transcripcional adaptativa, muchos de los cuales son factores involucrados en la activación de la angiogenesis. Dado que el tejido tumoral crece más rápido que su suministro y se desarrolla en un ambiente de privación de oxígeno, la hipoxia es una característica de los tumores, no es sorprendente que los niveles de HIF sean más altos en muchos tipos de cáncer (5,20).

Los efectores angiogénicos, incluyen una gran cantidad de moléculas pro-angiogénicas, la vía de señalización del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es la más potente. Controlado por la actividad de HIF, y también directamente por señalización de crecimiento, VEGF se sobreexpresa en una multitud de tumores malignos (21).

I.I.V Capacidad de migrar e invadir los tejidos

El proceso de invasión y metástasis se ha esquematizado como una secuencia de pasos discretos, que consiste en una sucesión de cambios celulares biológicos, comenzando con la invasión local, luego la invasión de las células cancerosas a los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, el tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfáticos y hematógenos, seguido del escape de las células cancerosas del lumen de

tales vasos en el parénquima de tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis) y, finalmente, el crecimiento de lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos, este último paso se denomina "colonización" (3).

La gran mayoría de los tumores sólidos humanos son carcinomas que se originan en varios tipos de células epiteliales en todo el cuerpo. Para que las células del carcinoma se separen de las vecinas y logren invadir tejidos adyacentes, estas células deben perder la adhesión celular (característica de un fenotipo epitelial) y adquirir motilidad. E-cadherina funciona como un componente clave de las uniones adherentes, que son integrales en la adhesión celular y mantienen el fenotipo epitelial. La unión homofílica de E-cadherina entre las células es importante para mediar la inhibición por contacto cuando las células alcanzan la confluencia (22). La pérdida parcial de E-cadherina, se ha asociado a la progresión del carcinoma y el mal pronóstico. En varios tipos de carcinomas humanos, la expresión de E-cadherina se pierde en una etapa temprana del desarrollo del tumor, lo que hace que los tumores resultantes exhiban un fenotipo mesenquimatoso esencialmente permanente (23).

Las MMP estimulan indirectamente el inicio y la progresión del tumor, ya que la irrupción de la MEC puede activar procesos celulares que causan daño al ADN y estimulan la inestabilidad genómica. Esta familia de proteínas puede inducir directamente la transición EMT en las células epiteliales diana y aumentar la invasividad (24).

I.I.VI Reprogramación del metabolismo energético

Las alteraciones metabólicas del cáncer, se han organizado en seis características distintivas: absorción desregulada de glucosa y aminoácidos, modos oportunistas de adquisición de nutrientes, utilización de glucólisis e intermedios del ciclo TCA, aumento de la demanda de nitrógeno, alteraciones en la regulación génica impulsada por metabolitos e interacciones metabólicas con el microambiente. Estos pueden existir total o parcialmente en diferentes entornos tumorales (25).

Dos nutrientes principales que las células en crecimiento requieren absolutamente, son la glucosa y la glutamina. Se han observado niveles elevados de proteínas transportadoras de glucosa (GLUT) en muchos tipos de cáncer. Múltiples mecanismos y vías de señalización en las células cancerosas promueven la captación de la glucosa,

como es el caso de HIF que aumenta la expresión de GLUT y hexoquinasa (atrapando la glucosa entrante), también la señalización aberrante de PI3K / Akt aumenta la expresión de GLUT1 y la translocación de proteínas a la membrana celular, al igual que KRAS y BRAF oncogénicos (25,26).

Los reguladores de la captación de glutamina están menos caracterizados: MYC mejora la expresión de los transportadores de glutamina y su utilización y RB puede regular negativamente la síntesis de glutamina. Las células tumorales pueden utilizar vías alternativas que no sean el transporte para la adquisición de glutamina (y otros aminoácidos), que incluyen macropinocitosis de proteínas extracelulares en períodos de privación de nutrientes, engrosamiento y digestión de células vivas ("entosis"), o fagocitosis de cuerpos apoptóticos vecinos. Por lo tanto, la absorción de nutrientes desregulada se extiende más allá de la glucosa y la glutamina, aunque esas han sido las vías hiperactivas y reconectadas más caracterizadas (5,25).

I.I.VII Evasión del sistema inmune

La antigua teoría de la vigilancia inmune propone que las células y los tejidos son monitoreados constantemente por un sistema inmune siempre alerta, y que dicha vigilancia inmune es responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de las células cancerosas incipientes y, por lo tanto, los tumores nacientes. Según esta lógica, los tumores sólidos que aparecen de alguna manera han logrado evitar ser detectados por las diversas barreras del sistema inmune o han sido capaces de limitar la muerte inmunológica, evitando así la erradicación (3).

A pesar de que las células cancerosas pasan por una presión de selección inmune constante, algunos clones emergen y 'escapan' de la vigilancia inmune, que es la fase final en la inmunoección del cáncer. Durante esta fase, las células tumorales que pueden evadir la detección inmune y la eliminación mediante alteraciones genéticas y epigenéticas crecen descontroladamente formando un tumor clínicamente detectable (5). Se han descrito varios mecanismos de evasión que se enmarcan en tres principios principales; (a) falta de reconocimiento de antígeno tumoral mediado por la alteración de las células tumorales o efectoras, (b) resistencia a la muerte celular, y (c) inducción de la tolerancia e ignorancia inmunológica, particularmente a través de factores inmunosupresores secretados por las células tumorales. Las células cancerosas pueden

paralizar los componentes citotóxicos del sistema inmunitario mediante la secreción de factores inmunosupresores o el reclutamiento de células inflamatorias inmunosupresoras. Además, las células del estroma secretan factores inmunosupresores, provocando un alza en la expresión de otras moléculas inmunosupresoras (5).

I.II Cáncer y muerte celular

La muerte celular es esencial para la regulación del desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis tisular, la cual es consecuencia del equilibrio entre muerte y proliferación celular (27). La alteración de la homeostasis en las células epiteliales conduce a la progresión de un cáncer agresivo, relacionado con la pérdida de las características epiteliales y la adquisición de un fenotipo migratorio (23).

La desregulación de la muerte celular por apoptosis es fundamental para el desarrollo del cáncer. La elucidación de los circuitos de señalización que rigen el programa apoptótico ha revelado cómo se desencadena la apoptosis en respuesta a diversas tensiones fisiológicas, que experimentan las células cancerosas durante el curso de la génesis del tumor. Estudios han revelado cómo la apoptosis se atenúa en aquellos tumores que logran progresar a estados de alto grado de malignidad y resistencia a la terapia (28).

La maquinaria apoptótica se compone de reguladores río arriba y efectores río abajo, (Figura 2). Los reguladores, a su vez, se dividen en dos circuitos principales, uno que recibe y procesa señales extracelulares inductoras de muerte (el programa apoptótico extrínseco, que implica por ejemplo el ligando Fas / receptor Fas), y el otro detecta e integra una variedad de señales de estrés de origen intracelular (el programa intrínseco) ocasionando un cambio en el equilibrio que favorece las proteínas proapoptóticas sobre las antiapoptóticas y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) con la liberación de moléculas activadoras desde el espacio intermembrana mitocondrial. Cada uno culmina en la activación de proteasas normalmente latentes (caspasas 8 y 9, respectivamente), que proceden a iniciar una cascada de proteólisis que involucra

caspasas efectoras responsables de la fase de ejecución de la apoptosis, en la que la célula se desmonta progresivamente y luego es consumida por células fagocíticas (28).

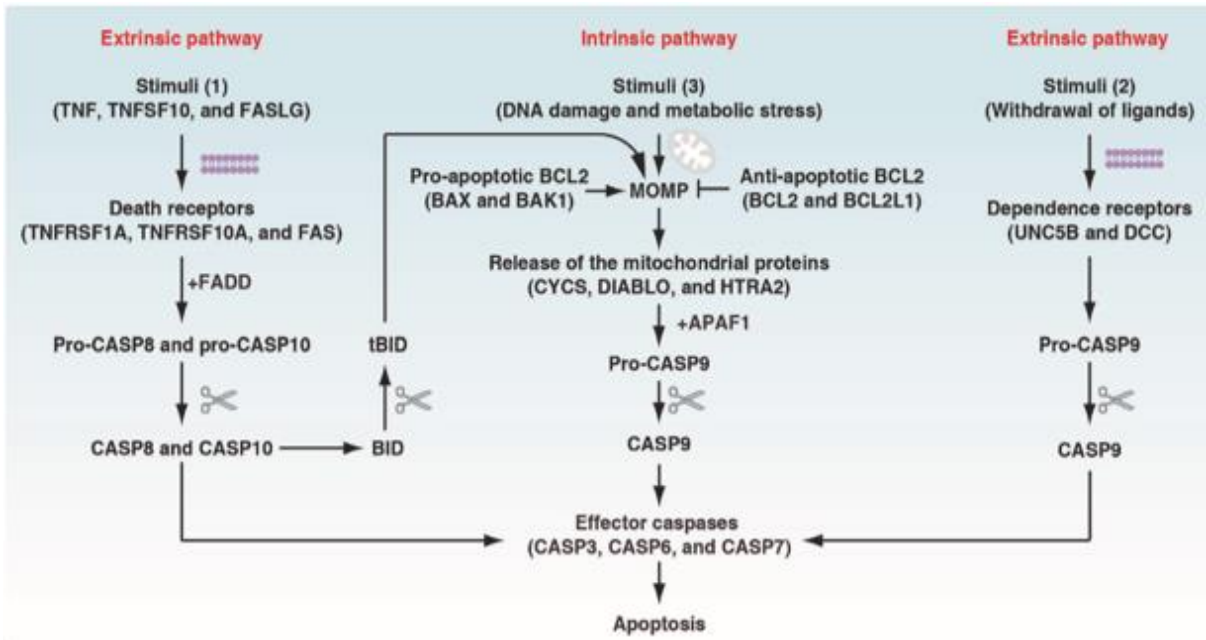


Figura 2. Apoptosis extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca es inducida por la unión de diferentes ligandos a los receptores de muerte o por la retirada de los ligandos de receptores de dependencia. CASP8 y CASP10 inician la apoptosis extrínseca mediada por los receptores de muerte, mientras que CASP9 inicia la apoptosis extrínseca por la retirada de los ligandos de factores de dependencia. Pro-CASP8 y pro-CASP10 son enzimáticamente inactivos hasta que interactúan con FADD (asociado a Fas a través del dominio de muerte). El daño en el ADN, la hipoxia, el estrés metabólico y otros factores pueden inducir apoptosis intrínseca, que comienza con MOMP y conduce a la liberación de proteínas mitocondriales (por ejemplo, CYCS) en el citosol. CYCS citosólico interactúa con APAF1, que recluta a la pro-CASP9 para formar el apoptosoma. MOMP está estrictamente controlado por la familia Bcl2, incluidos sus miembros pro y antiapoptóticos. CASP3, CASP6 y CASP7 se consideran como las caspasas efectoras comunes para ambos tipos de apoptosis. Además, la vía extrínseca puede desencadenar apoptosis intrínseca a través de la generación de BID truncada (tBID) por CASP8 activa, tBID puede trasladarse a las mitocondrias y causar MOMP a través de la activación de BAX y BAK1. Imagen extraída de Tang *et al* (29).

Las células cancerosas pueden superar la respuesta apoptótica por diversos mecanismos. Las mutaciones inactivadoras que involucran a p53 hacen que la célula sea insensible a muchos estímulos apoptóticos (aunque, y afortunadamente, existen vías de muerte celular independientes de p53). La regulación excesiva de las proteínas

antiapoptóticas o la pérdida de proteínas proapoptóticas a través de medios genéticos o epigenéticos, es producida en varios tumores. Las células cancerosas también ocasionalmente inhiben la actividad de las caspasas incluso con la aparición de la permeabilización irreversible de la membrana mitocondrial externa. Es importante tener en cuenta que, aunque el resultado neto de esas alteraciones es una mayor supervivencia del tumor, esto no significa que todas las células dentro de un tumor sean insensibles a las señales apoptóticas. Si este fuera el caso, la mayoría de las terapias anticancerígenas actuales, efectivas al inducir la muerte celular, serían inútiles y los tumores crecerían a tamaños absurdos. Por el contrario, es probable que las células tumorales sean más sensibles a la estimulación apoptótica que las células normales y la apoptosis ocurre continuamente en tumores en crecimiento (5,30).

I.II.I Apoptosis extrínseca

Proponemos definir la apoptosis extrínseca (figura 2) como un tipo de RCD iniciado por perturbaciones del microambiente extracelular que son detectadas por los receptores de membrana plasmática, propagadas por caspasa 8 (CASP8), con la participación opcional de MOMP y precipitadas por caspasas ejecutoras, principalmente caspasa 3 (CASP3) (27).

Los receptores de muerte incluyen (pero no se limitan a): receptor de muerte de superficie celular Fas y miembro de la superfamilia de receptores de TNF, TNFR1 TRAILR1 y TRAILR2. Como regla general, la asociación de receptores de muerte tras la unión del ligando permite el ensamblaje de un complejo multiproteico dinámico en la cola intracelular del receptor, como el llamado "complejo de señalización inductor de muerte" (DISC), "complejo i" y "complejo ii", que funcionan como plataformas moleculares para regular la activación y las funciones de CASP8 o CASP10 (31).

La ejecución de la apoptosis extrínseca dirigida por receptores de muerte sigue dos vías distintas. En las llamadas "células tipo I" (p. Ej., Timocitos y linfocitos maduros) la maduración proteolítica dependiente de CASP8, CASP3 y CASP7 es suficiente para impulsar el RCD, que no puede ser inhibido por la sobreexpresión impulsada por el transgén de las proteínas BCL2 antiapoptóticas, la co-eliminación de *Bax* y *Bak1*, o la

pérdida de BID (BH3 interacting domain death agonist). Por el contrario, en "células tipo II" (p. Ej., Hepatocitos, células β pancreáticas y la mayoría de las células cancerosas), en las que XIAP restringe la activación de CASP3 y CASP7, la apoptosis extrínseca requiere de la escisión proteolítica de BID por CASP8. Esto conduce a la generación de una forma truncada de BID (tBID), que se transloca a la OMM. En el OMM, tBID funciona como un activador BH3 para activar el RCD dependiente de MOMP dependiente de BAX / BAK y el consiguiente RCD impulsado por CASP9 (31).

I.II.II Apoptosis intrínseca

La apoptosis intrínseca (figura 2) es una forma de muerte celular regulada, iniciada por una variedad de perturbaciones micro ambientales, que incluyen: retirada de factores de crecimiento, daño en el ADN, estrés del ER, sobrecarga de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés de replicación, alteraciones microtubulares o defectos mitóticos. Las células apoptóticas retienen la integridad de la membrana plasmática y la actividad metabólica (hasta cierto punto) a medida que el proceso se completa, lo que, permite la eliminación rápida por los macrófagos u otras células con actividad fagocítica (un proceso comúnmente conocido como eferocitosis) (31,32).

En condiciones fisiológicas BAX realiza ciclos continuos entre el OMM y el citosol, donde exhibe una conformación dimérica, monomérica o inactiva. En contraste, BAK reside constitutivamente en el OMM, donde se inserta dentro de la bicapa lipídica a través del extremo hidrofóbico C-terminal de su conformación α 9 hélice que interacciona con VDAC2 (Voltage dependent anion channel 2). Es de destacar que se ha documentado cierto grado de retrotranslocación de BAK de la OMM al citosol. Tras la inducción de la apoptosis, la retrotranslocación de BAX cesa a medida que BAX y BAK experimentan activación directa o indirecta de BH3 (Pro-apoptotic BH3-only proteins) (33–35). Estos miembros proapoptóticos de la familia de proteínas BCL2 que contienen un solo dominio BH3 se activan transcripcional o postraduccionalmente en orgánulos específicos o compartimentos celulares que experimentan perturbaciones de la homeostasis, de hecho, operan como transductores celulares de señalización de estrés. Algunas proteínas que solo contienen dominio BH3, como PUMA (P53-upregulated modulator of apoptosis),

BCL2L11 mejor conocido como BIM y NOXA (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), son activados principalmente por la regulación transcripcional, mientras que otros, como BID (BH3 interacting domain death agonist), se someten principalmente a la activación postraducciona (31,36).

BID, BIM, PUMA y NOXA comparten la capacidad de interactuar físicamente (pero de manera transitoria) con el conjunto mitocondrial de BAX y / o BAK (por lo tanto, se los conoce como "activadores") para promover una serie de cambios conformacionales que culminan con la disociación de los dominios centrales y de retención de los efectores BCL2. La visión actual es que BAX y BAK activados forman homodímeros (también heterodímeros en entornos específicos), lo que da como resultado la liberación de BH3 y una mayor oligomerización de dímero con dímero. La oligomerización en última instancia, conduce al ensamblaje de un poro lipídico que altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial y provoca reordenamientos profundos de la ultra estructura mitocondrial y su función (31,37).

En línea con este modelo, recientemente se ha demostrado que BAX puede formar anillos u oligómeros lineales en forma de arco que perforan el OMM y continúa con MOMP, que puede variar en tamaño dependiendo del número de dímeros de BAX reclutados (31).

La MOMP está antagonizada por miembros antiapoptóticos de la familia BCL2, incluido BCL-XL, MCL1 (BCL2 family apoptosis regulator), BCL-W y BFL-1 (BCL2 related protein A1). Estas proteínas antiapoptóticas o pro-supervivencia contienen los cuatro dominios BH, generalmente se insertan en la membrana OMM o ER y ejercen principalmente funciones antiapoptóticas uniéndose directamente a los miembros proapoptóticos de la familia BCL2 (38).

La mayoría de los miembros de la familia BCL2 pro-supervivencia inhiben BAX y BAK al evitar su actividad de oligomerización y formación de poros, ya sea directamente, tras el secuestro físico en el OMM, o indirectamente, después del secuestro de activadores de BH3. Es de destacar que, en condiciones fisiológicas, algunas proteínas anti-apoptóticas BCL2, como BCL-XL, ejercen un papel protector al promover la retrotranslocación de BAX y (en menor grado) BAK de las mitocondrias al citoplasma, por lo tanto, limitan la cantidad mitocondrial. Es importante destacar que algunas proteínas que poseen solo BH3, incluido BAD (BCL2 associated agonist of cell death), BMF (Bcl2 modifying factor) o HRK (harakiri, BCL2 interacting protein) promueven MOMP en ausencia de una interacción física con BAX o BAK. Estas proteínas de solo un dominio

BH3, que a veces se denominan "sensibilizadores" o "inactivadores", se unen a los miembros de la familia BCL2 antiapoptóticos y, por lo tanto, limitan su disponibilidad para secuestrar activadores de BAX, BAK o BH3 (31,34,38).

Se ha sugerido que diferentes proteínas BH3 se unen preferentemente a miembros específicos de la familia BCL2 antiapoptótica (p. Ej., BID, BIM y PUMA se unen de forma potente a todos los miembros de la familia BCL2 antiapoptótica; BAD preferentemente interactúa con BCL2, BCL-XL y BCL-W; NOXA inhibe preferentemente MCL1; y HRK inhibe preferentemente BCL-XL) (31).

Las células transformadas que carecen de todos los principales activadores de BH3 (es decir, BID, BIM, PUMA y NOXA) aún pueden sufrir apoptosis en respuesta a los agentes que dañan el ADN o a la regulación negativa de BCL2, BCL-XL y MCL1. Esta observación está en línea con la idea de que BAX y BAK pueden autoactivarse en ausencia de miembros de la familia BCL2 antiapoptóticos y proteínas BH3 proapoptóticas (39,40).

La MOMP promueve directamente la liberación citosólica de factores apoptogénicos que normalmente residen en el espacio mitocondrial intermembrana. Estas proteínas mitocondriales incluyen (pero no se limitan a) el citocromo c somático (CYCS), que generalmente opera como lanzadera de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y a la proteína mitocondrial de unión a diablo IAP (DIABLO; second mitochondrial activator of caspases, SMAC). La liberación de CYCS y SMAC al citosol se ve favorecida por la remodelación de las crestas mitocondriales, que se basa en la oligomerización y activación de OPA1 (mitochondrial dynamin like GTPase), posiblemente dependiente de BAK y la activación secundaria de OMA1 (zinc metallopeptidase). El grupo citosólico de CYCS se une al factor de activación de la peptidasa apoptótica 1 (APAF1) y la procaspasa 9 de una manera dependiente de desoxiATP para formar el complejo supramolecular conocido como apoptosoma, que es responsable de la activación de CASP9 (31).

La CASP9 activada puede catalizar la activación proteolítica de la CASP3 y CASP7, que se perciben ampliamente como las enzimas responsables de la demolición celular durante la apoptosis intrínseca (y extrínseca) en células de mamífero (y, por lo tanto, se conocen comúnmente como caspasas ejecutoras). El SMAC citosólico precipita la apoptosis al asociarse con miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) como XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). XIAP es el único miembro de la familia de proteínas IAP que contrarresta la cascada apoptótica mediante la unión estable y, por

lo tanto, el bloqueo físico de las caspasas. Por el contrario, los inhibidores de la apoptosis IAP c-IAP1 y c-IAP2 primero impulsan la regulación positiva de factores antiapoptóticos potentes como CASP8, FADD y el regulador de apoptosis c-FLIP; segundo promueven la inactivación de la caspasa en virtud de su actividad de ubiquitina ligasa E3; tercero el receptor de ubiquitinato interactúa con la serina / treonina quinasa 1 (RIPK1) y, por lo tanto, desencadena la señalización NF- κ B pro-supervivencia; y por último quizás promueva la degradación de SMAC en las mitocondrias a través de un mecanismo que depende de las proteínas BCL2 (31,41).

I.III Compuestos naturales

El aumento en la incidencia global de cáncer en los últimos años han llevado a campañas centradas específicamente en la prevención de la enfermedad. Las disminuciones detectables en la incidencia mundial del cáncer se han logrado a través de esfuerzos como los movimientos para evitar el consumo de tabaco. Estudios epidemiológicos también han descubierto que la dieta y el ejercicio pueden disminuir significativamente la prevalencia de algunos tipos específicos de cáncer, renovando el interés en la investigación fitoquímica (42).

Los fitoquímicos constituyen un conjunto heterogéneo de compuestos bioactivos clasificados por su estructura química que incluyen fenoles, alcaloides, carotenoides y compuestos nitrogenados (43). Estos compuestos se encuentran naturalmente en las frutas, verduras, granos y otros productos vegetales como las plantas medicinales y son a menudo responsables de las características distintivas de las plantas, como la pigmentación, el sabor y el olor. Además, muchos son componentes integrales para la protección del huésped contra virus, parásitos y otros agentes dañinos y/o estresantes externos. Múltiples estudios han revelado que estos compuestos son capaces de afectar la proliferación y regulación del ciclo celular, y por lo general participan en múltiples vías de señalización que a menudo se interrumpen en la iniciación tumoral, la proliferación y la propagación (43,44).

Los principales grupos de compuestos naturales incluyen alcaloides, terpenos, flavonoides, saponinas, lignanos, vitaminas, ácidos grasos, betacaroteno, fibras, ácido

cafeicos, taninos, ácido ascórbico, aceites esenciales, gomas y muchos productos primarios y metabolitos secundarios (45).

Algunos de estos compuestos bioactivos cumplen funciones antitumorales, al inducir la activación de genes supresores de tumores, arrestar el ciclo celular y luego inducir apoptosis a través de la regulación positiva de miembros proapoptóticos (46). También, interfieren en vías de señalización asociadas al crecimiento y desarrollo celular. Por otro lado inducen la regulación negativa de TGF- β y VEGF, entre otros de sus efectos (47).

El uso de plantas medicinales como medicina alternativa y complementaria a los tratamientos convencionales contra el cáncer, ha aumentado en los últimos años y está ganando gran popularidad. En algunos tipos de tumores, como es el caso del cáncer mamario, se ha demostrado que el uso de medicina alternativa como terapia de apoyo, mejora la calidad de vida en las pacientes (48,49).

I.IV Muérdagos

En la literatura se ha descrito un grupo enigmático de plantas, las denominadas "muérdagos". Los muérdagos son un tipo de plantas de hábito parasitario comúnmente conocidas por ser unas 1.500 especies agrupadas en cuatro familias, Loranthaceae, Misodendraceae, Santalaceae y Viscaceae, entre las cuales la familia Loranthaceae es la más grande, con 900 o más especies (50). Estas plantas son vegetales, que al no poder satisfacer por sí mismas sus demandas nutricionales, obtienen los nutrientes que requieren a expensas de otra planta, denominado hospedero (51). El hábito parasitario de estas especies, las asociaciones co-evolutivas y la prominencia cultural, han inspirado a observadores de la naturaleza durante siglos. Plinio el Viejo, Linnaeus y Darwin estaban fascinados con el muérdago europeo *Viscum album*, señalando su dependencia de los árboles para la nutrición y de las aves para la dispersión de semillas (52).

La capacidad de absorber nutrientes de las plantas parásitarias se asocia con la producción de órganos y mecanismos especializados para adquirir recursos desde su hospedador. La transferencia de solutos del huésped a una planta parásita depende de la formación de un puente entre los dos organismos. Este órgano, el haustorio, es la característica definitoria de todas las plantas parásitas (53). Estudios sobre el y del hospedador, sugiere que cambios en la calidad de un potencial hospedador puede explicar patrones de ocurrencia de las plantas parásitas, que inciden en la calidad y

contenido de nutrientes, espesor de la corteza, profundidad de las raíces, edad, proximidad a una fuente de recursos, entre otras (54).

Una de las áreas más activas de la investigación actual sobre los muérdagos y que ha contribuido al aumento en la investigación durante la última década, es la medicina de productos naturales, específicamente la fitoquímica. La figura 3 muestra cómo ha aumentado el número de publicaciones asociadas a estas plantas en los últimos años (55).

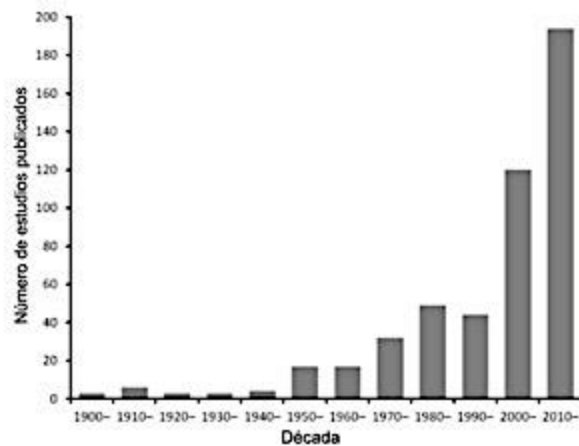


Figura 3. Estudios sobre muérdagos en las últimas décadas. A partir del año 2000 los estudios sobre muérdagos aumentaron considerablemente, llegando alrededor de las 200 publicaciones en el año 2010. Imagen extraída y modificada de Watson *et al* (55).

En Europa, la especie *Viscum álbium* es una de las drogas herbales más potentes y potencialmente efectiva contra el cáncer (56). El muérdago Europeo es un arbusto semiparasitario perteneciente a la familia Viscaceae con varias especies que pueden crecer en las ramas de diferentes árboles. El muérdago europeo contiene diferentes tipos de compuestos biológicamente activos como carbohidratos, grasas, aminoácidos, oligosacáridos, polisacáridos, enzimas, flavonoides, glicoproteínas (lectinas ML-T), polipéptidos (viscotoxinas) y ácidos triterpénicos (56). Estos compuestos derivados del muérdago se han utilizado como terapia complementaria para algunas formas de cáncer (56,57).

Las lectinas son los principales constituyentes del muérdago y son responsables de sus efectos antitumorales e inmunomoduladores (58). En la actualidad, la mayoría de los investigadores han centrado sus estudios en las lectinas de muérdago, en particular la lectina I (ML-I)(59). *Viscum álbum* ha sido usado en distintas preparaciones de plantas de diferentes árboles hospederos como manzana, pino, roble y otros. Muchos preparados de extracto de muérdago están disponibles, incluidos Isorel^{MR}, Cefaleksin^{MR}, Lektinol^{MR}, Eurixor^{MR}, Iscador^{MR}, Helixor^{MR}, Iscucin^{MR} y Abnobaviscum^{MR}, que se comercializan como prescripciones inyectables y pueden utilizarse como terapia adyuvante para el tratamiento del cáncer (59).

Solo en las últimas dos décadas con el trabajo pionero de los muérdagos africanos, se han explorado otras especies de muérdagos, para detectar su potencial actividad contra diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades como la diabetes y la hipertensión (60,61). Más recientemente, se han investigado muérdagos asiáticos, informados por el conocimiento etnobotánico tradicional extendiéndose a posibles aplicaciones de compuestos antimicrobianos y antivirales para otros fines, como la producción ganadera y la agricultura (62).

La investigación sobre las propiedades medicinales de los muérdagos neotropicales está en la etapa inicial. Además, existe gran diversidad de especies de muérdagos, por ejemplo, solo en Brasil existen más de 245 especies de muérdagos y aún se están descubriendo especies nuevas (55).

I.V Quintral

En Chile, el pueblo mapuche se ha reconocido por su vasto conocimiento y uso de plantas medicinales reportadas inicialmente por conquistadores españoles. Investigaciones al respecto, dan cuenta del conocimiento botánico local de los machis (médicos mapuches) y del traspaso de información sobre una gran cantidad de productos botánicos con aplicaciones medicinales (63).

Dentro de las especies utilizadas por el pueblo mapuche, existe un tipo de muérdago llamado comúnmente quintral (*Tristerix corymbosus*) (figura 4), perteneciente a la

familia Loranthaceae. El quintral, es un muérdago hemiparásito que crece en torno al bosque nativo así como en algunas especies introducidas, y es utilizado para tratar úlceras estomacales, colesterol alto y trastornos nerviosos (64). El género *Tristerix* comprende 11 especies descritas que crecen sólo en América del Sur en lugares cercanos a los Andes desde Chile y Argentina hasta Colombia y Ecuador (51). Dos de estas especies crecen en Chile. La especie *Tristerix aphyllus* crece sobre cactáceas, mientras que la especie *Tristerix corymbosus* lo hace sobre una gran variedad de huéspedes, entre los más comunes están el álamo, el maquí, el huayún y el olivo. En Chile se le considera una plaga agronómica en cultivos de olivo y frecuentemente es erradicada a través de la poda de la rama infectada (65).

Existe un estudio, en el cual, se describieron por primera vez los compuestos fenólicos del muérdago chileno (*Tristerix corymbosus*) endémico de la VIII región parasitario del álamo. Este estudio reveló la presencia de 36 compuestos, de los cuales, 30 están presentes en las hojas del muérdago, los que incluyen varios ácidos cafeicos, procianidinas, varios flavonoides y oxilipinas. En las flores del muérdago se detectaron 6 antocianinas (66). Los investigadores encontraron diferencias significativas entre hojas y flores en el contenido fenólico total y actividad antioxidante de esta especie (66).



Figura 4. A) Flor de *Tristerix corymbosus*. B) Semillas defecadas de *T. corymbosus*. C) Rama de *Aristotelia chilensis* siendo parasitada por *T. corymbosus*. D) *T. corymbosus* parasitando *A. chilensis*. Imagen extraída del libro Medicamentos herbarios tradicionales (MHT)(67).

Dentro de los compuestos fenólicos identificados en el quintral y que además han sido motivo de estudio en el último tiempo, se encuentran principalmente flavonoides tales como quercetina, luteolina, naringenina; oxilipinas como el ácido trihidroxioctadecenoico; ácidos fenólicos como el ácido quinico, entre otros (66).

En la literatura, se han informado los efectos antitumorales de estos compuestos (68). Varios de ellos han demostrado desencadenar la apoptosis intrínseca en células cancerosas y no en células normales (69). Esto se logra de varias maneras, como la disminución de ROS, la regulación negativa de NF- κ B, Bcl-2, Bcl-xL, survivina y Mcl-1; activación de las caspasas efectoras -9, -3 y -7, escisión de PARP, liberación de citocromo C y aumento de Bax, Bak, Bid y p53 (47).

La información anterior y los escasos datos con respecto a las propiedades del muérdago chileno (*Tristerix corymbosus*), sugieren que la investigación en este tema podría

proporcionar datos valiosos sobre las actividades biológicas de esta planta, así como también, sobre un futuro potencial terapéutico contra el cáncer.

Se ha documentado que el uso de la medicina complementaria y alternativa (MCA) ha ido en aumento especialmente en los pacientes con cáncer. La MCA incorpora prácticas que no suelen ser parte de la atención médica convencional, entre las que se incluye el consumo de productos naturales.

Actualmente pareciera que el término "natural" se ha mal entendido, al otorgarle el sinónimo de "inocuo", generando con ello el consumo de productos de origen natural con un escaso o nulo sustento científico. Es por esto, que siguiendo las estrategias de la Organización mundial de la salud (OMS), es necesario poseer bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para la administración de la MCA en seres humanos (70).

La presente investigación tiene como objetivo estudiar la especie *Tristeryx corymbosus*, especie cuyos metabolitos secundarios recientemente descritos pueden ser de interés y de la que existe muy poca información científica, con el fin de ampliar el conocimiento sobre esta planta y poder determinar si posee efectos sobre la viabilidad de células cancerígenas.

Todos los antecedentes anteriormente expuestos nos llevan a plantear la siguiente hipótesis.

II. HIPÓTESIS

"Los extractos de quintral (*Tristeryx corymbosus*) reducen la viabilidad celular e inducen la muerte celular, en líneas celulares tumorales"

III. OBJETIVOS

III.I OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los extractos de quintral (*Tristeryx corymbosus*) sobre la viabilidad y apoptosis en las líneas celulares de cáncer MCF-7, PC-3 y AGS y en la línea celular no tumoral HEK-293

III.I.II Objetivos específicos

Determinar el efecto de los extractos de quintral en la viabilidad celular en las líneas celulares MCF-7, PC-3, AGS y HEK-293.

Estudiar el rol de los extractos de quintral sobre la permeabilidad de membrana mitocondrial en las líneas celulares MCF-7, PC-3, AGS y HEK-293.

Evaluar el efecto de los extractos de quintral sobre la activación de caspasas en las líneas celulares MCF-7, PC-3, AGS y HEK-293.

IV. METODOLOGÍA

IV.I Células y condiciones de cultivo

Se analizó el efecto de los extractos de quintral en las células tumorales, mediante un modelo *in vitro* de líneas celulares tumorales de: adenocarcinoma mamario metastásico MCF-7 (ATCC®HTB-22), adenocarcinoma prostático PC3 (ATCC® CRL-1435), adenocarcinoma gástrico AGS (ATCC® CRL-1739) y células embrionarias renales HEK-293 (ATCC® CRL-1573). Todas las líneas celulares son de especie humana y fueron obtenidas desde la American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Para efectuar los ensayos, el medio de cultivo de cada línea celular fue complementado con 10% de suero bovino fetal (Heat-Inactivated European grade, Biological Industries), 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Las células fueron mantenidas en un incubador a 37°C en 5% de CO₂: 95% de aire mezclado.

Para la realización de los experimentos de viabilidad celular, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Falcon), a una densidad de 3×10^3 células/pocillo e incubadas durante 24 horas, antes de cada ensayo.

IV.II Extractos de quintral

En la realización de los extractos se utilizaron hojas o flores de quintral, parasitario de tres huespedes distintos, álamo (*Populus nigra*), maqui (*Aristotelia chilensis*) y huayún (*Rhaphitamnus spinosus*) obteniéndose un total de 20 extractos diferentes (ver anexo 1). Estos extractos fueron gentilmente donados por Christopher Gonzales, técnico en química analítica y profesor del laboratorio de química analítica de la Universidad tecnológica INACAP.

La extracción fue realizada por separado, sobre 20 gramos de hojas o de flores secas utilizando 200 mL de solventes en una gradiente creciente de polaridad: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol sucesivamente, en un aparato Soxhlet.

Una vez recibidos los extractos, se llevaron a una concentración inicial de 50 mg/mL, utilizando como solvente etanol (ETOH) al 100%. Cada extracto fue sometido a sonicación para conseguir la disolución final del soluto en el solvente. La solución stock de cada extracto fue alicuotada y almacenada a -20°C.

Variedad de Quintral	Solvente	ID Extracto
Hoja de Quintral de Maqui	Hexano	HHQM
	Diclorometano	HDQM
	Acetato de Etilo	HAQM
	Metanol	HMQM
Flor de Quintral de Maqui	Hexano	FHQM
	Diclorometano	FDQM
	Acetato de Etilo	FAQM
	Metanol	FMQM
Hoja de Quintral de Huayún	Hexano	HHQH
	Diclorometano	HDQH
	Acetato de Etilo	HAQH
	Metanol	HMQH
Flor de Quintral de Huayún	Hexano	FHQH
	Diclorometano	FDQH
	Acetato de Etilo	FAQH
	Metanol	FMQH
Flor de Quintral de Álamo	Hexano	FHQA
	Diclorometano	FDQA
	Acetato de Etilo	FAQA
	Metanol	FMQA

Tabla 1. Identificación de los extractos del quintral. La primera letra representa la parte de la planta, H para hojas y F para flores. La segunda letra corresponde al solvente utilizado, H para hexano, D para diclorometano, A para acetato de etilo y M para metanol. Las últimas dos letras representan la variedad de Quintral, QM para Quintral de Maqui, QH para Quintral de Huayún y QA para Quintral de Álamo.

V.III Viabilidad

V.III.I Ensayo de citotoxicidad

La evaluación de los efectos de los extractos de quintral sobre la viabilidad celular, fue realizada mediante el ensayo de sulforodamina B, el cual permite medir la cantidad de células viables tras cada tratamiento (71,72) .

Antes de cada ensayo, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^3 células/pocillo en 100 μ l de medio de cultivo e incubadas durante 24 horas. Para evaluar el efecto de los extractos de quintral, las células fueron tratadas por cuadruplicado con los 20 extractos por separado, utilizando cinco concentraciones distintas para cada extracto de la hoja de quintral (50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 2,5 μ g/mL) y seis concentraciones para la flor del quintral (100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 2,5 μ g/mL). Para determinar el efecto sobre la viabilidad celular del solvente utilizado en la preparación de los extractos de quintral, se utilizó un control solvente con ETOH al 1%. Además, se usó un control negativo con células incubadas solo con medio de cultivo. Para todos los tratamientos y controles, las células fueron incubadas por 72 horas a 37°C en 5% CO₂.

Luego de cada incubación las células fueron fijadas con ácido tricloroacético 50% durante 1 h a 4°C, tras lo cual fueron lavadas tres veces con agua destilada. Posteriormente fueron teñidas con sulforodamina B al 0.1% en ácido acético al 1% por 30 min a temperatura ambiente. Tras la tinción, las células fueron lavadas tres veces con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no unido y secadas a temperatura ambiente. El colorante presente en las células fue solubilizado con Tris Base 10 mM, para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplacas Biotek Instruments modelo EL808.

Los valores de absorbancia obtenidos fueron promediados y llevados a porcentajes de células viables respecto del control solvente, luego se extrapolaron a una curva estándar y se calculó el parámetro IC₅₀ de cada extracto en las líneas celulares estudiadas, este valor es considerado como la concentración en la cual una sustancia reduce a la mitad un proceso biológico, en este caso la reducción de la viabilidad celular en un 50%. Para

realizar el cálculo se utilizó el software SigmaPlot 11, usando la siguiente formula:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{-\text{(hillslope)}}$$

IV.IV Muerte celular

IV.IV.I Potencial de membrana mitocondrial

Para la evaluación del cambio de potencial de membrana mitocondrial, las células fueron marcadas con rodamina 123 (73), sonda fluorescente catiónica sensible al voltaje que se acumula de forma reversible en las mitocondrias, la fluorescencia asociada a esta sonda fue analizada mediante un citometro de flujo FACS Calibur (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU).

Las líneas celulares MCF-7, PC-3, AGS y HEK-293 fueron sembradas en placas de 24 pocillos, a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en 500 μ l de medio de cultivo. Luego de 24 horas de incubación, las células fueron tratadas con los extractos de acetato de etilo a la concentración de 100 μ g/mL del quintral parasitario de maqui y huayún durante 48 horas. Una vez finalizado los tratamientos, se adicionaron 5 μ l de la sonda rodamina 123 al pocillo correspondiente (concentración final 1 μ M) y se incubaron durante 45 minutos a 37°C, posteriormente se recogió el medio de cultivo de cada pocillo en tubos eppendorf de manera independiente y cada pocillo fue lavado con 300 μ l de PBS 1X, transfiriendo el lavado al mismo tubo. Luego se adicionaron 200 μ l de tripsina a cada pocillo, se incubaron durante 15 minutos a 37°C y se transfirió el contenido a cada tubo, para así, obtener las células presentes en el pocillo. Finalmente, cada tubo fue centrifugado durante 10 minutos a 1500 rpm, el sobrenadante fue retirado y el pellet resuspendido en 500 μ l de PBS 1X. Como control sin marcaje se utilizaron células tratadas con el solvente exclusivamente (ETOH 1%) pero no incubadas con rodamina, el control negativo fueron células tratadas con solvente y marcadas con rodamina 123 durante 48 horas y como control positivo se utilizaron células tratadas con FCCP

(Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) ($10\mu\text{M}$) durante 24 horas y marcadas con rodamina 123.

Los histogramas obtenidos tras el análisis en el citómetro de flujo utilizando el filtro FL1, fueron analizados para evaluar el porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto utilizando el software Cyflogic v.1.2.1.

IV.IV.II Caspasas

Para evaluar la activación de caspasas como una característica propia del proceso apoptótico, las células fueron tratadas con el marcador CaspACE™ FITC-VAD-FMK, el cual es un isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con un inhibidor general de las caspasas (VAD-FMK), de esta forma, el FITC-VAD-FMK es un marcador *in situ* que se une a caspasas activas (74). La fluorescencia asociada a este marcador fue analizada mediante citometría de flujo.

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, con una densidad de 3×10^5 células/pocillo en 1,5 mL de medio de cultivo. Luego de la incubación, las células fueron expuestas a los tratamientos con el extracto de acetato de etilo a la concentración de $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ del quintral parasitario de maqui y huayún durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó el marcaje en oscuridad con el marcador CaspACE™, durante 30 minutos a 37°C . Tras el marcaje se recolectó el contenido de cada pocillo de forma independiente y fue transferido a tubos de 15 mL, los pocillos fueron lavados con 1ml de PBS 1X, el lavado fue transferido al tubo y las células aun adheridas a los pocillos fueron removidas con $400\ \mu\text{l}$ de tripsina durante 15 minutos a 37°C , posteriormente el contenido fue agregado al mismo tubo para reunir todo el contenido del pocillo. El contenido completo del tubo se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante fue descartado y el pellet re-suspendido en $500\ \mu\text{L}$ de PBS 1X. Como control sin marcaje se utilizaron células tratadas con el solvente exclusivamente, el control negativo fueron células tratadas con solvente y marcadas con CaspACE, como control positivo se utilizaron células tratadas con daunorrubicina ($1\ \mu\text{M}$).

Los histogramas obtenidos tras el análisis en el citómetro de flujo utilizando el filtro FL1, fueron analizados para evaluar el porcentaje de células con caspasas activas, utilizando el software Cyflogic v.1.2.1.

IV.V Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en cada estudio fue analizado con los softwares estadísticos STATISTICA 7 y SPSS.

Para determinar la significancia estadística de los resultados, se realizaron diferentes pruebas. Inicialmente se evaluó la distribución de los datos, con el menú "DISTRIBUTION FITTING", del programa STATISTICA 7 y el test de Levene del programa SPSS, para evaluar la distribución de los datos y la homogeneidad de la varianza. En el caso de encontrarse distribución normal de los datos y homocedasticidad de la varianza ($p > 0,05$) se realizó el test estadístico ANOVA de una vía sin interacción y posteriormente se realizó una prueba post hoc Tukey. En el caso de que los datos no presentaran distribución normal, ni varianzas homogéneas ($p < 0,05$), se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para dos muestras independientes. En ambas pruebas se consideró como variable dependiente el % de viabilidad obtenido con los valores de absorbancia de cada ensayo y como variable independiente o categórica la concentración utilizada para cada tratamiento.

En los ensayos para evaluar la muerte celular, se consideró como variable dependiente el porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto. Los valores en que $p < 0,05$ indicaron diferencias significativas.

Para en ensayo de caspasas, no se realizó el análisis de estadístico de los datos, ya que el número de réplicas biológicas fue insuficiente ($n=2$).

V. RESULTADOS

V.I VIABILIDAD CELULAR

Para el análisis de la viabilidad celular se utilizó el ensayo colorimétrico de la sulforodamina B. A continuación, se muestran los resultados en las diferentes líneas celulares utilizadas.

Inicialmente se evaluó el efecto de los extractos de la flor del quintral de los tres huéspedes diferentes. Posteriormente se evaluaron los efectos de los extractos de la hoja del quintral huésped del maqui y huayún dado que con los extractos de quintral de álamo no se observaron efectos significativos.

V.I.I Línea celular de cáncer gástrico AGS

V.I.I.I Tratamiento con extractos de flor de quintral de álamo

En el gráfico de la figura 5, se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea celular AGS, tratada con los extractos de la flor del quintral de álamo.

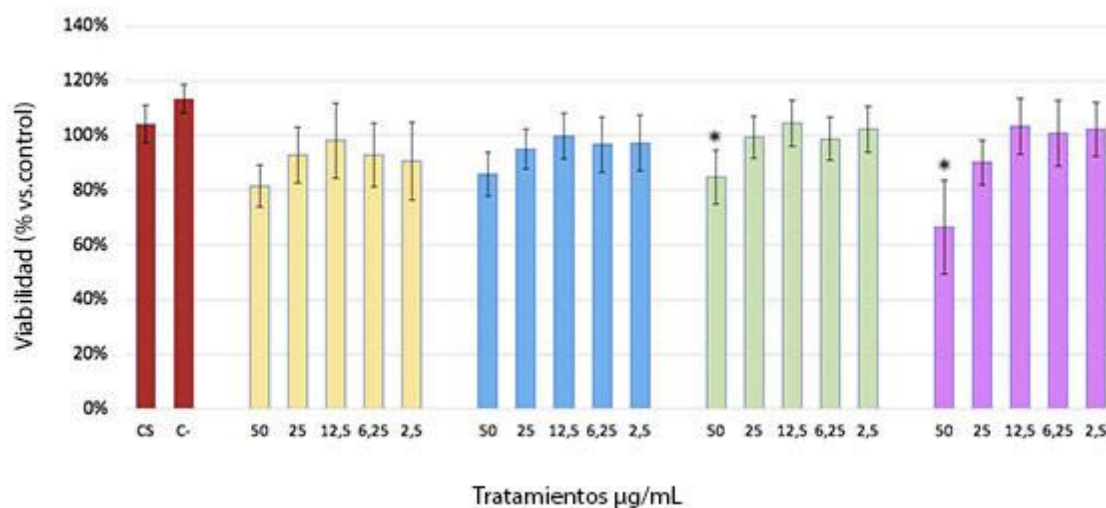


Figura 5. Efectos de los extractos de la flor de quintral de álamo sobre la viabilidad celular en la línea celular AGS. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de la flor de quintral de álamo (50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 2,5 $\mu\text{g/mL}$) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Tras el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En la figura 5 se observa que el extracto de flor de acetato de etilo y metanol, solo disminuyen significativamente la viabilidad celular (% viabilidad), a la mayor concentración utilizada (50 $\mu\text{g/mL}$) (ver tabla 2). El resto de los extractos y concentraciones no muestran diferencias significativas con respecto a los controles. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre en control solvente y control negativo en ninguno de los ensayos ($p > 0,05$).

V.I.I.II Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de huayún

En el gráfico de la figura 6 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea celular AGS tratada con los extractos de la flor y hoja del quintral de huayún.

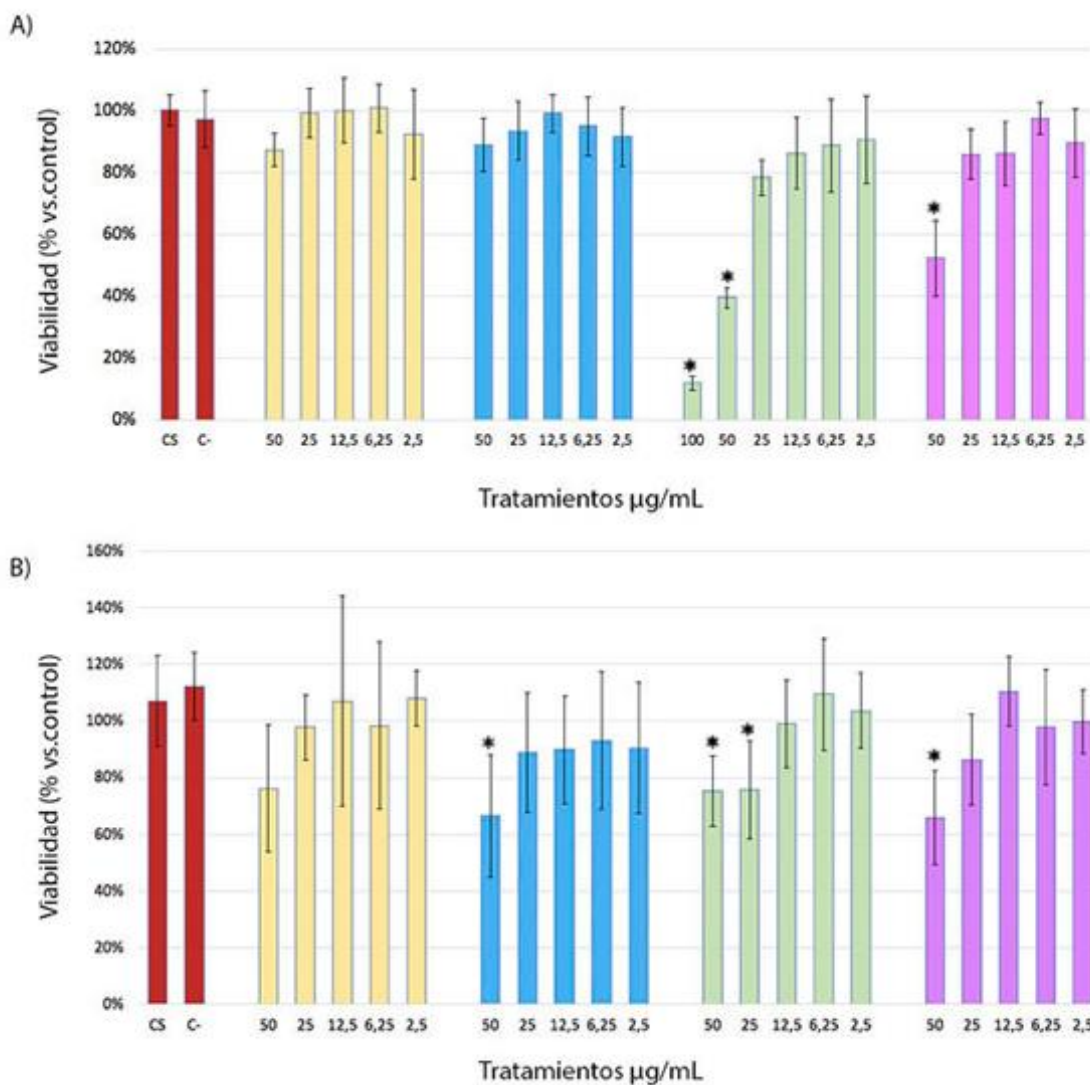


Figura 6. Efectos de los extractos de la flor y hoja de quintral de huayún sobre la viabilidad celular en la línea celular AGS. (A) tratamiento con los extractos de flor, **(B)** tratamiento con los extractos de hoja. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos (50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Adicionalmente se agregó la concentración de 100 µg/mL para los extractos de acetato de etilo de la flor de huayún. Tras los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B). Se gráfica la media

de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En la (figura 6-A) se observó que en la línea celular AGS, los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún (100-50-25 $\mu\text{g/mL}$) y metanol (50 $\mu\text{g/mL}$) presentaron una disminución significativa sobre la viabilidad celular con respecto a los controles.

Para los extractos de hoja del quintral de huayún (figura 6-B), se observó efectos sobre la viabilidad a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, en todos los extractos excepto en los tratamientos con los extractos de hexano, donde no se observó actividad.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre en control solvente y control negativo en ninguno de los ensayos ($p > 0,05$).

V.I.I.III Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de maqui

En el gráfico de la figura 7 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea celular AGS tratada con los extractos de la flor y hoja del quintral de maqui.

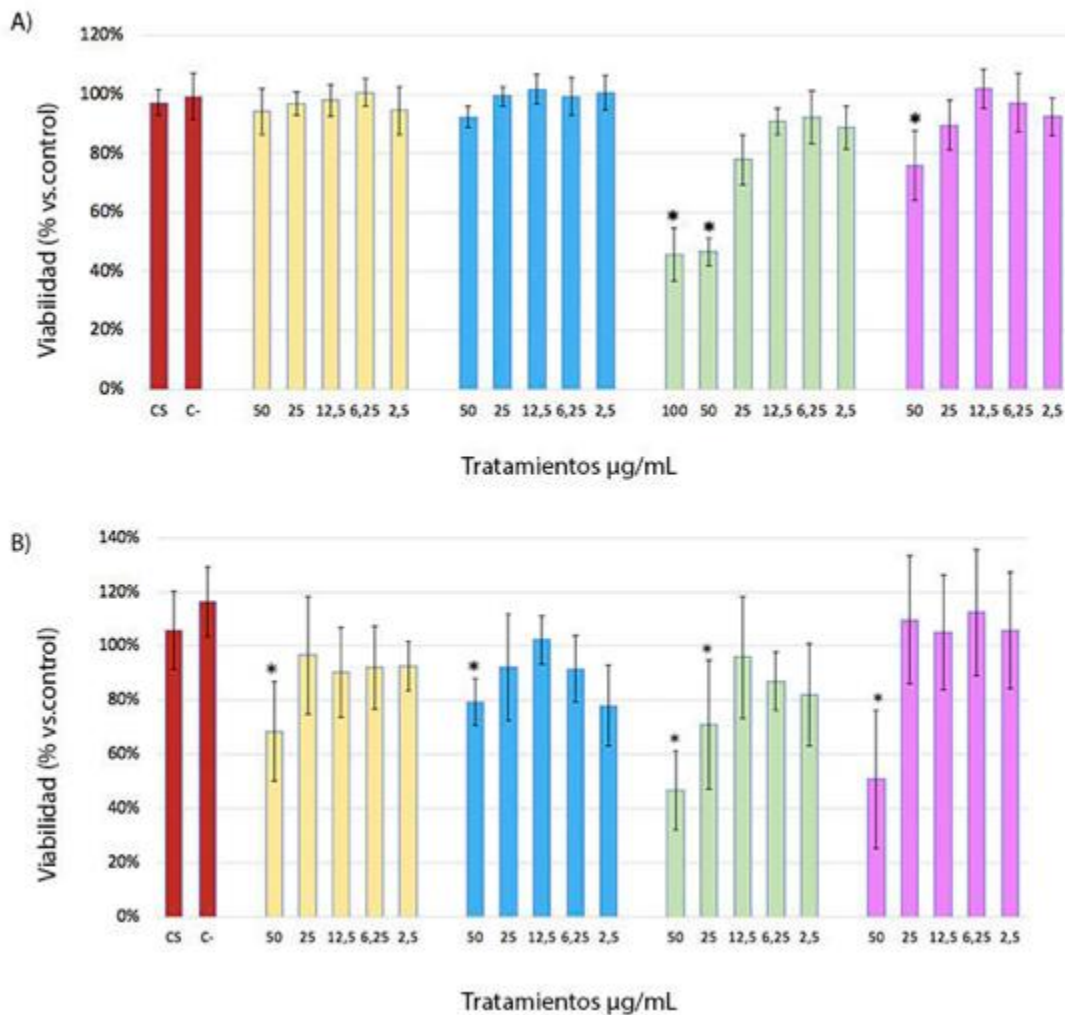


Figura 7. Efectos de los extractos de la flor y hoja de quintral de maqui sobre la viabilidad celular en la línea celular AGS. (A) tratamiento con los extractos de flor, (B) tratamiento con los extractos de hoja. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de la flor y hoja de quintral de maqui (50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Adicionalmente se agregó la concentración de 100 µg/mL para los extractos de acetato de etilo de la flor de maqui. Tras los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En la figura (7-A) se observó que en la línea celular AGS, los extractos de acetato de etilo de la flor del quintral de maqui y huayún, presentaron actividad significativa sobre la viabilidad celular, disminuyéndola, a las mayores concentraciones usadas (100 y 50 µg/mL). En los tratamientos con los extractos de la hoja de quintral de maqui (7-B) se observó disminución significativa de la viabilidad con respecto al control solvente a la mayor concentración utilizada 50 µg/mL para todos los extractos, siendo el extracto de acetato de etilo de la hoja de quintral de maqui, el más significativo. En general, con el resto de las concentraciones no se observó diferencias significativas.

No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre en control solvente y el control negativo en ninguno de los ensayos ($p > 0,05$).

V.I.II Línea celular de cáncer de próstata PC-3

V.I.II.I Tratamiento con los extractos de flor de quintral de álamo

En el gráfico de la figura 8 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea PC-3 tratada con los extractos de la flor del quintral de álamo.

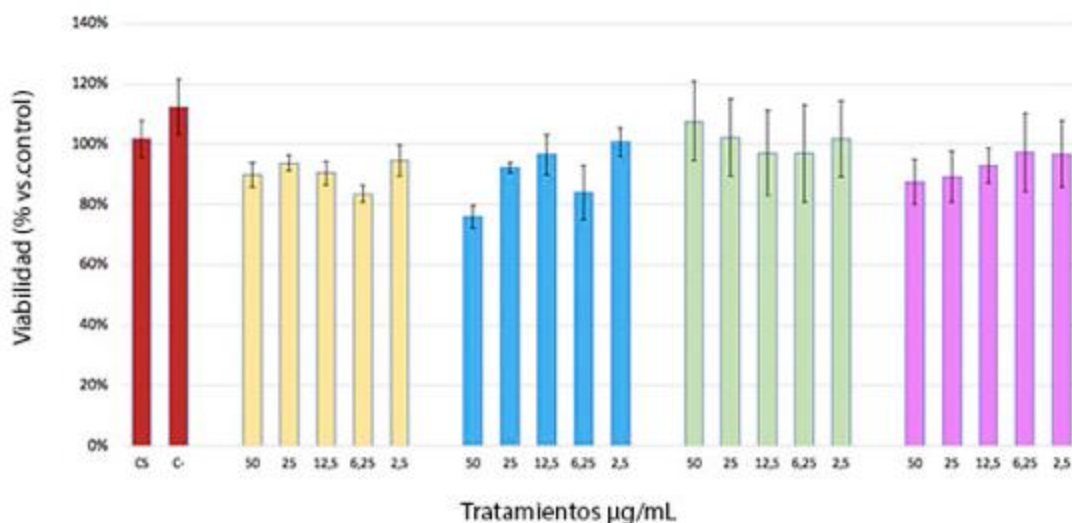


Figura 8. Efectos de los extractos de la flor de quintral de álamo sobre la viabilidad celular en la línea PC-3. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de la flor de quintral de álamo (50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 $\mu\text{g/mL}$) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Tras el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

No se observó una reducción significativa de la viabilidad celular para ninguno de los extractos de quintral de álamo.

V.I.II.II Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de huayún

En los gráficos de la figura 9 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea PC-3 tratada con los extractos de la flor y hoja del quintral de huayún.

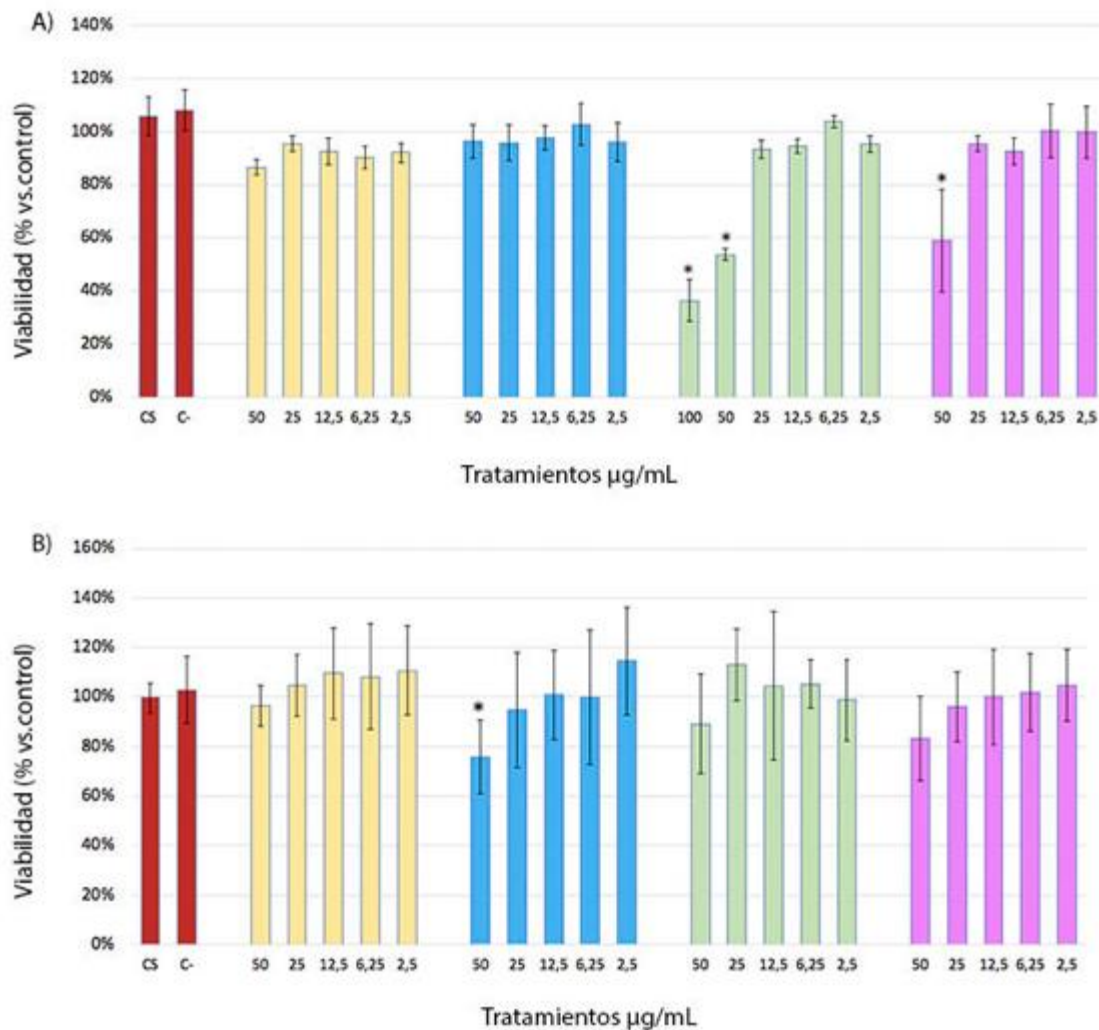


Figura 9. Efectos de los extractos de la flor y hoja de quintral de huayún sobre la viabilidad celular en la línea celular PC-3. (A) tratamiento con los extractos de flor, (B) tratamiento con los extractos de hoja. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad.

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos (50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillo), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Adicionalmente se agregó la concentración de 100 µg/mL para los extractos de acetato de etilo de la flor de huayún. Tras los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En la gráfica de la figura 9, se observó una disminución significativa de la viabilidad en la línea celular PC-3, tratada con los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún (figura 9-A) a las concentraciones de 100 y 50 µg/mL. Los tratamientos con los extractos de hexano y metanol también disminuyeron significativamente la viabilidad celular a la concentración de 50 µg/mL. Por otra parte los extractos de diclorometano no presentaron efectos.

Para los extractos de hoja de maqui (figura 9-B), el tratamiento con el extracto de diclorometano fue el único que presentó diferencias significativas.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control solvente y control negativo en ninguno de los ensayos ($p > 0,05$).

V.I.II.III Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de maqui

En el gráfico de la figura 10 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea celular PC-3 tratada con los extractos de la flor y hoja del quintral de maqui.

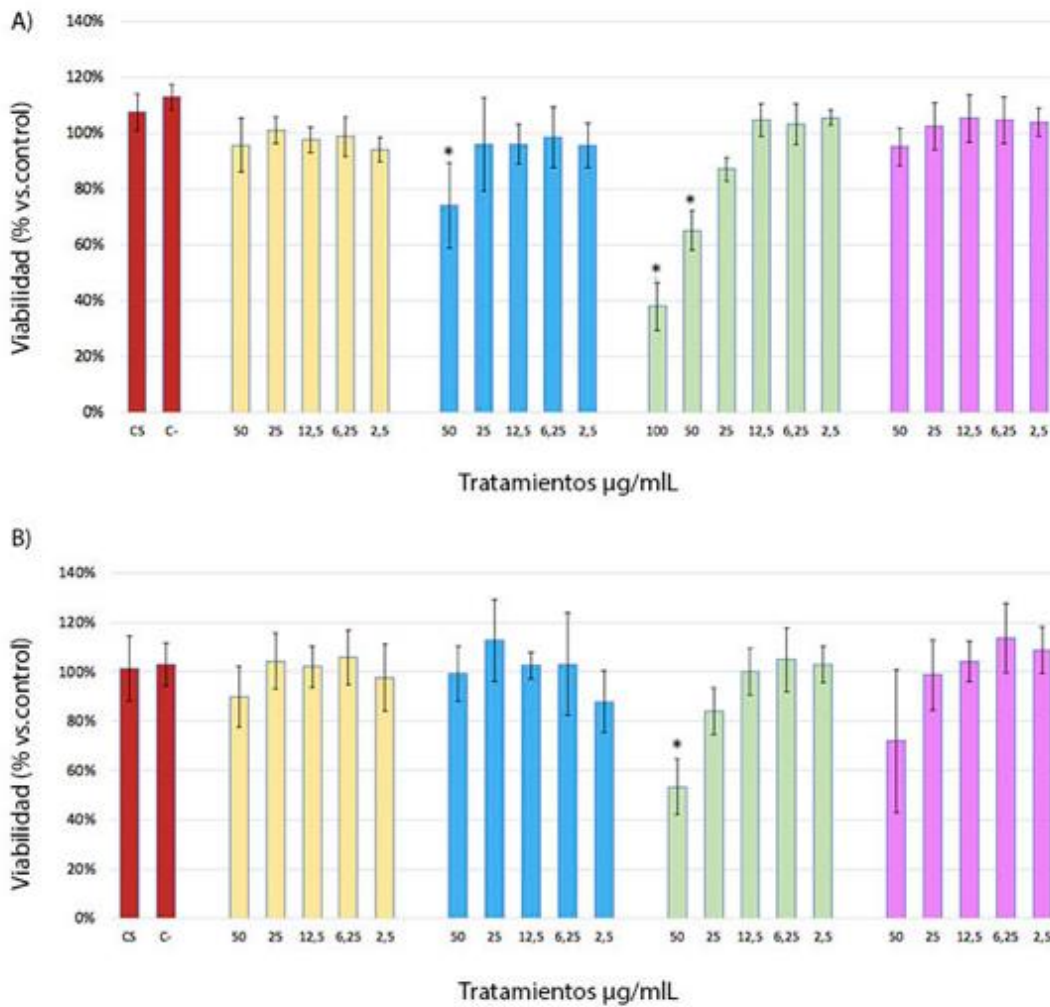


Figura 10. Efectos de los extractos de la flor y hoja de quinral de maqui sobre la viabilidad celular en la línea celular PC-3. (A) tratamiento con los extractos de flor, **(B)** tratamiento con los extractos de hoja. Los extractos de quinral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos (50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Adicionalmente se agregó la concentración de 100 µg/mL para los extractos de acetato de etilo de la flor de maqui. Tras los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En los gráficos de la figura 10 se observó una disminución significativa de la viabilidad con respecto al control solvente en la línea celular PC-3 (figura 10-A) tratada con el extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de maqui, a las mayores concentraciones utilizadas (100 y 50 µg/mL). El extracto de diclorometano de la flor, también disminuyó levemente el porcentaje de viabilidad a la concentración de 50 µg/mL. En los tratamientos con los extractos de la hoja de quintral de maqui (figura 10-B), se observó actividad significativa respecto al control con el extracto de acetato de etilo, a la concentración mayor 50 µg/mL. En general, no se observaron efectos para el resto de los extractos.

No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre el control solvente y control negativo en ninguno de los ensayos ($p > 0,05$)

V.I.III Línea celular de cáncer mamario MCF-7

V.I.III.I Tratamiento con los extractos de flor de quintral de álamo

En el gráfico de la figura 11 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea MCF-7 tratada con los extractos de la flor del quintral de álamo

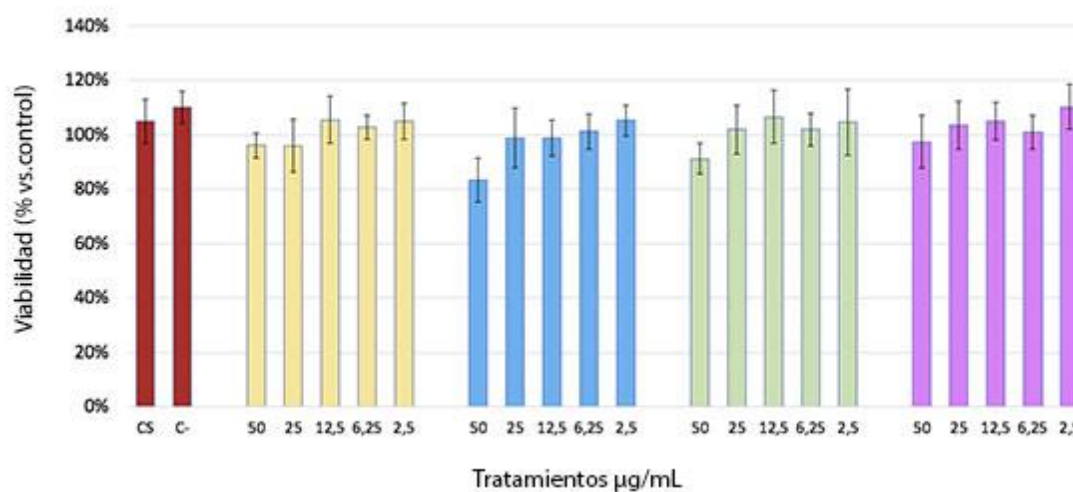


Figura 11. Efectos de los extractos de la flor de quintral de álamo sobre la viabilidad celular en la línea celular MCF-7. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de la flor de quintral de álamo (50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), amarillas extracto de hexano, azul diclorometano, verde acetato de etilo y rosa metanol. Tras el tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En el gráfico de la figura 11 no se observó actividad significativa para ninguno de los extractos de quintral de álamo en la línea celular MCF-7.

V.I.III.II Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de huayún

En el gráfico de la figura 12 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea MCF-7 tratada con los extractos de la flor del quintral de huayún.

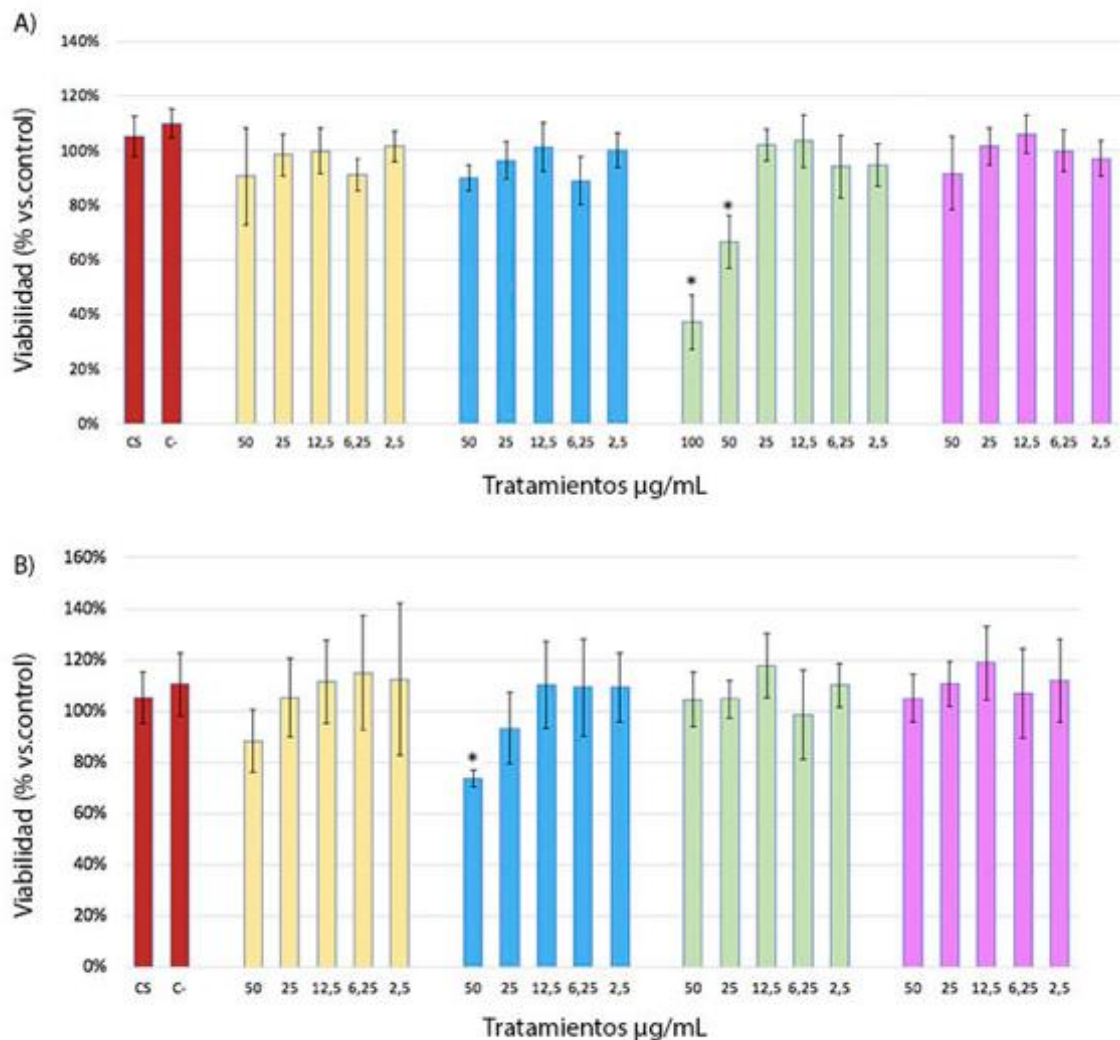


Figura 12. Efectos de los extractos de la flor y hoja de quintral de huayún sobre la viabilidad celular en la línea celular MCF-7. (A) tratamiento con los extractos de flor, (B) tratamiento con los extractos de hoja. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad.

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos (50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Adicionalmente se agregó la concentración de 100 µg/mL para los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún. Tras los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica

la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En la figura 12 se observó que en la línea celular MCF-7, los tratamientos con los extractos de acetato de etilo de la flor (figura 12-A) presentaron actividad significativa sobre la viabilidad, a las concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Para el resto de los extractos no se observó efecto. En los tratamientos con los extractos de la hoja de quintral de huayún (figura 12-B) solo se observó diferencias significativas en la viabilidad, para la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de diclorometano.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control solvente y control negativo en ninguno de los ensayos ($p > 0,05$).

V.I.III.III Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de maqui

En los gráficos de la figura 13 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea MCF-7 tratada con los extractos de la flor y hoja del quintral de maqui.

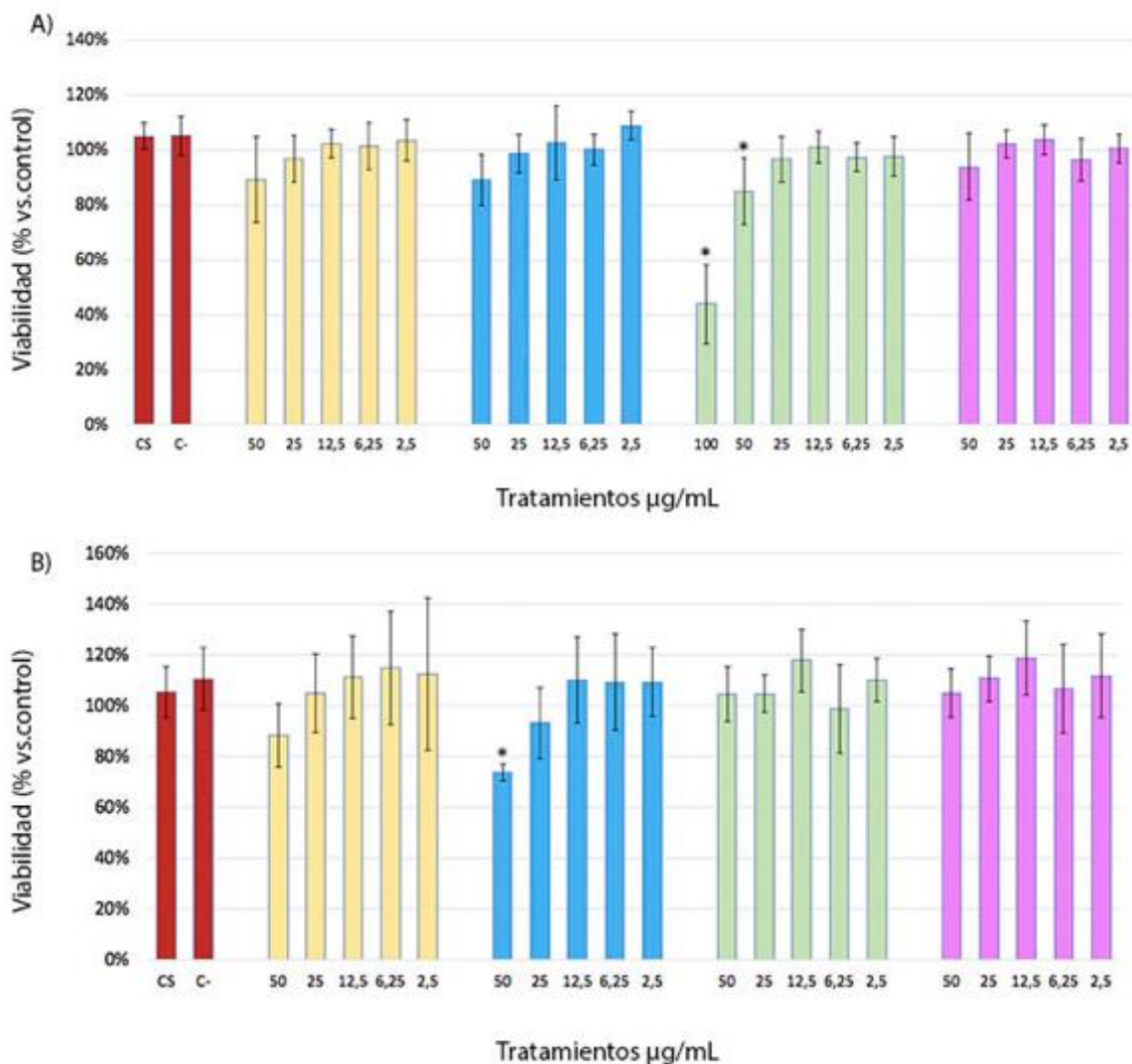


Figura 13. Efectos de los extractos de la flor y hoja de quintral de maqui sobre la viabilidad celular en la línea celular MCF-7. (A) tratamiento con los extractos de flor, (B) tratamiento con los extractos de hoja. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos (50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Adicionalmente se agregó la concentración de 100 µg/mL para los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún. Tras los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulfurodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En la figura 13 se observa que en la línea celular MCF-7, el extracto de acetato de etilo (figura 13-A) solo presentó actividad significativa sobre la viabilidad con respecto a los controles, a las mayores concentraciones utilizadas (100 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para el resto de los extractos no se observó efecto. En los extractos de hoja de quintral de maqui figura (figura 13-B) no se observaron diferencias significativas en la viabilidad con respecto a los controles, exceptuando la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto de diclorometano. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control solvente y control negativo en ninguno de los ensayos ($p > 0,05$).

V.I.IV Línea de células embrionarias renales HEK-293

En la línea celular no tumoral HEK-293, se evaluaron los efectos del quintral parasitario del maqui y huayún.

V.I.IV.I Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de huayún

En los gráficos de la figura 14 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea celular no tumoral HEK-293 tratada con los extractos de flor y hoja del quintral de huayún.

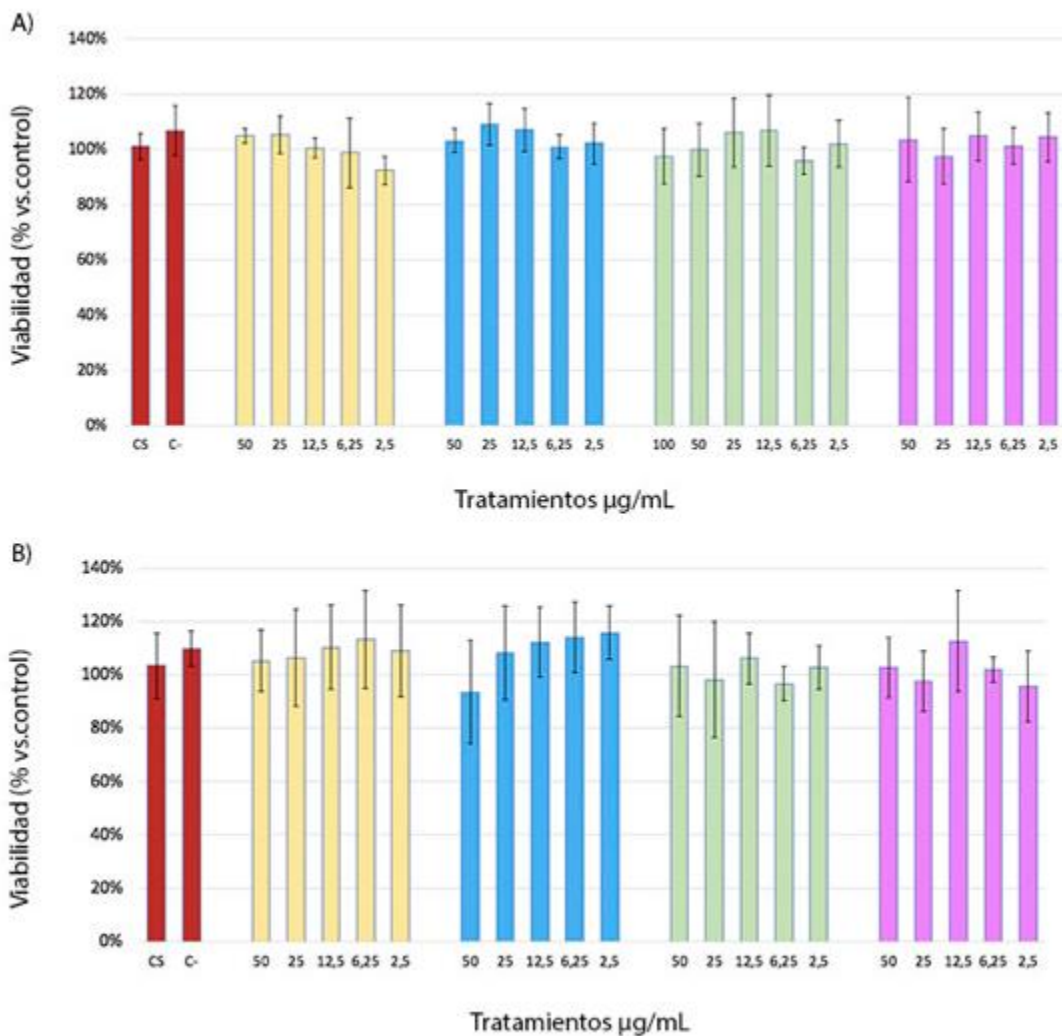


Figura 14. Efectos de los extractos de la flor y hoja de quintral de huayún sobre la viabilidad celular en la línea celular HEK-293. (A) tratamiento con los extractos de flor, (B) tratamiento con los extractos de hoja. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos (50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Adicionalmente se agregó la concentración de 100 µg/mL para los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún. Tras los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En los gráficos de la figura 14 se observó que no hubo actividad significativa sobre la viabilidad celular para ninguno de los extractos utilizados de flor y hoja de quintral de huayún.

V.I.IV.II Tratamiento con los extractos de flor y hoja de quintral de maqui

En el gráfico de la figura 15 se muestran los valores del porcentaje de viabilidad celular obtenidos en la línea celular HEK-293 tratada con los extractos de la flor y hoja del quintral de maqui.

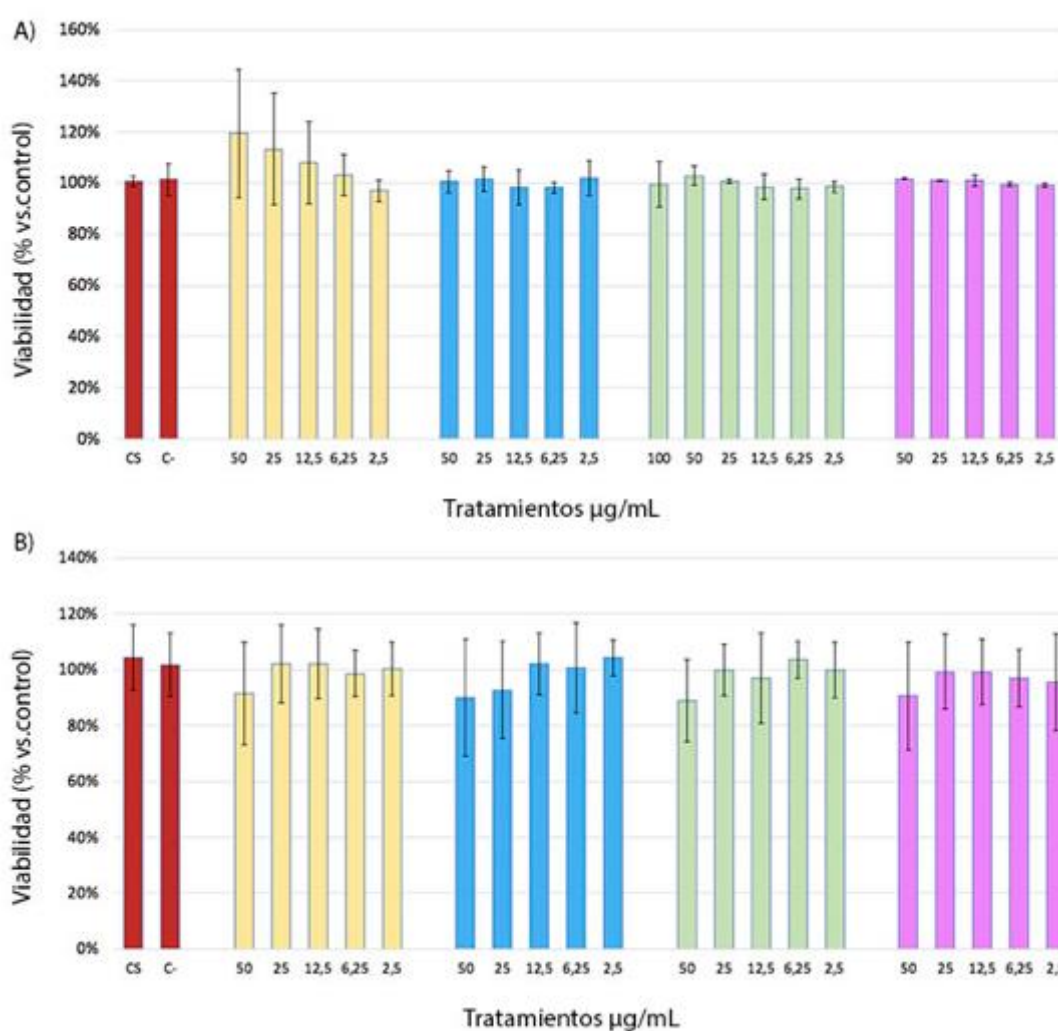


Figura 15. Efectos de los extractos de la flor y hoja de quintral de maqui sobre la viabilidad celular en la línea celular HEK-293. (A) tratamiento con los extractos de flor, **(B)** tratamiento con los extractos de hoja. Los extractos de quintral provienen de una extracción de tipo Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad.

Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos (50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 µg/mL) por 72h. Las barras en color rojo corresponden al control solvente (CS) y control negativo (C-), extracto de hexano (amarillas), diclorometano (azul), acetato de etilo (verde) y metanol (rosado). Adicionalmente se agregó la concentración de 100 µg/mL para los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún. Tras los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de la sulforodamina B. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células viables comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

Al igual que con los tratamientos huayún, no se observó efectos significativos sobre la viabilidad de la línea celular HEK-293 con ninguno de los extractos utilizados.

La tabla 2 muestra los valores del porcentaje de viabilidad, en los que se observaron diferencias significativas con respecto al tratamiento control solvente junto a los valores obtenidos en la línea HEK-293 para los mismos extractos.

	HEK-293	AGS	PC3	MCF-7
ID Extracto (µg/mL)				
CS	≥ 50 ($\bar{x}=1,01 \pm 0,05$)	≥ 50 ($\bar{x}=1,04 \pm 0,07$)	≥ 50 ($\bar{x}=1,08 \pm 0,07$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,05 \pm 0,05$)
FAQA	-	≥ 50 ($\bar{x}=0,85 \pm 0,10$)	≥ 50 ($\bar{x}=1,07 \pm 0,13$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,91 \pm 0,05$)
FMQA	-	≥ 50 ($\bar{x}=0,67 \pm 0,17$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,50 \pm 0,87$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,87 \pm 0,10$)
FAQH	≥ 50 ($\bar{x}=1,00 \pm 0,09$)	≥ 25 ($\bar{x}=0,39 \pm 0,03$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,54 \pm 0,02$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,67 \pm 0,13$)
FMQH	≥ 50 ($\bar{x}=1,04 \pm 0,15$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,52 \pm 0,12$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,69 \pm 0,19$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,91 \pm 0,29$)
HAQH	≥ 50 ($\bar{x}=1,03 \pm 0,19$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,75 \pm 0,13$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,89 \pm 0,20$)	≥ 50 ($\bar{x}=1,04 \pm 0,10$)
HMQH	≥ 50 ($\bar{x}=1,00 \pm 0,11$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,66 \pm 0,17$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,83 \pm 0,16$)	≥ 50 ($\bar{x}=1,05 \pm 0,09$)
HDQH	≥ 50 ($\bar{x}=0,93 \pm 0,19$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,67 \pm 0,22$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,76 \pm 0,15$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,88 \pm 0,12$)
FAQM	≥ 50 ($\bar{x}=1,03 \pm 0,04$)	≥ 25 ($\bar{x}=0,47 \pm 0,05$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,65 \pm 0,09$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,54 \pm 0,02$)
FMQM	≥ 50 ($\bar{x}=1,02 \pm 0,00$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,76 \pm 0,12$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,93 \pm 0,12$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,85 \pm 0,12$)
HAQM	≥ 50 ($\bar{x}=1,00 \pm 0,09$)	≥ 25 ($\bar{x}=0,47 \pm 0,14$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,53 \pm 0,11$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,81 \pm 0,05$)
HMQM	≥ 50 ($\bar{x}=0,91 \pm 0,19$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,51 \pm 0,26$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,72 \pm 0,29$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,91 \pm 0,13$)
HDQM	≥ 50 ($\bar{x}=0,90 \pm 0,21$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,79 \pm 0,09$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,99 \pm 0,11$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,89 \pm 0,11$)
HHQM	≥ 50 ($\bar{x}=0,91 \pm 0,18$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,68 \pm 0,18$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,89 \pm 0,12$)	≥ 50 ($\bar{x}=0,93 \pm 0,12$)

Tabla 2. Valores del porcentaje de viabilidad calculados tras los tratamientos con los extractos de quintral. Se observan los valores de concentración que reducen significativamente la viabilidad celular en las

diferentes líneas celulares estudiadas ($p < 0,05$). El primer valor corresponde a la concentración estimada en que los extractos comenzaron a ejercer su efecto. Los valores entre parentesis corresponden a la media calculada (\bar{x}) \pm los valores de la desviación estándar.

El tratamiento con el extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún, redujo la viabilidad celular entre un 90 y 60% a la concentración mayor (100 $\mu\text{g/mL}$) en las tres líneas tumorales estudiadas.

En la línea celular AGS, en 13 de los 20 extractos probados, presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control solvente, sin embargo, es posible observar que los tratamientos que disminuyeron la viabilidad en alrededor de un 50% son aquellos correspondientes a los de acetato de etilo y metanol de la flor del quintral huayún, y el acetato de etilo de la hoja y flor de quintral del maqui.

Para la línea celular PC-3 y MCF-7, se observó que el tratamiento correspondiente a los extractos de acetato de etilo de huayún y maqui, disminuyeron el porcentaje de viabilidad al 50%.

Con los resultados de viabilidad celular obtenidos en las diferentes líneas celulares utilizadas, se calcularon los valores de IC_{50} , utilizando el software sigmaplot 12.0, mediante la ecuación:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{\text{IC}_{50}}\right)^{-\text{(hillslope)}}$$

El valor de la IC_{50} requerida para obtener el 50% de la respuesta deseada (efecto citotóxico) de cada uno de los extractos y para cada línea celular se detalla en la tabla 1.

ID Extracto	AGS	PC-3	MCF-7	HEK-293
HHQM	>100	>100	>100	>100
HDQM	>100	>100	>100	>100
HAQM	47,33 \pm 0,42	>100	>100	>100
HMQM	50,33 \pm 0,58	>100	>100	85,54 \pm 0,66
FHQM	>100	>100	>100	>100

FDQM	>100	>100	>100	>100
FAQM	40,76 ± 1,00	70,95 ± 0,85	94,13 ± 0,69	>100
FMQM	>100	>100	>100	>100
HHQH	>100	>100	>100	>100
HDQH	>100	>100	>100	>100
HAQH	>100	>100	>100	>100
HMQH	>100	>100	>100	>100
FHQH	>100	>100	>100	>100
FDQH	>100	>100	>100	>100
FAQH	43,45 ± 0,53	54,23 ± 0,69	52,08 ± 0,38	>100
FMQH	53,53 ± 0,43	50,57 ± 0,26	>100	>100
FAQA	>100	>100	>100	>100
FMQA	>100	>100	>100	>100

Tabla 3. Valores de IC₅₀ (µg/mL) obtenidos de cada extracto probados en las distintas líneas celulares.

En la tabla 3 se observó que en la línea tumoral AGS, se presentan los valores de IC₅₀ menores para los extractos de quintral. Se observó que el efecto deseado ocurre a concentraciones entre los 40 y 54 µg/mL, siendo en general esta la línea celular más sensible a los efectos del quintral.

En la línea celular MCF-7, el IC₅₀ menor fue para el extracto de acetato de etilo de la flor del quintral de huayún (52,08 µg/mL).

Para la línea celular PC-3 se observó que los IC₅₀ de los extractos de acetato de etilo y metanol de la flor de quintral de huayún fueron de 54,23 y 50,57 µg/mL respectivamente.

En general, el extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún presentó IC₅₀ menores en las tres líneas celulares tumorales.

El resto de extractos no mencionados presentaron IC₅₀ mayores a 100 µg/mL.

Para determinar la selectividad de la actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales, se calculó el índice de selectividad (IS) con los valores IC₅₀ presentados en la tabla 1.

El índice de selectividad fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$\frac{IC_{50} \text{ línea no tumoral}}{IC_{50} \text{ línea tumoral}}$$

El valor de cada índice de selectividad se presenta en la tabla 2.

ID Extracto	AGS	PC-3	MCF-7
HHQM	1,0	1,0	1,0
HDQM	1,0	1,0	1,0
HAQM	1,9	1,0	1,0
HMQM	1,7	0,8	0,8
FHQM	1,0	1,0	1,0
FDQM	1,0	1,0	1,0
FAQM	2,4	1,4	1,0
FMQM	1,0	1,0	1,0
HHQH	1,0	1,0	1,0
HDQH	1,0	1,0	1,0
HAQH	1,0	1,0	1,0
HMQH	1,0	1,0	1,0
FHQH	1,0	1,0	1,0
FDQH	1,0	1,0	1,0
FAQH	2,3	1,8	1,9
FMQH	1,9	2,0	1,0

Tabla 4. Valores de índice de selectividad obtenidos para cada extracto en las líneas celulares tumorales.

Los hallazgos más relevantes del ensayo de viabilidad celular fueron observados en la línea AGS, cinco de los extractos que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células viables, además, presentaron valores de IC_{50} entre 40 y 53 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 5).

ID Extracto	AGS	IS	PC-3	IS	MCF-7	IS	HEK-293
HAQM	47,33 ± 0,42	1,9	>100	1,0	>100	1,0	>100

HMQM	50,33 ± 0,58	1,7	>100	0,8	>100	0,8	85,54 ± 0,66
FAQM	40,76 ± 1,00	2,4	70,95 ± 0,85	1,4	94,13 ± 0,69	1,0	>100
FAQH	43,45 ± 0,53	2,3	54,23 ± 0,69	1,8	52,08 ± 0,38	1,9	>100
FMQH	53,53 ± 0,43	1,9	50,57 ± 0,26	2,0	>100	1,0	>100

Tabla 5. Resumen de los valores IC₅₀ ± desviación estándar (µg/mL) y el índice de selectividad (IS).

Para la línea celular PC-3 se observó efectos citotóxicos en los tratamientos con los extractos del metanol (IC₅₀ 54,23 ± 0,69 µg/mL) y acetato de etilo (IC₅₀ 50,57 ± 0,26 µg/mL) de la flor de quintral de huayún y de acetato de etilo de la flor de quintral de maqui (IC₅₀ 70,95 ± 0,85 µg/mL). En la línea celular MCF-7, el IC₅₀ menor fue calculado para el extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún (IC₅₀ 52,08 ± 0,38 µg/mL). El extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de maqui, presento un valor IC₅₀ de 94,13 ± 0,69 µg/mL.

Los extractos de acetato de etilo de ambos huéspedes, fueron los que presentaron valores IC₅₀ menores a 100, en las 3 líneas tumorales estudiadas.

La viabilidad celular de la línea no tumoral HEK-293 no se vio afectada por los extractos de quintral a excepción del extracto de metanol de la hoja de quintral de maqui.

Junto a los valores IC₅₀, se observa los índices de selectividad de los extractos de quintral probados en las líneas tumorales. Para el extracto de acetato de etilo de la flor de huayún, se observaron valores cercanos a 2 en las tres líneas celulares, lo que indica que este extracto en particular presenta cierta selectividad en su efecto citotóxico para las líneas tumorales, en comparación con la línea celular no tumoral. Además, en la línea celular AGS se observaron valores cercanos a 2 para el resto de los extractos activos. En general, los extractos en las otras dos líneas celulares tumorales no presentaron un índice de selectividad deseable, exceptuando el extracto de metanol de la flor de quintral de maqui, que en la línea PC-3, presentó un índice de selectividad de 2,0.

V.II MUERTE CELULAR

V.II.I Potencial de membrana mitocondrial

Tras los ensayos de viabilidad, se evaluó si el efecto en la disminución del porcentaje de células viables, se relaciona con la muerte celular por la vía extrínseca de la apoptosis. Para ello, se evaluó la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y la activación de caspasas, como procesos asociados a la apoptosis intrínseca. Tomando en consideración los resultados de la viabilidad celular, fueron electos los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de maqui y de huayún, ya que presentaron los efectos citotóxicos más potentes. Las células fueron tratadas con los extractos indicados a la concentración de 100 µg/mL. Tras 48 horas de tratamiento, las células fueron marcadas con rodamina 123 y la fluorescencia asociada fue analizada mediante citometría de flujo con el filtro FL-1.

V.II.I.I Línea celular de cáncer gástrico AGS

En la figura 16 se muestran los histogramas representativos obtenidos tras los tratamientos con la flor de quintral de huayún y maqui en la línea celular AGS, junto a los porcentajes de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto.

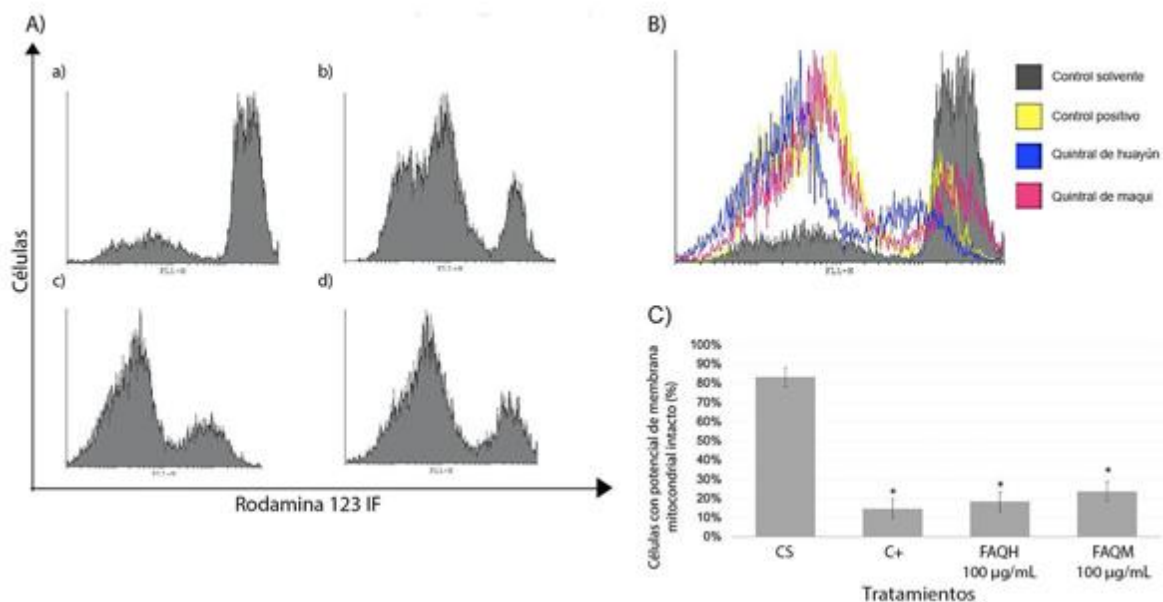


Figura 16. Efectos de los extractos de acetato de etilo de flor del quintral de huayún y maqui sobre el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular AGS. Las células AGS fueron tratadas con los extractos de acetato de etilo de flor de quintral de huayún y maqui a la concentración de 100 µg/mL. Tras 48 horas de tratamiento las células fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría. El control positivo (FCCP) fue tratado durante 24 horas. **(A)** Histogramas representativos del efecto de los extractos sobre el potencial de membrana mitocondrial. (a) control solvente, (b) control positivo, (c) extracto acetato de etilo de flor de quintral de huayún, (d) extracto acetato de etilo de flor de quintral de maqui. **(B)** Histograma representativo de la superposición de las curvas de fluorescencia. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células con el potencial de membrana intacto comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En la línea AGS se observó en el histograma de superposición de las curvas (figura 16-B), una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia tanto para el control positivo como para los tratamientos con ambos extractos, lo que indica un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial que favorece la salida de la sonda desde la mitocondria y por lo tanto, la disminución de la intensidad de la fluorescencia emitida respecto del control solvente. El del porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto fue significativamente menor en los tratamientos con los extractos de acetato de etilo de la flor del maqui ($23,71 \pm 1,89$) y huayún ($18,36 \pm 1,90$) comparados con el control solvente ($83,20 \pm 11,75$) (figura 16-C), esta disminución fue de alrededor del 60% para ambos extractos, valor similar al obtenido con el control positivo.

V.II.I.II Línea celular de cáncer de próstata PC-3

En la figura 17 se muestran los histogramas representativos obtenidos tras los tratamientos con la flor de quintral de huayún y maqui en la línea celular PC-3, junto a los porcentajes de células cuyo potencial de membrana mitocondrial se mantiene intacto.

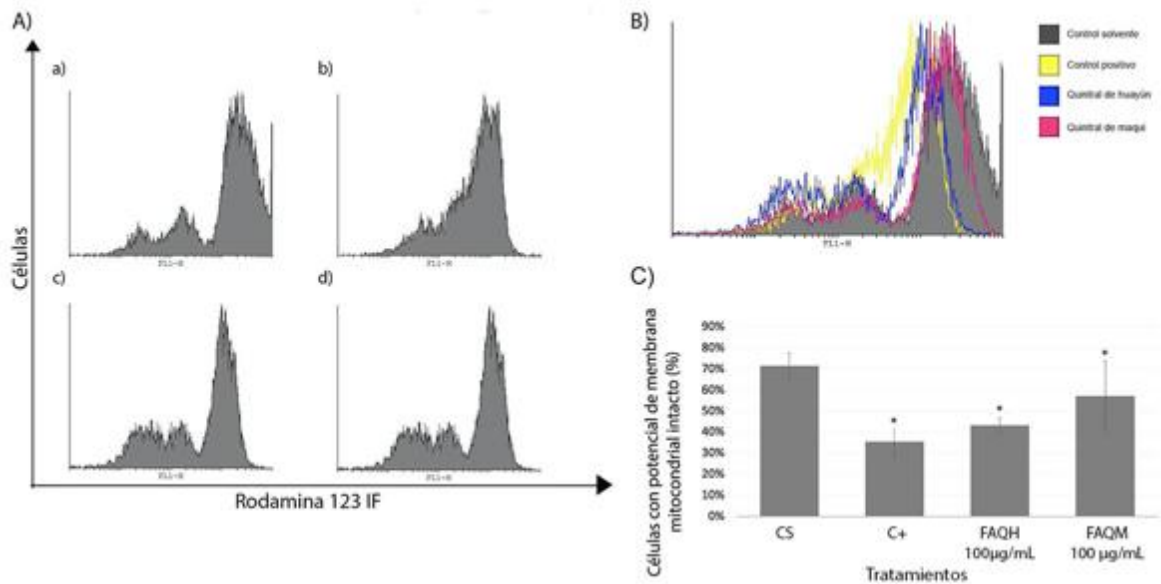


Figura 17. Efectos de los extractos de acetato de etilo de flor del quintral de huayún y maqui sobre el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular PC-3. Las células PC-3 fueron tratadas con los extractos de flor de quintral de huayún y maqui a la concentración de 100 µg/mL. Tras 48 horas de tratamiento las células fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría. El control positivo (FCCP) fue tratado durante 24 horas. **(A)** Histogramas representativos del efecto de los extractos sobre el potencial de membrana mitocondrial. (a) control solvente, (b) control positivo, (c) extracto de la flor de quintral de huayún, (d) tratamiento con el extracto de la flor de quintral de maqui. **(B)** Histograma representativo de la superposición de las curvas de fluorescencia. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células con el potencial de membrana intacto comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En el histograma de superposición de las curvas (figura 17-B), se observó una disminución de la intensidad de la fluorescencia asociada al marcaje con rodamina 123 tanto para el control positivo, como para el tratamiento con el extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún comparada control solvente. En la figura 17-C se observó una disminución significativa de las células PC-3 con el potencial de membrana mitocondrial intacto, al ser tratadas con el extracto de la flor de quintral de huayún ($43,28 \pm 3,51$) en comparación con el tratamiento con el control solvente ($71,43 \pm 6,05$) (figura 17-C), esta disminución fue de alrededor del 30%.

V.II.I.III Línea celular de cáncer mamario metastásico MCF-7

En la figura 18 se muestran los histogramas representativos obtenidos tras los tratamientos con la flor de quintral de huayún y maqui en la línea celular MCF-7, junto a los porcentajes de células con potencial de membrana mitocondrial intacto.

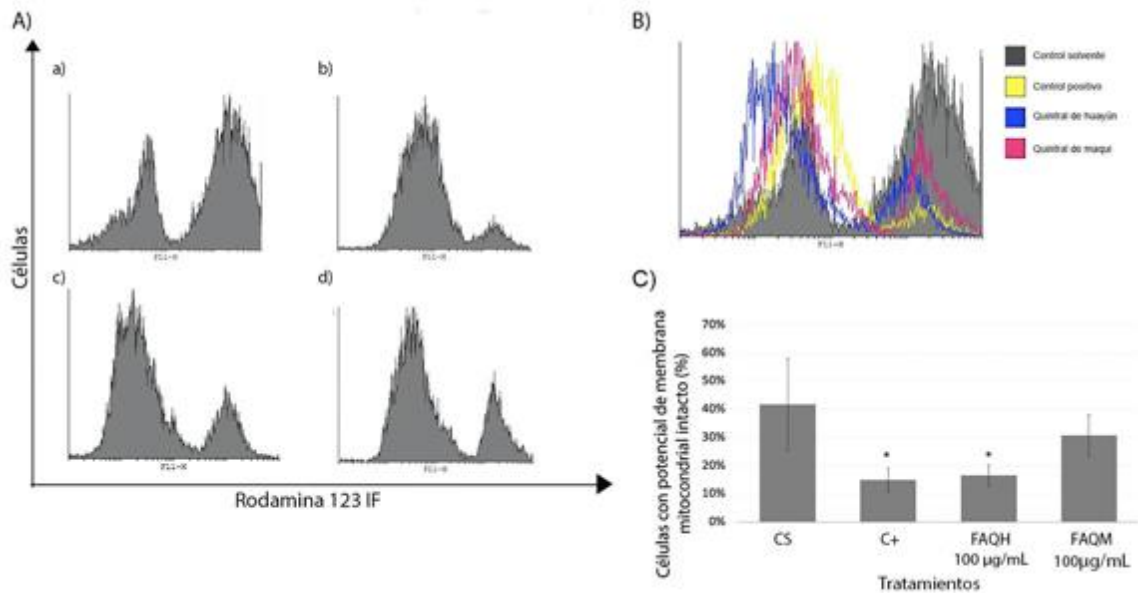


Figura 18. Efectos de los extractos de acetato de etilo de flor del quintral de huayún y maqui sobre el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular MCF-7. Las células MCF-7 fueron tratadas con los extractos de acetato de etilo de flor de quintral de huayún y maqui a la concentración de 100 µg/mL. Tras 48 horas de tratamiento las células fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría. El control positivo (FCCP) fue tratado durante 24 horas. **(A)** Histogramas representativos del efecto de los extractos sobre el potencial de membrana mitocondrial. (a) control solvente, (b) control positivo FCCP, (c) extracto acetato de etilo de la flor de quintral de huayún, (d) extracto acetato de etilo de la flor de quintral de maqui. **(B)** Histograma representativo de la superposición de las curvas de fluorescencia. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto. Se gráfica la media de los valores obtenidos para el porcentaje de células con el potencial de membrana intacto, comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En el histograma de superposición de las curvas (figura 18-B) para la línea celular MCF-7, se observó el desplazamiento de la fluorescencia hacia la izquierda tanto para el control positivo, como para el tratamiento con el extracto de acetato de etilo de la flor

de quintral de huayún, lo que indica una disminución de la intensidad de fluorescencia asociada a la sonda, indicando una caída del potencial de membrana mitocondrial. En la figura (figura 18-C), se observó una disminución significativa del porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto, tras los tratamientos con el extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún y el control positivo, en comparación al control solvente (figura 18-C), esta disminución fue de alrededor del 30%.

V.II.I.IV Línea de células embrionarias renales HEK-293

En la figura 19 se muestran los histogramas representativos obtenidos tras los tratamientos con los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún y maqui en la línea celular HEK-293, junto a los porcentajes de células cuyo potencial de membrana mitocondrial resta intacto.

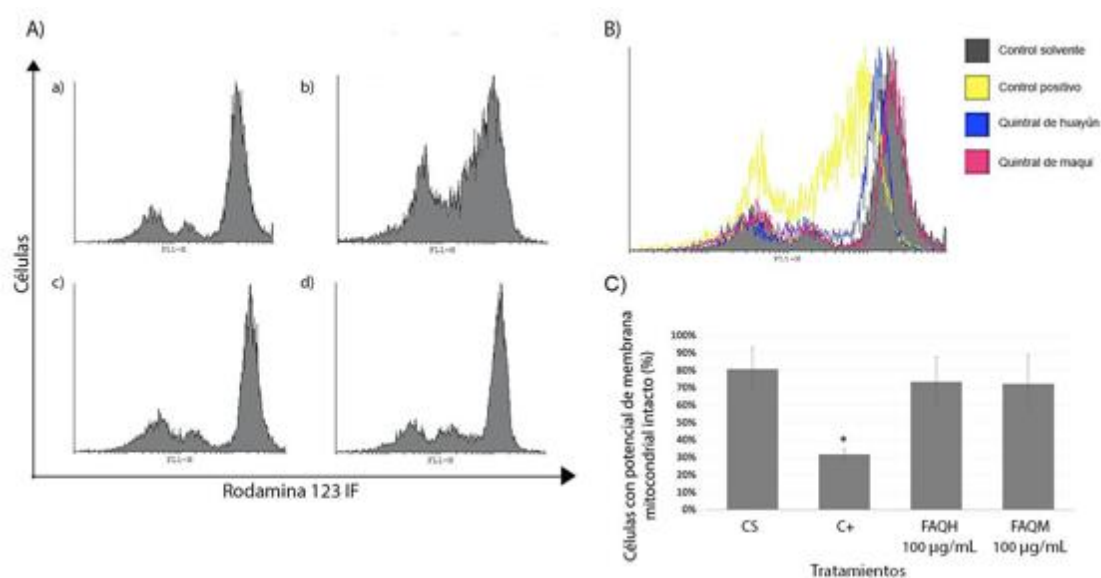


Figura 19. Efectos de los extractos de acetato de etilo de flor del quintral de maqui y huayún sobre el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular HEK-293. Las células HEK fueron tratadas con los extractos de acetato de etilo de flor de quintral de huayún y maqui a la concentración de 100 µg/mL. Tras 48 horas de tratamiento las células fueron marcadas con rodamina 123 y analizadas mediante citometría. El control positivo (FCCP) fue tratado durante 24 horas. **(A)** Histogramas representativos del efecto de los extractos sobre el potencial de membrana mitocondrial. (a) control solvente, (b) control positivo, (c) extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún, (d) extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de maqui. **(b)** Histograma representativo de la superposición de las curvas de fluorescencia. **(C)** Cuantificación

del porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células con el potencial de membrana intacto comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=3$; * $p < 0,05$ vs CS).

En la línea HEK-293 no se observó disminución significativa del porcentaje de células con el potencial de membrana intacto, en ninguno de los tratamientos con los extractos utilizados, en comparación al control solvente (figura 19-C). Solo se hubo efectos significativos para el tratamiento con el control positivo (FCCP).

El potencial de membrana mitocondrial se vio afectado en las tres líneas celulares tumorales (tabla 6). El porcentaje de células con el potencial de membrana intacto, se vio disminuido luego de los tratamientos con el extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún (figura 20).

ID Extracto ($\mu\text{g/mL}$)	AGS	PC-3	MCF-7	HEK-293
	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$
CS	83,20 \pm 11,75	71,43 \pm 6,05	41,80 \pm 16,35	80,87 \pm 12,21
C+	14,65 \pm 3,36	35,40 \pm 6,61	14,96 \pm 4,14	31,89 \pm 3,07
FAQH 100	18,36 \pm 1,90	43,28 \pm 3,51	16,57 \pm 3,75	73,53 \pm 14,26
FAQM 100	23,71 \pm 1,89	57,05 \pm 16,62	30,81 \pm 7,26	72,4 \pm 16,53

Tabla 6. Valores del porcentaje de células con el potencial de membrana intacto. Se muestra el promedio del porcentaje de células con el potencial de membrana intacto asociado a la fluorescencia de la rodamina 123. Los valores fueron obtenidos con el software Cyflogic v.1.2.1.

El extracto de acetato de etilo de la flor de maqui, disminuyó significativamente el número de células con el potencial de membrana intacto de las líneas tumorales AGS y PC-3. No se observaron efectos en el potencial de membrana mitocondrial de las células HEK-293, para los grupos tratados con los extractos de quintral.

V.II.II Activación de caspasas

Este ensayo se presenta como resultado preliminar ya que solo considero 2 replicas biológicas.

Tras la evaluación del potencial de membrana mitocondrial, se estudió la activación de caspasas como un proceso relevante en la muerte celular por apoptosis. Para ello, las células fueron tratadas con los extractos de acetato de etilo de flor de quintral de maqui y huayún a la concentración de 100 µg/mL. Luego de 72 horas de tratamiento, las células fueron tratadas con Caspace y la intensidad de fluorescencia asociada fue analizada mediante citometría de flujo con el filtro FL-1.

V.II.II.I Línea celular de cáncer gástrico AGS

En la figura 20 se muestran los histogramas representativos obtenidos tras los tratamientos con los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún y maqui en la línea celular AGS junto a los porcentajes de células con caspasas activas.

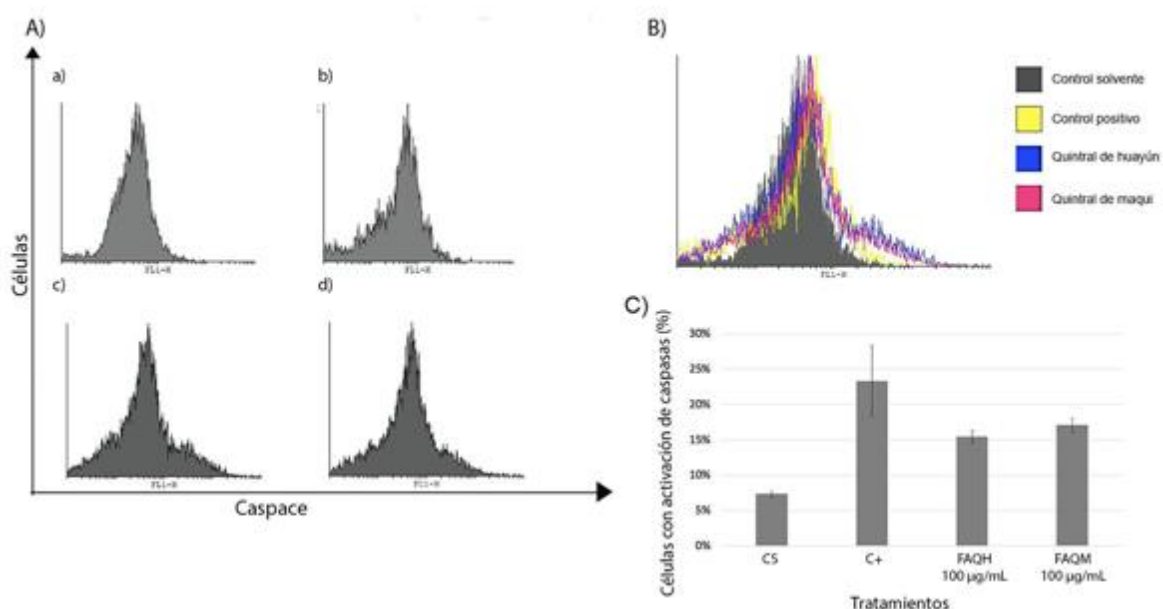


Figura 20. Efectos de los extractos de acetato de etilo de flor del quintral de maqui y huayún sobre la activación de caspasas en la línea celular AGS. Las células AGS fueron tratadas con los extractos de acetato de etilo de flor de quintral de huayún y maqui a la concentración de 100 µg/mL. Tras 72 horas de tratamiento las células fueron marcadas con caspace y analizadas mediante citometría. El control positivo (daunorrubicina 1 µM) fue tratado durante 48 horas. **(A)** Histogramas representativos del efecto de los extractos sobre la activación de caspasas. (a) control solvente, (b) control positivo, (c) extracto de acetato

de etilo de la flor de quintral de huayún, (d) extracto de la flor de quintral de maqui. **(B)** Histograma representativo de la superposición de las curvas de fluorescencia. **(C)** Cuantificación de células con caspasas activas. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células con activación de caspasas comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=2$).

En la línea celular AGS, en el histograma de superposición de las curvas (figura 20-B) se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia, tanto para los tratamientos como para el control positivo. En la figura 18-C se cuantificó el aumento en las células con activación de caspasas. Se observó un leve aumento del porcentaje de células con activación de caspasas para ambos extractos (figura 20-C), este aumento fue de alrededor del 10%.

V.II.II.II Línea celular de cáncer de próstata PC-3

En la figura 21 se muestran los histogramas representativos obtenidos tras los tratamientos con los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún y maqui en la línea celular PC-3, junto a los porcentajes de células con caspasas activas.

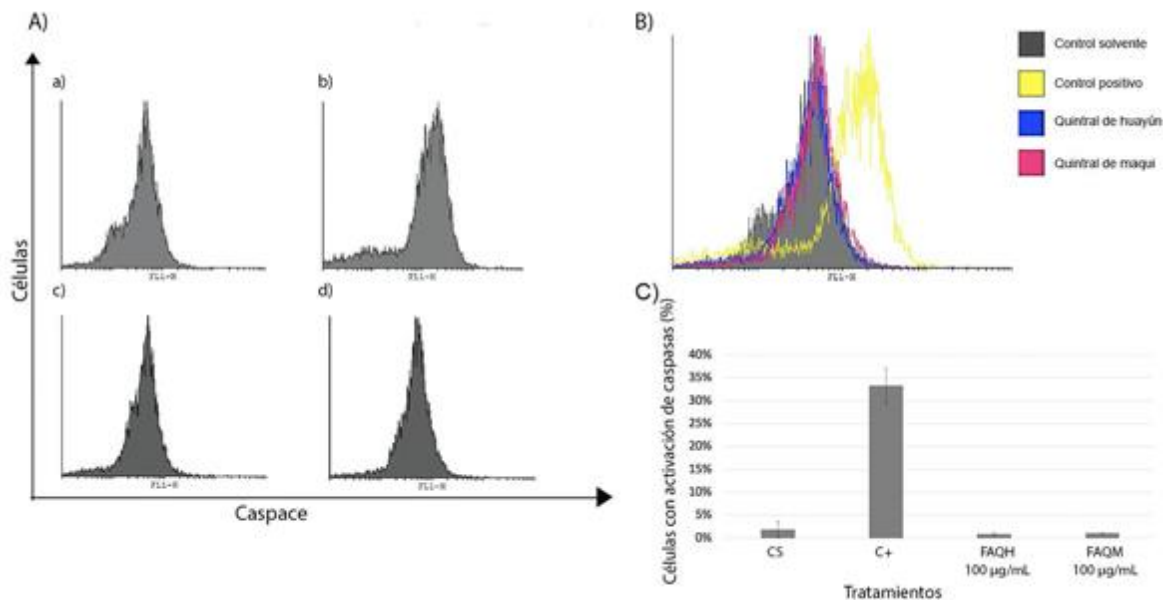


Figura 21. Efectos de los extractos de acetato de etilo de flor del quintral de maqui y huayún sobre la activación de caspasas en la línea celular PC-3 . Las células PC-3 fueron tratadas con los extractos de

acetato de etilo de flor de quintral de huayún y maqui a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Tras 72 horas de tratamiento las células fueron marcadas con caspase y analizadas mediante citometría. El control positivo (daunorrubicina 1 μM) fue tratado durante 48 horas. **(A)** Histogramas representativos del efecto de los extractos sobre la activación de caspasas. (a) control solvente, (b) control positivo, (c) extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún, (d) extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de maqui. **(B)** Histograma representativo de la superposición de las curvas de fluorescencia. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células con caspasas activas. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células con activación de caspasas comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=2$).

En la línea celular PC-3, no se observó aumento del porcentaje de células con caspasas activas para ninguno de los extractos utilizados (figura 21-C).

V.II.II.III Línea celular de cáncer mamario MCF-7

En la figura 22 se muestran los histogramas representativos obtenidos tras los tratamientos con los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún y maqui en la línea celular MCF-7, junto a los porcentajes de células con caspasas activas.

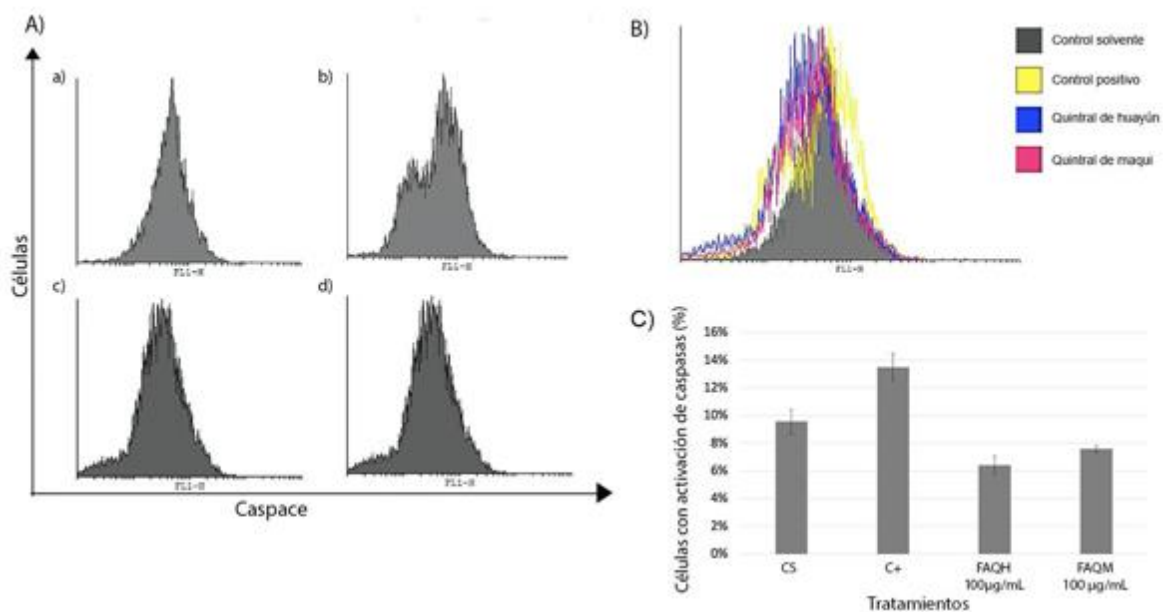


Figura 22. Efectos de los extractos de acetato de etilo de flor del quintral de maqui y huayún sobre la activación de caspasas en la línea celular MCF-7. Las células MCF-7 fueron tratadas con los extractos de acetato de etilo de flor de quintral de huayún y maqui a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. Tras 72 horas de

tratamiento las células fueron marcadas con caspase y analizadas mediante citometría. El control positivo (daunorrubicina 1 μM) fue tratado durante 48 horas. **(A)** Histogramas representativos del efecto de los extractos sobre la activación de caspasas. (a) control solvente, (b) control positivo, (c) extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún, (d) extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de maqui. **(B)** Histograma representativo de la superposición de las curvas de intensidad de fluorescencia. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células con activación de caspasas. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células con activación de caspasas comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=2$).

En la línea celular MCF-7, no se observó aumento del porcentaje de células con caspasas activas para ninguno de los tratamientos (figura 22-C).

V.II.II.IV Línea celular HEK-293

En la figura 23 se muestran los histogramas representativos obtenidos tras los tratamientos con los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún y maqui en la línea celular HEK-293, junto a los porcentajes de células con activación de caspasas.

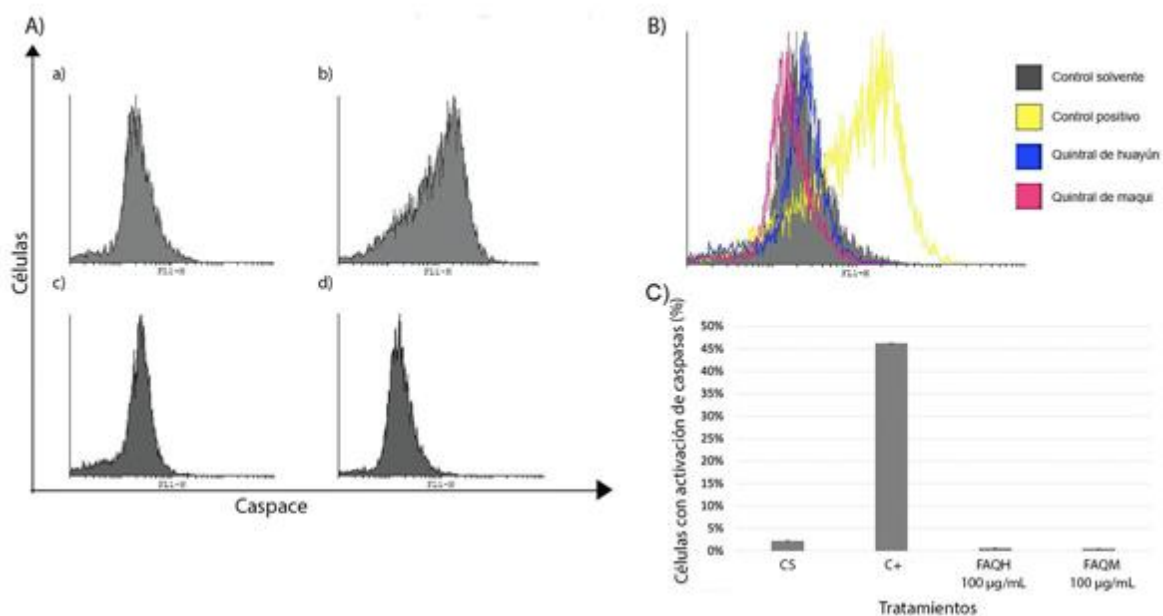


Figura 23. Efectos de los extractos de acetato de etilo de flor del quintral de maqui y huayún sobre la activación de caspasas en la línea celular HEK-293. Las células HEK-293 fueron tratadas con los extractos de acetato de etilo de flor de quintral de huayún y maqui a la concentración de 100 µg/mL. Tras 72 horas de tratamiento las células fueron marcadas con caspace y analizadas mediante citometría. El control positivo (daunorrubicina 1 µM) fue tratado durante 48 horas **(A)** Histogramas representativos del efecto de los extractos sobre la activación de caspasas. (a) control solvente, (b) control positivo, (c) extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún, (d) extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de maqui. **(B)** Histograma representativo de la superposición de las curvas de intensidad de fluorescencia. **(C)** Cuantificación de células con activación de caspasas. Se gráfica la media de los valores obtenidos para porcentaje de células con activación de caspasas comparado con el control solvente y la desviación estándar ($n=2$).

En la línea celular HEK-293, no se observó aumento del porcentaje de células con activación de caspasas para ninguno de los extractos utilizados en comparación al control solvente (figura 23-C).

La tabla 7, muestra los valores calculados para el porcentaje de células con activación de caspasas.

	AGS	PC-3	MCF-7	HEK-293
ID Extracto (µg/mL)	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \pm DE$
CS	7,39 ± 0,35	1,89 ± 1,73	9,57 ± 0,88	2,29 ± 0,22
C+	23,37 ± 4,94	33,36 ± 3,7	13,50 ± 0,98	46,24 ± 1,28
FAQH 100	15,46 ± 0,81	0,90 ± 0,32	6,41 ± 0,64	0,54 ± 0,04
FAQM 100	17,10 ± 0,93	1,07 ± 0,17	7,5 ± 0,23	0,63 ± 0,07

Tabla 7. Porcentaje de células con activación de caspasas según tratamiento y línea celular.

Se muestra el promedio del porcentaje de células con activación de caspasas asociado a la fluorescencia del caspace. Los valores fueron obtenidos con el software Cyflogic v.1.2.1.

VI. DISCUSIÓN

El proceso neoplásico se caracteriza por una serie de capacidades que adquieren las células durante el desarrollo tumoral. La capacidad de inhibir la muerte celular y otras estrategias elaboradas por las células cancerígenas, sumado al gran aumento de muertes provocadas por cáncer y el futuro aumento en la tasa de mortalidad, siguen generando la necesidad de encontrar nuevos posibles tratamientos para prevenir y curar la enfermedad (1). Los principales agentes quimioterapéuticos son moléculas aisladas de diferentes plantas. Estas moléculas son conocidas como compuestos naturales (CN). Durante las últimas décadas los CN han sido investigados como posibles fuentes de moléculas con efectos antiproliferativos sobre una amplia gama de cánceres (75).

En la base de datos de productos naturales y extractos fraccionados para la regulación del cáncer, se pueden explorar 6578 compuestos naturales y 2566 extractos fraccionados aislados de 1952 especies biológicas distintas, cuyas actividades anticancerígenas se validaron en 1107 líneas celulares para 34 tipos de cáncer. Sin embargo, no existen estudios de las capacidades del quintral (76).

Es conocido que el quintral (*Tristerix corymbosus*) es utilizado para tratar problemas gástricos en general. Tomando en cuenta el uso tradicional del muérdago Chileno y los resultados de esta investigación, es posible sugerir, que el quintral ejerce potentes efectos sobre este órgano (64).

La forma de consumir el quintral establecida por los machis mapuches es una infusión de hoja y flor por lo que se podría deducir que ambas partes de la planta son aditivas en sus efectos (77).

Aunque en la actualidad existen algunos estudios que avalan las capacidades antitumorales de algunos muérdagos de la familia Loranthacea, los efectos de los extractos del genero *Tristerix* aún no han sido reportados. Nos basamos en la idea de dotar de evidencia científica al uso de diversas plantas comúnmente empleadas en medicina alternativa mapuche, con el fin de proponer nuevas fuentes ricas en compuestos con posibles actividades supresoras de tumores, orientados en la prevención y/o futuras terapias contra la enfermedad. Esta es la primera investigación que describe la actividad citotóxica y otras actividades biológicas del quintral (*Tristerix corymbosus*), en diferentes líneas de células tumorales.

Los extractos de quintral utilizados en este estudio, provienen de la extracción en un aparato Soxhlet, realizada por separado sobre hojas y flores secas, utilizando diferentes solventes en una gradiente creciente de polaridad: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol sucesivamente.

Los efectos citotóxicos de los extractos de quintral y algunos de los mecanismos que subyacen a la muerte celular producida por la vía intrínseca de la apoptosis, fueron estudiados en un modelo *in vitro* de líneas celulares de, adenocarcinoma mamario metastásico (MCF-7), adenocarcinoma prostático (PC-3), adenocarcinoma gástrico AGS y células embrionarias renales (HEK-293). EL porcentaje de células viables tras los tratamientos permitio el cálculo del IC_{50} y posteriormente el índice de selectividad (IC_{50} no tumoral/ IC_{50} tumoral).

Los mejores resultados fueron observados en la línea celular AGS. 5 de los 20 extractos presentaron valores de $IC_{50} < 100$, destacando el extracto de acetato de etilo de la flor de huayún, a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50} 43,45 \pm 0,53$). El resto de los extractos activos (8), redujeron la viabilidad entre un 10 y 60% a las concentraciones mas altas (50 y 100 $\mu\text{g/mL}$).

En las líneas PC-3 y MCF-7, los efectos mas potentes fueron producidos por los extractos de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún y maqui, con valores de IC_{50} entre 50 y 94 $\mu\text{g/mL}$.

Una vez concluidos los ensayos de viabilidad, fueron escogidos los extractos de acetato de etilo de la flor del quintral de huayún y maqui a la concentracion citotóxica de 100 $\mu\text{g/mL}$. El extracto de acetato de etilo de la flor de huayún provocó la disminución del porcentaje de células con el potencial de membrana mitocondrial intacto, en las 3 lineas tumorales, en cambio, no se observaron efectos para los extractos en la línea de células

no tumorales HEK-293, lo que indica que estos extractos en particular presentan cierta selectividad en su efecto sobre la permeabilidad de membrana mitocondrial para las líneas de cancer estudiadas.

En el análisis de la activación de caspasas, los resultados obtenidos sugieren un aumento del porcentaje de células con activación de caspasas para la línea tumoral AGS.

Algunos muerdagos de la familia Loranthaceae de la que es miembro el quintral, han mostrado actividad citotóxica en estudios *in vitro*. La fracción enriquecida del arbol *Elytranthe parasitica* inhibió la proliferación de células de cáncer de colon HCT 116 (IC_{50} 60.18 μ g/mL) en forma dependiente de la dosis (78). En los resultados obtenidos en esta investigación, se encontraron valores similares de IC_{50} a los descritos para *Elytranthe parasitica*. Tanto en las líneas celulares AGS, PC-3 y MCF-7, los tratamientos con el extracto de acetato de etilo de la flor del quintral de huayún, provocaron una disminución significativa de la viabilidad celular, registrándose valores IC_{50} de alrededor de 40 a 54 μ g/mL y un índice de selectividad (IC_{50} no tumoral/ IC_{50} tumoral) entre 1,8 a 2,0 .

Otro muérdago de origen mexicano *Struthanthus venetus* también perteneciente a la familia Loranthaceae, fue estudiado en la línea de cáncer mamario MCF-7. El tratamiento con extractos hidrometanólicos de esta planta a una concentración 50 μ g/mL, redujo la proliferación de las células tumorales en un 60% (79). Resultados similares se obtuvieron en esta tesis, con el extracto de acetato de etilo de la flor de quintral de huayún en la línea celular MCF-7 (IC_{50} 52,08 \pm 0,38), con reducciones de la viabilidad, de alrededor de un 40 a 60% para las concentraciones más altas.

VI.I Metabolitos presentes en el quintral

Una reciente investigación en la que se evaluó la composición de los extractos de las tres variedades del quintral que fueron utilizadas en esta tesis, encontraron diferencias significativas, con respecto al contenido de fenoles, flavonoides y al poder reductor cuando el quintral presentaba huéspedes diferentes (80). Estas diferencias podrían estar relacionadas con la influencia del huésped en la composición fitoquímica de la planta (80), y podrían relacionarse con los efectos observados con los diferentes extractos en esta tesis.

<u>ID Extracto</u>	<u>Glicósidos cardíacos</u>	<u>Taninos</u>	<u>Flavonoides</u>	<u>Esteroides</u>	<u>Quinonas</u>	<u>Saponinas</u>	<u>Esteroides/ Triterpenos</u>
HHQM	-	+	Flavona/Xantona	+	-	-	-
HDQM	-	+	Flavonol	-	-	-	Esteroles
HAQM	-	+	Flavonol	+	+	+	Esteroles
HMQM	-	+	Flavonol	+	+	-	-
FHQM	+	+	Flavona/Xantona	+	+	+	Triterpenos
FDQM	+	+	Flavona/Xantona	+	+	-	-
FAQM	-	+	Flavona/Xantona	+	-	-	-
FMQM	-	+	Flavona/Xantona	+	+	-	-
HHQH	+	+	Flavona/Xantona	+	-	-	Esteroles
HDQH	+	+	Flavonol	+	+	+	Esteroles
HAQH	+	+	Flavonol	+	-	+	Esteroles
HMQH	-	+	Flavonol	+	+	-	-
FHQH	+	-	Flavona/Xantona	+	+	+	Triterpenos
FDQH	-	+	Flavona/Xantona	-	-	+	-
FAQH	-	+	Flavonol	-	+	-	Triterpenos
FMQH	-	+	Flavonol	+	+	+	-
HHQA	-	+	-	+	-	-	Esteroles
HDQA	-	+	Flavonol	+	-	+	Esteroles
HAQA	-	+	Flavonol	+	+	-	-
HMQA	-	+	Flavonol	+	+	+	Esteroles
FHQA	-	+	-	+	+	-	-
FDQA	-	+	-	+	+	-	Esteroles
FAQA	-	-	Flavonol	+	+	-	Esteroles
FMQA	-	-	Flavonol	+	+	-	-

Tabla 8. Screening fitoquímico del quintral. Resultados del análisis fitoquímico cualitativo de los extractos de hoja y flor de Quintral (*T. corymbosus*) hospedado en Maqui (*A. chilensis*), Huayún (*R. spinosus*) y Álamo (*P. nigra*)(80).

Todos los extractos revelaron la presencia de flavonoides, que en la investigación se restringen a flavonas, xantonas y flavonoles. Destacable también es la presencia de esteroides, quinonas y taninos, en hojas y flores de quintral parasitario de maqui y huayún (tabla 8).

En los extractos de flor de quintral de álamo no se observó la presencia de saponinas, taninos ni glicosidos cardíacos. En cuanto al rendimiento en la extracción y la cantidad

de compuestos fenólicos, fue menor en comparación con los extractos de quintral de las otras dos variedades. (80).

Para la actividad antioxidante, los investigadores observaron que el quintral de huayún posee la mayor capacidad reductora, asociando esta característica al rendimiento y al contenido de fenoles y flavonoides obtenidos. En los extractos apolares la capacidad reductora observada, podría atribuirse a la presencia de componentes no fenólicos, como por ejemplo los glicósidos cardíacos, esteroides y terpenoides encontrados en el análisis fitoquímico (80).

Considerando la composición fitoquímica presente en los extractos de quintral, podemos encontrar distintos tipos de moléculas, algunas con actividades biológicas bien descritas, como es el caso de los flavonoides, saponinas, taninos, terpenos, entre otros. Estos metabolitos están ampliamente distribuidos en la flora vegetal. Son compuestos de alto peso molecular generalmente solubles en agua y alcohol, que se encuentran en la raíz, la corteza, el tallo y las capas externas del tejido vegetal. Además, forman complejos con proteínas, carbohidratos, gelatina y alcaloides, tienen efectos antioxidantes, antibacterianos y antitumorales (81).

VI.II Compuestos fenólicos

Las propiedades de los compuestos fenólicos y flavonoides, así como sus posibles aplicaciones han sido extensamente descritas (82).

Dentro del grupo de moléculas presentes en los extractos de quintral, especialmente en los de acetato de etilo de la hoja del quintral de maqui y huayún, se encuentran las saponinas. Estas corresponden a compuestos fenólicos condensados. En la literatura, se han descrito los efectos de algunas saponinas aisladas de diferentes árboles, como por ejemplo, las saponinas de los extractos de *Acacia victoriae*, provocaron efectos antitumorales en diferentes líneas de cáncer y en modelos *in vivo* (83). Otras saponinas, como las aisladas de *Lonicera macranthoides*, disminuyeron el porcentaje de viabilidad de varias líneas celulares tumorales, entre ellas las MCF-7 (84). El compuesto macranthoside B, una saponina purificada de *Dipsacus asperoides* (*Caprifoliaceae*), disminuyó el porcentaje de células viables en la línea de cáncer gástrico MGC-803 y MCF-7, a concentraciones de 30 µg/mL. Dentro de los efectos antitumorales descritos para

algunas saponinas, se encuentra la inhibición en la proliferación celular, aumento en la expresión de p21 y la inhibición de la actividad de la quinasa dependiente de ciclina (PKC), morfológicamente, las células de cáncer de colon HT-29, exhibieron características apoptóticas como la fragmentación del ADN, condensación de la cromatina nuclear y la presencia de cuerpos apoptóticos (85). Las características antes descritas y los efectos citotóxicos se observaron entre las 48 y 72 horas (IC_{50} 39,8 y 31,6 $\mu\text{g/mL}$)(85). Similares características y efectos se observaron en esta investigación, en aquellos extractos en que se identificaron saponinas, (hoja de quintral de maqui y huayún) en las células AGS y PC-3 (IC_{50} 50 a 54 $\mu\text{g/mL}$).

Otros de los grupos de metabolitos identificados en los extractos de quintral en los solventes, diclorometano, acetato de etilo y metanol, tanto de la flor y hoja del quintral de maqui y huayún, son los taninos. Algunos de los efectos reportados para los taninos, podrían estar relacionados con los resultados de esta investigación asociados a una disminución de la viabilidad celular (75, 76).

En el quintral de álamo fueron encontrados taninos, como, epigallocatequina, galotanino y malvidina. Investigaciones sobre estos compuestos, han demostrado un potente efecto anticancerígeno *in vitro* contra diversas células cancerosas. (86,87).

VI.III Flavonoides y cáncer

Sumado a los compuestos antes mencionados, los extractos de quintral también presentan una importante cantidad de flavonoides. El contenido total de fenoles predomina en los quintrales de huayún y maqui en comparación al quintral de álamo (80). Los compuestos más abundantes reportados para la hoja del quintral de álamo, son los flavonoides como la quercetina y naringenina, junto con otros derivados glicosilados de estos compuestos (66). La quercetina es un flavonoide que se encuentra en variadas plantas comestibles y medicinales y ha sido motivo de múltiples estudios. Se le han atribuido actividades farmacológicas a este fitoquímico y a sus análogos, incluidas las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antialérgicas, así como actividades quimiopreventivas, antígenotóxicas y antitumorales. Existen diferentes estudios que demuestran los efectos citotóxicos y proapoptóticos de

la quercetina sobre diferentes líneas celulares tumorales, (AGS, PC-3, MCF-7 ETC.) (88,89).

En la flor del quintral de álamo, el compuesto más abundante corresponde a delfinidina-3-O-glucósido (66). En un estudio realizado en células de cáncer colorrectal, la delfinidina-3-O-glucósido y sus metabolitos, delfinidina y ácido gálico, inhibieron la viabilidad celular y presentaron valores de $IC_{50} = 242, 396$ y $>600 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (90,91). Valores muy por encima de los obtenidos en esta tesis para cualquiera de los extractos con actividad.

Otro flavonoide identificado en el quintral de álamo es la naringenina, un estudio indicó que la naringenina aislada de *Citrus aurantium*, disminuyó el porcentaje de células viables e indujo la apoptosis en la línea celular AGS (IC_{50} de $99 \mu\text{g/mL}$ y MCF-7 (IC_{50} $65,34 \mu\text{g/mL}$) (68,92).

Es de destacar, que en nuestros resultados los efectos sobre la reducción de la viabilidad celular, fueron obtenidos a concentraciones menores que las descritas para los compuestos por sí solos.

Tomando en consideración que la composición fitoquímica presente en los extractos de quintral de maqui y huayún es superior, en cuanto al rendimiento, actividad y contenido de compuestos a los de los extractos de quintral de álamo (80). Es posible sugerir que la mayor proporción de estas moléculas en los extractos de quintrales de maqui y huayún se asocia al mayor efecto observado sobre la viabilidad celular. La influencia del huésped en el traspaso de solutos al parásito, podría estar asociada a la abundante presencia de estos compuestos. El maqui (*Aristotelia chilensis*) posee un importante contenido de procianidinas y antocianinas, como por ejemplo, la delfinidina (93). Tomando en consideración que la delfinidina resultó ser el metabolito más abundante en el álamo, es posible asociar esta característica con los efectos más significativos.

VI.IV Metabolitos del quintral y la maquinaria apoptótica

Varios de los compuestos identificados en el quintral, cuentan con extensos estudios que exhiben sus efectos antitumorales (68). Las capacidades de estas moléculas de activar

la muerte celular a través de las dos vías que regulan e inducen la apoptosis, en especial, la vía intrínseca asociada a la mitocondria, han sido observadas en una gran cantidad de líneas tumorales.

Es de destacar, que en nuestros resultados, se observó la disminución significativa de la cantidad de células con el potencial de membrana intacto, en las 3 líneas tumorales. Si bien, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células con caspasas activadas, es necesario aumentar el número de replicas biológicas a un mínimo de $n=3$ para poder realizar el análisis estadístico de este ensayo.

Tomando en consideración la importante cantidad de fenoles y flavonoides presentes en los extractos de quintral, es posible asumir que tanto el efecto citotóxico, como el ejercido sobre el potencial de membrana mitocondrial, podrían estar ligados a la presencia de estos metabolitos. Particularmente, la quercetina, se ha identificado como un potente flavonoide bioactivo, con importantes efectos antioxidantes y utilidad en la prevención del cáncer (94). En algunos extractos de muérdagos de la familia Loranthaceae a la que pertenece el quintral, se ha sugerido que el compuesto fenólico identificado como quercetina y sus derivados, son los componentes más activos y con más efectos en algunos tipos de células tumorales (95).

El efecto apoptótico de la quercetina sobre el cáncer gástrico fue descrito a través del análisis de la familia de proteínas Bcl-2, BAX y caspasas (95). La permeabilización de la membrana mitocondrial interna esta directamente regulada por la familia de proteínas BCL-2. En las células madres de cáncer gástrico (GCSCs) la quercetina inhibió la viabilidad celular dependiente de vía mitocondrial de la apoptosis, mediante el bloqueo de la señalización de la vía de la PI3K-Akt (una de las vías asociada a la proliferación celular y que se encuentra alterada en muchos tumores) (96,97). Las células presentaron una reducción significativa del potencial de membrana mitocondrial y activación de las caspasas CASP3 y CASP9 (96). En la línea AGS, la quercetina induce la apoptosis junto a la activación de la CASP3 y CASP9 (98).

En las células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), los tratamientos con quercetina inhiben la proliferación celular a través de múltiples mecanismos algunos

como la inducción de apoptosis mitocondrial y la activación de caspasas, coinciden con los observados en esta tesis (99–101).

En cáncer de próstata, el tratamiento con la quercetina disminuyó el desarrollo tumoral, la inhibición de Ki67 y aumentó en la expresión de la CASP7, también inhibió la expresión de los factores de crecimiento VEGF y EGF (102,103).

Sumado a lo anteriormente descrito, otros fenoles y flavonoides como la naringenina, luteolina, delphinidina, epigallocatequina y galotanino, también se han descritos sus efectos promotores de la apoptosis por la vía intrínseca (68,86,87,104,105). En un estudio en que se evaluó la actividad de la naringenina sobre células de cáncer de piel, la naringenina inhibió la proliferación de las células A431 a la concentración de 204,15 µg/mL. Indujo la fragmentación nuclear, detuvo el ciclo en las fases G1 y G2, consideradas como importantes puntos de control dentro del ciclo celular, y en consecuencia indujo la apoptosis desencadenando MOMP y aumento de la CASP3 (106). Las antocianinas como la delphinidina, han reducido la expresión de la PI3K en las células de pulmón (NCIH441 y SK-MES-1), al inhibir la subunidad reguladora P85 y la subunidad catalítica P110. Redujo la fosforilación de AKT, ERK1/2, JNK1/2 y p38. También redujo la expresión de la ciclina D1, PCNA, Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 y aumentó la expresión de BAK Y BAX (107).

Los resultados de esta investigación son la primera aproximación de los posibles efectos antitumorales de esta especie que ha sido ampliamente utilizada a través de los años en medicina alternativa. Hemos observado el potente efecto ejercido en las tres líneas tumorales. Es de esperar que se siga estudiando sus capacidades en próximas investigaciones.

VII. CONCLUSIONES

En resumen, los resultados de esta investigación permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Los extractos de acetato de etilo de la flor del quintral de huayún y maqui, presentan actividad antiproliferativa. Inhibieron el crecimiento de las células AGS, MCF-7 y PC-3 y mostraron citotóxicidad al inducir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial.
- Los resultados más potentes fueron observados en la línea de adenocarcinoma gástrico (AGS).
- El extracto de flor de huayún, inhibió la proliferación en un 90%.
- Los extractos no presentaron actividad contra la línea no tumoral (HEK-293).

Por lo tanto, sugerimos que el *Tristerix corymbosus* tiene un potencial para desarrollarse como un agente anticancerígeno. Será necesario realizar más estudios para comprender de mejor forma la eficacia y las implicaciones de los extractos de *Tristerix corymbosus* en cáncer.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
2. Miller E, Miller J. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer.* 1981;47(10):2327–45.
3. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
4. Weinberg† DH and RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100:57–70.
5. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(5):1016–36.
6. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. TGF- β signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res.* 2008;6(10):1521–33.
7. B. Vogelstein, N. Papadopoulos, E. Velculescu, S. Zhou, L. Diaz Jr. and K, Kinzler. Cancer Genome Landscapes. *Science (80-).* 2013;233(4770):1246.
8. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(11):788–99.
9. Csermely P, Korcsmáros T, Nussinov R. Intracellular and intercellular signaling networks in cancer initiation, development and precision anti-cancer therapy: RAS acts as contextual signaling hub. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;58:55–9.
10. Ratner N, Miller SJ. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: The neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(5):290–301.
11. Myoung H, Han N, Jung L, Jun S and YAY. Inhibition of PI3 kinase/Akt pathway is required for BMP2-induced EMT and invasion. *Oncol Rep.* 2011;25:223–30.
12. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(5):297–306.
13. Indovina P, Marcelli E, Casini N, Rizzo V, Giordano A. Emerging roles of RB family:

- New defense mechanisms against tumor progression. *J Cell Physiol.* 2013;228(3):525–35.
14. Stracquadanio G, Wang X, Wallace M, Grawenda A, Zhang P, Hewitt J, et al. The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(4):251–65.
 15. Günes C, Rudolph K. The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell.* 2013 Jan 31;152(3):390–3.
 16. Kruiswijk F, Labuschagne C, Vousden K. P53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(7):393–405.
 17. Koff J, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):2942–55.
 18. Kim M, Zhang Y, Lozano G. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front Oncol.* 2015 Nov 11;5:249.
 19. Ribatti D. Vascular morphogenesis: Methods and protocols. *Vasc Morphog Methods Protoc.* 2014;1214:1–272.
 20. Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B. HIFs, angiogenesis, and cancer. *J Cell Biochem.* 2013;114(5):967–74.
 21. Kieran M, Kalluri R, Cho Y-J. The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 1;2(12):a006593.
 22. Mendonsa A, Na T, Gumbiner B. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene.* 2018;37(35):4769–80.
 23. Thiery J, Acloque H, Huang R, Nieto M. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009;139(5):871–90.
 24. Radisky E, Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Radisky D. Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. *J Cell Biochem.* 2017;118(11):3531–48.
 25. Pavlova N, Thompson C. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016 Jan 12;23(1):27–47.
 26. Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2013;1835(2):164–9.
 27. Cotter T. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field therapy. *Nat Rev*

- Cancer. 2009;9(july):501-7.
28. Adams J, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
 29. Tang D, Kang R, Berghe T Vanden, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 2019;29(5):347-64.
 30. Labi V, Erlacher M. How cell death shapes cancer. *Cell Death Dis*. 2015 Mar 5;6(3):e1675-e1675.
 31. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Vol. 25, *Cell Death and Differentiation*. 2018. p. 486-541.
 32. Green D, Oguin T, Martinez J. The clearance of dying cells: Table for two. *Cell Death Differ*. 2016;23(6):915-26.
 33. Ma S, Nguyen T, Tan I, Ninnis R, Iyer S, Stroud DA, et al. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ*. 2014;21(12):1925-35.
 34. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, Wang C, et al. Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*. 2011;145(1):104-16.
 35. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk J, Bonzon C, Sullivan B, Green D, et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell*. 2005;17(4):525-35.
 36. Li M, Tan I, Ma S, Hockings C, Kratina T, Dengler M, et al. BAK $\alpha 6$ permits activation by BH3-only proteins and homooligomerization via the canonical hydrophobic groove. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(29):7629-34.
 37. Ren D, Tu H, Kim H, Wang G, Bean G, Takeuchi O, et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science* (80-). 2010;330(6009):1390-3.
 38. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondrial regulation of cell death: A phylogenetically conserved control. *Microb Cell*. 2016;3(3):101-8.
 39. Follis A, Llambi F, Merritt P, Chipuk J, Green D, Kriwacki R. Pin1-Induced Proline Isomerization in Cytosolic p53 Mediates BAX Activation and Apoptosis. *Mol Cell*.

- 2015;59(4):677–84.
40. Chen H, Kanai M, Inoue-Yamauchi A, Tu H, Huang Y, Ren D, et al. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nat Cell Biol.* 2015;17(10):1270–81.
 41. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015;22(4):526–39.
 42. Torre L, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar 1;65(2):87–108.
 43. Aleksandrova K, Pischon T, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Fedirko V, Norat T, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Med.* 2014 Dec 10;12(1):168.
 44. Garcia D, Thomson C. Physical activity and cancer survivorship. *Nutr Clin Pract.* 2014;29(6):768–79.
 45. Priya S, Satheeshkumar P. 5 - Natural products from plants: recent developments in phytochemicals, phytopharmaceuticals, and plant-based nutraceuticals as anticancer agents. *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals.* Elsevier Inc.; 2020. 145–163 p.
 46. Kumar D, Haldar S, Gorain M, Kumar S, Mulani FA, Yadav AS, et al. Epoxyzadiradione suppresses breast tumor growth through mitochondrial depolarization and caspase-dependent apoptosis by targeting PI3K/Akt pathway. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1–17.
 47. Madak Erdogan Z. Impact of Diet and Nutrition on Cancer Hallmarks. *J Cancer Prev Curr Res.* 2017;7(4).
 48. Beuth J. Evidence-based complementary medicine in breast cancer therapy. *Breast Care.* 2009;4(1):8–12.
 49. Gerber B, Scholz C, Reimer T, Briese V, Janni W. Complementary and alternative therapeutic approaches in patients with early breast cancer: A systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;95(3):199–209.
 50. Kim C, Kim S, Sun B, Yi J. A review of the taxonomic and ecological characteristics of Korean mistletoe types (*Viscum*, *Korthalsella*, *Loranthus* and *Taxillus*). *Korean J Plant Taxon.* 2013;43(2):81–9.
 51. Amico G, Russell R, Nickrent D. Phylogenetical Relationships and Ecological Speciation Influence of *Tristerix* (*L Oranthaceae*): the influence of pollinators,

- dispersers, and hosts. *Am J Bot.* 2007;94(4):558–67.
52. Watson D. Mistletoe—a keystone resource in forests and woodlands worldwide. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2001;32(1):115–36.
 53. Westwood J, Yoder J, Timko M, dePamphilis C. The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci.* 2010;15(4):227–35.
 54. Watson D. Determinants of parasitic plant distribution: The role of host quality. *Botany.* 2009;87(1):16–21.
 55. Watson D. On tropical mistletoes: tractable models for evolutionary ecology, ecosystem function, and phytochemistry. *Botany.* 2017;95(3):211–7.
 56. Marvibaigi M, Supriyanto E, Amini N, Abdul Majid FA, Jaganathan SK. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:785479.
 57. Bar-Sela G. White-Berry Mistletoe (*Viscum album* L.) as complementary treatment in cancer: Does it help? *Eur J Integr Med.* 2011 Jun;3(2):e55–62.
 58. Pryme I, Bardocz S, Pusztai A, Ewen S. Suppression of growth of tumour cell lines in vitro and tumours in vivo by mistletoe lectins. *Histol Histopathol.* 2006;21(1–3):285–99.
 59. Marvibaigi M, Supriyanto E, Amini N, Abdul Majid FA, Jaganathan SK. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
 60. Zhao Y, Wang X, Sun L, Fan R, Bi K, Yu Z. Cytotoxic constituents of *Viscum coloratum*. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci.* 2012;67 C(3–4):129–34.
 61. Ukpanukpong R, Adekunle I, Uyabeme R, Adeleke C. Biochemical Studies on *Loranthus bengwensis* Ethanolic Leaf Extract in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. 2017;13(1):1–12.
 62. Park K, Choi S. The effect of mistletoe, *Viscum album coloratum*, extract on innate immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2012;32(6):1016–21.
 63. Burdick C. The remedies of the machi : visualizing Chilean medicinal botanicals in Alonso de Ovalle’s *Tabula geographica* (1646). *Colon Latin Am Rev.* 2017 Jul 3;26(3):313–34.
 64. Houghton P. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas.* 2003;2(3):36–41.

65. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. J, Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía., Universidad de Concepción. Facultad de Ingeniería Agrícola., Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Veterinarias. Agro-ciencia. Vol. 26, Agro-Ciencia. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de Concepción; 2010. 109–119 p.
66. Simirgiotis M, Quispe C, Areche C, Sepúlveda B. Phenolic compounds in Chilean mistletoe (*quinral*, *Tristerix tetrandus*) analyzed by UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS and its antioxidant properties. *Molecules*. 2016;21(3).
67. Gobierno de CHILE, PROTEGE Red de protección social. MHT Medicamentos Herbarios Tradicionales. 2014.
68. Twilley D, Lall N. The Role of Natural Products From Plants in the Development of Anticancer Agents. *Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach*. Elsevier; 2018. 139–178 p.
69. Delgado L, Fernandes I, González-Manzano S, De Freitas V, Mateus N, Santos-Buelga C. Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites. *Food Funct*. 2014;5(4):797–803.
70. 2 0 1 4-2 0 2 3 Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional.
71. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112–6.
72. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(13):1107–12.
73. Ferlini C, Scambia G. Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange. *Nat Protoc*. 2007;2(12):3111–4.
74. Yang T, Witham T, Villa L, Erff M, Attanucci J, Watkins S, et al. Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase: Implications for the use of dendritic cells for therapy of gliomas. *Cancer Res*. 2002;62(9):2583–91.
75. Lim E, Hong D, Park J, Joung Y, Darvin P, Kim S, et al. Methylsulfonylmethane Suppresses Breast Cancer Growth by Down-Regulating STAT3 and STAT5b Pathways. 2012;7(4).
76. Choi H, Cho S, Pak H, Kim Y, Choi J, Lee Y, et al. NPCARE: Database of natural products and fractional extracts for cancer regulation. *J Cheminform*.

- 2017;9(1):1–9.
77. Houghton P, Manby J. Medicinal plants of the Mapuche. *J Ethnopharmacol.* 1985;13(1):89–103.
 78. Kumar N, Biswas S, Hosur Shrungheswara A, Basu Mallik S, Hipolith Viji M, Elizabeth Mathew J, et al. Pinocembrin enriched fraction of *Elytranthe parasitica* (L.) Danser induces apoptosis in HCT 116 colorectal cancer cells. *J Infect Chemother.* 2017;23(6):354–9.
 79. Marte L, María E, Alejandra F, Lorena M, Gil A, Cristina L. The Mexican mistletoe *Struthanthus venetus* (HBK Blume) inhibits proliferation and synergizes antagonistic actions of Tamoxifen and Fulvestrant in breast cancer MCF-7 cells. *J Pharmacogn Phyther.* 2018;10(8):133–41.
 80. Torres P, Saldaña C, Ortega R, González C. Determination of reducing power and phytochemical profile of the chilean mistletoe “quintral” (*Tristerix corymbosus* (L) Kuijt) hosted in “maqui” (*Aristotelia chilensis*), “huayún” (*Rhaphitamnus spinosus*) And “poplar” (*Populus nigra*). 2019;4:1–6.
 81. Yildirim I, Kutlu T. Anticancer agents: Saponin and tannin. *Int J Biol Chem.* 2015;9(6):332–40.
 82. Mogoşanu, G. D., Grumezescu, A. M., Bejenaru, C., & Bejenaru LE. Natural products used for food preservation. Vol. 6, *Food Preservation.* 2017. 365–41 p.
 83. Haridas V, Higuchi M, Jayatilake GS, Bailey D, Mujoo K, Blake ME, et al. Avicin Apoptosis. 2001;1–6.
 84. Wang J, Zhao X, Qi Q, Tao L, Zhao Q, Mu R, et al. Macranthoside B, a hederagenin saponin extracted from *Lonicera macranthoides* and its anti-tumor activities in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(7):1716–21.
 85. Tin M, Cho C, Chan K, James A, Ko J. Astragalus saponins induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft. *Carcinogenesis.* 2007 Jan 18;28(6):1347–55.
 86. Al-Halabi R, Chedid M, Merhi R, El-Hajj H, Zahr H, Schneider-Stock R, et al. Gallotannin inhibits NFκB signaling and growth of human colon cancer xenografts. *Cancer Biol Ther.* 2011;12(1):59–68.
 87. González-Sarrías A, Yuan T, Seeram N. Cytotoxicity and structure activity relationship studies of maplexins A-I, gallotannins from red maple (*Acer rubrum*). *Food Chem Toxicol.* 2012;50(5):1369–76.

88. Wang K, Liu R, Li J, Mao J, Lei Y, Wu J, et al. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: Involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 α -mediated signaling. *Autophagy*. 2011;7(9):966–78.
89. Mendes V, Costa V, Mateus N. Involvement of the modulation of cancer cell redox status in the anti-tumoral effect of phenolic compounds. *RSC Adv*. 2015;5(1):1–9.
90. Mazewski C, Kim M, Gonzalez de Mejia E. Anthocyanins, delphinidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-glucoside, inhibit immune checkpoints in human colorectal cancer cells in vitro and in silico. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–15.
91. Grimes K, Stuart C, McCarthy J, Kaur B, Cantu E, Forester S. Enhancing the Cancer Cell Growth Inhibitory Effects of Table Grape Anthocyanins. *J Food Sci*. 2018;83(9):2369–74.
92. Lee D, Park K, Park H, Kang S, Nagappan A, Kim J, et al. Flavonoids isolated from Korea Citrus aurantium L. induce G2/M phase arrest and apoptosis in human gastric cancer AGS cells. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012;2012.
93. Masoodi H, Villaño D, Zafrilla P. A comprehensive review on fruit: *Aristotelia chilensis* (Maqui) for modern health: Towards a better understanding. *Food Funct*. 2019;10(6):3057–67.
94. Rauf A, Imran M, Khan I, ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phyther Res*. 2018;32(11):2109–30.
95. Muhammad K, Jamil S, Basar N. Phytochemical study and biological activities of *scurrula parasitica* L (Loranthaceae) leaves. *Marmara Pharm J*. 2019;23(3):522–31.
96. Shen X, Si Y, Wang Z, Wang J, Guo Y, Zhang X. Quercetin inhibits the growth of human gastric cancer stem cells by inducing mitochondrial-dependent apoptosis through the inhibition of PI3K/Akt signaling. *Int J Mol Med*. 2016;38(2):619–26.
97. Lee H, Lee S, Shin Y, Cho M, Kang H, Cho H. Anti-cancer effect of quercetin in xenograft models with EBV-associated human gastric carcinoma. *Molecules*. 2016;21(10):1–10.
98. Shang H, Lu H, Lee C, Chiang H, Chu Y, Chen A, et al. Quercetin induced cell apoptosis and altered gene expression in AGS human gastric cancer cells. *Environ Toxicol*. 2018;33(11):1168–81.

99. Nguyen L, Lee Y, Sharma A, Park J, Jagga S, Sharma G, et al. Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2017;21(2):205–13.
100. Balakrishnan S, Mukherjee S, Das S, Bhat F, Raja Singh P, Patra CR, et al. Gold nanoparticles-conjugated quercetin induces apoptosis via inhibition of EGFR/PI3K/Akt-mediated pathway in breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). *Cell Biochem Funct*. 2017;35(4):217–31.
101. Sarkar A, Ghosh S, Chowdhury S, Pandey B, Sil PC. Targeted delivery of quercetin loaded mesoporous silica nanoparticles to the breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2016;1860(10):2065–75.
102. Wang P, Henning S, Magyar C, Elshimali Y, Heber D, Vadgama J. Green tea and quercetin sensitize PC-3 xenograft prostate tumors to docetaxel chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35(1):1–11.
103. Sharma V, Kumar L, Mohanty S, Maikhuri J, Rajender S, Gupta G. Sensitization of androgen refractory prostate cancer cells to anti-androgens through re-expression of epigenetically repressed androgen receptor - Synergistic action of quercetin and curcumin. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;431:12–23.
104. Deng L, Jiang L, Lin X, Tseng K, Lu Z, Wang X. Luteolin, a novel p90 ribosomal S6 kinase inhibitor, suppresses proliferation and migration in leukemia cells. *Oncol Lett*. 2017 Jan 11;
105. Chang H, Chang Y, Lai S, Chen K, Wang K, Chiu T, et al. Naringenin inhibits migration of lung cancer cells via the inhibition of matrix metalloproteinases-2 and -9. *Exp Ther Med*. 2017 Feb;13(2):739–44.
106. Ahamad M, Siddiqui S, Jafri A, Ahmad S, Afzal M, Arshad M. Induction of apoptosis and antiproliferative activity of naringenin in human epidermoid carcinoma cell through ROS generation and cell cycle arrest. *PLoS One*. 2014;9(10).
107. Pal H, Sharma S, Strickland L, Agarwal J, Athar M, Elmets C, et al. Delphinidin Reduces Cell Proliferation and Induces Apoptosis of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Targeting EGFR/VEGFR2 Signaling Pathways. *PLoS One*. 2013;8(10):1–13.