

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

**“Efectos antioxidantes y antitumorales de los extractos secuenciales de  
*Escallonia illinita* sobre líneas celulares de cáncer de mama y cáncer  
cérvico uterino”**

Tesis para optar a Licenciatura en Obstetricia y Puericultura

Tutor:

Iván Montenegro Venegas

Co-tutor:

Juan Villena García

Carlos Jara Gutiérrez

Autores:

Araceli Castillo Alarcón, Josefa Jaramillo Céspedes,

Camila Moraga Segura, Paula Nardi Vargas,

Gisselle Olivares Bustos

**Valparaíso, Julio 2017**

## AGRADECIMIENTOS

Finalizada la gran tarea que implicó nuestra tesis, queremos agradecer a la Carrera de Obstetricia y Puericultura de la Universidad de Valparaíso por entregarnos el espacio para incidir en nuestra área y poder ampliar cada vez más nuestros horizontes, no solo en el ámbito clínico sino también en lo que acontece a la investigación que día a día enriquece más la práctica.

Expresamos nuestra gratitud hacia los docentes que nos guiaron y motivaron a embarcarnos en este gran desafío de investigación: a nuestro tutor Dr. Bq Iván Montenegro Venegas por incentivar las ganas de conocer nuevas áreas más allá del quehacer de la matronería, por su gran compromiso y dedicación al proyecto, su desmedida paciencia y el gran cariño que deslumbra en su labor como docente que sin duda ha dejado una huella en nuestra historia universitaria. Al cotutor Dr. Joan Villena García, quien nos enseñó a desenvolvemos dentro del laboratorio, donde entre probetas y solventes logramos crear nuestras propias herramientas de investigación. Agradecemos también al Técnico en control de Medio Ambiente Diego Taha Cortez por su colaboración en la ardua búsqueda y obtención de nuestros extractos. Y por último al Dr. Carlos Jara Gutiérrez que con clases magistrales de polifenoles y antioxidantes nos ayudó a comprender cada vez más el trasfondo de esta investigación.

No podemos dejar de lado a nuestros seres queridos que día a día nos dan los ánimos a ir por más, por ser esa energía constante de apoyo gracias a la cual seguimos avanzando incluso cuando el camino se hace más empinado.

Finalmente, y no menos importante, agradecer a las circunstancias que nos reunieron como grupo, donde compartimos un sinnúmero de experiencias que nos hizo afiatar los lazos día a día. Gracias a nosotras mismas por apoyarnos mutuamente en esta hazaña que no solo quedará en papel, sino también en el corazón de cada una.

“Si no puedes volar entonces corre, si no puedes correr entonces camina, si no puedes caminar entonces arrástrate, pero sea lo que hagas, sigue moviéndote hacia adelante”.

Martin Luther King JR.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

I. ABREVIACIONES .....	10
II. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS .....	12
III. RESUMEN.....	15
IV. ABSTRACT.....	16
V. INTRODUCCIÓN .....	17
VI. MARCO TEÓRICO .....	20
1. Estrés oxidativo .....	20
2. Radicales libres .....	20
2.1 Radicales libres inorgánicos o primarios: .....	21
2.2 Radicales libres orgánicos o secundarios: .....	21
2.3 Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.....	21
3. Daño inducido por radicales libres .....	22
4. Radicales libres y cáncer .....	23
5. Cáncer.....	23
5.1 Cáncer de mama .....	26
5.1.1 Cáncer Ductal in situ (CDIS): .....	27
5.1.2 Cáncer Lobulillar in situ (CLIS): .....	27
5.1.3 Cáncer Estadio I: .....	28
5.1.4 Cáncer Estadio II: .....	28
5.1.5 Cáncer Estadio III: .....	28
5.1.6 Cáncer Estadio IV:.....	29
5.2 Cáncer Cérvico Uterino .....	30
5.2.1 Carcinoma de células escamosas: .....	31

5.2.2 Adenocarcinomas in Situ (AIS): .....	32
5.2.3 Carcinoma adenoescamoso: .....	32
5.2.4 Carcinoma Preinvasivo o Estadio 0:.....	32
5.2.5 Carcinoma invasivo: .....	32
<b>6. Tratamientos contra el cáncer .....</b>	<b>33</b>
6.1 Cirugía .....	33
6.2 Radioterapia: .....	33
6.3 Inmunoterapia:.....	33
6.6 Terapia dirigida: .....	34
6.7 Terapia hormonal .....	34
6.8 Trasplante de células madre: .....	34
6.9 Quimioterapia:.....	34
<b>7. Antioxidantes .....</b>	<b>35</b>
7.1 Antioxidantes endógenos:.....	36
7.2 Antioxidantes exógenos: .....	36
<b>8. Plantas medicinales .....</b>	<b>37</b>
8.1 Maqui .....	38
8.2 <i>Escallonia illinita</i> .....	39
8.2.1 Actividad biológica de <i>Escallonia illinita</i> .....	39
<b>VII. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. HIPÓTESIS .....</b>	<b>43</b>
<b>IX. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
1. Objetivo General:.....	44
2. Objetivos Específicos:.....	44
<b>X. MATERIALES Y MÉTODO .....</b>	<b>45</b>
1. Material biológico .....	45
1.1 Vegetal.....	45
1.1.1 Clasificación taxonómica .....	45

1.2 Celular .....	45
1.2.1 Líneas celulares de colon .....	45
1.2.2 Líneas celulares de cáncer cérvico uterino .....	46
1.2.3 Líneas celulares de cáncer de mama .....	47
1.3 Reactivos y Equipos .....	47
1.3.1 Solventes y reactivos: .....	47
1.3.2 Equipos.....	48
1.3.3 Otros.....	49
1.4 Métodos.....	49
1.4.1 Estudios químicos: .....	49
2. Pruebas de actividad antioxidante .....	51
2.1 Material biológico: .....	51
2.2 Reactivos y Equipos.....	52
2.2.1 Solventes y reactivos: .....	52
2.2.2 Equipos: .....	52
2.3 Método.....	53
2.3.1 Prueba TRAP, método Romay et al, 1996.....	53
2.3.2 Prueba FRAP, método Dudonné et al, 2009 .....	53
2.3.3 Prueba DPPH, método Brand- William et al, 1995.....	54
2.3.4 Fitoconstituyentes .....	54
2.3.5 Prueba Antraquinonas totales, método Mellado et al, 2012 .....	55
XI. Resultados .....	56
1. Efectos antioxidantes de los extractos Acetato de etilo, Acetato de etilo San Felipe, Hexano, Diclorometano y Etanol de <i>Escallonia illinita</i> .....	56
1.1 Capacidad antioxidante.....	56
1.2 Prueba Potencial Antioxidante Reactivo Total.....	56
1.3 Prueba Capacidad antioxidante para Reducir el ion Férrico .....	57
1.4 Prueba Actividad antioxidante método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.....	58
1.5 Fitoconstituyentes .....	59
1.6 Prueba Polifenoles.....	59
1.7 Prueba Flavonoides .....	60
1.8 Prueba Antraquinonas .....	61

2. Efectos sobre la viabilidad celular de los extractos secuenciales (n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol) de <i>Escallonia illinita</i> sobre líneas celulares. ....	62
2.1 Viabilidad de células CON v/s control en líneas celulares .....	62
2.2 Viabilidad de células MCF-7 v/s control en líneas celulares .....	63
2.3 Viabilidad de células HeLa v/s control en líneas celulares .....	63
XII. Discusión .....	65
XIII. Conclusiones.....	69
XIV. Bibliografía.....	70
XV. Anexos.....	75
Anexo 1: .....	75
Anexo 2: .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1 Esquema representativo de carcinoma ductal in situ. American Cancer Society.....	27
2. Figura 2 Esquema representativo de carcinoma lobulillar in situ. American Cancer Society.....	27
3. Figura 3 Representación de los distintos estadios de CaCu.....	32
4. Figura 4 Representación del proceso de Oxido- Reducción.....	36
5. Figura 5 Fotografía de <i>Escallonia illinita</i> florecida, ciudad de San Francisco, comuna de San Esteban, Los Andes, Chile. Enero, 2017. ....	39
6. Figura 6 Estructura química de Pinocembrina. ....	40
7. Figura 7 Estructura química Umbeliferona. ....	40
8. Figura 8 Estructura química de Beta-sitosterol.....	41
9. Figura 9 Fotografía de <i>Escallonia illinita</i> , ciudad de San Francisco, comuna de San Esteban, Los Andes, Chile. Enero, 2017. ....	45

10. Figura 10 magen microscópica de línea celular CON. ....	45
11. Figura 11 Imagen microscópica de línea celular HeLa. ....	46
12. Figura 12 Imagen microscópica de línea celular MCF-7 .....	47
13. Figura 13. Fotografía de hojas y tallos secos de Escallonia illinita. Laboratorio Universidad Técnica Federico Santa María, sede Valparaíso..	50
14. Figura 14 Pruebas de Capacidad antioxidante para educir ion Férrico en Laboratorio de Investigación-Estrés Oxidativo de Universidad de Valparaíso .....	57

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

1. Gráfico 1 Tasa de mortalidad por tumores malignos de mama según grupos de edad, ambos sexos, Chile 2000-2010. Minsal.....	26
2. Gráfico 2 Evolución de la mortalidad por ciertos tumores malignos en mujeres, Chile 2000- 2010. Minsal.....	29
3. Gráfico 3 Capacidad antioxidante en equivalentes al Trolox promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde Escallonia illinita.....	57
4. Gráfico 4 Capacidad antioxidante equivalentes al trolox promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde Escallonia illinita, en comparación al ácido gálico. ....	58
5. Gráfico 5 Actividad antioxidante método del radical libre 2,2-difenil-1- picrilhidracilo promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde Escallonia illinita, en comparación al ácido gálico.....	59
6. Gráfico 6 Polifenoles totales promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde Escallonia illinita, en equivalencia al ácido gálico. ....	60
7. Gráfico 7 Flavonoides promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde Escallonia illinita, en equivalencia a la Quercetina. ....	60
8. Gráfico 8 Antraquinonas promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde Escallonia illinita, en equivalencia al Extracto etanólico (EE). ....	61

9. **Gráfico 9 Efectos de los extractos secuenciales obtenidos desde Escallonia illinita, sobre la viabilidad celular en las líneas celulares CON. En las células tratadas con cinco diferentes concentraciones (10=50, 5=25, 2.5=12.5, 1.25=6.25, 0.5=3.125 µg/mL) de los extractos se cuantificó la viabilidad celular en relación con el control (DMSO 0.1% final). ..... 62**
10. **Gráfico 10 Efectos de los extractos secuenciales obtenidos desde Escallonia illinita sobre la viabilidad celular en las líneas celulares MCF-7. En las células tratadas con cinco diferentes concentraciones (10, 5, 2.5, 1.25, 0.5 µg/mL) de los extractos se cuantificó la viabilidad celular en relación con el control (DMSO 1%). ..... 63**
11. **Gráfico 11 Efectos de los extractos secuenciales obtenidos desde Escallonia illinita sobre la viabilidad celular en las líneas celulares HeLa. En las células tratadas con cinco diferentes concentraciones (10, 5, 2.5, 1.25, 0.5 µg/mL) de los extractos se cuantificó la viabilidad celular en relación con el control (DMSO 1%). ..... 64**

## **ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1. IC<sub>50</sub> de los extractos secuenciales de Escallonia illinita. .... 75**

**Tabla 2. Datos estadísticos de citotoxicidad de los extractos sobre las líneas celulares Hela, CON y MCF-7 ..... 76**

## I. ABREVIACIONES

1. ABAP: 2,2'-azobis(2-amidinopropano).
2. ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico.
3. ACOE SF: Acetato de etilo San Felipe.
4. ACOE: Acetato de etilo.
5. ADN: Ácido desoxirribonucleico.
6. AIS: Adenocarcinoma in situ.
7. ALCL3 2%: Cloruro de aluminio al 2%.
8. ARN: Ácido ribonucleico.
9. CaCu: Cáncer cervicouterino.
10. CaMa: Cáncer de mama.
11. CDIS: Cáncer ductual in situ.
12. CLIS: Cáncer lobulillar in situ.
13. DCM: Diclorometano.
14. DMSO: Dimetilsulfóxido.
15. DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.
16. DST: Desviación estándar.
17. EE: Extracto etanólico.
18. ERBr: Especies reactivas de Bromo.
19. ERCl: Especies reactivas de Cloro.
20. ERN: Especies reactivas de Nitrógeno.
21. ERO: Especies reactivas de oxígeno.
22. ET: Etanol.
23. FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power (capacidad antioxidante para reducir el hierro férrico).
24. GES: Garantías explícitas en salud.
25. GSH: Glutación reducido.
26. HeLa: Primera línea celular humana maligna, cultivada de forma continua, proveniente del carcinoma cervical Henrietta Lacks.
27. HEX: hexano.
28. IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50.

29. MCF-7: línea celular de estrógeno sensible procedente de un paciente con adenocarcinoma metastásico de mama humano (de la Michigan Cancer Foundation).
30. NIE: Neoplasia intraepitelial.
31. OMS: Organización mundial de la salud.
32. PAP: Papanicolau.
33. REDOX: Reacción de óxido reducción.
34. RL: Radicales libres.
35. TRAP: Potencial total antioxidante de atrapamiento de radicales (Total radical trapping power).
36. Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid.
37. TPTZ: tripiridil s-triazina.
38. VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.
39. VPH: Virus papiloma humano.

## II. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

**Carcinoma:** Tumor cancerígeno que aparece en los tejidos epiteliales (que cubren o revisten) de diversos órganos del cuerpo o glándulas. Corresponde al 80% de los tumores cancerosos.

**Adenocarcinoma:** Es un tipo de carcinoma que aparece en las células glandulares que revisten algunos órganos internos como los conductos o lobulillos mamarios y de próstata.

**Cirugía:** Rama de la medicina que busca curar enfermedades mediante una operación. En el ámbito de la oncología consiste en la extirpación del tumor o tejido dañado. Puede ser paliativa (donde se extirpa el tumor para evitar mayores molestias y mejorar la calidad de vida del paciente), para la reducción de la masa tumoral o para realizar biopsias sobre el tejido afectado.

**Inmunoterapia:** Tratamiento que estimula las defensas naturales del organismo mediante sustancias de laboratorio con la finalidad de combatir el cáncer. Puede destruir células cancerígenas, retrasar su crecimiento o detenerlo.

**Quimioterapia:** Corresponde a la utilización de fármacos nocivos para las células cancerígenas. Este tipo de fármacos se encarga de detener el crecimiento de las células neoplásicas (que es más rápido que el de una célula fisiológica) y posteriormente las destruye. Posee poca especificidad y un efecto potente sobre todo el tejido celular, por tanto, puede generar daño en células sanas adyacentes.

**Radioterapia:** Tratamiento médico que consiste en la utilización y la aplicación de altas dosis de radiación, con el fin de destruir células cancerosas o reducir tumores. Esto es posible ya que la radiación tiene mayor afinidad hacia las

células que poseen mayor capacidad de multiplicación, como células cancerígenas.

**Tratamiento Antineoplásico:** Erradicación completa de las células cancerosas que se encuentran en el organismo, ya sea mediante la reducción del tumor o el número de células tumorales. Este concepto engloba varios tratamientos como quimioterapia, radioterapia o cirugía oncológica.

**Tratamiento Antioxidante:** Administración de formulaciones que contengan productos antioxidantes, de forma única o complementaria en la terapia contra el cáncer.

**Trasplante de Células Madre:** Es un procedimiento que restaura las células madre que forman la sangre, en individuos cuyas células madre fueron destruidas por dosis muy elevadas de quimioterapia o radioterapia, usadas para tratar algunos cánceres.

**Terapia Dirigida:** Uso de fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y diseminación del cáncer al interferir en moléculas específicas, que participan en el crecimiento, el avance y diseminación del cáncer.

**Terapia Hormonal:** Tratamiento que enlentece o detiene el crecimiento del cáncer asociado o dependiente de hormonas.

**Compuesto natural:** Es una molécula o metabolito obtenido de la naturaleza y que no ha sido alterado por parte del ser humano.

**Droga:** En medicina se entiende como sustancia que tiene afección biológica, mediada por un receptor, con potencial para prevenir o curar una enfermedad, mientras que en el lenguaje coloquial se utiliza para referirse a sustancias psicoactivas, a menudo ilegales.

**Fármaco:** De acuerdo con la farmacología, corresponde a cualquier sustancia con actividad biológica cuyo objetivo es curar o prevenir una enfermedad, para reducir sus efectos sobre el organismo o para aliviar un dolor físico.

**Planta medicinal:** Es un recurso vegetal cuya totalidad, parte o extracto se utilizan como droga medicinal para el tratamiento de alguna patología en particular. La parte que se utiliza de la planta medicinal se conoce como droga vegetal y puede suministrarse mediante diferentes formas galénicas: cremas, infusión, cápsulas, ungüento, entre otras.

**Extracto:** Sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol, agua y/o solventes orgánicos.

**Radical libre:** Son sustancias químicas muy reactivas que introducen oxígeno en las células, produciendo la oxidación de sus partes, alteraciones en el ADN, y que provocan cambios que aceleran el envejecimiento del cuerpo.

### III. RESUMEN

Se estudiaron los extractos de la especie *Escallonia illinita* (Barraco), arbusto que crece entre la IV y XI región de Chile y al cual se le atribuye propiedades medicinales para patologías hepáticas, renales y gripales. Para este cometido se evaluó la actividad antioxidante y antitumoral de los extractos de dicha especie biológica.

En total se utilizaron 5 extractos: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetato de etilo San Felipe y etanol. Con ellos se evaluó la viabilidad celular ( $IC_{50}$ ), en diferentes dianas celulares: Células control de colon (CON), Células de cáncer de mama (MCF-7) y Células de cáncer cérvico uterino (HeLa). Se obtuvo actividad citotóxica con los extractos de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol, siendo más significativo acetato de etilo en concentraciones de 10  $\mu$ M con  $IC_{50}$  de 23,4  $\mu$ g/mL y 11,8  $\mu$ g/mL en líneas celulares de cáncer de mama y cérvico uterino, respectivamente.

En paralelo se evaluó la actividad antioxidante mediante pruebas de TRAP, FRAP, DPPH, Fenoles totales, Flavonoides totales y Antraquinonas totales, utilizando los cinco extractos mencionados anteriormente. Los datos resultantes indican que existe una actividad antioxidante significativa, en los cuales destacó el extracto hexano, por tanto, los extractos de *Escallonia illinita* generan un aumento del Potencial Reactivo total, alta capacidad reductora de ion férrico y buenas concentraciones de fitoconstituyentes.

Si bien los resultados obtenidos son satisfactorios, es imperante la realización de estudios complementarios para poder determinar los métodos más beneficiosos para el tratamiento efectivo de cáncer de mama y cervicouterino mediante los extractos de *Escallonia illinita*.

## IV. ABSTRACT

We studied the extracts of the species *Escallonia illinita* (Barraco), a shrub that grows between the IV and XI region of Chile and to which medicinal properties for liver, kidney and influenza are attributed. For this purpose, the antioxidant and antitumor activity of the extracts of this biological species was evaluated.

In total, 5 extracts were used: *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, San Felipe ethyl acetate and ethanol. Cell viability (IC<sub>50</sub>) in different cell targets was evaluated through them: Colon control cells (CON), breast cancer cells (MCF-7) and cervical cancer cells (HeLa). Cytotoxic activity was obtained with the extracts of *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol, with ethyl acetate at concentrations of 10 µM with IC<sub>50</sub> of 23.4 µg / mL and 11.8 µg / mL being more significant in cell lines of breast and cervical cancer, respectively.

In parallel, the antioxidant activity was evaluated by TRAP, FRAP, DPPH, total phenols, total flavonoids and total anthraquinones, using the five extracts mentioned above. The resulting data indicate that there is a significant antioxidant activity, in which the hexane extract stood out, therefore, *Escallonia illinita* extracts generate an increase in total reactive potential, high ferric ion reducing capacity and good concentrations of phytoconstituents.

Although the results obtained are satisfactory, it is important to carry out complementary studies in order to determine the most beneficial methods for the effective treatment of breast and cervical cancer through the extracts of *Escallonia illinita*.

## V. INTRODUCCIÓN

Recursos naturales que han sido utilizados a lo largo de la historia por distintas culturas y generaciones en todo el mundo son las plantas medicinales, que gracias a su maravilloso y complejo metabolismo constituyen un verdadero arsenal químico, del cual sólo se conoce cerca de un tercio<sup>1</sup>.

A través del tiempo el ser humano ha ido acumulando una serie de conocimientos empíricos sobre plantas medicinales que ha tenido a su disposición, usándolas para tratar diferentes afecciones corporales. La civilización egipcia, por ejemplo, ha perpetuado estas prácticas en sus habitantes quienes adoraban a Isis, diosa de la salud, quien fue considerada “instructora de las leyes de la vida, de la salud y de los métodos de cultivo de los alimentos y especies medicinales”. Por otra parte, en textos religiosos de las culturas de la humanidad, como la Biblia, se mencionan cerca de trescientas especies de plantas medicinales. De este modo, desde tiempos ancestrales, cada región del mundo desarrolló formas únicas y características de curar enfermedades a partir de plantas medicinales; para ello se utilizaron especies endémicas propias de cada región.

Un ejemplo de esto ocurre en la cultura mapuche, donde utilizaban *Escallonia illinita* o Barraco, como es conocido popularmente, planta medicinal presente en algunas regiones geográficas de Chile. Esta subespecie del género *Escallonia* se caracteriza por poseer amplias propiedades curativas para afecciones principalmente de hígado, riñón y gripe, debido a sus propiedades antiinflamatorias, además de su alta concentración de flavonoides y antioxidantes.

Junto con la evolución de las especies, ha surgido una amplia serie de nuevas afecciones y patologías que afectan hasta nuestros días la salud. Un ejemplo de ellas es el cáncer, que en la actualidad es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, ya que sólo en el año 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes<sup>2</sup>, según la OMS se define como “un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido

circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco. Además, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana”<sup>3</sup>.

En la actualidad la radioterapia y quimioterapia son los métodos terapéuticos más utilizados como tratamiento para los diferentes tipos de cáncer<sup>4</sup>. Sin embargo, estas prácticas son responsables de varios malestares y efectos secundarios que sufren quienes son sometidos a estas herramientas terapéuticas, ya que su mecanismo de acción también afecta al tejido sano que rodea al tumor, dado que no permite diferenciar estas últimas de las células tumorales. En este contexto, la radioterapia consiste en aplicar ciertas dosis de radiación ionizante sobre el tumor, con el objetivo de eliminar las células malignas y, con ello, frenar el crecimiento y expansión del tumor. El mecanismo por el cual genera daño suele darse a través de la ionización de los átomos del ADN de las células cancerígenas, dañando directamente su material genético, y por otra parte, indirectamente, alterando las moléculas de agua, dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) incluidos los radicales libres (RL)<sup>5</sup>.

En el cuerpo humano existen diversos procesos químicos como lo es la oxidación-reducción. La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones, el cual siempre se ha asociado a otro proceso de captación llamado reducción<sup>6</sup>. La oxidación es fundamental para la vida, ya que participa en los procesos de obtención de la energía celular; en el metabolismo normal las especies reactivas de oxígeno se encuentran en equilibrio respecto a las defensas antioxidantes del organismo, sin embargo, cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidativo causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad del sistema biológico de reparar el daño producido. El daño al ADN puede ser producto de:

- 1- Radiación (ionizante, rayos X o gamma, o no ionizante; UV),
- 2- Agentes químicos (exógenos como agentes alquilantes, bleomicina; o endógenos como radicales libres o especies reactivas de oxígeno),
- 3- Errores en la replicación (errores de copia, deleciones, inserciones) o

#### 4- Errores en la actualización de enzimas ADN endógenas (recombinación).

Dichos agentes causales producen dos tipos de anomalías estructurales; el primer tipo se refiere a bases normales en un sitio incorrecto de la secuencia de lectura (errores). Mientras que el segundo tipo involucra daño o lesión del ADN implicando nucleótidos anormales (modificación, fragmentación, interacción) en el contexto de una secuencia normal.

De este modo, si el ADN se copiara con excesivas faltas el organismo desarrollaría diversas enfermedades. Por el contrario, si el ADN se copiara sin errores no habría cabida para la evolución. Por lo tanto, la maquinaria de reparación del ADN permite un término medio entre dichas posibilidades. Es así como ambas clases de anomalías estructurales pueden ser corregidas o rectificadas por una serie de reacciones enzimáticas que constituyen la reparación del ADN. El error o lesión puede eliminarse directamente (reparación directa) durante el mismo proceso de replicación, ser retirada como base libre (escisión de base) o como nucleótido (escisión de nucleótido). Si la maquinaria de reparación del ADN no actúa efectivamente, provoca este desequilibrio y la consecuente acumulación de radicales libres que se ha relacionado con diversas enfermedades, entre ellas el cáncer.

Considerando el aumento progresivo de personas que padecen esta patología es que surge la necesidad de innovar cada día en sus tratamientos, utilizando nuevas terapias en base a plantas medicinales, con el fin de reducir al mínimo los efectos secundarios que generan los tratamientos convencionales y así poder brindar mejor calidad de vida a quienes padecen esta patología.

## VI. MARCO TEÓRICO

### 1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como la exposición de la materia viva a variadas fuentes que producen la ruptura del equilibrio en las células del organismo, dado por un aumento de los radicales libres y/o una disminución de los antioxidantes. Este desajuste en las células puede gatillar con el tiempo un daño en los tejidos del organismo, desencadenando alteraciones morfofisiológicas que producen variadas patologías; gástricas, cardíacas, respiratorias, óseas e incluso multiorgánicas. Estas fallas son el resultado del desequilibrio entre la generación y eliminación de especies radiactivas que derivan de: la disminución de la defensa antioxidante celular, un aumento en la velocidad de producción de especies reactivas o en algunas ocasiones puede ser el resultado de ambas.

Las especies reactivas se dividen en dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales. Estas especies se originan del metabolismo celular y están representados en los sistemas biológicos como especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), que son los dos grupos más incidentes en la biología redox. Así también existen otras especies radiactivas provenientes de elementos como el cloro (ERCl) y Bromo (ERBr) que no son tan influyentes en los estudios redox. Las especies reactivas provienen tanto de procesos fisiológicos como patológicos del organismo<sup>7-8</sup>.

### 2. Radicales libres

Se consideran radicales libres todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que dentro de su estructura molecular presentan un electrón desapareado en su orbital externo, lo cual genera inestabilidad en el átomo. Este hecho los hace ser altamente reactivos y tener una vida media corta. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas conservadas y permanentes, provocadas por diversos mecanismos: cadena respiratoria mitocondrial, cadena

de transporte de electrones a nivel mitocondrial y en cloroplastos, y reacciones de oxidación, por lo que genera daño oxidativo, al interactuar con las principales biomoléculas del organismo.

Las principales ERO son: Radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), Oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), Óxido nítrico ( $NO$ ), Peróxido ( $ROO$ ), Semiquinona ( $Q$ ) y Ozono ( $O_3$ ).

La clasificación que se le da a los radicales libres del oxígeno es la siguiente<sup>9</sup>:

**2.1 Radicales libres inorgánicos o primarios:** Provocados por la transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan diferentes estados en la reducción y poseen una vida media muy corta; Anión superóxido (una molécula de oxígeno que ha adquirido un electrón adicional), Hidroxilo (una molécula de oxígeno que ha adquirido tres electrones y un protón adicional) y Óxido Nítrico (que contiene un electrón desapareado).

**2.2 Radicales libres orgánicos o secundarios:** Se originan por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de molécula orgánica, o por la reacción de dos radicales primarios entre sí. Estos poseen una vida media un poco más larga que los anteriores. Los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.

**2.3 Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno:** Especies químicas que, sin ser radicales libres, son productores de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas. Encontramos en esta clasificación: Oxígeno Singlete (forma excitada del oxígeno molecular con dos electrones apareados en el orbital más alto), Peróxido de Hidrógeno (radical superóxido que adquiere dos electrones), Ácido Hipocloroso (ion no dissociado del cloro dependiente del oxígeno, altamente inestable y altamente reactivo), Peroxinitrito (de la sobreproducción de óxido nítrico y superóxido) e Hidroperóxidos orgánicos (compuestos muy reactivos).

Los radicales libres se forman tanto a nivel intra como extracelular. Las células asociadas a producción de radicales libres son: neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y células endoteliales. Las enzimas oxidantes asociadas son las xantina-oxidasa, indolamindiocigenada, triptofano-dioxigenasa, mieloperoxidasa, galactosa oxidasa, ciclooxigenada, lipoxigenasa, monoamino-oxidasa y NADPH oxidasa. Existe una gran relación entre los productos cíclicos de redox y los radicales libres, los cuales son: paraquat, diquat, alloxano, estreptozozina y doxorubicina. Las especies reactivas también pueden formarse por el consumo constante de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida. Por otro lado, el consumo de ciertas sustancias como humo del tabaco, radiaciones ionizantes, exposición excesiva a la luz solar, shock térmico y sustancias que oxidan el glutatión (GSH) son un gran aporte a la producción de los radicales libres y otras circunstancias como: dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia y reperfusión, y ejercicio extenuante<sup>10</sup>.

### 3. Daño inducido por radicales libres

El daño que generan los ERO ocurre sobre variadas macromoléculas del organismo, las cuales se describen a continuación:

En los *lípidos* se evidencia el mayor daño mediante la peroxidación lipídica, la cual afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, puesto que altera la permeabilidad de la membrana celular, generando edema y finalmente efectos citotóxicos.

Si de proteínas se trata, se produce la oxidación de grupos aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. Junto a esto, se entrecruzan las cadenas peptídicas y forman grupos carbonilos.

En cuanto al ADN, este se ve afectado por mutaciones o carcinogénesis, generando pérdida de expresión o síntesis de proteínas por el daño en genes específicos, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan los genes.

#### 4. Radicales libres y cáncer

El estrés oxidativo está estrechamente asociado a procesos tumorales, lo cual se explica producto de la oxidación del material genético. El peróxido de hidrógeno, por ejemplo, juega un papel fundamental como segundo mensajero de las transducciones de señales de activación, diferenciación y proliferación celular, que está asociada a los niveles de oxidantes y antioxidantes que posea la célula. Para que se genere apoptosis debe haber un estímulo moderado de oxidantes y en el caso de necrosis debe haber un efecto oxidante exagerado, previo proceso inflamatorio. Por tanto, el desequilibrio entre ERO y antioxidantes será un potencial de la alteración en la apoptosis celular, lo que fomentará el crecimiento tumoral de las células cancerígenas<sup>11</sup>.

#### 5. Cáncer

El cáncer es un término utilizado para referirse a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a diversas partes del organismo. Esta enfermedad consiste en un conjunto de células que poseen daño en su ADN y por lo tanto no son capaces de controlar su crecimiento, división ni apoptosis de manera normal. La división celular incontrolada da lugar a un tumor primario, conformado por células capaces de invadir otros órganos por medio de la vía hematológica o linfática dando paso a la metástasis o tumor secundario.

Las clasificaciones del cáncer son variadas y dependen de múltiples factores: como el tipo de tejido celular en el cual se originan, la fase de carcinogénesis y la extensión de la enfermedad a lo largo del organismo.

El tipo de cáncer se determina mediante el estudio de muestras provenientes del tumor en cuestión (ya sea mediante biopsia o cirugía de extracción) donde finalmente se determina el tipo celular afectado. Bajo este criterio es que se desglosa el cáncer en: carcinomas (células que recubren el interior o exterior de un órgano, puede ser adenocarcinoma -células glandulares o carcinoma epidermoides - células no glandulares), sarcomas (de

tejido conectivo como huesos, cartílago, músculos, grasa, vasos sanguíneos), linfomas (sistema inmune), leucemias (sistema hematológico) y mielomas (células de la médula ósea).

Las fases de la carcinogénesis se encuentran bien delimitadas entre sí en cuatro etapas: en primer lugar se da una iniciación o inducción caracterizada por la alteración del ADN en las células, adquiriendo la capacidad de división incontrolada. En una segunda instancia se genera el tumor primario en el órgano en cuestión mediante el aumento de las células cancerosas, etapa a la cual se le denomina cáncer “in situ”. Posterior a este cuadro se produce una invasión local donde las células cancerígenas se ramifican hacia los órganos colindantes. Es en este estadio donde el paciente refiere los primeros síntomas propios de la afección. Cuando las células cancerígenas son capaces de invadir el torrente sanguíneo o linfático adquieren la capacidad de ramificación a lo largo de todo el organismo, formando tumores secundarios incluso en órganos lejanos al que dio inicio al tumor. A esta última fase se le denomina invasión a distancia o metástasis. Durante todo este proceso y a medida que las células se dividen y multiplican de una manera descontrolada, es que pierden las características propias de cada tejido y, por tanto, se ve alterado el funcionamiento correcto de estos mismos.

Acorde a la extensión de la enfermedad y el pronóstico de esta se clasifica al tumor en cuatro estadios, los cuales se definen con mayor precisión en el estudio específico de cada cáncer. Estos son: estadio I que hace referencia a la presencia de tumores pequeños, localizados y en su mayoría con buen pronóstico. Los estadios II y III se encuentran espacialmente más avanzados, comprometiendo en ocasiones los ganglios linfáticos. El estadio IV tiene un pronóstico desfavorable, ya que la extirpación del tejido es en muchos casos insuficiente producto de la metástasis tumoral<sup>12</sup>.

La sintomatología del cáncer es variable y dependiente de cada tipo de tejido celular afectado, pero aun así se han determinado ciertos síntomas que se presentan de manera general en la mayoría de los cuadros. En primera instancia se da una pérdida de peso inexplicable mayor a 5 kilogramos, la cual no pareciera tener una razón aparente. La fiebre corresponde a otro síntoma

común, que se presenta con mayor frecuencia en estadios más avanzados de la enfermedad por el compromiso del sistema inmunológico. El cansancio que no mejora con el descanso y que se hace progresivo con el tiempo se da principalmente en leucemias, pero también está presente en otras líneas cancerígenas. Dolores persistentes y localizados en alguna parte del organismo pueden ser indicadores de un cáncer y de mal funcionamiento orgánico. Los cambios de coloración y textura en la piel se presentan tanto en el cáncer de piel como en otros tipos de cánceres. Dentro de las diferencias que comienzan a presentarse en la epidermis están: hiperpigmentación (oscurecimiento), ictericia (coloración amarilla de piel y mucosas), eritema (enrojecimiento), prurito (picazón) o hirsutismo (crecimiento de vello)<sup>13</sup>.

Los factores de riesgo que predisponen al organismo de contraer este tipo de enfermedades son variados, pero el más significativo según los estudios es la exposición y consumo de tabaco (ya sea cigarrillos o tabaco sin humo). Otros factores son el consumo de alcohol, la obesidad, mala alimentación y la inactividad física. La exposición a radiación de tipo ionizante es también un factor de riesgo, sobre todo en aquellas personas que se exponen de manera recurrente. La infección de ciertos virus como VPH (virus papiloma humano) y Hepatitis (B o C) aumentan considerablemente los riesgos de contraer cánceres determinados: cáncer cervicouterino y cáncer hepático respectivamente (OMS).

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo. En el año 2015 aproximadamente 8.8 millones de defunciones fueron producto de esta causal a nivel global. El más incidente es el cáncer pulmonar, seguido de cáncer hepático, colorrectal, gástrico y ocupando el quinto lugar se encuentra el cáncer de mamas (OMS).

Según el tipo de cáncer, los órganos que afectan y el tiempo transcurrido desde el inicio de este, será el pronóstico. Hoy en día el pronóstico para los pacientes que son diagnosticados con cáncer es bastante favorable. Según la OMS un 30 a 50% de los cánceres se puede evitar reduciendo los factores de riesgo, aumentando las técnicas preventivas y accediendo a un tratamiento de manera oportuna.

### 5.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es un tumor maligno que se desarrolla a partir de las células del tejido mamario. La mayoría se presenta en las células de los lóbulos mamarios, donde se drena la leche materna. Con frecuencia menor este se puede desarrollar en el tejido adiposo o fibroso de la mama<sup>14</sup>.

Dentro de su epidemiología existe una incidencia mundial de 43,3 x 100.000 mujeres, aprox. 1.500.000 de casos nuevos en el año 2012, y una mortalidad de 12,9 x 100.000 mujeres, con 521.817 defunciones durante el mismo año. En Chile la incidencia es cercana a 40 por 100.000 mujeres y una mortalidad nacional de 15,69 x 100.000 mujeres, con 1367 defunciones durante el año 2012. La región de Valparaíso se ubica en el segundo lugar a nivel nacional después de la región Metropolitana con una tasa de mortalidad por cáncer de mama de 18,48 por 100.000 mujeres<sup>15-16-17</sup>.

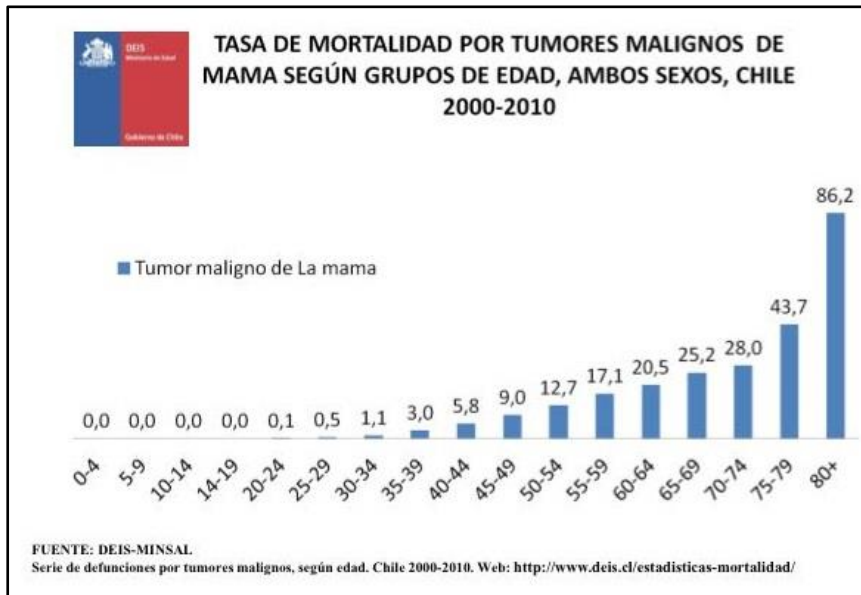


Gráfico 1 Tasa de mortalidad por tumores malignos de mama según grupos de edad, ambos sexos, Chile 2000-2010. Minsal.

El cáncer de mama se clasifica en dos tipos, según el tejido afectado. Estos se describen a continuación:

### 5.1.1 **Cáncer Ductal in situ (CDIS):**

Proliferación de células malignas epiteliales ductales dentro de los conductos lácteos de la mama. Considerado como no invasivo puesto que no se propaga fuera de los conductos lácteos, que de no ser tratado correctamente aumenta la probabilidad de padecer un cáncer invasivo en la mama.

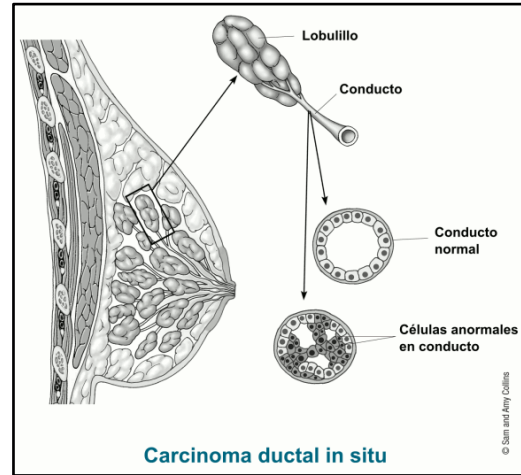


Figura 1 Esquema representativo de carcinoma ductal in situ. American Cancer Society.

### 5.1.2 **Cáncer Lobulillar in situ (CLIS):**

Las células malignas comienzan a crecer por dentro de los lobulillos que corresponden a las glándulas productoras de leche, ubicadas al final de los conductos de la mama. Este presenta una mayor probabilidad de padecer cáncer de mama a futuro en comparación al CDIS.

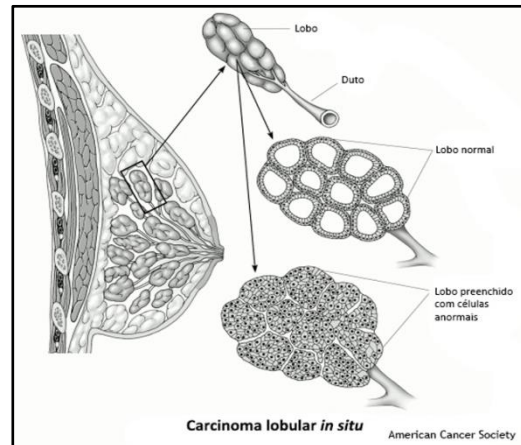


Figura 2 Esquema representativo de carcinoma lobulillar in situ. American Cancer Society.

En ambos escenarios existirán signos y síntomas que podrán alertar de estas afecciones, entre los cuales encontramos: abultamientos en la mama, dolor en el pezón, pezón umbilicado (hacia dentro de la areola), secreciones expulsadas desde el pezón que sean transparentes o con sangrado, ulceración del pezón y/o areola, líneas ganglionares cercanas a la mama inflamadas (Cola de Spence, zona axilar). Además, para un mayor control se han instaurado

campañas de realización de exámenes preventivos como son las mamografías y ecografías mamarias en la población de mayor incidencia que son las mujeres entre los 50 a los 69 años, examen que se incluye dentro del GES (Garantías explícitas en salud). Desde los 30 a 35 años se recomienda realizar ecografías mamarias en aquellas mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama. A partir de los 40 años se recomienda cambiar el método de ecografía mamaria a mamografía, ya que las condiciones de la mama permiten obtener imágenes concluyentes con este segundo método. Entre los 40 a 45 años se deben realizar al menos dos mamografías. Posterior a los 50 años se recomienda que el examen se realice de manera anual.

Para facilitar la interpretación de los exámenes (mamografías y ecografías mamarias) es que con el tiempo se han creado estadios según las características de avance que presente la enfermedad en cada usuaria, facilitando de esta forma la comprensión y establecimiento de diagnósticos por los distintos profesionales de la salud. Es así como encontramos las siguientes categorías:

**5.1.3 Cáncer Estadio I:** Cáncer invasivo donde las células cancerígenas recién han comenzado a invadir el tejido ubicado en las paredes del conducto o el lobulillo.

- **Estadio IA:** El cáncer no se ha extendido más allá de la mama.
- **Estadio IB:** Se observan en los ganglios linfáticos pequeños grupos de células cancerígenas.

**5.1.4 Cáncer Estadio II:**

- **Estadio IIA:** El tumor se ha propagado hacia los ganglios linfáticos axilares.
- **Estadio IIB:** El tumor aumenta de tamaño y se observan en los ganglios linfáticos pequeños grupos de células cancerígenas.

**5.1.5 Cáncer Estadio III:**

- **Estadio IIIA:** Presencia de cáncer en ganglios linfáticos axilares o en los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

- **Estadio IIIB:** El tumor tiene un tamaño indefinido y se ha propagado

hacia la pared torácica o la piel de la mama.

- **Estadio IIIC:** Tumor de tamaño variable, que se ha propagado hacia la pared torácica o a la piel de la mama, hacia los ganglios linfáticos ubicados sobre o debajo de la clavícula.

**5.1.6 Cáncer Estadio IV:** Cáncer metastásico que se ha propagado más allá de la mama y los ganglios linfáticos circundantes hacia otros órganos del cuerpo.

Según el estadio que se le asigne a cada examen, se realizará las derivaciones correspondientes a los distintos profesionales de salud para comenzar los tratamientos de cada mujer.

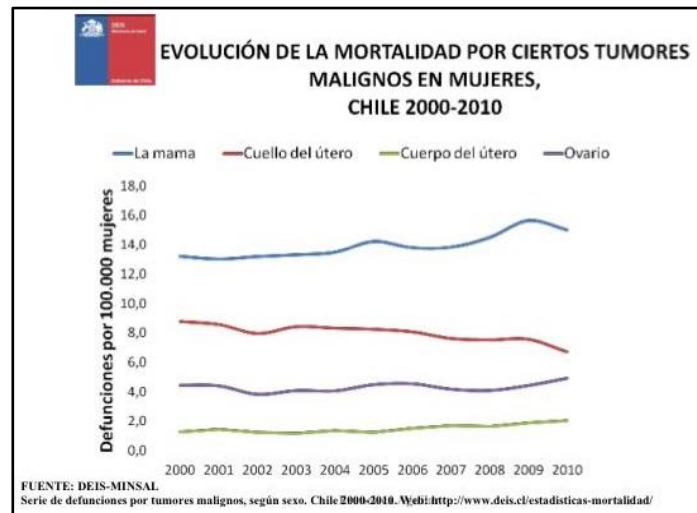


Gráfico 2 Evolución de la mortalidad por ciertos tumores malignos en mujeres, Chile 2000- 2010. Minsal.

El cáncer de mama no es una enfermedad excluyente del sexo masculino. Un 1% de los cánceres de mama se dan en varones, casos que constituyen el 0,1% de las muertes por cánceres en hombres. En este ámbito se considera una enfermedad infrecuente y de investigación limitada. No se conoce su etiología con claridad, pero se cree está asociado a factores genéticos (principalmente Síndrome de Klinefelter, mutación gen BRCA2), hormonales

(por hiperestrogenismo e hipotestosteronemia) y ambientales (exposición a altas temperaturas, radiación ionizante). Su presentación clínica se define como masa indolora, retroareolar, con inversión de pezón o sin ella y, en promedio, se presenta en un rango etario de 60 a 67 años. En la mayoría de los casos la detección es tardía<sup>18</sup>.

## 5.2 Cáncer Cérvico Uterino

El cáncer cérvico uterino, también conocido como cáncer de cérvix o cuello uterino se desarrolla en las células epiteliales del cérvix uterino, que es el puente conector entre el útero y la vagina en el sistema reproductor femenino. Al ser una zona de transición que une dos tipos de tejidos: **células escamosas** (exocérvix o zona que colinda con la vagina) y **células glandulares** (endocérvix o zona que se une a la parte inferior del cuerpo uterino), es una zona provista de cambio epitelial importante que aumenta la probabilidad de adquirir anomalías en el desarrollo de sus estratos presentes por diversos factores tanto externos como internos de cada mujer. Los factores de riesgo que hacen a las mujeres más propensas de contraer este virus son: el consumo de tabaco, la multiparidad, el consumo de pastillas anticonceptivas por muchos años consecutivos y el contagio de VIH.

El principal actor de cáncer cérvico uterino (CaCu) es el Virus Papiloma Humano (VPH), que es considerado el virus de mayor relevancia en el desarrollo del CaCu. Es un virus común en la población, el cual puede ocasionar verrugas en la zona genital. La mayoría son inofensivos, aunque existen aproximadamente 30 subtipos que son precursores de cáncer. En Chile los subtipos 16 y 18 son los más presentes y precursores de esta patología. Este virus se adquiere por contacto sexual con un individuo contagiado que generalmente son hombres ya que son portadores asintomáticos de este virus.

Es importante mencionar que el VPH también puede estar presente en la población masculina; aunque la mayoría de los hombres que contraen el VPH nunca presenta sintomatología y la infección por lo general desaparece completamente por sí sola. Sin embargo, si el VPH no desaparece, puede

causar verrugas genitales o cáncer de pene. Si bien el cáncer de pene es raro, cada vez es más frecuente<sup>19</sup>.

Existen ciertos factores de riesgo que se asocian con este tipo de cáncer, como: fimosis, mala higiene, haber tenido verrugas genitales por VPH, haber sido diagnosticado con VIH, lesiones en el pene. Además, se presenta principalmente en hombres mayores de 60 años, rara vez ocurre antes de los 40 años. Clínicamente la lesión más frecuente es una úlcera en el glande, surco coronario y en el prepucio. Alrededor 58% de los pacientes inicialmente tienen adenopatías palpables siendo positivas a tumor; tras linfadenectomía entre el 17%- 45% de las mismas e inflamatorias en el resto<sup>20</sup>. El diagnóstico se hace mediante el examen físico y la confirmación con biopsia. El tratamiento va a depender del sitio y de la extensión del tumor primario y de la presencia de metástasis inguinales.

En sus inicios este cáncer se mantiene desapercibido en el cuerpo de la mujer, pero con los años de desarrollo puede generar algia pelviana o metrorragia. La evolución de este mismo es muy lenta, puede tomar años hasta que genere los primeros síntomas. El principal método de detección es la citología vaginal o Papanicolau (PAP), el cual está incluido dentro de las prestaciones GES disponible desde los 25 años para toda mujer que ya haya tenido su primera relación sexual. Luego de esta toma se recomienda repetir el examen cada tres años hasta los 64 años<sup>21</sup>.

El **cáncer cérvico uterino** presenta una incidencia mundial de 528.000 casos nuevos en el año 2012 y una mortalidad de 266.000 muertes, representando 7,5% de las muertes por cáncer; en Chile representa una incidencia de 14,6 x 100.000 habitantes, 1279 casos por año entre el año 2003 y 2007, y una de mortalidad: 5,58 x100.000 mujeres, alrededor de 584 defunciones<sup>22</sup>. El cáncer cérvico uterino se clasifica en:

**5.2.1 Carcinoma de células escamosas:** se clasifican en queratinizados y no queratinizados que pueden tener una diferenciación marcada o su diferenciación puede ser escasa, están compuestos por grandes células tumorales. Los estadios son:

- **NIE I:** Neoplasia intraepitelial de bajo grado que rara vez progresa a

enfermedad invasiva.

- **NIE II:** Neoplasia intraepitelial de mediano grado que se mantiene en observación cada 6 meses.
- **NIE III:** Neoplasia intraepitelial de alto grado que tiene más probabilidades de progresar a cáncer de cuello uterino.

**5.2.2 Adenocarcinomas in Situ (AIS):** Mucinoso de tipo mucocervical es el más frecuente encontrado en el cuello uterino.

**5.2.3 Carcinoma adenoescamoso:** Tumores con crecimiento glandular y escamoso.

**5.2.4 Carcinoma Preinvasivo o Estadio 0:** Carcinoma in situ o carcinoma intraepitelial.

**5.2.5 Carcinoma invasivo:**

- **Estadio I:** Carcinoma limitado al cuello uterino.
- **Estadio II:** Compromete la vagina excluyendo el tercio inferior o infiltración de parámetros sin llegar a las paredes laterales de la pelvis.
- **Estadio III:** Es la anomalía del tercio inferior de la vagina o extensión a la pared lateral de la pelvis.
- **Estadio IV:** Es la extensión por fuera de los límites del tracto reproductor femenino.

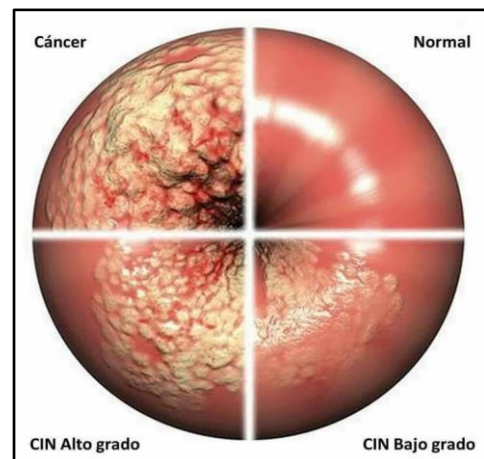


Figura 3 Representación de los distintos estadios de CaCu.

Para su prevención y detección temprana, en la atención primaria se realiza el examen de Papanicolau cada tres años. Este cáncer se caracteriza por poseer un avance muy lento por tanto su detección a tiempo es de suma importancia para comenzar un tratamiento oportuno evitando así su

proliferación a otros órganos. Con una detección a tiempo tiene un muy buen pronóstico en la mayor parte de las usuarias.

## 6. Tratamientos contra el cáncer

Existe una amplia gama de tratamientos en la actualidad para los diferentes tipos de cáncer que se utilizarán dependiendo de cada caso, estos son:

**6.1 Cirugía:** Se utiliza para prevenir, diagnosticar, determinar la etapa y tratar el cáncer. Es útil cuando las células neoplásicas se encuentran localizadas en un área determinada, es difícil determinar la magnitud necesaria de la cirugía hasta visualizar la extensión del cáncer durante la operación. Este tratamiento es efectivo cuando el tumor es localizado y no se ha extendido hacia otras áreas del cuerpo<sup>23</sup>.

**6.2 Radioterapia:** Consiste en aplicar dosis de radiación ionizante sobre células tumorales con el fin de eliminarlas, impidiendo su proliferación. Su objetivo es atacar la zona afectada, tratando de proteger los órganos circundantes no afectados. Se utiliza principalmente cuando el cáncer se encuentra localizado. La radiación se puede aplicar de dos maneras:

- **Radiación externa:** Es el tipo más común de radioterapia, se realiza a través de una máquina conocida como Acelerador lineal o Linac que dirige rayos de alta energía hacia el tumor. Es un tratamiento no invasivo, que se administra de manera ambulatoria en un centro de tratamiento u hospital.
- **Implantes radiactivos o braquiterapia:** Es un tratamiento invasivo, en donde se coloca un implante radiactivo dentro o cerca del tumor, este implante puede ser temporal o permanente dependiendo del tipo de cáncer a tratar. Este implante permite una mayor dosis de radiación en un área limitada de lo que se pudiera lograr con la radiación externa.

**6.3 Inmunoterapia:** Utilizan el sistema inmunológico para tratar o disminuir los efectos secundarios de algunos tratamientos contra el cáncer. Las

diferentes terapias actúan de distintas maneras, ya que pueden detener o reducir la proliferación de las células cancerosas, apoyar a las células inmunológicas no afectadas para controlar el cáncer o ayudar a reparar las células normales dañadas por otras formas de tratamiento.

**6.6 Terapia dirigida:** Tratamiento mediante medicamentos que atacan a cambios genéticos específicos que ayudan a detener el crecimiento y la diseminación del cáncer. Es diferente de la quimioterapia tradicional. Actúan atacando proteínas o genes específicos que se encuentran en células cancerosas o en células relacionadas con el crecimiento del cáncer, como células de vasos sanguíneos<sup>24</sup>.

**6.7 Terapia hormonal:** Tratamiento del cáncer que enlentece la proliferación celular a través del uso de hormonas para crecer. Esta terapia está comprendida en dos grupos: los que bloquean la capacidad del cuerpo para producir hormonas y los que interfieren en la forma como las hormonas se comportan en el cuerpo.

**6.8 Trasplante de células madre:** Es un procedimiento que restaura las células madre en individuos cuyas células fueron destruidas por dosis muy elevadas de quimioterapia o de radioterapia.

**6.9 Quimioterapia:** Consiste en tratar el cáncer a través de medicamentos que generalmente son endovenosos u orales. La quimioterapia es el tratamiento de primera opción para muchos tipos de cáncer y casi siempre se usa como tratamiento sistémico, en el cual los medicamentos viajan a través de todo el cuerpo para llegar hasta las células cancerígenas, donde sea que estas se hayan propagado. Entre los medicamentos más utilizados se encuentra:

- **Taxol:** Nombre químico "Paclitaxel", este es un antineoplásico cuyo trabajo es interferir con la división de las células cancerígenas, se utiliza en combinación con otros medicamentos para quimioterapia. Este reduce el riesgo de recidiva en cáncer de mama y cáncer

cervicouterino, y como tratamiento para cáncer de mama en estadios avanzados<sup>25</sup>.

- Doxil/Adriamycin: Nombre químico “doxorubicina”, antitumoral cuyo trabajo es destruir células cancerosas dañando sus genes e interfiriendo en su reproducción. Se utiliza principalmente para impedir la recidiva en cáncer de mama en estadios tempranos, reducción de tumores grandes en cáncer de mama en estadios avanzados<sup>26</sup>.
- 5-fluorouracilo (5-FU): Antineoplásico antimetabolito de uridina. Inhibe la división celular por bloqueo de síntesis de ADN y por formación de ARN de estructura defectuosa y actuando como antagonistas de la pirimidina<sup>27</sup>.
- Ciclofosfamida: Agente alquilante que debilita y destruye células cancerosas, dañando su material genético<sup>28</sup>.
- Metotrexato: Antimetabolito que inhibe al dihidrofolato reductasa, actuando como falsos bloques en la construcción del material genético de estas células, impidiendo su reproducción<sup>29</sup>.

## 7. Antioxidantes

Conjunto de moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otros sustratos biológicos, como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, actuando como donador de electrones. La oxidación consiste en la transferencia de electrones de una sustancia a otra a partir de un agente oxidante, lo que incurre en la liberación de radicales libres.

Los radicales libre son cualquier especie que contenga un electrón desapareado en su orbital más externo, la presencia de este aumenta la habilidad para reaccionar con otros átomos y/o moléculas presentes en su entorno, normalmente, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La interacción entre radicales libres y dichos sustratos da lugar a alteraciones en las propiedades estructurales y funcionales de estos. Es importante la actividad antioxidante en este proceso para neutralizar los radicales libres, ya que los niveles bajos de los mismos, o la inhibición de las enzimas antioxidantes

causan estrés oxidativo y pueden dañar o eliminar las células, pudiendo provocar enfermedades cardíacas, cáncer y algunas enfermedades neurológicas.

Los antioxidantes se pueden clasificar en:

**7.1 Antioxidantes endógenos:** Son aquellos sintetizados por el organismo, los cuales a su vez se clasifican en dos categorías:

- Enzimáticos: Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfoxi-metionina-reductasas.
- No enzimáticos: Glutatión, ácido úrico, ácido dihidro-lipóico, metalotioneína, ubiquinol y melatonina.

**7.2 Antioxidantes exógenos:** Son aquellos que ingresan al organismo a través de la dieta, como: ácido ascórbico, alfa-tocoferol, beta-caroteno, luteína, zeaxantina, licopeno, polifenoles y isotiocianatosdialil-disulfido.

En cuanto al mecanismo de acción de los antioxidantes estos pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas, a través de la interacción de forma directa con las especies reactivas, actuando como estabilizadores. En el caso de los radicales libres los estabiliza a través de la cesión de un electrón a las especies reactivas, esto permite que el radical libre pierda su condición por “pareamiento” de su electrón desapareado.

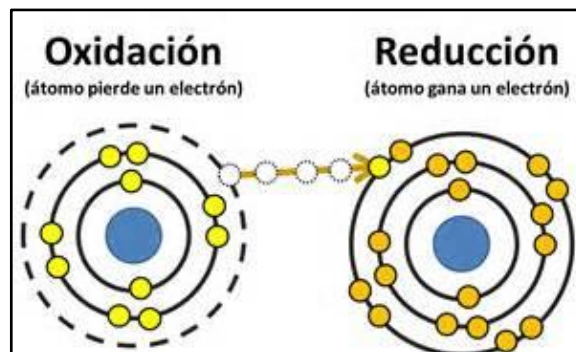


Figura 4 Representación del proceso de Oxido-Reducción.

Como resultado el antioxidante que cede un electrón se convierte en un radical libre y termina oxidándose bajo una forma que es de baja o nula reactividad hacia su entorno. Otro mecanismo por el cual los antioxidantes estabilizan a los radicales libres es a través de un mecanismo que implica la transferencia directa de un átomo de hidrógeno, donde el RL también queda estabilizado electrónicamente.

Otros antioxidantes pueden actuar estabilizando especies reactivas a través de la adición directa del radical a su estructura. Como resultado el RL pierde su condición, y el antioxidante es modificado covalentemente, convirtiéndose en un RL que es oxidado y convertido en derivados epóxido y carbonilos de notablemente menor reactividad.

## 8. Plantas medicinales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define (1979) una planta medicinal como *“cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos”* <sup>30</sup>.

Si bien no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la OMS ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos.

El uso de estas plantas ha ido evolucionando a través del tiempo, mediante ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos, buscando los principios activos que explicaran el uso terapéutico y la vigencia para su uso. Las diversas actividades biológicas y estructuras químicas abren una amplia gama de posibilidades para la creación de fármacos, teniendo importantes aplicaciones en la medicina moderna, ya que son fuente directa de agentes terapéuticos. Se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas

sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos<sup>31</sup>.

## 8.1 Maqui

El Maqui es un fruto que crece abundantemente de manera silvestre en campos y laderas del sur de Chile, entre la IV y XI región. Pertenece a la familia *Elaeocarpaceae*. Este se obtiene de arbustos verdes denominados “macales”, los cuales produce pequeñas bayas de 6 mm color púrpura/negro. El Maqui ha sido utilizado desde la antigüedad por el pueblo Mapuche en forma de infusión para el tratamiento de diversas enfermedades, como: diarreas, amigdalitis, faringitis y úlceras bucales. Estas bayas también son conocidas como Wineberry chileno, ya que se utiliza para darle color al vino, para hacer mermeladas y para tinturas negras o azules.

El Maqui es uno de los frutos con mayor poder antioxidante conocido. Los componentes antioxidantes que se encuentran en esta baya maqui son principalmente flavonoides como antocianinas y polifenoles. Las antocianinas son responsables de la coloración de las plantas en las que se producen y actúan como bloqueadores solares naturales, otorgando protección contra la radiación. También protegen a las plantas que las contienen de amenazas biológicas como bacterias, hongos y parásitos. Al ser ingeridas por humanos, las antocianinas proporcionan efectos contra los signos de envejecimiento, contribuyen a la salud cardiovascular, reducen las probabilidades de degeneración cancerígena de las células, reducen las reacciones alérgicas y contribuye al metabolismo de la insulina<sup>32</sup>.

En cuanto a los polifenoles, su capacidad para actuar como antioxidantes, tanto la de los flavonoides como de aquellos no flavonoides, depende principalmente de la presencia de hidroxilos en su estructura, ya que éstos le confieren la habilidad para donar un átomo de hidrógeno o como donante de un electrón a un radical libre (o a otras especies reactivas).

Respecto a los flavonoides, algunos pueden actuar como antioxidantes a través de su habilidad para quelar ciertos metales de transición (cobre y hierro),

lo cual evita la formación de radicales libres hidroxilo (a partir de peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton) y de superóxido (a partir de oxígeno molecular).

## 8.2 *Escallonia illinita*

El género *Escallonia* está compuesto por al menos 50 especies a nivel sudamericano, de las cuales 25 se encuentran en territorio chileno. Principalmente en la zona comprendida entre la región de Coquimbo y la región del Bio-Bio se encuentra *Escallonia illinita*, una subespecie conocida popularmente como “Barraco o planta del chancho” por su olor característico similar al de un cerdo castrado. Esta planta es un



Figura 5 Fotografía de *Escallonia illinita* florecida, ciudad de San Francisco, comuna de San Esteban, Los Andes, Chile. Enero, 2017.

arbusto aromático, resinoso de 3 a 4 metros de altura de hojas ovaladas y dentadas. Es considerada una planta medicinal para tratar enfermedades hepáticas, renales y gripe, debido a sus propiedades antiinflamatorias<sup>33</sup>. Esta planta tiene una alta concentración en flavonoides y antioxidantes.

### 8.2.1 Actividad biológica de *Escallonia illinita*

Se cree que la actividad biológica de esta planta es por causa de la combinación entre sus moléculas; que es un hepatoprotector y además posee actividad antitumoral; y la presencia de flavonoides, el cual posee actividad antioxidante<sup>34</sup>. Se ha demostrado la presencia de flavonoides como: pinocembrina, umbeliferona, Beta-sitosterol, metil-p-cumarato y astragalina. Siendo los tres primeros los más importantes por su actividad antioxidante.

- Pinocembrina: Es un flavonoide que posee actividades antimicrobianas, antiinflamatoria, antioxidante y actividades antitumorales. Además, esta puede utilizarse como neuroprotector contra lesiones isquémicas cerebrales con un amplio margen de tiempo terapéutico, que puede atribuirse a sus efectos antiexcitotóxicos.

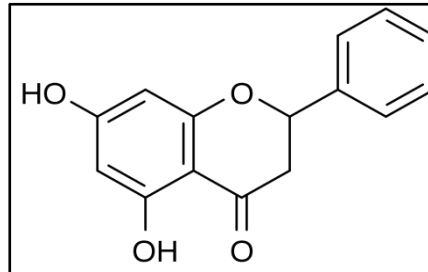


Figura 6 Estructura química de Pinocembrina.

- Umbeliferona: Es una curamina que se produce en plantas de la familia de las *Apiaceae*, siendo las más comunes el cilantro y la zanahoria, también está presente en *Justicia pectoralis* perteneciente a la familia *Acanthaceae*. La umbeliferona posee un fuerte efecto sobre la radiación ultravioleta, absorbiendo longitudes de onda de hasta 300, 305 y 325 nm. Es por esto, que la potente absorción de tres longitudes de onda diferentes hace a la umbeliferona un agente de filtro solar útil. Se ha asociado efecto analgésico y antiinflamatorio a *Justicia pectoralis*, ya que se describió que los principales constituyentes de dicha planta eran cumarina y umbeliferona, con un mecanismo de acción similar a indometacina y fenilbutazona. Las cumarinas constituyen una clase de metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pudiendo también ser encontrados en hongos y bacterias.

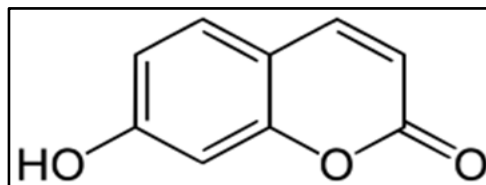


Figura 7 Estructura química Umbeliferona.

- Beta- sitosterol: Es un esteroide de origen vegetal el cual se encuentra en diversas plantas y semillas en su forma natural. Posee una actividad antioxidante y protector celular, el cual puede disminuir los radicales libres de las células. Estudios epidemiológicos realizados in vitro con tejidos animales, con beta-sitosterol indican que provocaría la inhibición de la proliferación e induce la apoptosis en tumores sólidos de mama y colon, sin afectar a las células sanas. También existen estudios clínicos que analizaron la utilidad del beta-sitosterol en el tratamiento del cáncer de mama, donde se comprobó que esta sustancia mejoró la eficacia del tamoxifeno.

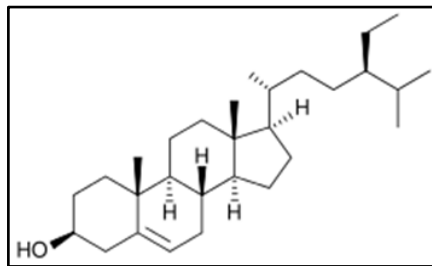


Figura 8 Estructura química de Beta-sitosterol.

## VII. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Según lo revisado e investigado en los antecedentes bibliográficos podemos plantear el siguiente problema de investigación:

¿Los extractos secuenciales del *Escallonia illinita* tienen efectos antioxidantes y antitumorales en líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino?

## VIII. HIPÓTESIS

La actividad biológica de *Escallonia illinita* aún es desconocida. Entonces, en base a los antecedentes bibliográficos expuestos anteriormente, como hipótesis de esta investigación se plantea lo siguiente:

“Los extractos secuenciales de *Escallonia illinita* presentan potencial actividad citotóxica y antioxidante”.

## IX. OBJETIVOS

### 1. Objetivo General:

Analizar los efectos citotóxicos que poseen los extractos secuenciales de *Escallonia illinita* “Barraco” sobre líneas celulares de “cáncer de mama” y “cáncer cérvico uterino”.

### 2. Objetivos Específicos:

- Determinar los efectos antitumorales que poseen los extractos (HEX, DCM, ACOE, ET) de Barraco sobre líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino.
- Confirmar los efectos antitumorales ante ensayos de citotoxicidad del Barraco como compuesto natural sobre líneas de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino.
- Analizar los posibles efectos antioxidantes que poseen los extractos (n-hexano, DCM, ACOE, ET) de barraco sobre líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino.

## X. MATERIALES Y MÉTODO

### 1. Material biológico:

#### 1.1 Vegetal

Se utilizaron extractos de la planta *Escallonia illinita* extraídos para el análisis de citotoxicidad. Este vegetal fue recolectado en enero del 2017, en la ciudad de San Francisco, comuna de San Esteban, Los Andes (coordenadas geográficas: -32.701792, -70.544044). La especie fue identificada por el Ingeniero Forestal Patricio Novoa que es el experto en botánica del Jardín Botánico Nacional de Viña del Mar.

##### 1.1.1 Clasificación taxonómica

Familia *Escalloniaceae*.

*Escallonia illinita* conocida popularmente como barraco, es un arbusto siempre verde, resinoso, pegajoso, muy fragante, de 1 a 2 mt de altura. De hojas ovaladas, con bordes dentados, brillantes. Flores blanquecinas en racimos terminales laxos.



Figura 9 Fotografía de *Escallonia illinita*, ciudad de San Francisco, comuna de San Esteban, Los Andes, Chile. Enero, 2017.

#### 1.2 Celular

##### 1.2.1 Líneas celulares de colon

- CON corresponde a una línea celular normal de un feto humano del sexo femenino, de 21 semanas de gestación. Estas células provienen del tejido de colon, de morfología epitelial y se caracteriza por poseer un crecimiento adherente. Esta es diploide y no se observan cromosomas marcadores consistentes.

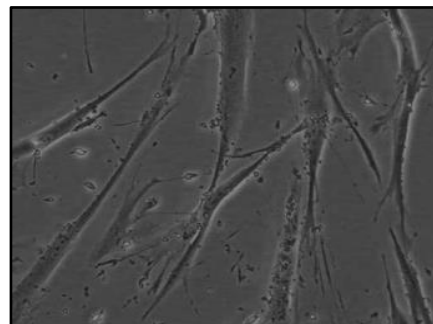


Figura 10 imagen microscópica de línea celular CON.

### 1.2.2 Líneas celulares de cáncer cérvico uterino

- HeLa es un tipo celular clasificado en una línea celular inmortal usado en la investigación científica. Es la más antigua y común línea celular usada en humanos. La línea derivó de unas células de cáncer cervical obtenidas el 8 de febrero de 1951 de Henrietta Lacks. La línea celular resultó ser de

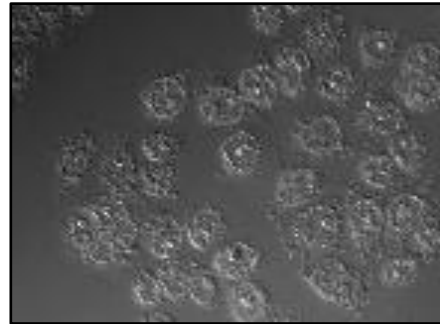


Figura 11 Imagen microscópica de línea celular HeLa.

gran durabilidad comparada con las múltiples otras líneas celulares que se usan en investigación. Las células HeLa han sido usadas en el estudio de la expresión del virus del papiloma E2 y apoptosis. Estas células también se usan en gran variedad de estudios sobre el cáncer incluyendo aquellos relacionados con las hormonas del sexo, esteroides como el Estradiol, estrógenos, y los receptores de estrógeno. Estas células proliferan anormalmente rápido, incluso comparándolas con otras células cancerígenas. Como otras muchas células cancerígenas, las células HeLa tienen una versión activa de telomerasa durante la división celular, que previene la reducción incremental de telomeres que implica el envejecimiento y la eventual muerte celular. De esta manera las células eluden el límite de Hayflick, que es la limitación de divisiones celulares que las células normales pueden realizar antes de convertirse en senescentes.

### 1.2.3 Líneas celulares de cáncer de mama

- MCF-7 es una línea celular del cáncer epitelial usada ampliamente, derivada del adenocarcinoma de mama. Las células MCF-7 mantienen características diferenciadas del epitelio mamario, incluida la habilidad de procesar el estradiol

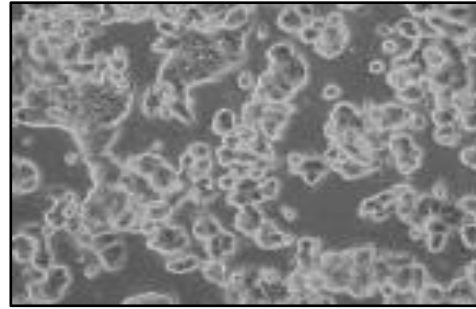


Figura 12 Imagen microscópica de línea celular MCF-7

vía receptores de estrógeno citoplásmico. Aunque es fácil de propagar, las células son, generalmente, de crecimiento lento. Las células MCF7 son usadas para detectar componentes MAPK y PI3K, y ERK y Akt de fosforilación. Las células MCF-7 expresan particularmente grandes niveles de p70S6K y pueden ser igual de útiles como marcadores para las partes altas de las quinasas como el mTOR y el PDK-1<sup>35</sup>.

## 1.3 Reactivos y Equipos

### 1.3.1 Solventes y reactivos:

- a) Para extracción de los compuestos:
  - Acetato de etilo grado técnico (HES).
- b) Para cromatografía en columna:
  - *n*-Hexano grado HPLC (Merck).
  - Acetato de etilo grado HPLC (Merck).
  - Metanol grado HPLC (Merck).
- c) Para cromatografía en capa fina:
  - Acetato de etilo grado cromatográfico (MERCK).
  - Hexano grado cromatográfico (Merck).
  - Heptano grado técnico (Comercial Vimaroni).
  - Metanol grado cromatográfico (MERCK).
  - Ácido sulfúrico 95%- 97% (MERCK).

d) Para cromatografía líquida de alta resolución

- Ácido fórmico 1% (Merck).
- Metanol 100% grado HPLC (Merck).
- Agua Mili-Q.

e) Para los ensayos microbiológicos

- Dimetilsulfóxido (Merck).
- Para cromatografía de gases (dilución de muestra).
- Acetato de etilo grado HPLC (Merck).

### **1.3.2 Equipos**

- Agitador Vortex modelo VM-300 de Gemmy Industrial Corporation.
- Aparato Stuart Scientific SMP3.
- Autoclave.
- Bomba de vacío PRO-SET modelo VP60.
- CG-EM marca Hewlett-Packard series Plus +, modelo HP-6890 acoplado con un detector de masa HP 5973.
- Espectrómetro Bruker Avance 400 para RMN.
- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 11 de Perkin Elmer, Longitud de onda 200-900 nm.
- Espectrofotómetro Nicolet Impact para IR.
- Estufa de cultivo Binder, funcionando a 28°C.
- Evaporador rotatorio DLAB modelo RE100- Pro con un baño termorregulado DLAB 5L.
- HPLC analítico marca JASCO, modelo CO- 2067 plus. Equipado con columna cromatográfica RP-18e de Merck.
- HPLC semi-preparativo Marca Merck Hitachi, modelo L- 6250, equipado con detector UV-VIS marca Knauer k-2500.
- Manta calefactora modelo HM-I, capacidad 2 litros.
- Transiluminador UV modelo TFX-20 MX 230V 50 Hz.
- Shaker INFORS MT modelo Ecotron, funcionando a 30°C a 150 rpm.
- Placas de micropocillos para cultivo celular de 96 pocillos.

- Placas petri para cultivo celular de 100 mm.
- Tubos para centrífuga de 15 y 50 mL *Biologix*.
- Botellas de vidrio con tapa *Duran Schott*<sup>®</sup>.
- Micropipetas *Biopette*<sup>®</sup>, modelos p2, p10, p20, p200 y p1000.
- Micropipeta multicanal de 200 µl *Biopette*<sup>®</sup>.
- Puntas para micropipetas desechables de 10, 200 y 1000.
- Cámara de flujo laminar clase II *ESCO*<sup>®</sup>.
- Incubadora *Kendro Laboratory Products*<sup>®</sup>.
- Refrigerador modelo Altus 700 *Mademsa*<sup>®</sup>.
- Microscopio invertido *Ivens-*, modelo XD-202.
- Lector de Microplacas *Biotek*<sup>®</sup>.
- Microscopio de fluorescencia invertido motorizado modelo IX 81 *Olympus*<sup>®</sup>.
- Balanza analítica *Mettler Toledo*<sup>®</sup> ML204.
- Vortex *VELP*<sup>®</sup> *Scientifica*.

### 1.3.3 Otros

- Se utilizaron placas para cromatografía en capa fina de silica gel (*Sorbtech*).
- Se utilizó silica gel 60 (0,063-0,200 mm) para cromatografía en columna (*Merck*).
- Se utilizó un estándar de pinocembrina para la cromatografía capa fina (purificado por HPLC).
- Se utilizó Helio como gas carrier en el análisis por CG-ES.

## 1.4 Métodos

### 1.4.1 Estudios químicos:

- **Obtención de los datos de *Escallonia illinita***

El material vegetal seco y molido de las hojas y tallos de *Escallonia illinita* (0,74 kg) se sometió a extracciones continuas Soxhlet con diferentes solventes, hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetato de etilo San Felipe y etanol.



Figura 13. Fotografía de hojas y tallos secos de *Escallonia illinita*. Laboratorio Universidad Técnica Federico Santa María, sede Valparaíso.

Cada extracción se realizó hasta total agotamiento del material vegetal, y posterior reducción de volumen a través de un evaporador rotatorio al vacío de la trompa de agua y a una temperatura no superior a 60°C. Con el fin de aislar la molécula pinocembrina, el extracto de *Escallonia illinita* fue sometido a un fraccionamiento mediante columna cromatográfica (CC).

➤ **Dilución de los datos de los extractos de *Escallonia illinita***

Cada extracto se diluyó a una concentración de 50 mg/mL de DMSO, siendo esta la solución madre, la cual se congeló para su adecuada mantención.

Se utilizó la solución madre para preparar la solución de trabajo cada vez que se requería, diluyendo 100 veces la solución madre, con la finalidad de obtener una concentración de 0,5 mg/mL, concentración en la cual ya no existe citotoxicidad celular. Para esto se descongeló la solución madre y se extrajo 3  $\mu$ L para diluirse en 297  $\mu$ L de agua estéril Miliq.

➤ **Preparación de las placas con las líneas celulares de HeLa, MCF-7 y CON**

Se utilizaron placas de 96 pocillos, cada uno con 3000 células. Se destinó tres columnas por cada concentración de la solución de trabajo proveniente de un extracto y las filas de la siguiente manera:

- A: Células control.
- B: Células control solvente (DMSO al 1%, 10  $\mu\text{L}$  en 100 mL del medio)
- C: 10  $\mu\text{L}$ = 50  $\mu\text{g/mL}$  extracto en el medio.
- D: 5  $\mu\text{L}$ = 25  $\mu\text{g/mL}$  extracto en el medio.
- E: 2,5  $\mu\text{L}$ = 12,5 $\mu\text{g/mL}$  extracto en el medio.
- F: 1,25  $\mu\text{L}$ = 6,25  $\mu\text{g/mL}$  extracto en el medio.
- G: 0,25  $\mu\text{L}$ = 2,5  $\mu\text{g/mL}$  extracto en el medio.
- H: Células control.

Así a cada pocillo de la placa se le adicionó la solución de trabajo indicada. Luego se dejó en cultivo la placa por 72 horas. Finalizado el cultivo se procedió con la fijación con ácido tricloroacético al 50% (25  $\mu\text{L}$ /pocillo) a 4°C por una hora. Posterior a esto se realizó el lavado de las células con agua destilada, tres veces por inmersión.

Se tiñeron las células con sulforodamina B 0,1%, (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) disuelto en ácido acético 1% (50  $\mu\text{L}$ /pocillo) durante 30 minutos y posteriormente lavadas tres veces con ácido acético 1% (100-150  $\mu\text{L}$ /pocillo), con la finalidad de eliminar el colorante no unido. El colorante no unido a proteína se solubilizó con 100  $\mu\text{L}$  de 10mM Tris base no tamponado.

➤ **Lectura de las placas celulares**

La lectura de las placas se realizó mediante un lector de placas a 540 nm. Los datos son expresados como absorbancia, luego transformados a viabilidad celular porcentual y por último analizados como media +/- desviación estándar.

## **2. Pruebas de actividad antioxidante**

### **2.1 Material biológico:**

Se utilizaron los mismos extractos de la planta *Escallonia illinita* extraídos para el análisis de citotoxicidad. Este vegetal fue recolectado en enero del 2017, en la ciudad de San Francisco, comuna de San Esteban, Los Andes

(coordenadas geográficas: -32.701792, -70.544044). La especie fue identificada por el Ingeniero Forestal Patricio Novoa que es el experto en botánica del Jardín Botánico Nacional de Viña del Mar.

## 2.2 Reactivos y Equipos

### 2.2.1 Solventes y reactivos:

Del Laboratorio de Investigación - Estrés Oxidativo, Universidad de Valparaíso (Brasil 1560, Valparaíso) se utilizó mezcla de FRAP, DPPH, ABAP, ABTS, Etanol, Folin, Carbonato de sodio 7,5%, ALCL<sub>3</sub> 2%, agua bidestilada.

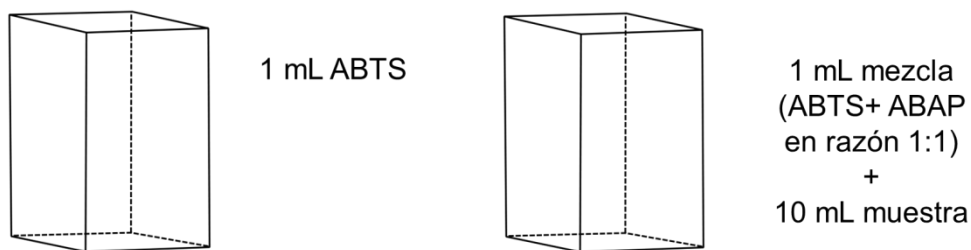
### 2.2.2 Equipos:

- Balanza Analítica. Marca RADWAG, modelo AS220-C/2.
- pHmetro. Marca JENCO, modelo 60.
- Centrífuga Clínica. Marca HETTICH, modelo UNIVERSAL/K2S.
- Placa Calefactora. Marca LabTech, modelo LMS – 1003.
- Vórtex. Modelo 37600 Mixer.
- Sonicador. Marca Elma, modelo TRANSSONIC 310.
- Baño Termorregulado. Marca K, modelo YCW – 04M (11L).
- Micropipeta. Marca GILSON (Volúmenes 1-10 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ L y 1-5 mL).
- Notebook. Marca Lenovo ideapad 100-14 IBY.
- Software Microsoft Office Excel 365. Versión 15.0.4797.1003, 2013.
- Instrumentos de medición: Espectrofotómetro UV visible. Marca Rayleigh. UV-2601.

## 2.3 Método

### 2.3.1 Prueba TRAP, método Romay et al, 1996

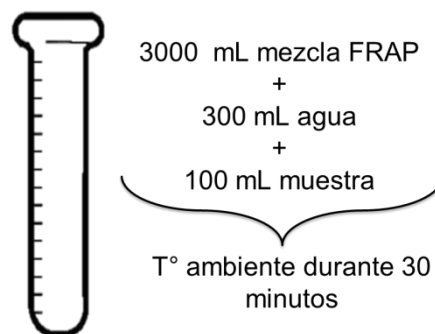
Para realizar esta prueba se utilizó ABAP 10 mM, ABTS 150  $\mu$ m y muestra de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEX, DCM, ET). Se preparó una muestra blanco y siete muestras con cada extracto de la siguiente forma:



Preparadas las muestras, se procesaron en Espectrofotómetro UV visible.

### 2.3.2 Prueba FRAP, método Dudonné et al, 2009

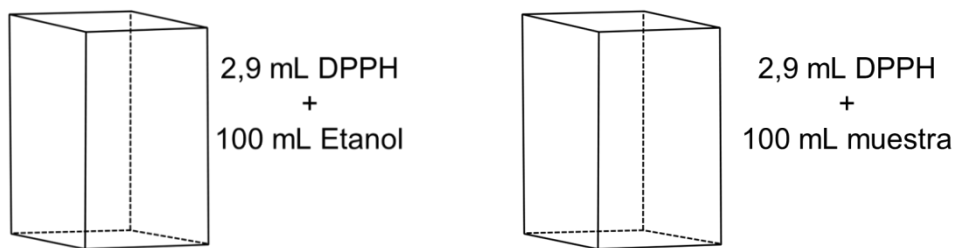
Para la realización de la prueba FRAP se utilizó mezcla de este, cuyo contenido era buffer acetato 300 mM pH 3.6, TPTZ 10 mM en ácido hidroclorehídrico 40 mM y Cloruro Férrico 20 mM, en razón 10:1:1; además se utilizó agua bidestilada y las muestras de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEX, DCM, ET). Se prepararon siete muestras de cada extracto de la siguiente forma:



Estas muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Luego se procesaron los resultados a 593 $\lambda$  en Espectrofotómetro UV visible.

### 2.3.3 Prueba DPPH, método Brand- William et al, 1995

Para la realización de esta prueba se utilizó 50  $\mu$ m de DPPH, 100 mL de etanol y las muestras de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEX, DCM, ET). Se preparó una muestra blanco y siete muestras de cada extracto de la siguiente forma:

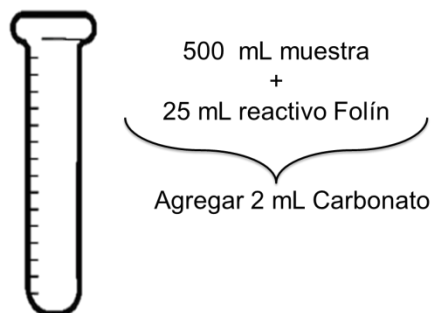


Preparadas las muestras se dejaron incubar 15 minutos a temperatura ambiente, luego se procesaron los resultados a 517 $\lambda$  en Espectrofotómetro UV visible.

### 2.3.4 Fitoconstituyentes:

#### ➤ Prueba Fenoles totales, método Waterman y Mole, 1994

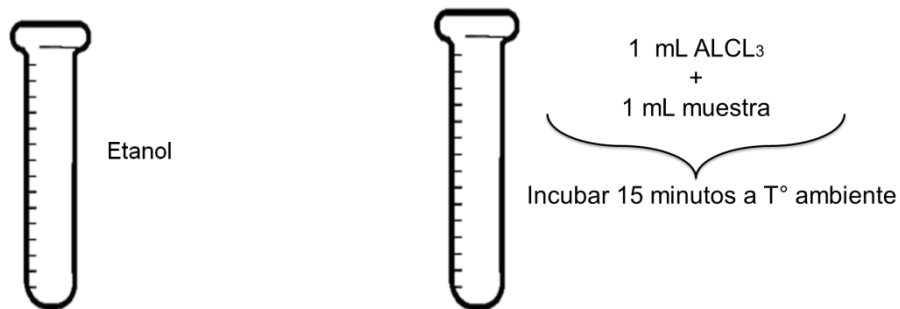
Para esta prueba se utilizó Carbonato de sodio 7,5%, Folin en razón 1:10 y muestra de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEX, DCM, ET). Se prepararon siete muestras de cada extracto de la siguiente forma:



Preparadas las muestras se dejaron incubar en oscuridad, a temperatura ambiente por 2 horas. Luego se procesaron los resultados a 700  $\lambda$  en Espectrofotómetro UV visible.

➤ **Prueba Flavonoides totales, método Arvovet- Grand et al, 1994**

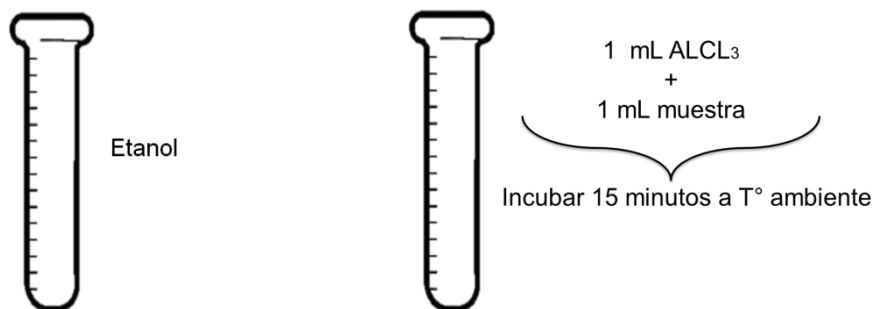
En esta prueba se utilizó  $AlCl_3$  al 2%, etanol y muestra de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEX, DCM, ET). Se preparó la muestra blanco y siete muestras de cada extracto de la siguiente forma:



Preparadas las muestras se procesaron en Espectrofotómetro UV visible a 415 $\lambda$ .

**2.3.5 Prueba Antraquinonas totales, método Mellado et al, 2012**

Se utilizó para esta prueba  $AlCl_3$  al 2%, etanol y muestra de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEX, DCM, ET). Se preparó la muestra blanco y siete muestras de cada extracto de la siguiente forma:



Preparadas las muestras se procesaron en Espectrofotómetro UV visible a 486 $\lambda$ .

## XI. Resultados

### 1. Efectos antioxidantes de los extractos Acetato de etilo, Acetato de etilo San Felipe, Hexano, Diclorometano y Etanol de *Escallonia illinita*

Una vez obtenidos los extractos se procedió a realizar los ensayos antioxidantes, de los cuales se midieron los siguientes parámetros: variables independientes ACOE, ACOE SF, HEX, DCM Y ET; y variables dependientes TRAP, FRAP, DPPH, Polifenoles, Flavonoides y Antraquinonas.

#### 1.1 Capacidad antioxidante

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra. Esto se midió a través de las siguientes pruebas:

#### 1.2 Prueba Potencial Antioxidante Reactivo Total

Esta prueba utiliza radicales libres peroxilo que se generan a través de la descomposición térmica de un compuesto hidrosoluble llamado ABAP (2,2'-azobis (2-amidinopropano)), una vez adicionado a la muestra a estudio, en este caso los extractos de *Escallonia illinita*, la oxigenación de las moléculas es monitorizada mediante la determinación del oxígeno consumido. Luego se inhibe la oxidación mediante la acción de los compuestos antioxidantes en la muestra y se compara por el generado con trolox en iguales condiciones.

El gráfico 3 muestra el ensayo TRAP, que tuvo una desviación estándar: 0,000 sobre la existencia de diferencia en el potencial antioxidante reactivo total de los extractos, en el cual los extractos D y D son iguales entre sí, pero diferentes a los demás extractos, A, B y C. Lo que demuestra que todos los extractos tienen un potencial antioxidante reactivo total diferente, destacando con mayor potencial el hexano.

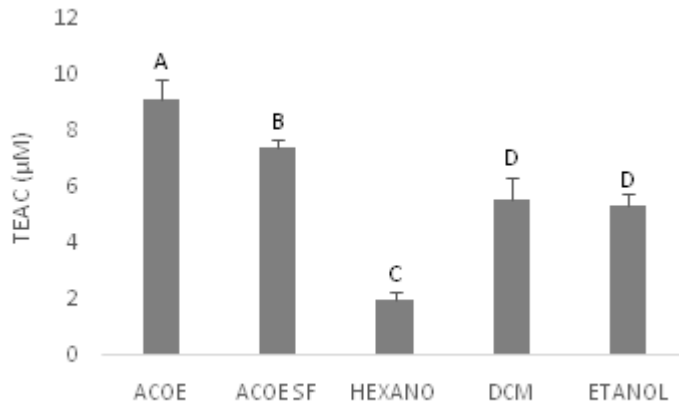


Gráfico 3 Capacidad antioxidante en equivalentes al Trolox promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde *Escallonia illinita*.

### 1.3 Prueba Capacidad antioxidante para Reducir el ion Férrico

Ensayo que determina la capacidad de las muestras de *Escallonia illinita* para reducir un complejo férrico con la molécula tripiridil s-triazina (TPTZ) a su forma ferrosa (pH bajo). Luego se genera una coloración azul que es de intensa proporcionalidad a la capacidad reductora de la muestra, se cuantifica por colorimetría (593nm) en base a un patrón de sulfato ferroso. La capacidad de reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra.

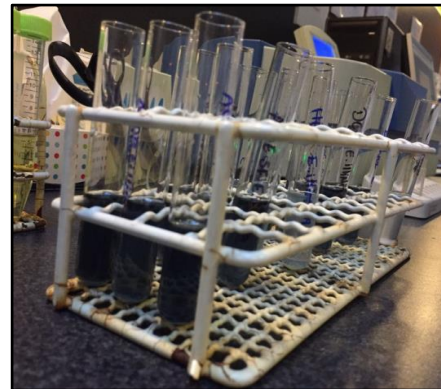


Figura 14 Pruebas de Capacidad antioxidante para educir ion Férrico en Laboratorio de Investigación-Estrés Oxidativo de Universidad de Valparaíso

El gráfico 4 muestra el ensayo FRAP, que tuvo una desviación estándar: 0,267 sobre la existencia de diferencia en el potencial antioxidante reductor de hierro (comparado con Ácido Gálico), lo que demuestra que hay poca variabilidad del potencial antioxidante reductor de hierro en los extractos (A), donde todos los extractos presentan valores similares entre sí, pero inferiores en comparación al Ácido Gálico (B).

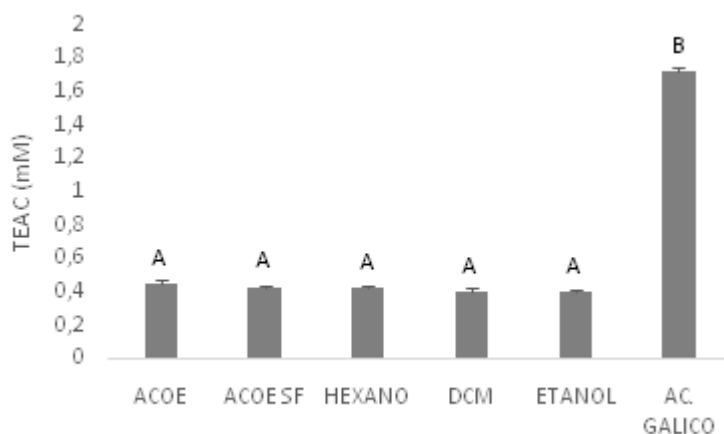


Gráfico 4 Capacidad antioxidante equivalentes al trolox promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde *Escallonia illinita*, en comparación al ácido gálico.

#### 1.4 Prueba Actividad antioxidante método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. Esta prueba se basa en la reducción del radical DPPH por los antioxidantes del extracto de *Escallonia illinita*.

El radical DPPH es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade el extracto de *Escallonia illinita*, sustancia en la que se midió la capacidad antioxidante. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza empleando soluciones patrón de Trolox. Los resultados se expresan como el valor de IC<sub>50</sub>.

El gráfico 5 muestra el ensayo DPPH, el cual presentó una desviación estándar de: 0,0077, sobre la existencia de diferencia en la actividad antioxidante a través del método del radical libre DPPH, en el cual el extracto que mostró mejor actividad antioxidante fue etanol (B), en comparación al ácido gálico (C). Mientras que los extractos restantes (A) se comportaron de manera similar, con menor actividad antioxidante en comparación al etanol.

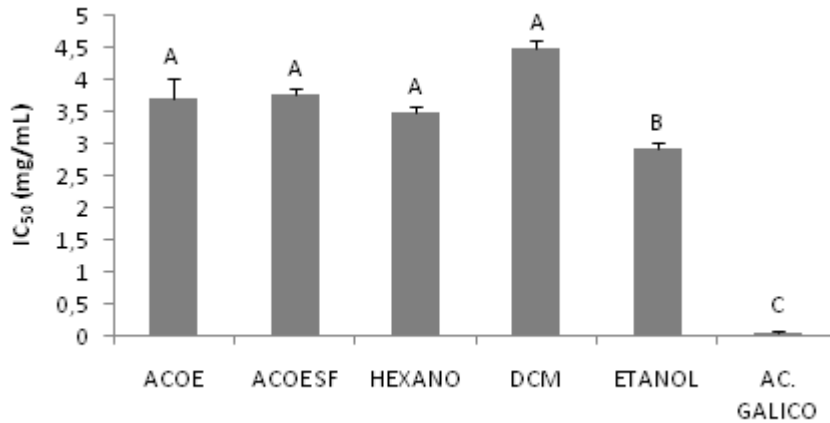


Gráfico 5 Actividad antioxidante método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde *Escallonia illinita*, en comparación al ácido gálico.

### 1.5 Fitoconstituyentes

Polifenoles, flavonoides y antraquinonas son constituyentes de las plantas muy valiosos en la captura de radicales libres, debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos presentes en su estructura.

### 1.6 Prueba Polifenoles

La prueba de polifenoles emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los compuestos fenólicos reaccionan con este reactivo, bajo condiciones alcalinas (ajustadas por la solución de carbonato de sodio a pH > 10).<sup>36</sup> La disociación del protón fenólico permite la formación del ión fenolato, el cual es capaz de reducir el reactivo Folin-Ciocalteu, reacción que ocurre a través del mecanismo de transferencia de electrones. Los compuestos resultantes de color azul tienen un máximo de absorbancia en la región de los 760 nm, la cual es proporcional a la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra.

El Ácido Gálico es un ácido fenólico natural soluble en agua, se utiliza como estándar para curvas de calibración para cuantificar los polifenoles totales, es decir, es un equivalente.

El gráfico 6 muestra el ensayo de Polifenoles que tuvo una desviación estándar de: 0,00001, en el cual destaca mayor concentración de polifenoles en el extracto de ACOE SF.

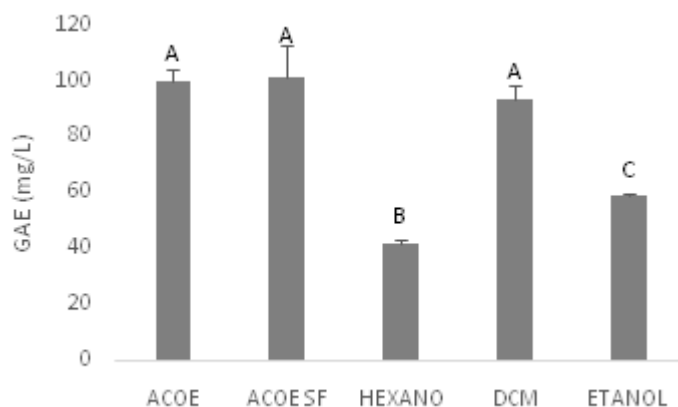


Gráfico 6 Polifenoles totales promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde *Escallonia illinita*, en equivalencia al ácido gálico.

### 1.7 Prueba Flavonoides

La prueba de flavonoides se basó en espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) está basada en la absorción de la radiación UV-Vis por una molécula, causando la promoción de algunos electrones de un estado de energía basal a uno excitado. La absorción del espectro UV-Vis de los constituyentes de *Escallonia illinita* es medido contra un blanco con etanol, usando un espectrofotómetro.

El gráfico 7 muestra el ensayo para medir Flavonoides que tuvo una desviación estándar de: 0,0000, en el cual destaca la mayor concentración de estos en los extractos ACOE, ACOE SF y DCM (A), en comparación al HEX y ET (B).

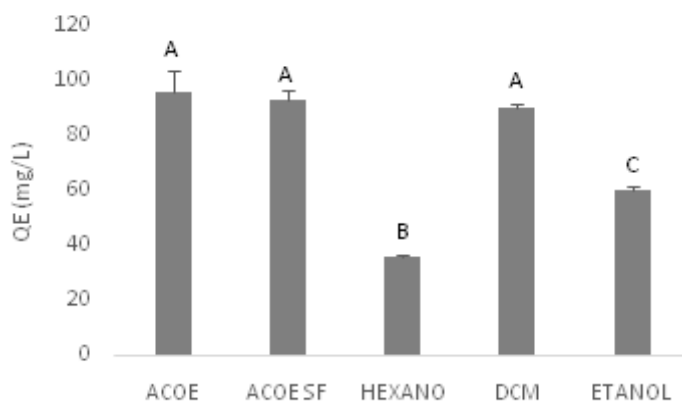


Gráfico 7 Flavonoides promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde *Escallonia illinita*, en equivalencia a la Quercetina.

### 1.8 Prueba Antraquinonas

La prueba de antraquinonas se basó en espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) está basada en la absorción de la radiación UV-Vis por una molécula, causando la promoción de algunos electrones de un estado de energía basal a uno excitado. La absorción del espectro UV-Vis de los constituyentes de *Escallonia illinita* es medido contra un blanco con etanol, usando un espectrofotómetro.

El gráfico 8 muestra el ensayo de antraquinonas que tuvo una desviación estándar de: 0,000067; el que presenta mayor concentración de estas en los extractos ACOE, ACOE SF y HEXANO (A), en comparación a DCM y ET (B).

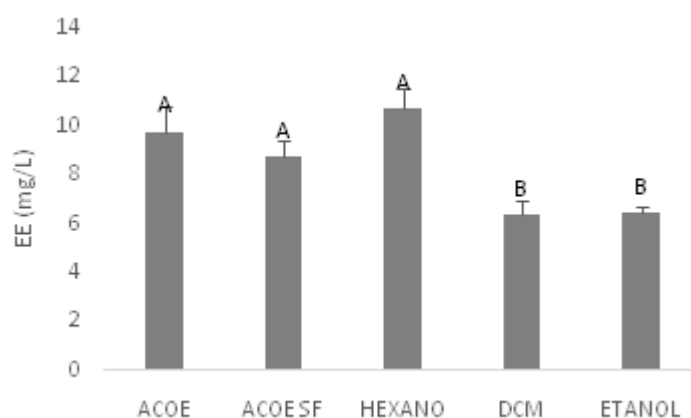


Gráfico 8 Antraquinonas promedio de los extractos (ACOE, ACOE SF, HEXANO, DCM, ETANOL) obtenidos desde *Escallonia illinita*, en equivalencia al Extracto etanólico (EE).

## 2. Efectos sobre la viabilidad celular de los extractos secuenciales (n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol) de *Escallonia illinita* sobre líneas celulares.

### 2.1 Viabilidad de células CON v/s control en líneas celulares

Se analizó la viabilidad celular tras los tratamientos con los extractos secuenciales. En el gráfico 9 se ven los efectos de los extractos sobre la viabilidad celular de CON, las cuales tuvieron una desviación estándar de: 0,242 sobre la existencia de diferencia en la viabilidad celular.

Se observa que en todos los extractos se genera una escasa sensibilidad; excepto en los ensayos HEX, DCM, ACOE y ET a concentración 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Al disminuir la concentración de los extractos se observa una disminución dependiente de la dosis, manteniéndose una disminución significativa de la viabilidad celular a concentración 5  $\mu\text{g/mL}$  en los extractos DCM y ACOE. A concentraciones menores no se observan efectos significativos de ninguno de los extractos estudiados en la línea celular CON. Presentando con un valor de F ratio de 1,426.

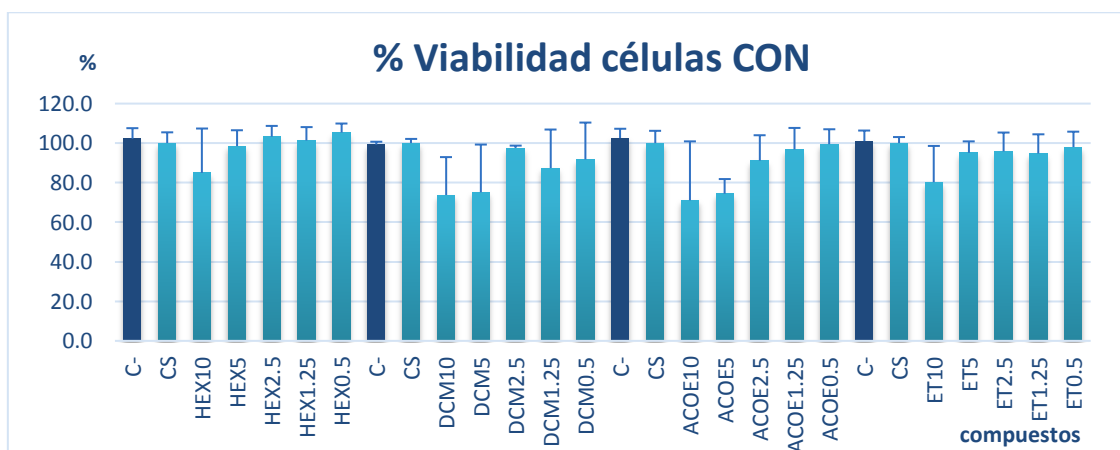


Gráfico 9 Efectos de los extractos secuenciales obtenidos desde *Escallonia illinita*, sobre la viabilidad celular en las líneas celulares CON. En las células tratadas con cinco diferentes volúmenes (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125  $\mu\text{g/mL}$ ) de los extractos se cuantificó la viabilidad celular en relación con el control (DMSO 0.1% final).

## 2.2 Viabilidad de células MCF-7 v/s control en líneas celulares

Se analizó la viabilidad celular tras los tratamientos con los extractos secuenciales. En el gráfico 10 se ven los efectos de los extractos sobre la viabilidad celular de MCF-7, las cuales tuvieron una desviación estándar de: 0,636 sobre la existencia de diferencia en la viabilidad celular.

Se observa que en todos los extractos se genera una alta sensibilidad a mayor concentración; donde destaca el ensayo DCM a concentración 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que provocó mayor citotoxicidad (80%). En el caso de la prueba con ET a concentración 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se evidencia un menor efecto citotóxico (aprox. 35%). Al disminuir la concentración de los extractos se observa una disminución dependiente de la dosis, manteniéndose una disminución significativa de la viabilidad celular a concentración 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los extractos DCM y ACOE. Presentando un valor de F ratio de 0,5371. A concentraciones menores no se observan efectos significativos de ninguno de los extractos estudiados en la línea celular MCF-7.

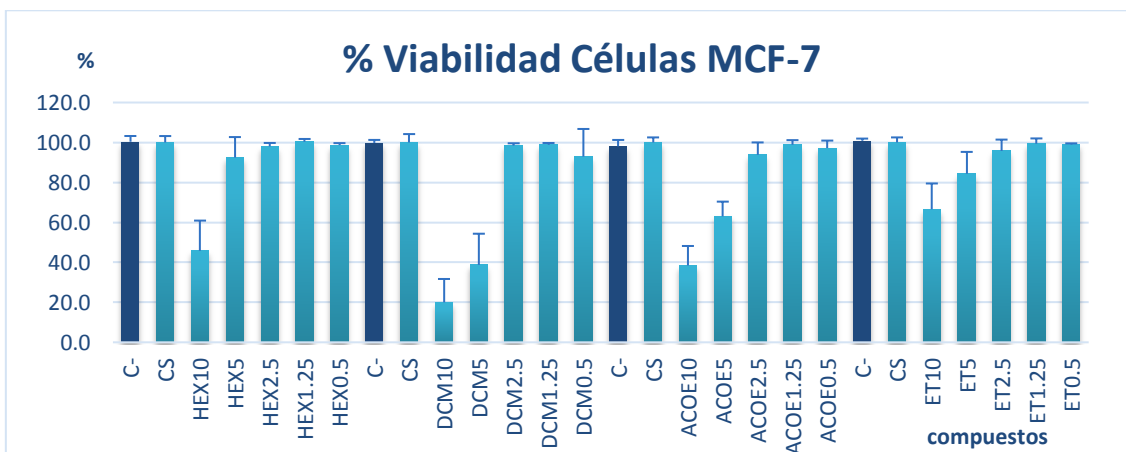


Gráfico 10 Efectos de los extractos secuenciales obtenidos desde *Escallonia illinita* sobre la viabilidad celular en las líneas celulares MCF-7. En las células tratadas con cinco diferentes volúmenes (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los extractos se cuantificó la viabilidad celular en relación con el control (DMSO 0.1% final).

## 2.3 Viabilidad de células HeLa v/s control en líneas celulares

Se analizó la viabilidad celular tras los tratamientos con los extractos secuenciales. En el gráfico 11 se ven los efectos de los extractos sobre la viabilidad de la línea celular HeLa, las cuales tuvieron una desviación estándar de: 0,165 sobre la existencia de diferencia en la viabilidad celular.

Se observa que en todos los extractos se genera una alta sensibilidad a mayor concentración; donde destacan los ensayos HEX y DCM a concentración 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que provocaron mayor citotoxicidad (aprox. 60% en ambos casos). En el caso de las pruebas ACOE y ET a concentraciones 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se evidencia un menor efecto citotóxico.

Al disminuir la concentración de los extractos se observa una disminución dependiente de la dosis, manteniéndose una disminución significativa de la viabilidad celular a concentración 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los extractos DCM y ACOE. Presentando un valor de F ratio de 0,1647. A concentraciones menores no se observan efectos significativos de ninguno de los extractos estudiados en la línea celular HeLa.

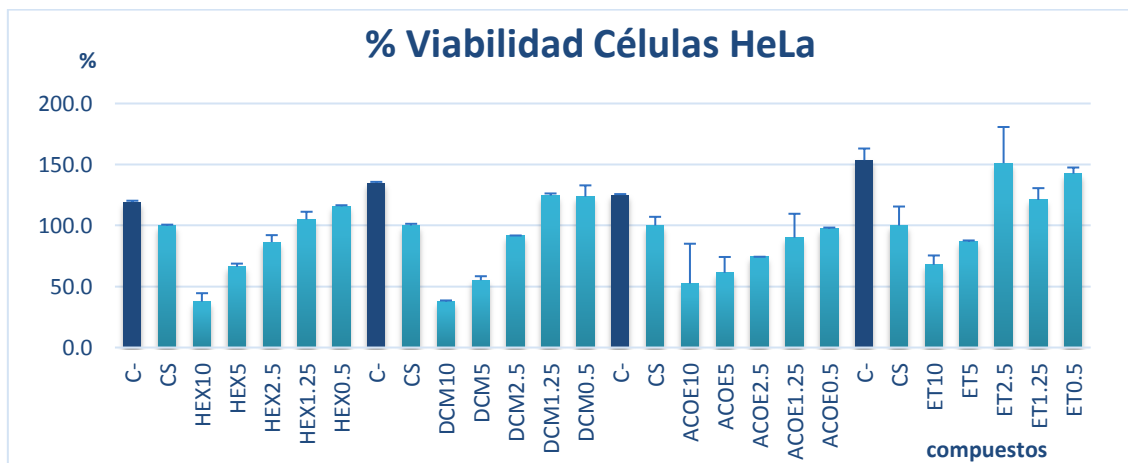


Gráfico 11 Efectos de los extractos secuenciales obtenidos desde *Escallonia illinita* sobre la viabilidad celular en las líneas celulares HeLa. En las células tratadas con cinco diferentes volúmenes (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los extractos se cuantificó la viabilidad celular en relación con el control (DMSO 0.1% final).

## XII. Discusión

De acuerdo con los resultados logrados en el estudio de la especie *Escallonia illinita* se pudo establecer que los extractos de esta especie presentan actividad citotóxica sobre líneas celulares cancerígenas, siendo visibles los efectos tanto sobre las células de cáncer de mama (MCF-7), como las células de cáncer cérvico uterino (HeLa).

Se monitorizó, a través del lector de placas, la viabilidad celular tras los tratamientos con los diferentes extractos secuenciales de la especie *Escallonia illinita*, en cuanto a la actividad citotóxica de esta especie sobre las líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino, destacando una alta citotoxicidad a concentraciones 50 µg/mL en todos los extractos secuenciales, Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo y Etanol, siendo mayor la sensibilidad en los extractos DCM a concentración 50 µg/mL, en ambas líneas celulares, en relación al control (DMSO 0.1% final); pero en relación a los resultados IC<sub>50</sub>, los extractos que presentaron mayor actividad en las línea celulares HeLa y MCF-7 fue acetato de etilo, con un valor de 11,8 y 23,4 µg/mL respectivamente.

En comparación con la actividad que mostraron las células de colon (CON), las que presentaron escasa sensibilidad en los extractos secuenciales en general, pero de igual forma destaca un mayor efecto sobre la viabilidad celular a concentración 50 µg/mL en todos los extractos secuenciales en relación con el control (DMSO 0.1% final), a su vez presentó el mejor valor de IC<sub>50</sub> en el extracto ET >100 µg/mL. Lo que demuestra que la efectividad de los extractos de *Escallonia illinita* presentaron efectividad selectiva, ya que sobre células tumorales de cáncer de mama y cérvico uterino redujeron su viabilidad de forma significativa, pero no así en las células sanas de colon, donde la sensibilidad fue escasa.

En relación con actividad citotóxica de *Escallonia illinita*, se puede comparar con estudios previos realizados en Chile, uno con la planta Mitique, estudio donde se concluye que Mitique, pese a disminuir la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama y cérvico uterino como se esperaba, este no es selectivo, ya que presenta citotoxicidad en células no tumorales, no así la

actividad presentada por *Escallonia illinita*, que si fue selectiva; y otro con los derivados de Safrol, estudio que demostró los efectos citotóxicos y selectivos sobre las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA MB-231, sin efectos en la línea celular no tumoral.<sup>35</sup>

En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio de capacidad antioxidante de la especie *Escallonia illinita*. Se monitorizó esta actividad a través de diferentes pruebas, en base a las cuales se pudo establecer que *Escallonia illinita* presenta actividad antioxidante.

Se comparó la capacidad antioxidante de *Escallonia illinita*, por el generado por Trolox en iguales condiciones, esto a través de la prueba TRAP, donde destacó con mayor capacidad antioxidante el extracto HEX. DCM y ET presentaron buena capacidad antioxidantes, pero menor en comparación con HEX. Acetato de etilo junto con ACE SF, presentaron escasa capacidad en comparación con HEX. Con una desviación estándar: 0,000. Por lo tanto, *Escallonia illinita* genera un aumento del Potencial Reactivo Total. Este potencial se puede comparar con el producido por el Maqui, el cual se estudió en Chile en cuanto al efecto protector del consumo de Maqui en eritrocitos irradiados en individuos sanos y cómo cambian los parámetros normales en función de la dosis expuesta, se evaluó la prueba TRAP, donde se obtuvo que el consumo de Maqui genera un aumento en el potencial Reactivo Total en muestras de eritrocitos irradiados.

En cuanto a la prueba FRAP, que mostró la capacidad reductora de *Escallonia illinita*, en general presentó poca variabilidad en el potencial antioxidante, los extractos se comportaron de manera similar entre sí (ACOE, ACOE-SF, HEX, DCM y ET), pero con efectos inferiores al Ácido Gálico, con una desviación estándar: 0.267, en general esta capacidad antioxidante se puede comparar con la capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivadas. En un estudio realizado en Chile, se analizó la capacidad antioxidante de estas a través del método FRAP, siendo el Maqui la fruta que presentó mayor capacidad antioxidante dentro del grupo de alimentos estudiados con 12,323  $\mu\text{molesFe}/100\text{g}$ , con una desviación estándar 0,168<sup>37</sup>.

Además, se realizó la prueba DPPH, el cual mide la capacidad de los extractos de *Escallonia illinita* para reducir la concentración inicial de DPPH al 50%, destacando con mejor actividad antioxidante ET, en comparación al Ácido Gálico. El resto de los extractos se comportaron de manera similar con menor actividad antioxidante que el extracto Etanólico. Desviación estándar 0,0077.

Se midieron de igual forma los fitoconstituyentes (constituyentes de plantas valiosos en la captura de radicales libres) presentes en los extractos secuenciales de *Escallonia illinita*; presentando una alta concentración de polifenoles en el extracto ACE SF, actividad inusual, debido a que lo esperable es que se presente mayor concentración de polifenoles en ET, con una desviación estándar 0,00001.

La concentración de polifenoles es comparable con la concentración que presenta el Maqui. En un estudio que se realizó en Chile para la elaboración y evaluación del jugo de maqui, en el cual se midió la concentración de polifenoles totales del jugo del Maqui, el cual arrojó una concentración de 829,22 mg 100 mL<sup>-1</sup>, con una desviación estándar de 25,86 en el jugo de Maqui con azúcar y de 993,21 mg 100 mL<sup>-1</sup>, con una desviación estándar de 54,87 en el jugo de Maqui sin azúcar<sup>38</sup>.

Los flavonoides se presentaron en mayor concentración en los extractos ACE, ACE SF y DCM (extractos semipolares), en comparación con HEX y ET, siendo esta actividad inusual, debido a que en esta prueba lo esperable es que se presente mayor concentración en ET, con una desviación estándar: 0,0000.

En cuanto a las antraquinonas se presentaron en mayor concentración en los extractos ACE, ACE SF y HEX, en comparación a DCM y ET, destacando mayor concentración de antraquinonas en los extractos apolares que en los polares, con una desviación estándar: 0,000067.

Es en base a nuestra hipótesis diagnóstica “Los extractos secuenciales de *Escallonia illinita* presentan potencial actividad citotóxica y antioxidante”, que podemos afirmar que los extractos de esta planta sí presenta potencial actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer cérvico uterino (HeLa), siendo una efectividad selectiva, ya que esta actividad citotóxica fue mayor sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama y cérvico uterino, no así en el grupo control de células de

colon (CON), donde presentaron escasa actividad. Pero pensar en un posible tratamiento sobre estas líneas celulares implicaría realizar investigaciones con mayores fracciones y con compuestos puros de *Escallonia illinita*.

En cuanto al efecto antioxidante, presentó resultados significativos e inesperados; presentando alto potencial antioxidante reactivo total, alta capacidad reductora del ion férrico y buenas concentraciones de fitoconstituyentes; si bien en comparación al Maqui, la capacidad antioxidante es menor, aun así, es destacable, por lo que se podría pensar en el tratamiento con extractos de *Escallonia illinita* para favorecer el potencial antioxidante exógeno.

### XIII. Conclusiones

Mediante este estudio se concluye que los extractos de *Escallonia illinita* poseen efectos antioxidantes y antitumorales en las líneas celulares de cáncer de mama y cáncer cérvico uterino.

La efectividad antitumoral se vio reflejada en los resultados de las pruebas de citotoxicidad realizadas en las líneas celulares CON, MCF-7 y HeLa. En estos estudios se estimó que existe un potencial citotóxico en todos los extractos, siendo el más influyente el extracto de ACOE ya que presentaba un menor valor  $IC_{50}$ . Destaca además la posible selectividad de las células cancerígenas, ya que en las líneas CON el valor de  $IC_{50}$  es considerablemente más elevado, demostrando el poco efecto sobre las células no tumorales.

En esta área, de citotoxicidad, los resultados son beneficiosos, pero no concluyentes, en este sentido es necesario la realización de otros estudios para la determinación del correcto uso de estas propiedades en tratamientos de cáncer de mama o cérvico uterino.

Las pruebas antioxidantes dejaron en evidencia una actividad antioxidante favorable, especialmente ante la utilización del extracto n-hexano. Esto se traduce en un claro potencial reactivo total, alta capacidad reductora de ion férrico y buenas concentraciones de fitoconstituyentes. Estos resultados, a pesar de no ser mayores a los niveles de especies como Maqui, demuestran una destacable actividad antioxidante que reafirma la posibilidad de usar esta planta medicinal en el tratamiento de las patologías antes mencionadas.

## XIV. Bibliografía

1. MARCIA AVELLO L.a, ISABEL CISTERNAS F.b. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev. méd. Chile, v.138, 1288-1293.  
[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872010001100014&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98872010001100014&script=sci_arttext&tlng=en)
2. Organización Mundial de la Salud. (2014). Cáncer; Datos y cifras sobre el cáncer; Enfermedades no transmisibles: perfiles de países 2014. 1 de febrero de 2018  
<http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
3. Organización Mundial de la Salud. Temas de Salud; Cáncer. Desde:  
<http://www.who.int/topics/cancer/es/>
4. Ministerio de Salud; Octubre 2016. Estrategia Nacional de Cáncer. Chile 2016. Desde:  
<http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/10/Estrategia-Nacional-de-Cancer-version-consulta-publica.pdf>
5. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. Int J Med Sci 2012; 9(3):193-199. doi:10.7150/ijms.3635. Desde:  
<http://www.medsci.org/v09p0193.htm>
6. J.I. Elejalde Guerra. (jun. 2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. An. Med. Interna (Madrid), vol.18 no.6. Desde:  
[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-71992001000600010](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010)
7. Environmental Health Fact Sheet. (Junio del 2012). ¿Qué es el Estrés Oxidativo? Junio del 2012, de University of Michigan. Desde:  
[http://www.cva.itesm.mx/biblioteca/pagina\\_con\\_formato\\_version\\_0ct/apaweb.html](http://www.cva.itesm.mx/biblioteca/pagina_con_formato_version_0ct/apaweb.html)
8. Lucía Constanza Corrales MSc, Maira María Muñoz, Ariza. (Diciembre 2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y

- consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Scielo, vol.10. Desde:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>
9. Cap. Justo R. Venereo Gutiérrez. (Febrero 2002). DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES. Rev Cubana Med Milit, vol. 31 Desde: [http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31\\_2\\_02/MIL09202.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf)
10. Elejalde Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. An Med Interna (Madrid) 2001; 18: 326-335. Desde: <http://scielo.isciii.es/pdf/ami/v18n6/revision1.pdf>
11. Octavio Maldonado Saavedra, Eric Nahúm Jiménez Vázquez, Mario Roberto Bernabé Guapillo Vargas, Guillermo Manuel Ceballos Reyes, Enrique Méndez Bolaina. (Octubre 2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev Med UV, vol. 10 n 2. Desde: [https://www.uv.mx/rm/num\\_anteriores/revmedica\\_vol10\\_num2/articulos/radicales.pdf](https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf)
12. Fundación para la excelencia y la calidad de la Oncología. Generalidades en Oncología (s.f.). Extraído el 03 de Noviembre de 2017. Desde: <https://www.fundacioneco.es/wp-content/uploads/2014/04/1.Generalidades.pdf>
13. Sociedad Americana contra el Cáncer. 2014. Signos y síntomas del cáncer. Extraído el día 04 de Nov. 2017. Desde: [https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/senales-y-sintomas-del-cancer.html#escrito\\_por](https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/senales-y-sintomas-del-cancer.html#escrito_por)
14. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (Septiembre, 2017). ¿Qué es el cáncer de seno? de American Cancer Society. Desde: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>
15. Guía Clínica. Cáncer de Mama. Santiago: MINSAL, 2015, 32-51
16. Prieto, M. M. (2011). Epidemiología del Cáncer de mama en Chile. Revista Médica Clínica Las Condes, 22.
17. Peralta, O. (2002). Cáncer de mama en Chile: Datos

- epidemiológicos. Revista chilena de obstetricia y ginecología, 67.
18. Mesa G, Matute G, Estrada M, Ocampo A, Restrepo C, Estrada J. (Agosto de 2011). Cáncer mamario en hombres. Rev Colomb Cir. , vol. 26 n4, 293-307. Desde:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcci/v26n4/v26n4a7.pdf>
19. HHS.Gov – Departamento de Salud y Servicios Humanos. (Febrero de 2017). Enfermedades de transmisión sexual (ETS), El VPH y los hombres: Hoja informativa. Julio de 2017, de Centros para el control y la prevención de enfermedades. Desde:  
<https://www.cdc.gov/std/spanish/vph/stdfact-hpv-and-men-s.htm>
20. Libia Rivas Suárez. (2011). CÁNCER DE PENE. Rev Med Cos Cen, vol. 68. Desde:  
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2011/rmc113c.pdf>.
21. Ministerio de Salud. Noviembre 2015. Guías Clínicas AUGE Cáncer Cérvico Uterino. Desde:  
<http://www.bibliotecaminsal.cl/wp/wp-content/uploads/2016/04/GPC-CaCU-Final.PLdocx.pdf>
22. Castro, J. M. B., Peralta, L. R. A., Chung, C. E. L., & Fung, W. F. (2015). Tasa de supervivencia y libre enfermedad en pacientes con cáncer cervicouterino. Instituto Oncológico. Revista Médica de Panamá-ISSN 2412-642X, 34.
23. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. (Marzo, 2015). Tipos comunes de tratamiento para el cáncer. Cirugía. De American Cancer Society. Desde:  
<https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/despues-del-diagnostico/tratamientos-comunes-contr-el-cancer.html>
24. American Society of Clinical Oncology (ASCO) (Mayo, 2017). Qué es la terapia dirigida. Desde:  
<https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atenci%C3%B3n-del-c%C3%A1ncer/c%C3%B3mo-se-trata-el-c%C3%A1ncer/qu%C3%A9>

[es-la-terapia-dirigida](#)

25. Breastcancer.org. Taxol. 1 de Septiembre de 2016. Extraído el 04 de Nov. de 2017. Desde <http://www.breastcancer.org/treatment/druglist/taxol>
26. Breastcancer.org. Doxil. 1 de Septiembre de 2016. Extraído el 04 de Nov. 2017. Desde <http://www.breastcancer.org/treatment/druglist/doxil>
27. ATC. Fluorouracilo. 27 de Abril de 2016. Extraído el 04 de Nov. 2017 desde <https://www.vademecum.es/principios-activos-fluorouracilo-101bc02>
28. Breastcancer.org. Cytoxan. 01 de Septiembre de 2016. Extraído el 04 de Nov. de 2017. Desde: <http://www.breastcancer.org/treatment/druglist/cytoxan>
29. Breastcancer.org. Metotrexato. 01 de Septiembre de 2016. Extraído el 04 de Nov. de 2017. Desde: <http://www.breastcancer.org/treatment/druglist/methotrexate>
30. Akerele, 1993; Sheldon et al., 1997; Shrestha y Dhillon, 2003; Katewa et al., 2004. Desde: <https://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16618/1/bermudez2005.pdf>
31. Alexis Bermúdez<sup>1</sup>, María A. Oliveira-Miranda<sup>2</sup> y Dilia Velázquez. (Ago. 2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. INCI, Caracas, v.30 n.8. Desde: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442005000800005](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005).
32. Maqui: propiedades, beneficios para la salud, efectos secundarios y dosis recomendada. Junio 2016. Desde: <https://www.nutrioptima.com/guia/hierbas/maqui-propiedades-beneficios/>
33. Metabolitos secundarios de Escallonia illinita. R Garcia, S. Erazo, A. Canepa, I. Lemus. Facultad de ciencias quimicas y farmaceuticas Universidad de Chile, An. real acad. Farm. 1990 56: 539
34. Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología.

Orlando Muñoz, Marco Montes, Tatiana

Wilkomirsky; Universidad de Chile; 1999; p 117-119. Desde:

<https://books.google.cl/books?id=cuviT1SKao8C&pg=PA117&lpg=PA117&dq=escallonia+illinita&source=bl&ots=BpocAM3Gi3&sig=-7ePCqFVZOaRjWrFcc1fwFWflyA&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi30bTLogXXAhXGI5AKHfewDF8Q6AEIzAN#v=onepage&q=escallonia%20illinita&f=false>

35. Héctor Araya L., Carolina Clavijo R. y Claudia Herrera. (Caracas dic. 2006). Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivadas en Chile. ALAN, v.56, n.4.
36. Andrés Cofré Martínez. (Chile, 2015). Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de Jugo de Murtilla (Ugni molinae Turcz) Obtenido por Condensación de Vapor. Desde: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2015/fac675d/doc/fac675d.pdf>
37. Tania Hevia Cisternas, Anibal Mac- Lean de León, Manuel Mandiola León (Chile, 2017). Efecto del consumo de Maqui (Aristotelia Chilensis) sobre los niveles de estrés oxidativo en eritrocitos irradiados de individuos sanos. Universidad de Valparaíso, Tecnología Médica.
38. Ximena Araneda; Elisa Quilamán; María Martínez; Daniza Morales. (2014). Elaboración y evaluación de jugo de maqui (Aristotelia chilensis (Mol.) Stuntz) por arrastre de vapor. Scientia Agropecuaria, vol.5 no. 3. Desde: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172014000300005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172014000300005&script=sci_arttext)

## XV. Anexos

### Anexo 1:

Valores IC<sub>50</sub> de los extractos secuenciales de *Escallonia illinita*.

Extractos de <i>Escallonia illinita</i>		Líneas de Colon IC <sub>50</sub> µg/mL	Líneas Cérvico uterinas IC <sub>50</sub> µg/mL	Líneas mamarias IC <sub>50</sub> µg/mL
Nombre Abreviatura		CON	HeLa	MCF-7
n- hexano <b>HEX</b>	IC <sub>50</sub>	43.7	24.8	48.7
	DST	12.3	15.6	10.5
Diclorometano <b>DCM</b>	IC <sub>50</sub>	18.3	19.0	24.1
	DST	7.5	4.9	12.3
Acetato de Etilo <b>ACOE</b>	IC <sub>50</sub>	60.2	11.8	23.4
	DST	18.3	1.2	0.7
Etanol <b>ET</b>	IC <sub>50</sub>	>100	22.9	32.1
	DST	-	1.4	3.2

**Tabla 1.** IC<sub>50</sub> de los extractos secuenciales de *Escallonia illinita*.

## Anexo 2:

### Efectos de Citotoxicidad

		%_de_Viabilidad HeLa	%_de_Viabilidad CON	%_de_Viabilidad MCF-7
N Válidos		28	28	28
N perdidos		0	0	0
Media		0,518	2,273	2,359
Desviación estándar		0,165	0,242	0,636
ANOVA	F	0,1647	1,426	0,5371
	P	0,9192	0,2597	0,6614

**Tabla 2.** Datos estadísticos de citotoxicidad de los extractos sobre las líneas celulares HeLa, CON y MCF-7