



Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de obstetricia y
puericultura
Casa central



“CONOCER EL EFECTO QUE PRODUCEN SOBRE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS DE LAUREL Y TORONJIL CUYANO Y COMPARAR SU ACCIÓN CONJUNTA E INDIVIDUALMENTE EN ENSAYOS IN VITRO REALIZADOS DURANTE EL AÑO 2016.”

Tesis para obtener el grado de licenciado/a en Obstetricia y Puericultura

Profesor Guía:
Dr. Joan Villena García
Doctor En Ciencias Biológicas
Biología Celular Del Cáncer Y Muerte Celular
Universidad De Valparaíso
Chile

Estudiantes:
Francisca Cortés
Javiera Delgado Almuna
Nancy Delgado Leiva
Cinthia Torres Gómez
Yasmín Tiemann Lazo

Reñaca, 2017.

Dedicatoria

A nuestros padres y familias, por su apoyo y confianza en estos 5 años de formación profesional, brindándonos los recursos y enseñanzas que nos llevaron a cumplir nuestros objetivos como estudiantes.

A nuestros profesores(as) y tutores(as), quienes suponen los cimientos de nuestro desarrollo profesional, compartiendo sus conocimientos y experiencias para completar este duro camino.

“La preocupación por el hombre y su destino siempre debe ser el interés primordial de todo esfuerzo técnico. Nunca olvides esto entre tus diagramas y ecuaciones.”

Albert Einstein

Índice	Páginas
I. Título.....	1
II. Resumen.....	2
a. Palabras Claves	3
III. Introducción.....	4
IV. Marco Teórico.....	7
V. Materiales y Métodos.....	21
a. Análisis estadísticos.....	22
b. Pruebas no Paramétricas de Friedman.....	23
c. Conclusión Estadística Final.....	28
d. Justificación.....	28
VI. Estudio y Diseño de Investigación.....	29
a. Procedimientos.....	30
b. Población de Estudio.....	31
c. Variables.....	34
d. Limitaciones.....	34
VII. Resultados.....	34
VIII. Discusión y Conclusiones	38
IX. Referencias Bibliográficas.....	39

Índice de Figuras

Figura 1.....	11
Figura 2	13
Figura 3.....	13
Figura 4	16
Figura 5	19

Índice de Tablas

Página

Tabla I.....	25
Tabla II.....	25
Tabla III.....	26
Tabla VI.....	26
Tabla V.....	27
Tabla VI.....	27
Tabla VII.....	31
Tabla VIII.....	32
Tabla IX.....	33
Tabla X.....	35
Tabla XI.....	36
Tabla XII.....	37

Índice de Gráficos

Gráfico I.....	35
Gráfico II.....	36
Gráfico III.....	37

I. Título

“CONOCER EL EFECTO QUE PRODUCEN SOBRE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS OBTENIDOS DE LAUREL Y TORONJIL CUYANO Y COMPARAR SU ACCIÓN CONJUNTA E INDIVIDUALMENTE EN ENSAYOS IN VITRO REALIZADOS DURANTE EL AÑO 2016.”

Tesis para obtener el grado de licenciado/a en Obstetricia y Puericultura

Profesor Guía:

Dr. Joan Villena García

Doctor En Ciencias Biológicas

Biología Celular Del Cáncer Y Muerte Celular

Universidad De Valparaíso

Chile

Estudiantes:

Francisca Cortés

Javiera Delgado Almuna

Nancy Delgado Leiva

Cinthia Torres Gómez

Yasmín Tiemann Lazo

Reñaca, 2017.

II. Resumen

Bajo los criterios de la medicina natural de plantas, existen amplios estudios entorno a la fitoquímica, que se enfoca en el descubrimiento de los principios activos y su desarrollo a nivel de organismo, quienes buscan tratamientos efectivos frente a enfermedades de gran prevalencia como es el cáncer.

El objetivo de este estudio es analizar, caracterizar y determinar el comportamiento de extractos etanólicos naturales de las plantas Toronjil Cuyano y Laurel frente a cultivos en placa de células HeLa, la evolución de cáncer cérvico uterino y células de epitelio de colon CoN.

Los extractos etanólicos seleccionados, Laurel (*Laurus nobilis*) y Toronjil cuyano (*Marrubius vulgare*), se prepararon por inmersión de las hojas obtenidas en etanol durante 72h. Posteriormente el solvente fue evaporado obteniéndose el extracto seco a partir del cual se preparó una solución madre en etanol (50 mg/ml), de la cual se obtuvo la solución de trabajo con la cual se realizaron los tratamientos.

Para los procedimientos de laboratorio fueron seleccionadas células de cáncer cérvico uterino HELA y células de epitelio de colon CoN. Las células antes de ser utilizadas fueron lavadas y tripsinizadas antes de llegar al 90-100% de confluencia y resuspendidas en medio de cultivo. Luego, fueron sembradas a una densidad celular de $3-5 \times 10^3$ cel/pocillo, e incubadas a 37°C. Finalmente fueron tratadas con los dos extractos a concentraciones distintas durante 72 horas.

Ambas plantas aisladamente mostraron un potente efecto citotóxico en el crecimiento de las células cancerígenas (Cérvico Uterino y Colon CoN), siendo el extracto de toronjil el que mostró un efecto mayor respecto del laurel. Esta acción tendió a aumentar al utilizar ambos extractos juntos.

a. Palabras Claves

CaCu: Cáncer Cérvico Uterino. Enfermedad que se caracteriza por la transformación de las células ubicadas en el cuello del útero.

Células HeLa: Tipo particular de cultivo celular usadas para la investigación a partir de una muestra de cáncer cérvico uterino de Henrietta Larcks (HeLa) en 1951.

Células de colon CoN: Células absortivas y secretoras presentes en el epitelio del intestino grueso, son especializadas en la secreción de moco y en la absorción de sales y agua.

Laurel (*Laurus Nobilis*): Arbusto Familia Lauraceae, es una especie perenne espontánea de la península Ibérica.

Toronjil Cuyano (*Marrubium Vulgare*): Hierba siempre-verde originaria de áreas de la cuenca del mediterráneo que se emplea con fines medicinales desde tiempos remotos.

Extractos Etanólicos: Producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales. Éste puede realizarse en un medio etanólico u acuoso.

Alcohol Etílico: Líquido incoloro, inflamable y soluble en agua, que se obtiene de la fermentación de productos naturales ricos en hidratos de carbono, es componente fundamental de las bebidas alcohólicas y tiene, además, múltiples aplicaciones en la industria.

III. Introducción

La utilización empírica de hierbas y plantas como agentes medicinales es ampliamente conocida y transmitida a través de generaciones en diversas culturas alrededor del mundo. [1] La evidencia más temprana del uso de los seres humanos de las plantas para la curación se remonta al período de Neanderthal [2], sin embargo, esta práctica tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, cribado por el rigor científico y sometido a diversos ensayos clínicos, farmacológicos, químicos y toxicológicos, en busca de los principios activos que expliquen legítimamente el uso terapéutico de una planta en particular.

Tanto en su singular estructura química, como la diversa actividad biológica que caracteriza a los principios activos que constituyen a las plantas y hierbas naturales, abren nuevos e innumerables campos de investigación y exploración respecto a sus usos químico-farmacológico, fármaco-cinético y clínico. [3]

Si bien se conocen las propiedades curativas de ciertas plantas, no todas las especies vegetales cuentan con estudios acerca de sus constituyentes bioactivos y su aplicación en el área terapéutica.

Las plantas son fundamentales en el desarrollo de la medicina moderna. Su acción preventiva o curativa se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo. Estas sustancias se conocen como principios activos y, generalmente, son producto del metabolismo secundario de la planta. [4] El interés actual en la medicina herbolaria y la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas, sumado al desarrollo de las ciencias -donde tiene gran protagonismo la fitoquímica- hizo posible reconocer y aislar los principios activos de variadas especies, que a su vez se han reproducido sintéticamente en laboratorios para la fabricación de diversos medicamentos.

El estudio de las sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal se conoce como farmacognosia, y el efecto que ocasionan esas sustancias en el

organismo se estudia en farmacología. “La fitoquímica permite detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las plantas”. [5] Lo que se refiere estrictamente a la fitoterapia, la acción farmacológica de una determinada planta medicinal depende en la mayoría de los casos de varios principios activos y no solo de uno aislado, existiendo sinergismos y acciones coadyuvantes entre ellos. [6]

Luego de un extenso período donde la industria farmacéutica se dedicó meramente a la fabricación de fármacos sintéticos, se ha generado un cambio cualitativo donde se ha dado mayor énfasis en la búsqueda de nuevos medicamentos de origen herbario. En países desarrollados, la industria químico-farmacéutica tiene preferencia por las sustancias naturales puras o sus derivados semi-sintéticos, en relación con los extractos vegetales de composición química compleja. [7] Se calcula que 80% de la población mundial confía en la medicina herbolaria para el cuidado de sus necesidades de salud. [8]

“Con base en estos hechos, la OMS ha promovido el estudio de las plantas como fuente de medicamentos, dentro del programa “Salud para todos en el año 2000” (Akerlele, 1985). Durante la conferencia de Alma-Ata, celebrada en 1978, se acordó impulsar la documentación y evaluación científica de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, abriendo las puertas al diálogo entre la medicina tradicional y la moderna, sobre la base de que las prácticas peligrosas se eliminarían y sólo se promovería lo que fuese seguro y eficaz (Albornoz, 1993; Akerlele, 1993)”. [9]

La mayoría de los remedios herbolarios se obtienen por extracción alcohólica, acetónica o acuosa, y en ocasiones sin manipulación, de semillas, hojas, tallo, corteza o raíces de estas plantas. [10] Los extractos son preparados farmacéuticos que por condiciones de higiene y preparación en su fabricación y envasado se realizan en laboratorios especializados. [11]

En este estudio se pretende estudiar mediante la experimentación con bases científicas, el efecto o propiedades anticancerígenas que pudieran tener 2 plantas medicinales seleccionadas.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, lo cual representó 7,6 millones de muertes (alrededor del 13%) a nivel de la población mundial en el año 2008. Se estima que, es probable además que las muertes aumenten, alcanzando la cifra de 13,1 millones en 2030. [12] Uno de los tipos más frecuentes de cáncer que se encuentra en las mujeres es el cáncer de cuello de útero. La principal causa de éste va ligada al virus del papiloma humano (HPV), El VPH puede infectar a las células de la superficie de la piel, y aquellas que revisten los genitales, el ano, la boca y la garganta. [13]

A través de investigaciones científicas se ha comprobado que la bioactividad de los distintos componentes presentes en plantas, hierbas y especias pueden reducir el riesgo de cáncer a través de diferentes actividades biológicas como la actividad antioxidante, capaces de suprimir bio-activación carcinógena. [14] Un informe presentado por la Annual Reports of Medicinal Chemistry en 1995 indica que alrededor del 60 % de los fármacos aprobados para el cáncer y como agentes antiinfecciosos son de origen natural. [15]

Según lo expuesto, mediante un estudio de tipo experimental se escogió estudiar la acción citotóxica de 2 extractos etanólicos de plantas medicinales, laurel y toronjil cuyano, ya sea de manera individual y/o conjunta en células de cáncer cérvico uterino (HeLa).

IV. Marco Teórico

El cáncer corresponde al crecimiento desmedido de células anormales o malignas dentro del organismo, también denominado carcinoma.

El material genético de una célula muta, lo que ocasiona que éstas crezcan de forma descontrolada, se dividan de forma veloz y no realicen apoptosis o muerte natural programada, que sería lo normal.

Existen diversos tipos de cáncer, los cuales pueden originarse y causar daño en cualquier tejido u órgano.

El desarrollo de cáncer puede estar relacionado con una multiplicidad de factores de riesgo como por ejemplo el consumo nocivo de alcohol, la sobreexposición a los diversos tipos de radiaciones existentes incluyendo la emitida por el sol a través de los rayos UV, el contacto con toxinas ambientales o químicos dañinos como el benceno y todos los pertenecientes a esa familia, mutaciones génicas, entre otros; aun teniendo conocimiento de muchos de los agentes causales, existe una enorme cantidad de cánceres de los que se desconoce su etiología.

La sintomatología de esta enfermedad, dependerá de la ubicación del tumor o del tipo de cáncer que se esté manifestando; habiendo incluso ciertos tipos que son asintomáticos, o los síntomas se presentan una vez avanzada la enfermedad.

Existen una variedad de pruebas y exámenes para detectar el cáncer, identificar su tipo, localización y estadio; algunas de ellas son biopsia de tumor o médula ósea, radiografía, CSC (conteo sanguíneo completo), resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones o computarizada.

Una vez diagnosticada esta enfermedad se debe iniciar el tratamiento, y al igual que los exámenes existen varios tipos de tratamiento; estos se adecuarán al tipo y estadio del cáncer. Algunos de estos son: cirugía ya sea para extirpación de

ganglios o tumor, quimioterapia, radioterapia, o la combinación de estos dos últimos radio-quimioterapia. [16]

Cáncer cérvico uterino

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, habitualmente de lenta y progresiva evolución en el tiempo, que se suceden generalmente en etapas. En grado variable evolucionan a cáncer *in situ* cuando compromete sólo a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal.

En Chile, el cáncer cérvico uterino constituye un importante problema de salud pública. El año 2008 fallecieron 636 mujeres, ocupando el sexto lugar entre las muertes por cáncer en la mujer y el primer lugar en tasa de años de vida potencialmente perdidos con 129 por 100.000 mujeres. De acuerdo a las estadísticas oficiales del Ministerio de Salud, la tasa total de mortalidad en el año 2008 alcanzó a 7,5 por 100.000 mujeres y la tasa ajustada para el mismo año fue de 5,9 por 100.000 mujeres. [17] Al comparar la tasa observada de mortalidad entre los años 1987 y 2008 en mujeres entre 25 y 64 años, grupo objetivo del Programa Nacional de Cáncer Cérvico Uterino, se observa un descenso de un 57,3%. La mortalidad en mujeres menores de 25 años es ocasional y el ascenso se produce a partir de los 45 años, aumentando progresivamente. El 48,4% de las muertes se produce en mujeres entre 35 y 64 años. [18]

Anatómicamente el cuello del útero se delimita por dos estructuras, el orificio cervical externo, o exocérvix y el endocérvix.

El exocérvix consta de un epitelio plano estratificado.

El endocérvix consta de un epitelio cilíndrico simple.

En ocasiones existen modificaciones de la unión escamocolumnar, que es donde se une el exocérnix con el endocérnix, debido a la migración de células, ya sea del endocérnix al exocérnix (ectropion) o del exocérnix al endocérnix (entropión).

Dentro de las patologías cérvico uterinas se encuentran las hiperplasias, dentro de la cual la más frecuente es el pólipo endocervical, que es una hiperplasia de la mucosa, generalmente pediculado que se encuentra con mayor frecuencia en el endocérnix.

También se encuentra el cáncer cérvico uterino (CaCu), el cual consiste en una alteración de las células epiteliales del cérvix, que tiene una evolución lenta y progresiva.

Dentro de los más frecuentes se encuentran el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma

* Carcinoma de células escamosas

Se clasifican en:

- Moderadamente diferenciado: es la más frecuente, también conocido como carcinoma sólido de células grandes sin diferenciación córnea, son células con abundante citoplasma, moderado pleomorfismo celular y escasa queratinización.
- Bien diferenciado: también corresponde a células grandes, pero presenta diferenciación córnea, poseen menor pleomorfismo, poseen una disposición celular en tela de cebolla.
- Poco diferenciado: corresponde a células pequeñas, sin diferenciación córnea, poseen escaso citoplasma, tienen un comportamiento más agresivo.

* Adenocarcinoma y carcinoma adenoescamoso

Posee una estrecha relación con el virus papiloma, específicamente con el tipo 18.

El carcinoma escamoso es poco frecuente en el cuello uterino.

El carcinoma cérvico uterino se puede presentar en distintas formas macroscópicas:

- Solevado (exofítico): poco frecuente, aparición de una masa poliposa hacia el exocérvix.
- Ulcerado: es más frecuente, lesión rojiza, poco delimitada.
- Infiltrante (endofítico): el exocérvix se observa normal anatómicamente, pero el cuello está aumentado en consistencia, puede comprometer toda la circunferencia cervical, labio anterior y posterior.

Diseminación

Se pueden presentar en 2 formas:

- Local: más frecuente, producida hacia vagina y útero, hacia vejiga, uréteres y recto.
- Metástasis linfática: hacia ganglios pelvianos, ilíacos internos y externos, principalmente, poco frecuente en los sacros, ilíacos comunes y paraaórticos

Factores de riesgo

1. Relaciones sexuales de inicio precoz
2. Múltiples parejas sexuales
3. Parejas sexuales de alto riesgo (promiscuos, condilomas peneanos, relaciones sexuales con otra mujer con carcinoma cérvico uterino).

Células HeLa

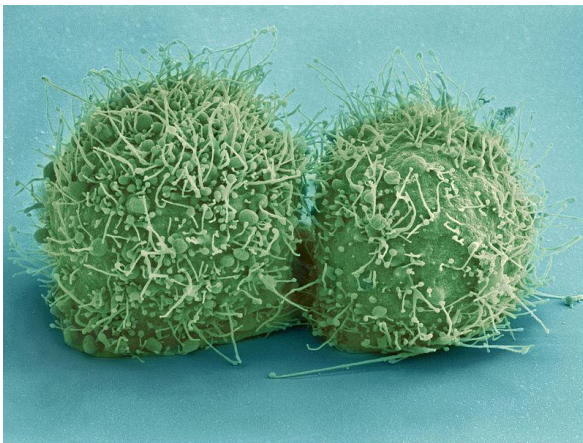
Linaje celular que se caracteriza por tener una larga vida y ser prolífero, poseen la capacidad de crecer fácil y rápidamente en placas de cultivo.

Estas células son denominadas “inmortales” debido a que tienen la capacidad de dividirse un ilimitado número de veces en un cultivo en el que existan las condiciones fundamentales para la supervivencia de las células.

Debido a la proliferación anormalmente veloz de las células HeLa es que se han utilizado para la investigación de cáncer.

Figura 1. Microfotografía de células HeLa

Figura 1



Laurel (*Laurus nobilis*)

Producto de la gran incidencia que ha surgido en estos últimos años con respecto a casos asociados al cáncer cérvico uterino, existe un inminente interés en el desarrollar estudios en búsqueda de diferentes métodos para entender sus causales y combatir dicha patología. Por tanto buscamos una contribución en base a la compilación de datos y análisis tanto cuantitativos como cualitativos a partir de la medicina basada en las propiedades de plantas que demuestren potencial en función a su composición química, en donde nos focalizamos principalmente en el estudio del Laurel (*Laurus nobilis*) y el Toronjil cuyano (*Marrubium vulgare*).

El laurel (*Laurus nobilis*) perteneciente a la familia Lauraceae, es una especie perenne espontánea de la península Ibérica y cultivada en muchos jardines,

utilizada como ornamentación. Esta especie es de tamaño arbustivo o arbóreo, dioico, es decir que posee las estructuras reproductivas de ambos sexos, pero separadas en diferentes individuos, y esto se puede diferenciar ya que los laureles masculinos no dan fruto. Esta especie raramente sobrepasa los 10 m de altura, posee tallo lampiño de corteza lisa, madera de color amarillo pálido y ramas erguidas. Las hojas son persistentes, coriáceas, pecioladas, aromáticas, con bordes ligeramente ondulados y de colores verde oscuro, brillantes, de 6 y 12 cm de largo por 2.5 a 4 cm de ancho. Las flores son de color blanco amarillento, agrupándose en inflorescencias axilares. Los frutos son unas bayas carnosas ovoidales de color verde, que pasan a pardo negruzcos cuando están maduros, con superficie rugosa una vez desecados y contienen en su interior una semilla libre. [19] Esta especie es cultivada y utilizada tanto para fines medicinales como culinarios. [20]

Las hojas de laurel son ricas en aceite esencial- el cual no solo se limita a las hojas, sino que se encuentra en todas las partes aéreas de la planta, incluidos los frutos- cuya composición varía dependiendo su origen geográfico, pero siempre como constituyente principal 1,8 – cineol (entre el 30 a 60%), además lo constituyen aproximadamente 120 compuestos, entre ellos 47 reportados por primera vez en laurel. Podemos destacar entre los compuestos volátiles, tanto los frutos como las hojas contienen aceites volátiles ricos en cineol, geraniol, linalol, taninos y otras sustancias. [21]

Figura 2



Figura 2. Laurel en Otto Wilhelm Thomé

Figura 3



Figura 3. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. 1885

Componentes activos y acción farmacológica:

El aceite esencial de laurel posee: cineol, pineno, linalol, alfa-terpineol acetato, sabineno, limoneno, terpineno, metil eugenil y canfeno. Los frutos poseen más aceite esencial que las hojas. 3% de aceite esencial en frutos y 1% en hojas.

Alcoholes: eugenol, se encuentra en las hojas.

Ácidos orgánicos: acético, fórmico, pelargónico, propiónico (hojas), cinámico, láurico (frutos).

Las hojas también contienen pequeñas dosis de lactonas sesquiterpénicas (costunólida y laurenobiólida) y taninos.

Minerales: manganeso, calcio, potasio, fósforo, magnesio, hierro, sodio, zinc. [22]

Las hojas de esta especie contienen aproximadamente entre 1 a 3% de aceite esencial, destacando entre sus componentes el cineol (30 – 70%) linalol, eugenol, lactonas sesquiterpénicas (costunilida, desacetil laurenobiólida y alcaloides

isoquinolíticos de estructuras relacionadas a las del boldo (aporfinoídes y su precursor, reticulina). [23]

Para que este aceite esencial sea de alta calidad y de una mayor riqueza en sus componentes, se prefieren aquellas hojas que presenten un alto grado de exposición a la insolación, como ocurre en aquellas hojas que están más orientadas hacia el sur que hacia el norte. Otros usos de las hojas frescas o secas del laurel son para condimento culinario, que aromatiza escabeches y otros platos. También utilizadas en infusiones que tradicionalmente por vía oral, han sido tratamiento sintomático de trastornos digestivos como carminativos, antiespasmódico gástrico e intestinal y astringente en caso de diarrea. La utilización en dolores reumáticos, en alteraciones respiratorias tales como calmante de la tos cuando es aplicado como cataplasma, ya que el cineol, presente en las hojas de laurel, juega un papel principal por sus virtudes antibacterianas, antitusivas y anti bronquíticas. A través de investigaciones mediante ensayos experimentales realizados tanto *in vitro* como *in vivo* se han demostrado las propiedades antioxidantes, citotóxicas, inmunomoduladoras, antibacterianas, analgésicas, anti inflamatorias y antiagregantes plaquetarios del *Laurus nobilis*. [24]

En base a los siguientes estudios suponemos que el Laurel posee potencial para tratamientos contra el cáncer cérvico uterino producto de tres alcoholes primordiales que destacan en la composición de su aceite esencial, correspondientes a Linalol, Geraniol y Cineol, donde acorde a recientes estudios, basados en los tratamientos herbarios chinos tradicionales a partir del uso de Plantaginaceae (familia de plantas dicotiledóneas, a las cuales también pertenece el Laurel) han presentado un potencial frente al tratamiento de la infección viral y la terapia contra el cáncer, esto se debe a que el linalol y el ácido p-cumárico son dos compuestos biológicamente activos los cuales pueden aislarse de las plantaginaceae. Producto de ello, el linalol particularmente, ha presentado una bioactividad en sus efectos citotóxicos en las células cancerosas como los efectos generados a través de la apoptosis y la actividad inmunorreguladora, buenos efectos inhibidores contra células del cáncer

de mama, colorrectal y de hígado, donde también en análisis realizados del ciclo celular confirmo que tanto el linalol y el ácido p-cumarico pueden conducir la apoptosis producto de un aumento de concentración de células en la fase G1. Adicionalmente se demostró que el linalol presenta capacidades de regulación bidireccional que induce la respuesta inmune celular Th1 en células T-47D. [25]

El Geraniol y otros compuestos de la familia de los monoterpenos encontrados comúnmente en aceites esenciales tanto de frutas como hierbas han sido sugeridos para la representación de una nueva clase de agentes en la quimio-prevención del cáncer. En donde estudios basados en la carcinogenesis del colon avalan que el geraniol en concentraciones de 400 μ M (micro molar) causa una inhibición cercana al 70% del crecimiento celular, con la acumulación de células en la fase de transición S del ciclo celular como a su vez, la inhibición concomitante de la síntesis del ADN. A diferencia del linalol, con el geraniol no se observaron signos de citotoxicidad o apoptosis. A su vez el geraniol genero la disminución del 50% de actividades enzimáticas clave en la biosíntesis de poliaminas, las cuales presentan un incremento en las fases de crecimiento del cáncer. [26]

El aceite esencial y algunas de sus lactonas sesquiterpénicas han demostrado ejercer citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares humanas. Un ejemplo es una investigación que han demostrado que un extracto de cloroformo de semillas *Laurus nobilis* revela sensibilidad colateral en glicoproteínas que expresan las células tumorales resistentes a múltiples fármacos, por lo tanto podría ser utilizado para eliminar células tumorales multirresistentes expresando glicoproteína P. [27] Otro estudio demuestra que el extracto esencial de *Laurus nobilis* presentó seis lactonas sesquiterpénicas, las cuales resultaron altamente citotóxicas contra la línea celular del cáncer de ovario A2780. [28]

Figura 4. Tabla actividad antitumoral y hepatotoxicidad

Figura 4

Table 2: Antitumor activity and hepatotoxicity (GI₅₀, μg/mL) of different extracts of *Laurus nobilis*. The results are presented as mean ± SD¹.

	MCF7	NCI-H460	HCT15	HeLa	HepG2	PLP2-hepatotoxicity
Origin (O)						
Cultivated	187 ± 12 ^a	83 ± 13	56 ± 1	119 ± 21	185 ± 7	195 ± 85
Wild	88 ± 5 ^b	73 ± 19	44 ± 7	69 ± 9	166 ± 59	114 ± 29
<i>P</i> value (<i>n</i> = 18)	<0.001	0.077	<0.001	<0.001	0.171	<0.001
Extract (E)						
Methanolic	140 ± 50	74 ± 21	47 ± 10	100 ± 41	207 ± 17	99 ± 14
Aqueous	135 ± 53	81 ± 10	53 ± 2	88 ± 11	144 ± 37	210 ± 70
<i>P</i> value (<i>n</i> = 18)	0.773	0.254	0.011	0.242	<0.001	<0.001
O×E						
<i>P</i> value (<i>n</i> = 36)	0.261	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ellipticine	0.91 ± 0.04	1.42 ± 0.01	1.91 ± 0.05	1.14 ± 0.05	3.2 ± 0.5	2.06 ± 0.03

¹Means within a column with different letters differ significantly (*P* < 0.001).

Otro estudio demostró que *Laurus nobilis* inhibe fuertemente la proliferación de las células HeLa como se ve en la Tabla 2 donde se observa que *Origanum vulgare* y *Laurus nobilis* tenían valores de IE, que fueron mayores que uno. Cuando se considera la efectividad de estos extractos sobre células HeLa, se observó que *Laurus nobilis* tenía la más alta toxicidad mientras que *Origanum vulgare* tenía una toxicidad mucho menor. [29]

Toronjil cuyano (*Marrubium vulgare*)

Por otro lado el Toronjil Cuyano o Marrubio Blanco (*Marrubium vulgare*) es una hierba siempre verde, de 30 - 60 cm de alto, blanco-lanosa, pelos simples y ramificados, de sabor muy amargo, tallos erguidos, cuadrangulares, hojas opuestas, aovadas o casi orbiculares, de superficie arrugada, con márgenes con dientes redondeados, de 5 - 6 cm de longitud por 1 - 2,5 cm de ancho. Flores blancas y pequeñas, dispuestas en grupo a lo largo del tallo. Fruto seco contiene 4 semillas ovoides, lisas, menores de 1 mm de longitud. Es una planta originaria del área de la cuenca del Mediterráneo, que se utiliza con fines medicinales desde tiempos remotos. Actualmente crece en prácticamente todos los países de climas cálido y templado del mundo, donde se le encuentra silvestre sobre suelos ricos en nitritos, prados secos, campos, terrenos baldíos y sitios abandonados. En Chile es una maleza que vegeta desde Coquimbo hasta Cautín. [30] [31] [32]

Las flores del toronjil cuyano contienen un principio activo, la marrubina, taninos, y saponinas y se han identificado tres isoflavonas, entre ellas la ladaneina y la scutellarina, la primera con propiedades anti-leucémicas. [33]

Antiguamente se utilizaba para curar la malaria y la tuberculosis, principalmente por sus propiedades beneficiosas en el sistema respiratorio.

Actualmente se le ha dado un uso farmacológico y es cultivado especialmente para eso.

Posee un uso externo e interno en el organismo, que varía según su preparación. La infusión de esta planta, es digestiva, estimulante del apetito, tiene efectos colerético y colagogo; tradicionalmente, además, se le emplea como febrífugo, antidiarreico, en enfermedades respiratorias y dolores menstruales. Con respecto al uso externo de esta planta, es común su empleo en afecciones del cuero cabelludo, para tratar lesiones cutáneas, heridas y quemaduras. Por lo general, uso rústico; sin embargo en farmacias se expende una combinación de marrubio, manzanilla y menta, todas plantas con antecedentes de incidir sobre el metabolismo de las grasas, recomendado para tratar la obesidad. [34]

Dentro de los principios activos que posee el toronjil cuyano se encuentran:

-Marrubina: acción colagoga. [35]

-Taninos: capacidad astringente, antioxidante y antibacteriana. [36]

-Saponinas (saponósidos): agente emulsionante con función similar al jabón, reduce el colesterol. [37]

-Colina: precursora de acetilcolina, participa en la integridad estructural y funciones de señalización para las membranas celulares. Tiene acción antiinflamatoria, consumo alto de colina se asocia a niveles bajos de marcadores inflamatorios. [38]

-Hierro: participa en el proceso de oxigenación tisular junto a la hemoglobina. Ayuda en el metabolismo de diversas células. [39]

-Potasio: contiene propiedades para neutralizar ácidos, participa en el crecimiento y mantenimiento de la masa ósea. Es un electrolito que posibilita la transmisión del impulso nervioso. Permite la relajación del músculo cardíaco luego de la estimulación causada por el Calcio. Contrarresta la acción del Sodio en el alza de las cifras tensionales, es decir, regula la presión arterial. Colabora en la secreción de insulina, síntesis de diversas proteínas, producción de glucógeno, entre otros procesos metabólicos. [40] [41]

-Flavonoides: metabolitos secundarios presentes en las plantas, se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Son los responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz UV del sol, otorgan a la planta un color y olor característicos para atraer a animales polinizadores. Generan protección en la planta en defensa hacia los herbívoros a través de sabores amargos y texturas desagradables. Son encargados de la protección contra los hongos, a través de la pisatina un isoflavonoide que induce la expresión del gen PDA1.

Flavonoides poseen propiedades cardiotónicas (potencia el músculo cardíaco y mejora la circulación), mejoran la resistencia de los capilares, impiden formación de trombos previniendo así diversas enfermedades cardiovasculares, disminuye la concentración de triglicéridos y colesterol en sangre, rol protector del hígado,

protección de la mucosa gástrica a través de propiedades antiulcerosas, actúan también como antioxidantes.

La hesperidina un tipo de flavonoide tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas, los Taninos poseen propiedades vasoconstrictoras, astringentes y antiinflamatorias.

Los isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos, tipos de flavonoides, posee propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. [42]

*Apigenina: antiinflamatoria, antioxidante y antiangiogénica. [43]

*Luteolina: antioxidante y antiinflamatorio. [44]

*Ladaneina: propiedades antileucémicas. [45]

Figura 5. Marrubium vulgare

Figura 5



En base a la literatura presente, establecemos que el Toronjil Cuyano (*Marrubium vulgare*) y el Laurel (*Laurus nobilis*), poseen sustancias químicas albergadas principalmente en sus aceites esenciales (particularmente la familia de los alcoholes), con estructuras compatibles que permiten interactuar en el desarrollo y crecimiento celular donde se ha observado que la presencia de dichas sustancias en concentraciones considerables conducen principalmente a la apoptosis en las primeras etapas del crecimiento celular, por tanto, creemos en su efectividad al combatir la proliferación de células HeLa y CoN, inhibiendo la potencialidad de carcinogénica. A partir de ello, pretendemos determinar los efectos frente a una exposición directa, tanto en dosis individuales como conjuntas, la posible actividad citotóxica de los componentes del Laurel y el Toronjil cuyano obtenidos por medio de extracción en uso de etanol como solvente, ante el crecimiento de células cancerígenas de HeLa y CoN mediante la realización de ensayos *in vitro* permitiendo determinar si existe alguna correlación en su eficacia anticancerígena.

V. MATERIALES Y MÉTODO

1. Vasijas que se usaron para comenzar la maceración de las hojas (Etanol 1 litro por cada tipo de hoja) 2 litros
2. 2 frascos de vidrio de un litro con tapa para maceración de hojas de plantas seleccionadas
3. Discos de papel de filtro.
4. Frascos de 10 ml app para contener extractos etanólicos.
5. Micropipetas de diferente volumen para trasvasijar los extractos etanólicos a los pocillos con cultivos celulares
6. Cabina de flujo laminar para realizar los procedimientos de aplicación de extractos en los pocillos con cultivo celular.
7. El extractor Soxhlet para la extracción de los extractos etanólicos
8. 10 placas para cultivo celular multipocillos
9. Ácido tricloroacético
10. Ácido acético
11. Sulforodamina B
12. Incubador de CO₂ atmósfera
13. Refrigerador
14. Tris base 10 mM
15. Células de cáncer cérvico uterino HeLa
16. Células de epitelio de colon CoN.
17. Software estadístico SPSS para análisis estadístico.

a. Análisis Estadístico

Para otorgar validez a nuestros resultados fue necesario un análisis estadístico, sin embargo, nuestra base de datos no poseía una distribución normal, o más bien, no cumplía con los criterios estadísticos que lo caracterizaran como “normal”.

En estadística, al hablar de normal nos referimos a una distribución de probabilidad determinada. Esta distribución se caracteriza por su simetría alrededor de una media, que coincide con la mediana, además que otras características propias en las cuales no podemos abordar dentro de este estudio.

El hecho de encontrarse en presencia de una distribución normal nos ofrece un abanico de herramientas estadísticas de fácil comprensión y manejo. Caso contrario ocurre con los datos que exponemos; Caracteres morfológicos (como la talla o el peso), o psicológicos (como el cociente intelectual) son ejemplos de variables de las que frecuentemente se asume que siguen una distribución normal. No obstante, y aunque algunos autores han señalado que el comportamiento de muchos parámetros en el campo de la salud puede ser descrito mediante una distribución normal, puede resultar incluso poco frecuente encontrar variables que se ajusten a este tipo de comportamiento.

La cantidad de mediciones realizadas (tratamientos) es otro factor que nos condiciona puesto que para la bioestadística es muy difícil aplicar pruebas con muestras tan pequeñas. Por todo ello se tuvo que ajustar a nuestro estudio la realización de pruebas “No Paramétricas”:

b. Pruebas no paramétricas de Friedman

Esta es una prueba para más de 2 muestras relacionadas, para variables cuantitativas que no tienen una distribución normal o que sean ordinales.

Es paralela a la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA) para muestras relacionadas.

Planteamiento de las hipótesis estadísticas:

En un contraste de hipótesis se establece una hipótesis nula que, habitualmente, dice lo contrario de lo que queremos demostrar. Así, si el valor de significación estadística es menor de valor definido (habitualmente 0,05), rechazamos la hipótesis nula (**H0**) y nos quedamos con la alternativa (**H1**), que dirá precisamente lo que queremos demostrar.

H0: La medición de células vivas es igual por concentraciones de los extractos en la aplicación de los tratamientos.

H1: La medición de células vivas no es igual por concentraciones de los extractos en la aplicación de los tratamientos.

Si la significación estadística que tienen los datos es alta, no se podrá rechazar que la Hipótesis Nula (**H0**) es falsa, lo que nos llevaría a adoptar nuestra hipótesis alternativa, donde afirmamos que las mediciones no son iguales, y por lo tanto, si podremos afirmar nuestra sospecha y declarar que los nuestros resultados son estadísticamente significativos.

Para este fin se compararon los datos muestrales obtenidos en los tratamientos respecto del grupo control (C-), es decir, se contrasta la viabilidad celular sin tratar, versus las muestras ya tratadas, tanto con Laurel, Toronjil y Laurel +Toronjil.

Nivel de significancia (α): 0,05 → Significa que se trabajó con un 95% de confiabilidad.

Zona de rechazo: Con $p < 0,05$ se debe rechazar H_0

Con $p > 0,05$ no se debe rechazar H_0

Los datos fueron trabajados a partir del software estadístico SPSS. La disposición de las tablas fue cambiada sólo por defecto, para facilitar su análisis.

LAUREL

Tabla I

Estadísticos descriptivos

	N° de mediciones	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
C-	7	1783,57	259,29	1434	2246
CS	7	1366,29	830,42	171	2107
L 500	7	479,71	160,42	347	814
L 375	7	490,29	175,86	359	860
L 250	7	463,57	98,77	349	610
L 125	7	1808,14	3473,56	349	9680
L 62.5	7	861,14	290,96	545	1336
L 25	7	1136,71	374,45	670	1516

Resultados:

Tabla II

Estadísticos de contraste

N	7
Chi-cuadrado	43,810
gl	7
Sig. asintót.	0,000

a. Prueba de Friedman

Conclusión: El valor-p es menor a 0,05 ($p=0,000$), por lo tanto se rechazó la hipótesis nula (H_0) y se asumió la hipótesis alternativa (H_1). La medición de células vivas no es igual por concentraciones de los extractos/tratamientos en la aplicación de laurel.

TORONJIL CUYANO

Tabla III

Estadísticos descriptivos

	Nº de mediciones	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
C-	7	1986,71	311,62	1617	2294
CS	7	1973,14	332,66	1402	2341
T 500	7	384,43	219,65	70	793
T 375	7	447,43	176,40	280	808
T 250	7	548,86	160,04	296	758
T 125	7	941,71	471,68	540	1892
T 62.5	7	1446,43	419,17	977	2145
T 25	7	1682,86	597,12	537	2332

Resultados:

Tabla IV

Estadísticos de contraste^a

N	7
Chi-cuadrado	43,810
gl	7
Sig. asintót.	0,000

a. Prueba de Friedman

Conclusión:

El valor-p es menor a 0,05 ($p=0,000$), por lo tanto se rechazó la hipótesis nula (H_0) y se asumió la hipótesis alternativa (H_1). La medición de células vivas no es igual por concentraciones de los extractos/tratamientos en la aplicación de toronjil cuyano.

LAUREL + TORONJIL

Tabla V

Estadísticos descriptivos

	N° de mediciones	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
C-	4	793,75	218,59	531	994
CS	4	736,75	139,27	545	877
T 500	4	168,25	91,30	107	304
T 375	4	156,25	90,35	92	289
T 250	4	238,25	143,33	104	412
T 125	4	204,00	107,12	137	364
T 62.5	4	271,25	154,69	133	477
T 25	4	482,50	217,40	248	744

Resultados:

Tabla VI

Estadísticos de contraste^a

N	4
Chi-cuadrado	24,928
gl	7
Sig. asintót.	0,001

a. Prueba de Friedman

Conclusión:

El valor-p es menor a 0,05 ($p=0,001$), por lo tanto se rechazó la hipótesis nula (H_0) y se asumió la hipótesis alternativa (H_1). La medición de células vivas no es igual por concentraciones de los extractos/tratamientos en la aplicación de laurel más toronjil.

c. Conclusión estadística final:

Se pudo comprobar mediante las 3 pruebas de hipótesis aplicadas, las cuales llegaron al mismo resultado, tanto en el tratamiento con Laurel, Toronjil Cuyano y Laurel +Toronjil, que los datos obtenidos tienen suficiente peso estadístico para refutar la hipótesis Nula y comprobar nuestra Hipótesis “Objetivo”.

d. Justificación

En vista de la baja cantidad de mediciones realizadas, resulta imposible aplicar pruebas estadísticas más específicas, puesto que estas requieren de más datos, es decir, más mediciones, lo que correspondería en este caso a los tratamientos. Por factores de tiempo, dinero y materiales, no fue factible la realización de mayor cantidad de tratamientos por cada extracto y principalmente de los extractos en su acción conjunta.

Las pruebas de significación estadística sirven para comparar variables entre distintas muestras. Si la muestra tiene una distribución normal, se aplican los llamados tests paramétricos, en cambio, si la distribución no puede asumirse como normal, se aplican las pruebas no paramétricas, como fue este caso. También se debe tener en cuenta que los tests paramétricos son más potentes y dan más información que los no paramétricos, por lo que, si pueden usarse, se prefieren.

En general, con pocos datos, es preferible, si no es difícil ni conlleva un alto costo de tiempo y dinero, realizar más determinaciones o mediciones para poder aplicar pruebas paramétricas al lograr una distribución normal. El teorema del límite nos dice que si el tamaño de la muestra es suficiente, la distribución siempre tiende a ser normal, pero este no fue nuestro caso, por lo que se tuvo que aplicar una prueba de acuerdo a los datos que se poseían.

También hay que tener presente que la mayoría de las veces no hay suficiente tiempo y dinero para realizar un número elevado de pruebas para calcular la variancia de la población, por lo que se recurre a la variancia de la muestra.

Es importante tener en cuenta que en las pruebas de significación estadística siempre se plantea la hipótesis nula " H_0 " (no hay diferencias significativas entre los estadísticos de las muestras comparadas), y la hipótesis alternativa " H_1 " (hay diferencias significativas). Se obtiene mucha mayor información cuando se puede rechazar la hipótesis nula, lo que quiere decir que los estadísticos de las muestras que se comparan son diferentes entre sí con una probabilidad mayor del 95%. Si no se puede rechazar la hipótesis nula ($p > 0,05$) se pierde mucha información porque no se puede decir que sean iguales, ni que sean diferentes porque la probabilidad es menor del 95%.

En el análisis realizado se logró refutar la hipótesis nula, donde se comparan las muestras obtenidas en los tratamientos respecto del grupo control (C-), lo que indica que las muestras tratadas no son iguales a las no tratadas y que los valores obtenidos tienen suficiente significancia estadística para afirmarlo, con una probabilidad mayor al 95%.

VI. Estudio y Diseño de Investigación

El tipo de estudio de investigación será analítico y experimental, debido a que se estudiarán los efectos que los extractos etanólicos provocan sobre la población de estudio, específicamente sobre Células HeLa y Células de epitelio de colon CoN.

Durante la investigación se observará si los extractos seleccionados producen algún efecto en la viabilidad de éstas células, ya sea de forma conjunta o individual.

Este experimento se llevará a cabo a través de múltiples ensayos, donde los resultados serán analizados y comparados entre sí, para lograr responder a la hipótesis de investigación planteada.

Las células se someten a distintos procedimientos como preparación, tratamiento y fijación para su posterior análisis.

a. Procedimiento

Iniciamos los procedimientos de laboratorio seleccionando células de cáncer cérvico uterino HELA y células de epitelio de colon CoN. Las células antes de ser utilizadas fueron lavadas y tripsinizadas antes de llegar al 90-100% de confluencia y resuspendidas en medio de cultivo. A través de una suspensión celular homogénea de 1:1 (suspensión celular: 0.4% [wt/vol] azul de tripan) fue utilizada para determinar la concentración (n° células/ml). Como la suspensión celular no presentó un porcentaje elevado de células teñidas con azul de tripan (+5-10%) las células se utilizaron para la realización del experimento.

Las células fueron sembradas a una densidad celular de $3-5 \times 10^3$ cel/pocillo, dependiendo de la línea celular. Luego las células fueron incubadas a 37°C en un incubador con atmósfera de 5% CO₂/95% O₂ y tratadas con los extractos a las concentraciones indicadas durante 72 horas.

Por otra parte los extractos etanólicos de Laurel (*Laurus nobilis*) y Toronjil cuyano (*Marrubius vulgare*) se prepararon por inmersión de las hojas obtenidas de laurel y toronjil cuyano en etanol durante 72h. Posteriormente el solvente fue evaporado obteniéndose el extracto seco a partir del cual se preparó una solución madre en etanol (50 mg/ml) a partir de la cual se obtuvo la solución de trabajo por dilución 1:10 (1 vol. solución de trabajo: 10 vol. agua), cada vez que se realizaron los tratamientos.

Para obtener las concentraciones experimentales, se procedió a aplicar en los pocillos de las placas de 96 diferentes volúmenes de la solución de trabajo (10-7.5-5-2.5-1.25-0.5) que corresponde a las concentraciones de 500-375-250-125-62.5-25 ug/ml, respectivamente. En el caso de los tratamientos combinados se preparó una mezcla 1:1 de las soluciones de trabajo utilizándose posteriormente los volúmenes anteriormente indicados. Las células fueron tratadas a 37°C para continuar con el siguiente procedimiento.

Tras los tratamientos se llevó a cabo la fijación de células con ácido tricloroacético al 50% (25µl/pocillo) a 4°C durante 1 hora. Las células fueron lavadas con agua destilada, 3 veces por inmersión. Posteriormente las células fueron teñidas con sulforodamina B al 0.1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelta en 1% ácido acético (50 µl/pocillo), durante 30 minutos aproximadamente, y lavadas nuevamente, 3 veces con ácido acético al 1% (100-150 µl/pocillo) para eliminar el colorante en exceso no unido. Dicho colorante unido a proteína se solubiliza con 100 µl de 10 mM Tris base no tamponada (100 µl/pocillo).

Finalmente, una vez realizado el marcaje, se analizó la densidad celular en un lector de placas a una longitud de onda de 540 nm, en donde los datos son expresados como media \pm desviación estándar de seis pocillos, para un N de más de tres experimentos independientes. Dichos datos a obtener deben ser en tiempo cero (T0), con control negativo (C-), con control de solvente (DMSO o etanol) y poseer diferentes concentraciones de compuestos. El porcentaje de viabilidad se calcula en relación al control de solvente.

b. Población de Estudio

La determinación de universo Población celular de Células HeLa y Células de epitelio de colon CoN.

c. Variables

Objetivo 1

Determinar actividad citotóxica de los extractos etanólicos naturales de Laurel y Toronjil Cuyano sobre la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa.

Tabla VII

Nombre	Definición	Dimensión	Indicador	Subindicador
Efectividad del Laurel	Acción citotóxica de extracto etanólico de laurel sobre la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa.	Concentración inhibitoria del 50% (IC50).	Alta. Media. Baja.	ug/ml
		Concentración de extracto aplicado.	500-375-250 125-62.5-25	ug/ml
Efectividad Toronjil cuyano	Acción citotóxica de extracto etanólico de toronjil cuyano sobre la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa.	Concentración inhibitoria del 50% (IC50).	Alta. Media. Baja.	ug/ml
		Concentración de extracto aplicado.	500-375-250 125-62.5-25	ug/ml

Objetivo 2

Comparar los efectos de extractos etanólicos naturales de Laurel y Toronjil sobre la viabilidad celular de la línea de cáncer cérvico uterino HeLa.

Tabla VIII

Nombre	Definición	Dimensión	Indicador	Sub indicador	
Eficacia del extracto de laurel versus extracto de toronjil cuyano	Capacidad de lograr la supresión del crecimiento de la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa con extracto etanólicos natural de laurel versus del toronjil cuyano, a través de parámetros de crecimiento.	Concentración inhibitoria del 50% (IC50).	Baja. Media. Alta.	Extracto laurel	Extracto toronjil cuyano
				2 1 0	2 1 0
		Concentración de extractos aplicados.	ug/ml		

Objetivo 3

Determinar eficacia del extracto del Laurel en combinación con extracto de Toronjil Cuyano sobre la viabilidad celular de la línea de cáncer cérvico uterino HeLa.

Tabla IX

Nombre	Definición	Dimensión	Indicador	Sub indicadores	
Eficacia del extracto de laurel <i>versus</i> la del laurel en combinación con toronjil cuyano	Capacidad de lograr la supresión del crecimiento de la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa con extracto etanólicos natural de laurel <i>versus</i> la del laurel en combinación con toronjil cuyano, a través de parámetros de crecimiento.	Concentración inhibitoria del 50% (IC50).	Baja. Media. Alta.	Extracto laurel	Extracto laurel + toronjil cuyano
				2 1 0	2 1 0
		Concentración de extractos aplicados.	ug/ml		
Eficacia del extracto de toronjil cuyano <i>versus</i> la del laurel en combinación con toronjil cuyano	Capacidad de lograr la supresión del crecimiento de la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa con extracto etanólicos natural de toronjil cuyano <i>versus</i> la del laurel en combinación con toronjil cuyano, a través de parámetros de crecimiento.	Concentración inhibitoria del 50% (IC50).	Baja. Media. Alta.	Extracto toronjil cuyano	Extracto laurel + toronjil cuyano
				2 1 0	2 1 0
		Concentración de extractos aplicados.	ug/ml		

d. Limitaciones

- Tiempo de cultivo
- Tiempo de procedimientos
- Tiempo de reunión del equipo de investigación
- Dificultad en la obtención de líneas celulares
- Costo del material de investigación
- Búsqueda de bibliografía referencial
- Recolección de plantas medicinales de tratamiento
- Tiempo de obtención de extractos de plantas

VII. Resultados

Las siguientes tablas y gráficos plasman a modo general los resultados obtenidos a partir de los tratamientos aplicados a las células de cáncer cérvico uterino, con los extractos etanólicos de Toronjil cuyano (*Marrubium vulgare*), Laurel (*Laurus Nobilis*), y la combinación de Laurel y Toronjil.

En las tablas se aprecia los resultados de distintas intervenciones, clasificadas por fecha, con un promedio estimado, una Desviación Estándar (DS) y finalmente el porcentaje de viabilidad de la población celular, presentada en los tratamientos según sus distintas concentraciones, comenzando con la dosis mayor (500 µg/ml).

Tabla Laurel

Tabla X

	05.05	09.05	12.05	12.05	16.06	20.08	09.09	Promedio	DS	%
C-	1.725	1.732	1.726	1.434	1.979	1.643	2.246	1.784	259,3	100
CS	1.769	206	1.505	171	2.107	2.071	1.735	1.366	830,4	77
L 500	375	814	427	347	519	382	494	480	160,4	27
L 375	391	860	359	381	527	401	513	490	175,9	27
L 250	351	610	349	426	532	444	533	464	98,8	26
L 125	354	9.680	349	469	609	489	707	1.808	3.473,6	101
L 62.5	568	1.336	545	682	889	1.111	897	861	291,0	48
L 25	779	1.327	670	787	1.511	1.367	1.516	1.137	374,4	64

Gráfico I

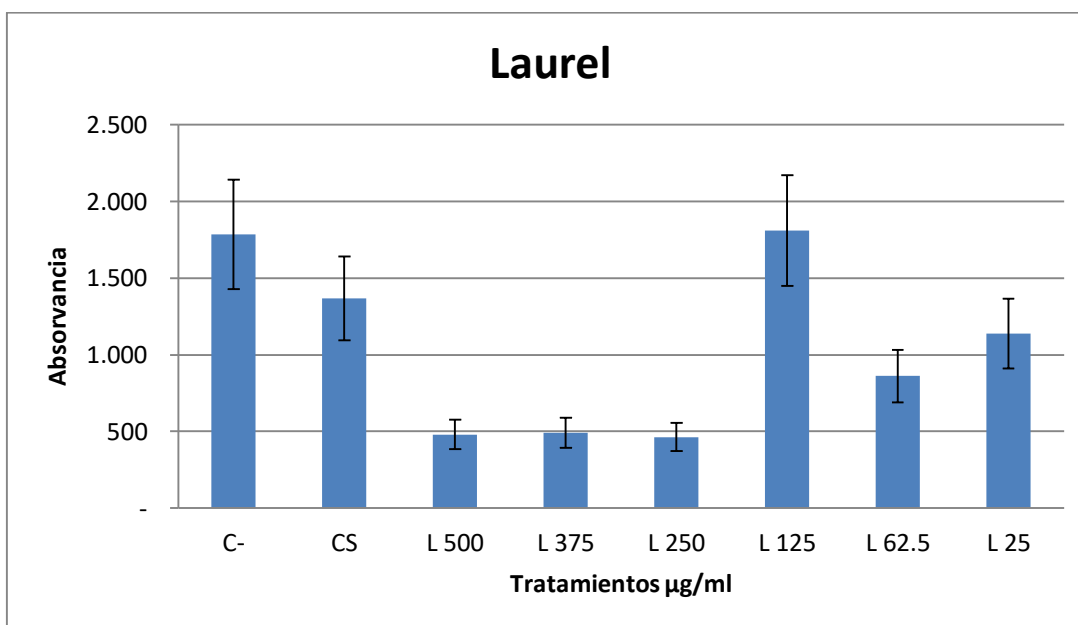
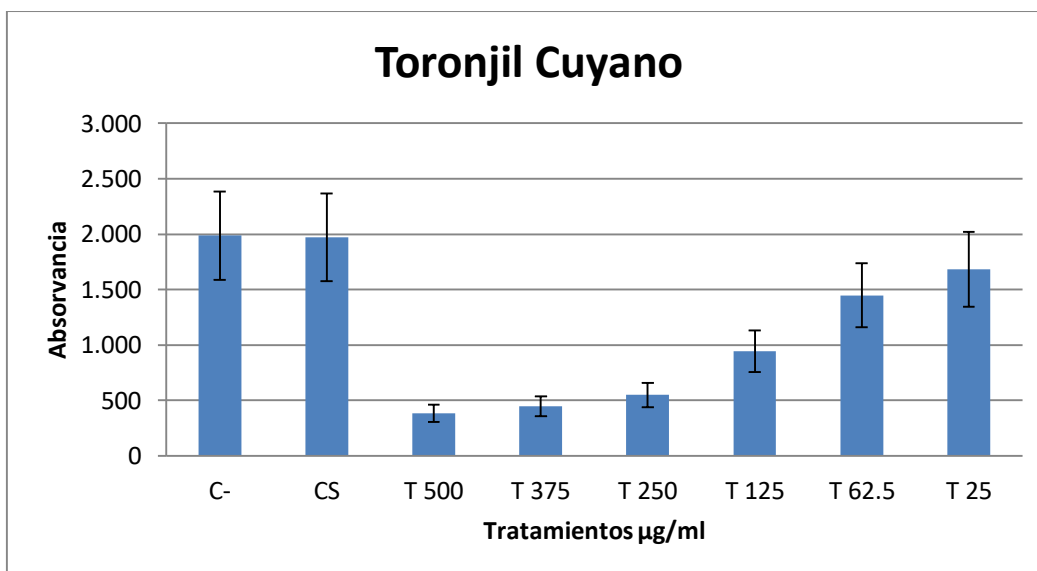


Tabla Toronjil Cuyano

Tabla XI

	05.05	09.05	12.05	12.05	16.06	20.08	09.09	Promedio	DS	%
C-	2.168	2.238	1.714	1.617	2.294	1.641	2.235	1.986,7	312	100
CS	2.256	2.341	1.688	1.402	2.175	1.961	1.989	1.973,1	333	99
T 500	316	793	387	286	361	70	478	384,4	220	19
T 375	322	808	359	280	510	414	439	447,4	176	23
T 250	632	627	296	468	644	417	758	548,9	160	28
T 125	1.010	1.892	540	578	1.033	588	951	941,7	472	47
T 62.5	977	2.145	1.132	1.202	1.781	1.250	1.638	1.446,4	419	73
T 25	1.698	2.332	1.403	537	2.234	1.772	1.804	1.682,9	597	85

Gráfico II

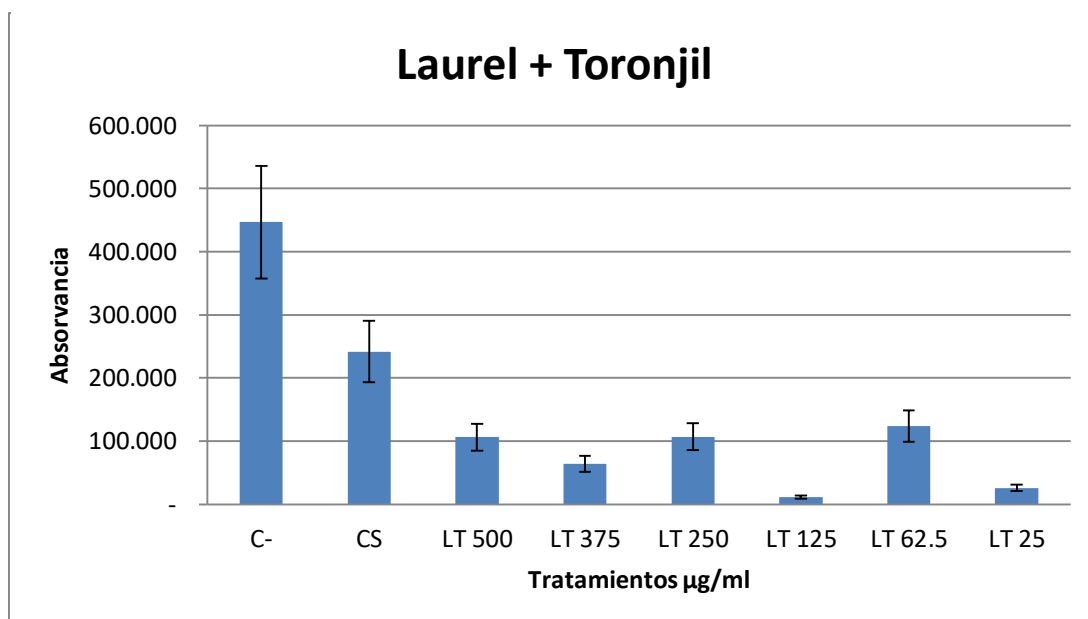


Laurel + Toronjil

Tabla XII

	22.08 A	22.08 B	22.08 C	22.09	Prome dio	DS	%
C-	531	697.5 83	95.17 5	993.5 83	446.71 8	477.72 3,7	10 0
CS	5.447	7.477	77.67 5	876.8 33	241.85 8	424.64 6,5	54
T 500	106.9 17	1.363	304.1 67	12.57 5	106.25 6	140.17 5,9	24
T 375	9.183	136.4 17	2.893	107.5 83	64.019	68.026 ,1	14
T 250	10.42 5	1.393	2.893	412.4 16	106.78 2	203.79 4,5	24
T 125	13.71 7	16.02 5	364	15.47 5	11.395	7.419, 7	3
T 62.5	13.31 7	3.007	477.4 17	1.743	123.87 1	235.75 4,3	28
T 25	2.4 77	56.3 83	7.4 43	37.3 75	25.9 20	25.496,3	6

Gráfico III



VIII. Discusión y Conclusiones

Las plantas seleccionadas no poseían estudios científicos específicos relacionados a su citotoxicidad con las células tumorales trabajadas en este estudio.

Ambas plantas aisladamente mostraron cierto efecto citotóxico en el crecimiento de las células cancerígenas (Cérvico uterino y Colon CoN), siendo el Toronjil Cuyano quien mostró un efecto mayor respecto del laurel, presentando porcentajes de viabilidad menores que los registrados por el último. Esta acción tendió a aumentar al utilizar ambos extractos juntos, por lo que se evidencia que existe un sinergismo en sus bioactivos, el cual aumenta su potencial citotóxico frente a las células tratadas.

En relación a la actividad de los extractos utilizados de forma individual, también se pueden ver diferencias, donde la actividad citotóxica del Laurel parece ser más efectiva incluso en concentraciones/dosis más bajas, las cuales mantienen la viabilidad celular en disminución durante las 3 primeras dosis (500, 375 y 250 ug/mL), mientras que en el Toronjil evidenciamos que el menor porcentaje de viabilidad, o en su defecto, la mayor mortalidad celular, se consigue sólo con el tratamiento más concentrado (500 ug/mL), y luego la viabilidad vuelve a aumentar conforme la dosis va bajando.

La relevancia estadística de los datos fue comprobada y apoya la hipótesis buscada, sin embargo, no nos entrega una confiabilidad del 100%, pues la cantidad de mediciones logradas no son suficientes para la aplicación de pruebas estadísticas más detalladas. A pesar de ello, esto es posible evitarlo en un nuevo estudio, con la aplicación de mayor cantidad de mediciones/tratamientos.

Los ensayos experimentales desarrollados en el laboratorio durante este estudio sólo nos confirman la notoria citotoxicidad de estos extractos al utilizarlos de forma conjunta, sin embargo no se tiene clara la acción y composición de los bioactivos que participan en esta. Frente a esto, sería recomendable la realización de estudios fitoquímicos de mayor profundidad, mediante técnicas modernas que permitan la separación de compuestos más puros, su identificación, y la evaluación de su actividad, con el fin de identificar los activos propios de cada planta que participan en la mortalidad de las células cancerígenas, puesto que podría representar evidencias experimentales en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales y en la terapia contra el cáncer.

IX. Referencias Bibliográficas

- [1] [3] [23] O. Muñoz, M. Montes, T. Wilkomirsky. Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. 2ª Edición. Colección Textos universitarios Monografías. (2004) Santiago, Chile. Editorial Universitaria.
- [2] S. Kleiner., La verdadera naturaleza de las hierbas. Phys Med Deportes, Journal of the American Dietetic Association (2005) [Consultado el: 13/04/16], vol. 99, no 2, p. 200-206.
- [4], [5] A. Torres M , G.Ibarra M, M. Martínez, Díaz de Salas M., Universidad Autónoma de Zacatecas, Universidad Autónoma de Querétaro, ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PLANTAS MEDICINALES PROPIAS DEL ESTADO DE QUERÉTARO [internet], Memorias del Programa Verano de la Ciencia 2008, México, (2008) . [Consultado el: 13/04/2016.] Disponible en: <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2008/10VeranoRegionCentro/34UAZAlonsoTorresIbarraMartinez.pdf>
- [6] B. Vanaclocha V, Cañigueral, S. Cañigueral F.; Fitoterapia: vademécum de prescripción; 4ª Edición, Editorial Elsevier, Masson, S.A. Barcelona, (2003), España.
- [7] N. Sharapin, Edit. R. Pinzón S., Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos.1ª Edición, Editorial Convenio Andrés Bello, (Marzo 2000) Santafé de Bogotá, Colombia.
- [8] Cragg GM, Nexman DJ. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. Cancer Investig. [Internet, PubMed - indexed for MEDLINE], [Consultado el: 20/04/2016.] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- [9] A. Bermúdez, M.A. Oliveira-Miranda, D. Velázquez. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. [Internet] INCI v.30 n.8, Caracas, págs. 453-459. (Agosto 2005) [Consultado el: 20/04/2016] Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005
- [10] D. Smet PA. Herbal remedies. New England Journal of Medicine [Revista Internet], (Diciembre 2002) [Consultado el: 20/04/2016.], vol. 347, no 25, p. 2046-2056. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra020398>

- [11] J. O. Flórez, J. Mendez, Guía de plantas y productos medicinales, 1ªEdición, Editorial Convenio Andrés Bello, (2003) Bogotá, Colombia.
- [12] E. Tejada Vásquez, M. Castañón; G.DIRECCION EJECUTIVA DE EPIDEMIOLOGIA, Dirección Regional de Salud Tacna; BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO DE LA MORTALIDAD POR CANCER. [Internet] (2011) [Consultado el: 28/06/16] Disponible en: <http://www.tacna.minsa.gob.pe/uploads/epidemiologia/2014/BOLETIN%20CANCER%202011-TACNA.pdf>
- [13] American Cancer Society [Internet], ACS Fecha última actualización: 13/06/2016 [Consultado el: 20/07/16], Página Web, Disponible en: <http://www.cancer.org/>
- [14] D. Laza Loaces, I. Rodríguez , G. Sardiña C. ; Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales [Internet, Artículo de Revisión]; Rev Cubana Plant Med v.8 n.3 Ciudad de la Habana, Cuba ; versión On-line ISSN; (Sept. Dic. 2003.) [Consultado el: 23/06/16] Disponible en: <http://scielo.sld.cu/>
- [15] Rodríguez I, Laza D. La información científica en homeopatía. Resumed [Internet], (En. - Feb. 2001) [Consultado el: 20/04/16] Vol 14. No. 1 Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas>
- [16] [18] Programa Nacional de Cáncer Cérvico Uterino. (2015) [Internet] In: Unidad de Cáncer, Ministerio de Salud. Guía Clínica del Cáncer cérvico uterino, Santiago: Minsal 2015
- [17] Departamento de Estadísticas e Información de Salud. (2008) [Internet]. Estadísticas Vitales. In: Ministerio de Salud, ed. Chile; 2008]
- [19] G. Delucchi; E. Farina y S. Torres R. *Laurus Nobilis* (Lauraceae) especie naturalizada en la República Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. [Internet] 2007, vol.42, n.3-4, pp. 309-312.
- [20] J. Menéndez V. “*Laurus nobilis* L.” Asturnatura [En línea] (Noviembre 11, 2006) [Consultado el: 18/11/2015.] Disponible en <http://www.asturnatura.com/especie/laurus-nobilis.html>
- [21] C. Quijano; J. Pino. Characterization of the leaf essential oil from laurel (*Laurus nobilis* L.) grown in Colombia Revista CENIC. Ciencias Químicas, vol. 38, núm. 3, 2007, pp. 371-374.

[22] Propiedades del Laurel, *Laurus nobilis* L. Botanica-online (1999-2015) [Internet]. [Consultado el 16/11/2015]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalslaurusnobiliscastella.htm>

[24] Botanica-online .Propiedades del Laurel, *Laurus nobilis* L. [Internet] (1999-2015). [Consultado el 16/11/2015]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalslaurusnobiliscastella.htm>

[25] M. Chang, Y. Shen, " Linalool Exhibits Cytotoxic Effects by Activating Antitumor Immunity". [Internet] PubMed, (Mayo 2014). (Consultado el 11/09/2016) Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262607904_Linalool_Exhibits_Cytotoxic_Effects_by_Activating_Antitumor_Immunity

[26] Carnesecchi, Schneider, R. Ceraline. "Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells", [Internet] .PubMed (Agosto 2001). [Consultado el 11/09/2016 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/11930506_Geraniol_a_component_of_plant_essential_oils_inhibits_growth_and_polyamine_biosynthesis_in_human_colon_cancer_cells

[27] A. Saab, A. Guerrini , M. Zeino , B. Wiench "Laurus nobilis L. Seed Extract Reveals Collateral Sensitivity in Multidrug-Resistant P-Glycoprotein-Expressing Tumor Cells". [Internet], (Enero 1, 2015). MedLine, capítulo 67 página 664-75. [Internet] Disponible en: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/medline/2-s2.0-25837780>

[28] A. Barla, G. Topçu, S. Öksüz, G. Tümen, & D. Kingston. "Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L." [Internet]. Food chemistry (2007) 104(4), 1478-1484. Disponible en: <http://fulltext.study/preview/pdf/1187508.pdf>

[29] M.I Dias, J. Barreira, R.C Calhelha, M.J. Queiroz, M.B Oliveira, M. Soković & I.C. Ferreira. "Two-dimensional PCA highlights the differentiated antitumor and antimicrobial activity of methanolic and aqueous extracts of *Laurus nobilis* L. from different origins." [Internet]. BioMed research international. (2014)

[30] MTH, "Medicamentos Herbatios Tradicionales, 103 especies vegetales" Gobierno de Chile, Ministerio de Salud (Noviembre, 2009). Pág. 199. [Internet] Disponible en: <http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/Libro%20MHT%202010.pdf>

- [31] Plantas Medicinales: Marrubio (*Marrubium vulgare*), Todoplantas.net. (2005-2015) [Internet] [Consultado el 17/11/2015] Disponible en: http://www.todoplantas.net/es/plant_view.jsp?id=1127943372640
- [31] Plantas Medicinales: Marrubio (*Marrubium vulgare*), Todoplantas.net. (2005-2015) [Internet] [Consultado el 17/11/2015] Disponible en: http://www.todoplantas.net/es/plant_view.jsp?id=1127943372640
- [32] [45] IQB. Plantas medicinales “Marrubio, *Marrubium vulgare*”. [Internet]. (Febrero 16, 2010) [Consultado el 17/11/2015] Disponible en: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma06/plantas/pm13sm.htm>
- [33] R. Alkhatib, S. Joha , Cheok “Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*”. [Internet] Planta Med. (Enero 2010) 76(1):86-7. Epub (Julio 2009) [Consultado el 11/11/2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644796>
- [34] Y. Keyvan, F. Fatemeh, S. Hamid. “*Marrubium vulgare* L. methanolic extract inhibits inflammatory response and prevents cardiomyocyte fibrosis in isoproterenolinduced acute myocardial infarction in rats”. [Internet]. BiolImpacts (2014) (Consultado el 15/11/2015) Disponible en: <http://bi.tbzmed.ac.ir/Portals/0/Garjani%20-%20BipolImpacts%20-%202014.pdf>
- [35] “Plantas medicinales, Especies y propiedades Marrubio Blanco (*Marrubium vulgare*)”. [Internet]. Natureduca. [Consultado el 16/11/2015]. Disponible en: http://www.natureduca.com/med_espec_marrubio.php
- [36] Varios autores, Diccionario enciclopédico Uno Color, [Libro] 1º Edición, Editorial Océano, Barcelona, España; 2003, Pág. 1554
- [37] Varios autores, Diccionario enciclopédico Uno Color, 1º Edición, Editorial Océano, Barcelona, España, 2003; Pág. 1462
- [38] Varios autores, Diccionario enciclopédico Uno Color, 1º Edición, Editorial Océano, Barcelona, España, 2003; Pág. 391
- [39] M. Olivares, T. Walter. CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO. [Internet]. Rev. chil. nutr. (Dic 2013) [Citado 16/02/2017]; 30(3): 226-233. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182003000300002&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182003000300002>.

[40] F. Tejada C. Alteraciones del equilibrio del Potasio: Hipopotasemia. Rev. Clin. Med. Fam. [Internet]. (Feb 2008)[Citado 17/02/2017]; 2(3): 129-133. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2008000100008&lng=es.

[41] A. Bernasconi, E. Zotta, M. Ortemberg, L. Albarracín, C. Musso, I. Koland et al. Trastornos del potasio: herramientas diagnósticas y terapéuticas: diagnostic and therapeutic tools. Rev. nefrol. dial. transpl. [Internet]. (Dic 2013) [Citado 16/02/2017]; 33(4): 224-232. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2346-85482013000400006&lng=es.

[42] G. Pérez T. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev. Cubana Invest Bioméd [Internet]. 2003 Mar [Citado 16/02/2017]; 22(1): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000100007&lng=es.

[43] H. Meyer, A. Bolarinwa, G Wolfram, J. Linseisen. Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. [Internet]. (Enero 2006) [Citado 16/02/2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407641>

[44] A. CROZIER, J. BURNS, A. AZIZ, A. STEWART J, H. RABIASZ S, G. JENKINS. et al. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. Biol. Res. [Internet]. (2000) [Citado 16/02/2017]; 33(2): 79-88. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602000000200007&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602000000200007>.

