



Efectos de extractos de flores de palo negro sobre líneas celulares de cáncer de mama y de tejido proliferativo benigno mamario

Tesis para optar al Grado de Licenciado/a en Obstetricia y Puericultura

Director de Tesis: Iván Montenegro Venegas

Joan Villena García

Nombre de estudiantes: Catalina Cruces Carrasco

Ornella Mutarello Canibilo

Sofía Órdenes Jiménez

Michelle Tapia Figueroa

Viña del Mar, Reñaca, 2024

AGRADECIMIENTOS

“Le agradezco a mi madre, por siempre estar junto a mí, por enseñarme a ser siempre mejor y por siempre fomentar mi crecimiento como profesional. Le agradezco a mi pareja, por estar siempre para mí, por ser un apoyo incondicional y por ayudarme a levantarme cada vez que me caí en este proceso”.

“Quiero agradecer a mi familia, que me ha acompañado en este largo camino, en especial a mi hermana mayor, que me guió y ayudó a encontrar mi lugar en esta hermosa carrera. Y gracias a mi mejor amiga, compañera y futura colega, quien ha sido mi más grande pilar y sostén dentro de esta travesía”.

“Quiero agradecer a mis padres por ser mi luz y compañía incluso a kilómetros de distancia, gracias a mi hermano menor quien me impulsa todos los días a ser una mejor profesional, una mejor mujer y un mejor ser humano. Un especial agradecimiento a mi amiga, compañera y futura colega quien durante estos años me ha demostrado que debo confiar en mi potencial y ha fortalecido mi fe en mí misma y en Dios”.

“Agradezco a mi familia, en especial a mis padres, por el apoyo incondicional que me brindaron desde el primer momento. Son mi fuerza y quienes me motivan a siempre seguir adelante, confiando en Dios. También quiero agradecer a la gran amiga que me dió esta carrera por ser mi fiel compañera, gracias por creer en mí y acompañarme en este hermoso viaje”.

“Por último queremos agradecer a la profesora Rut Vergara, quien estuvo para responder todas nuestras preguntas, aguantó todas las veces que la molestamos y nos ayudó a realizar este proyecto, que sin su guía no hubiésemos podido lograr ”

ÍNDICE

Abreviaturas.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Marco teórico.....	9
Cáncer de mama.....	9
Generalidades sobre los tratamientos en cáncer.....	11
Fitofarmacología.....	12
Podanthus mitiqui.....	12
Podanthus ovatifolius.....	14
Objetivos.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Hipótesis.....	16
Materiales y métodos.....	16
Producción de extractos de flores de Podanthus ovatifolius y Podanthus mitiqui. 17	
Materiales.....	17
Metodología.....	17
Protocolo de trabajo para el análisis de productos naturales en líneas celulares humanas.....	17
Materiales.....	19
Resultados.....	25
Análisis de extractos florales sobre líneas neoplásicas de cáncer de mama:.....	25
Podanthus ovatifolius:.....	25
Podanthus mitiqui:.....	30
Concentración media máxima:.....	34
Solventes más eficaces.....	36
Discusión.....	37
P. mitiqui:.....	40
P. ovatifolius:.....	40
Conclusiones:.....	40
Referencias bibliográficas.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras:

<u>Introducción</u>	
Figura 1: Flor de la especie de palo negro, <i>Podanthus mitiqui</i> .	13
Figura 2: Flor de la especie de palo negro, <i>Podanthus ovatifolius</i> .	15
<u>Metodología</u>	
Figura 3: Control negativo de células tumorales de la línea celular MCF-7	19
Figura 4: Control solvente DMSO en células MCF-7 al momento.	22
Figura 5: Células MCF-7 al momento de ser tratadas con P. mitiqui en ETOH (superior) y a las 72hr de tratamiento (inferior).	23
Figura 6: Células MCF-7 al momento de ser tratadas con P. mitiqui en ACOET (superior) y a las 72hr de tratamiento (inferior).	23
Figura 7: Células MCF-7 al momento de ser tratadas con P. mitiqui en DCM (superior) y a las 72hr de tratamiento (inferior).	24
Figura 8: Células MCF-7 al momento de ser tratadas con P. mitiqui en n-HEX (superior) y a las 72hr de tratamiento (inferior).	24
<u>Resultados:</u>	
Figura 9: Gráfico de efecto de P. ovatifolius a diferentes concentraciones sobre línea celular MCF-7.	26
Figura 10: Gráfico de efecto de P. ovatifolius a diferentes concentraciones sobre línea celular MDA MB231.	28
Figura 11: Gráfico de efecto de P. ovatifolius a diferentes concentraciones sobre línea celular MCF-10A.	29

Figura 12: Gráfico de efecto de P. MIT a diferentes concentraciones sobre línea celular MCF-7.	31
Figura 13: Gráfico de efecto de P.MIT a diferentes concentraciones sobre línea celular MDA MB231.	32
Figura 14: Gráfico de efecto de P.MIT a diferentes concentraciones sobre línea celular MCF-10A.	33
Figura 15: Gráfico comparativo de EC ₅₀ entre líneas celulares y solventes.	34
Figura 16: Estructura de Ovatifolina y Acetato de ovatifolina	39

Tablas:

<u>Metodología</u>	
Tabla 1: Distribución de placa, por columnas los 4 compuestos en que se diluyeron los extractos, por filas las concentraciones en que se aplicaron los distintos compuestos .	21
<u>Resultados</u>	
Tabla 2: Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MCF-7	25
Tabla 3: Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MDA MB231.	27
Tabla 4: Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MCF-10A.	28
Tabla 5: Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MCF-7.	30
Tabla 6: Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MDA-MB231.	31
Tabla 7: Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MCF-10A.	32

Abreviaturas

MCF-7: Línea celular de adenocarcinoma metastásico de mama

MDA-MB-231: Línea celular de adenocarcinoma metastásico de mama

MCF-10A: Línea celular epitelial no tumorigénica derivada de tejido mamario proliferativo benigno

DCM: Diclorometano

ACOET: Acetato de etilo

EtOH: Etanol

µg: Microgramo.

µL: Microlitro.

mg: Miligramos.

mL: Milímetro.

°C: Grados Celsius.

IMC: Índice de masa corporal

MAC: Método anticonceptivo

THR: Terapia de reemplazo hormonal

HER2: (del inglés) Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

BRCA: Gen de cáncer de mama

OMS: Organización mundial de la salud

GLOBOCAN: Observatorio Global del Cáncer

DMSO: Dimetilsulfóxido

IL-6: Interleuquina-6

FNT: Factor de necrosis tumoral

p53: Gen supresor de tumores

TCA: ácido tricloracético

UV: Ultravioleta

EC₅₀: Concentración máxima media

Resumen

Antecedentes: Según las Estadísticas Sanitarias Mundiales 2023 (OMS), el cáncer fue una de las principales causas de muerte por enfermedades no transmisibles a pesar de los avances tecnológicos en diagnóstico y tratamiento. En Chile la principal causa de muerte en mujeres es el cáncer de mama, por lo que la necesidad de encontrar nuevas terapias menos invasivas y más efectivas se convierte en un motivo de investigación. El Palo Negro es un arbusto endémico de Chile con componentes bioactivos capaz de inhibir el crecimiento y proliferación celular en diferentes tipos de cáncer.

Hipótesis: *Podanthus mitiqui* y *Podanthus ovatifolius* tienen efecto citotóxico sobre MCF-7 y MDA-MB231 sin selectividad sobre la línea MCF-10A en el caso de *P. mitiqui*.

Materiales y métodos: Se produjeron extractos a partir de flores de *Podanthus mitiqui* y *Podanthus ovatifolius* en Etanol, Acetato de etilo, Diclorometano y *n*-Hexano, con los cuales se trataron las líneas celulares de adenocarcinoma metastásico de mama (MCF-7 y MDA-MB231) y línea celular de mama no tumoral (MCF-10A).

Resultados: *P. mitiqui* en DCM es la disolución que potencia de mejor manera el efecto citotóxico sin selectividad celular, sin embargo *P. ovatifolius* posee la misma citotoxicidad indiscriminada pero en menor capacidad.

Conclusiones: Se requiere continuar con estudios clínicos *in vivo* para evaluar su eficacia y perfeccionar el extracto como fármaco para suponer una alternativa de tratamiento quimiopreventivo frente al adenocarcinoma metastásico de mama.

Palabras clave: *Podanthus mitiqui*, *Podanthus ovatifolius*, Palo Negro, citotoxicidad, cáncer de mama.

Abstract

Background: According to the World Health Statistics 2023 (WHO), cancer was one of the leading causes of death from non-communicable diseases despite technological advances in diagnosis and treatment. In Chile, the main cause of death in women is breast cancer, so the need to find new less invasive and more effective therapies becomes a reason for research. Palo Negro is an endemic Chilean shrub with bioactive components capable of inhibiting cell growth and proliferation in different types of cancer.

Hypothesis: *Podanthus mitiqui* and *Podanthus ovatifolius* have cytotoxic effect on MCF-7 and MDA-MB231 without selectivity on MCF-10A line in the case of *P. mitiqui*.

Materials and methods: Extracts were produced from flowers of *Podanthus mitiqui* and *Podanthus ovatifolius* in Ethanol, Ethyl acetate, Dichloromethane and n-Hexane, with which metastatic breast adenocarcinoma cell lines (MCF-7 and MDA-MB231) and non-tumorous breast cell line (MCF-10A) were treated.

Results: *P. mitiqui* in DCM is the dilution that best potentiates the cytotoxic effect without cell selectivity, however *P. ovatifolius* possesses the same indiscriminate cytotoxicity but in lesser capacity.

Conclusions: Further in vivo clinical studies are required to evaluate its efficacy and to refine the extract as a drug to represent an alternative chemopreventive treatment against metastatic breast adenocarcinoma.

Key words: *Podanthus mitiqui*, *Podanthus ovatifolius*, Palo Negro, cytotoxicity, breast cancer.

Introducción

El cáncer, según la Organización Mundial de la Salud es “un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células”, que se puede desarrollar en cualquier parte del cuerpo e incluso puede llegar a invadir los tejidos cercanos y generar metástasis. Puede ser causado por diferentes razones, como defectos genéticos transmitidos por los padres de generación en generación, por exposición a agentes radioactivos, citotóxicos o por defectos en la división celular; este afecta en grandes proporciones a la población mundial, por lo que se convierte en un desafío de salud global.

Según las Estadísticas Sanitarias Mundiales 2023 (OMS), el cáncer fue una de las principales causas de muerte por enfermedades no transmisibles con 9,3 millones de muertes el año 2019 [1] y a pesar de los grandes avances tecnológicos en diagnóstico y tratamiento, en Chile alrededor de 28.000 personas mueren cada año por algún tipo de neoplasia [2], siendo la principal causa de muerte en mujeres el cáncer de mama, registrando 8,5 muertes por cada 100.000 habitantes en el año 2020; las tasas de incidencia de esta patología registran 55 mujeres por cada 100.000 habitantes [3]. De esta forma, la necesidad de encontrar nuevas terapias menos invasivas y más efectivas se convierte en un motivo de investigación, considerando además que las cifras anteriormente nombradas van en aumento año tras año.

En este contexto, la exploración del uso de extractos de plantas y extractos naturales como fuentes potenciales de tratamientos antineoplásicos ha sido un foco de interés científico, impulsando a que múltiples laboratorios comiencen a estudiar las propiedades de un arbusto que crece comúnmente en la zona sur de Chile, específicamente desde la región de Coquimbo hasta la región de la Araucanía, el Palo Negro (en Mapudungun “Cudü-mamëll”).

Esta tesis se centra en el estudio de dos especies de Palo Negro pertenecientes a la familia *Asteraceae*: *Podanthus mitiqui* y *Podanthus ovatifolius*, arbustos de hoja perenne que se

caracterizan por sus flores amarillas aromáticas, endémicas de ciertas regiones de Chile, ladronas de la atención de la comunidad científica debido a sus componentes bioactivos y su posible capacidad para inhibir el crecimiento y proliferación de células neoplásicas en diferentes tipos de cáncer.

Marco teórico

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el crecimiento anormal y descontrolado de células del tejido mamario, el cual está conformado por conductos, lóbulos y lobulillos, este crecimiento descontrolado tiene la capacidad de diseminarse a cualquier sitio del organismo; si llegase a alcanzar la cadena linfática mamaria, este es capaz de diseminarse más fácil y rápidamente alrededor del cuerpo. Los tipos más comunes de cáncer de mama son el carcinoma lobulillar y el carcinoma ductal, en algunas pocas ocasiones las células neoplásicas se originan en tejidos estromales (tejido conjuntivo graso y tejido fibroso de la mama).

Las líneas celulares de adenocarcinoma de mama, más ampliamente utilizadas en la investigación corresponden a las líneas MCF-7 y MDA-MB-231. Las MCF-7 son células que se utilizan ampliamente como modelo in vitro para el cáncer de mama hormonodependiente y son fundamentales para evaluar la eficacia de los fármacos frente a esta morbilidad [4]. Por otro lado, la línea celular MDA-MB-231 se caracteriza por su naturaleza agresiva e invasiva, lo que las convierte en un modelo ideal para estudiar el cáncer de mama triple negativo, además carecen de receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y amplificación HER2, que son marcadores utilizados para clasificar y tratar los cánceres de mama. Por ello, estas células se consideran resistentes a las terapias hormonales.[5] Las células MCF-10A corresponden a una línea celular no

tumoral derivada de tejido mamario proliferativo benigno. Se utilizan con frecuencia en el ámbito de la investigación, ya que permiten estudiar la función normal de las células mamarias, la transformación y la transición epitelial a mesenquimal, clave en la transición del carcinoma mamario invasivo [6]. Es importante que dentro del proceso de investigación del adenocarcinoma de mama se trabaje con estas tres líneas celulares, con el fin de contrastar los resultados obtenidos en cada una, y obtener una visión más completa del comportamiento de distintos fenotipos frente a un mismo tratamiento efectuado.

El cáncer de mama puede ser clasificado de diferentes maneras, ya sea según origen o según perfil molecular. Según su origen se clasifican en 75% cáncer esporádico, 15% cáncer familiar y 10% cáncer hereditario (gen BRCA, genes desconocidos u otros genes). Según perfil molecular se clasifican en Luminal A, Luminal B, HER2/Neu positivo y Basal-like (triple negativo). [7]

La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, el más frecuente en la mujer tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, tanto así que en los últimos 25 años se duplicó el número de nuevos casos anuales; sin embargo, la mortalidad en los países desarrollados ha disminuido debido a la detección temprana y los tratamientos efectivos.

Según estimaciones de GLOBOCAN 2012, durante el año 2012 se diagnosticaron un poco más de un millón y medio de nuevos casos de cáncer de mama a nivel mundial, con una tasa estandarizada de 43,3 por 100,000 mujeres y fallecieron 521,817 mujeres por esta causa alcanzando una tasa estandarizada por edad de 12,9 por 100,000 mujeres. [8]

Dentro de los factores de riesgo que inducen a la eventual aparición de cáncer de mama están:

1. Sexo femenino
2. Edad mayor a 65 años

3. Atipia en tumores de mama
4. Antecedente personal de cáncer de mama
5. Mutaciones genéticas
6. Antecedente familiar de cáncer de mama
7. Radioterapia torácica
8. Enfermedad mamaria benigna proliferativa
9. IMC sobre 31 post menopausia
10. Menarquia menor a los 12 años
11. Menopausia mayor a 55 años
12. Ingesta de alcohol
13. Hormonas exógenas (MAC y/o THR)

Generalidades sobre los tratamientos en cáncer

Actualmente existen múltiples alternativas para el tratamiento de los diferentes tipos de cánceres que se conocen, la elección de una o la combinación de varias de ellas, dependerá de las decisiones que tomarán el equipo de salud en conjunto con la paciente y su familia. Para ello se deben tener presentes los determinantes de salud que condicionan la vida de esta persona, así como también las características propias de su tumor: la sintomatología asociada, características moleculares, tamaño, invasión de otros tejidos, infiltración, extensión y metástasis a otros órganos, entre otras. [9]

El objetivo del tratamiento es que se logre el mejor impacto posible en la tasa de curaciones de la enfermedad, causando la menor cantidad de efectos adversos.

En el caso del cáncer de mama las alternativas de tratamientos convencionales son:

- Tumorectomía (cirugía conservadora de la mama).
- Biopsia selectiva de ganglio centinela.
- Mastectomía (amputación de la mama).
- Linfadenectomía axilar (vaciamiento axilar).
- Radioterapia (radiación en la zona afectada)

- Quimioterapia (aislada o en combinación con bevacizumab, un agente antiangiogénico).
- Tratamiento hormonal con medicamentos orales.
- Terapia anti HER2 en tumores HER2 positivos (algunos fármacos en el mercado son: trastuzumab, pertuzumab, T-DM1, lapatinib).
- Hormonas orales si el tumor HER2 positivo expresa receptores de estrógenos.
- Cuidados paliativos.[10]

Fitofarmacología

El avance de la tecnología y la medicina sintética ha traído como consecuencia un olvido generacional del uso terapéutico que antiguamente se le otorgaba a las plantas y sus extractos. Hoy en día, ha surgido una necesidad de explorar estas propiedades medicinales, adoptando para ello criterios de investigación propios de la metodología científica.

La fitofarmacología consiste en el desarrollo y el uso de productos elaborados con drogas vegetales y moléculas que interaccionan en una misma especie vegetal logrando estimular o inhibir diversos receptores según sus características. Es una de las ramas de la farmacología más complejas e infravalorada por los profesionales de la salud, ya que requiere de estudios científicos que sustenten la indicación terapéutica, y sus efectos heterogéneos causan duda e impiden su aplicación a gran escala. [11]

Podanthus mitiqui

- **Familia:** Asteraceae
- **Género:** Podanthus
- **Especie:** mitiqui
- **Nombre común:** Mitriu, Mitique
- **Forma de crecimiento:** Arbusto

- **Origen:** Endémica
- **Distribución por regiones de Chile:** Coquimbo, Valparaíso, la Región Metropolitana de Santiago, O'Higgins, Maule y Biobío.



Figura 1. Flor de la especie de palo negro, *Podanthus mitiqui*.

Descripción: arbusto que mide de entre 2 a 4 metros de alto, ramoso, aromático, dioico. Sus hojas tienen forma ovalada, de ápice agudo. El margen de ellas puede ser de liso a gruesamente dentado, el envés pubescente y con glándulas amarillas. Posee flores amarillas tubulosas reunidas en capítulos globosos solitarios. Fruto de tipo aquenio tetrágono. [12]

“*P. mitiqui* ha mostrado actividad antitumoral, sin embargo esta no es selectiva, ya que presenta citotoxicidad en células no tumorales. Posee características antibióticas, antihelmínticas, es un diurético natural y ayuda a los trastornos urinarios. En la medicina originaria del pueblo mapuche es usada principalmente para enfermedades relacionadas con las vías urinarias, estómago y riñones, y también se utiliza como remedio eficaz contra

la gonorrea”. [13] El componente químico presente en esta especie de planta, es una lactona sesquiterpénica (“diacetylovatifolium” y “arturin”), tipo de compuesto químico terpenoide (compuesto orgánico derivado del isopreno) clase de hidrocarburos orgánicos volátiles. [13] Otra lactona presente en esta planta es la “erioflorin”, la cual posee una poderosa actividad citotóxica debido a la estabilización del supresor tumoral Pcd4 mediante la inhibición de su interacción con la E3-ligasa β TrCP 1 y además interfiere con el ciclo de proliferación celular de las células tumorales.

Podanthus ovatifolius

- **Familia:** Asteraceae
- **Género:** Podanthus
- **Especie:** ovatifolius
- **Nombre común:** Palo Negro, Mitique
- **Forma de crecimiento:** Arbusto
- **Origen:** Endémica
- **Distribución por regiones de Chile:** Coquimbo, Valparaíso, la Región Metropolitana de Santiago, O'Higgins, Maule, Biobío y Araucanía.



Figura 2. Flor de la especie de palo negro, *Podanthus ovatifolius*.

Características: arbusto ramoso, dioico. Sus hojas poseen un pecíolo corto, la base tiene forma ovalada y el ápice es obtuso. El margen de ellas puede ser entero o ligeramente dentado, glanduloso ásperas, de envés tomentoso. También posee unas flores amarillas tubulosas reunidas en capítulos globosos terminales. Su fruto es un aquenio con forma de cono invertido, papiloso. [14]

Al aislar acetato de ovatifolina (AO), una lactona sesquiterpénica de *Podanthus ovatifolius*, se encontró propiedades antineoplásicas en la prueba estándar de células KB, epidermoides de carcinoma nasofaríngeo humano. Se muestra como un poderoso agente citotóxico capaz de alterar la proliferación/maduración de los eritrocitos en médula ósea de ratón, y así mismo inducir micronúcleos en ellas. [15]

Objetivos

Objetivo general

Analizar las propiedades terapéuticas de los extractos de las flores de *Podanthus ovatifolius* y *Podanthus mitiqui* frente al adenocarcinoma humano de mama metastásico.

Objetivos específicos

1. Identificar y recopilar estudios que investigan las propiedades farmacológicas y bioquímicas de dos especies de Palo Negro: *Podanthus ovatifolius*, *Podanthus mitiqui*.
2. Proporcionar una visión global de las evidencias disponibles acerca del potencial terapéutico de las dos especies de Palo Negro en el tratamiento de neoplasias.
3. Evaluar el posible efecto benéfico del Palo Negro en el tratamiento del adenocarcinoma de mama metastásico.

Hipótesis

Los extractos de las flores de *Podanthus ovatifolius* y *Podanthus mitiqui* disminuyen la viabilidad celular de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama, no obstante el efecto citotóxico de *P. mitiqui* se extiende a células no tumorales correspondientes a la línea MCF-10A.

Materiales y métodos

Para analizar el efecto de cada producto natural sobre las líneas celulares humanas de mama, se requiere de un trabajo preciso y cuidadoso que permita un resultado fidedigno. Para lograrlo, se expondrán a continuación los materiales que se necesitan y los pasos a

seguir en la fase experimental para lograr responder nuestra pregunta investigativa en pos de nuestra tesis recién expuesta.

Producción de extractos de flores de *Podanthus ovatifolius* y *Podanthus mitiqui*

Materiales

Solventes:

- *n*-Hexano
- Diclorometano
- Acetato de Etilo
- Etanol

Elementos de protección personal:

- Guantes de procedimiento
- Delantal

Equipo:

- Tubos eppendorf
- Espátula metálica
- Agitador vortex VELP SCIENTIFICA
- Balanza analítica
- DMSO
- Pipeta 100-1000 μ L
- Punta pipeta celeste

Metodología

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

1. Para generar los extractos de la planta se utilizaron distintos solventes; Etanol, Acetato de etilo, Diclorometano y *n*-Hexano. Se colocó la planta en cada uno de los solventes por al menos 3 días, posterior a esto se evaporó el solvente en un matraz

a una temperatura de 40-50 °C, formándose una película la cual que corresponde al extracto.

2. 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.

- **Podanthus ovatifolius en ETOH:**

Se extrajeron 0,0501 gr del extracto, lo cual se diluyó con 1,002 µL de DMSO, logrando una concentración de 50,1 mg de solución madre.

- **Podanthus ovatifolius en ACOET:**

Se extrajeron 0,0430 gr del extracto, lo cual se diluyó con 860 µL de DMSO, logrando una concentración de 43 mg de solución madre

- **Podanthus ovatifolius en DCM:**

Se extrajeron 0,0565 gr del extracto, lo cual se diluyó con 1,130 µL de DMSO, logrando una concentración de 56,5 mg de solución madre

- **Podanthus ovatifolius en *n*-HEX:**

Se extrajeron 0,0507 gr del extracto, lo cual se diluyó con 1,014 µL de DMSO, logrando una concentración de 50,7 mg de solución madre

- **Podanthus Mitique en ETOH:**

Se extrajeron 0,0436 gr del extracto, lo cual se diluyó con 872 µL de DMSO, logrando una concentración de 43,6 mg de solución madre

- **Podanthus Mitique en ACOET:**

Se extrajeron 0,0562 gr del extracto, lo cual se diluyó con 1.124 µL de DMSO, logrando una concentración de 56,2 mg de solución madre

- **Podanthus Mitique en DCM:**

Se extrajeron 0,0540 gr del extracto, lo cual se diluyó con 1,080 µL de DMSO, logrando una concentración de 54 mg de solución madre

- **Podanthus Mitique en *n*-HEX:**

Se extrajeron 0,0457 gr del extracto, lo cual se diluyó con 914 µL de DMSO, logrando una concentración de 45,7 mg de solución madre

Materiales

Líneas celulares:

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB231) y línea celular de mama no tumoral (MCF-10)

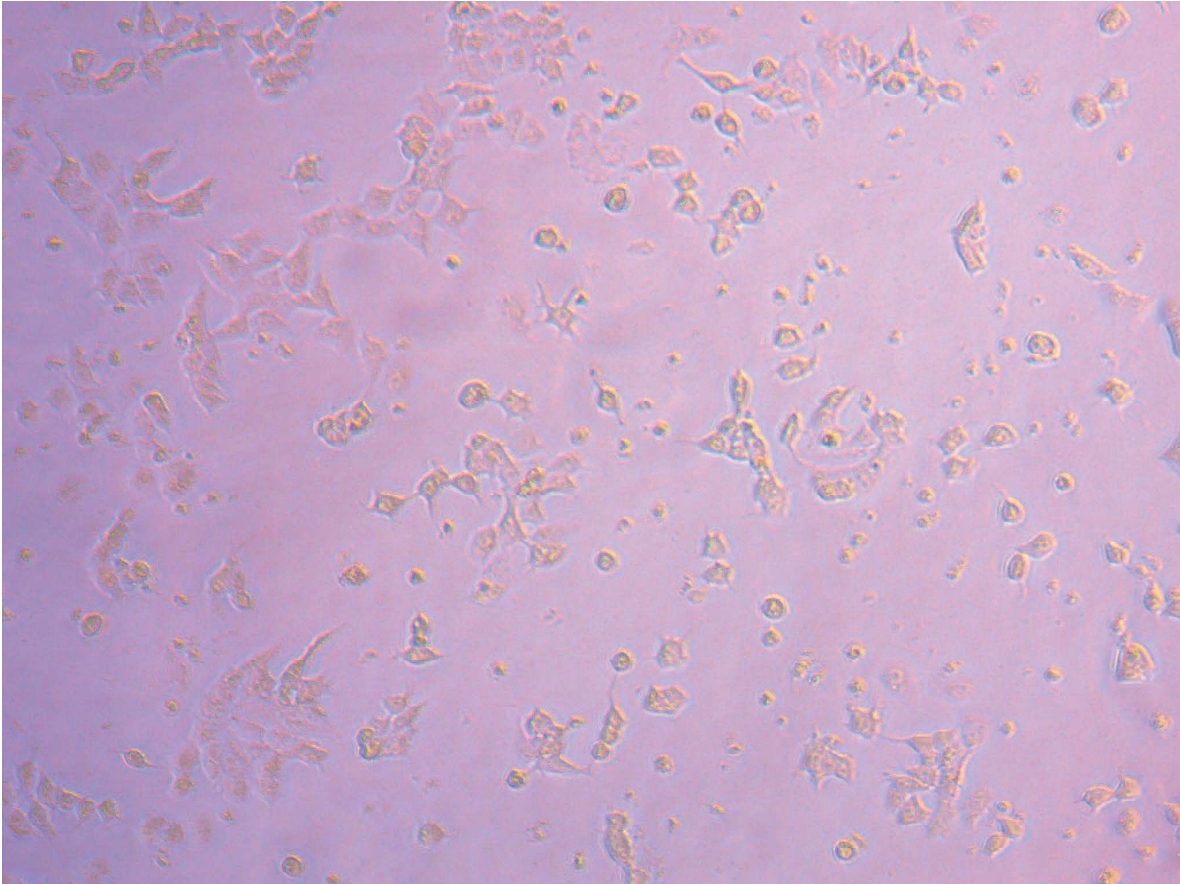


Figura 3. Control negativo de células tumorales de la línea celular MCF-7.

Solventes:

- DMSO

Reactivos:

- Ácido acético al 1%
- Sulforodamina-B
- Trisbase
- Ácido tricloroacético al 50%

Elementos de protección personal:

- Guantes de procedimiento
- Delantal

Equipos:

- Cabina biológica de seguridad HAIER HR30-IIA2
- Matraces
- Tubos eppendorf
- Placas de 96 pocillos
- Pipetas de diversa capacidad
- Puntas de pipeta estériles
- Parafilm
- Pipeta graduada
- Agitador vortex VELP SCIENTIFICA
- Agua Miliq estéril
- Agua destilada
- Lector de placa BIOTEK modelo EL808
- Microscopio ZEISS PRIMOVERT
- Computador
- Cámara AXIOCAM ERc5s

Metodología

3. Se preparó la solución de trabajo cada vez que se utilizó, diluyendo 100 veces la solución madre, obteniendo una concentración de 1 mg/mL en la que “ya no existe citotoxicidad celular”. Para ello se descongeló la solución madre y se extrajo 1 μ L para diluirse en 99 μ L de agua destilada estéril.

4. Se trabajó con líneas celulares MCF-7, MDA-MB231 y MCF-10A: cada una en su respectiva placa de 96 pocillos. Se sembraron 3000 células en cada una.
5. Se destinó cuatro columnas por cada solvente en el que se diluyó el compuesto de trabajo proveniente de un extracto y las filas se distribuyen de mayor a menor concentración de este compuesto; de la siguiente forma:
 - A: Control negativo.
 - B: Control solvente (DMSO 10 μ L en 990 μ L de medio)

	ETOH			ACOET			DCM			n-HEX		
C-												
CS												
10 μ L												
7.5 μ L												
5 μ L												
2.5 μ L												
1.25 μ L												
0.5 μ L												

Tabla 1. Distribución de placa, por columnas los 4 compuestos en que se diluyeron los extractos, por filas las concentraciones en que se aplicaron los distintos compuestos .

6. A cada pocillo se le adiciona la cantidad de solución de trabajo indicada anteriormente.
7. Luego de ser tratadas, las células son incubadas a 37° C, con atmósfera 5% CO₂ / 95% O₂, durante 72 hrs.
8. Cumplido este periodo las células se fijaron con Ácido tricloroacético al 50% (25 μ L / pocillo) a 4°C durante 1h.
9. Las células se lavaron con agua destilada, 3 veces por inmersión.
10. Se tiñeron las células con 0.1% sulforodamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelto en 1% ácido acético (50 μ L / pocillo) durante 30 min para posteriormente

ser lavadas 3 veces con ácido acético al 1% (100-150 μ L / pocillo), esto con el objetivo de eliminar el colorante no unido.

11. El colorante unido a proteína se solubilizó con 100 μ L de 10 mM Tris base no tamponado.
12. La densidad celular se analizó en un lector de placas a 540 nm.
13. Los datos son expresados como absorbancia, luego transformados a viabilidad celular porcentual y por último analizados como media \pm desviación estándar.

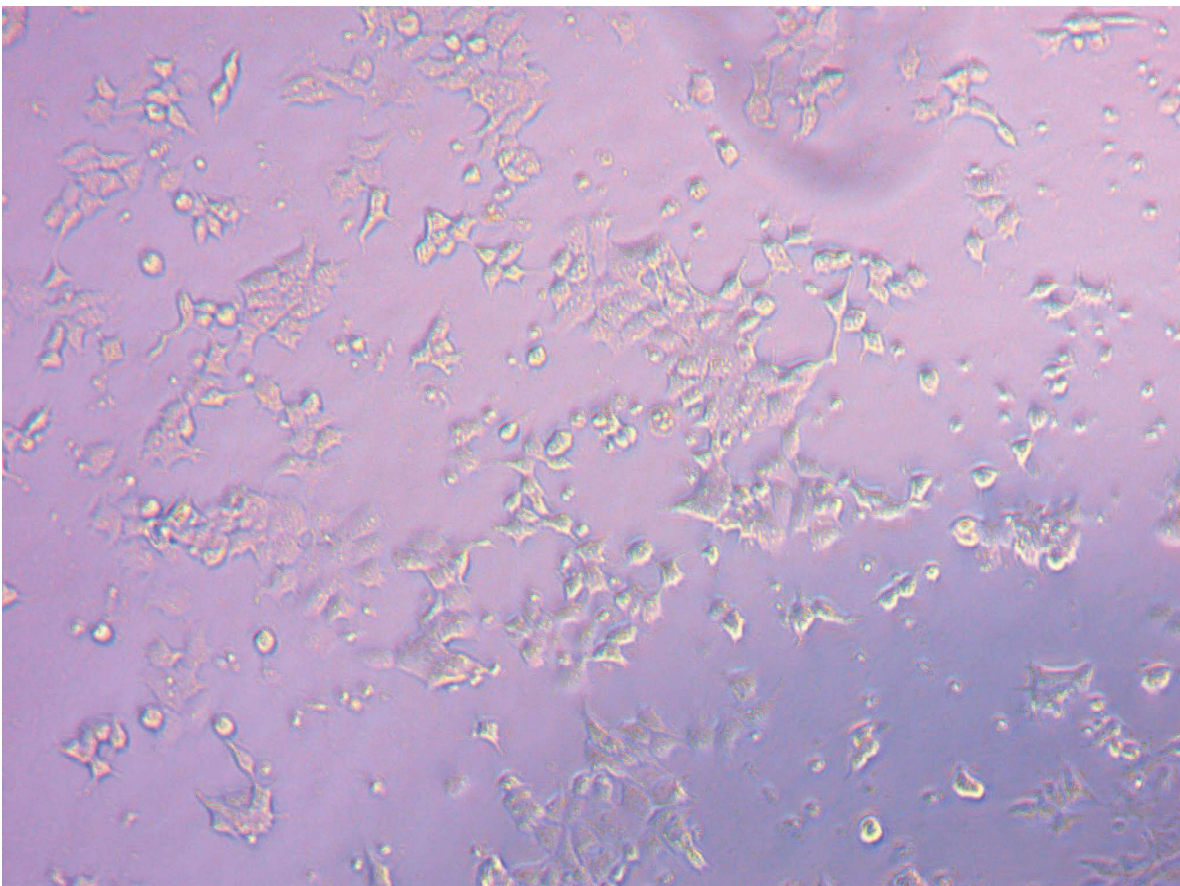


Figura 4. Control solvente DMSO en células MCF-7 al momento.

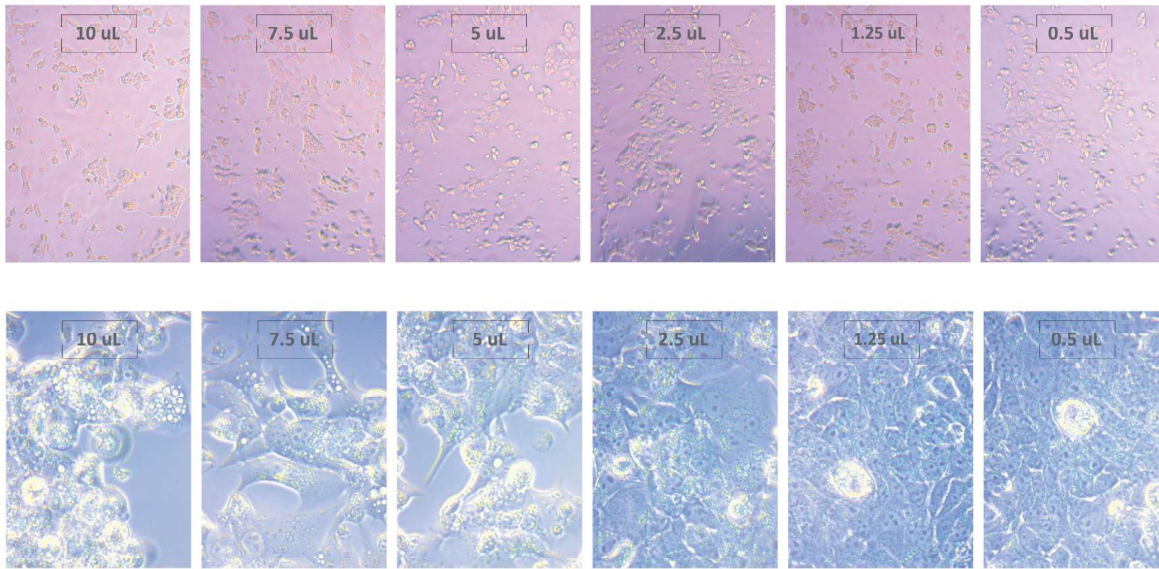


Figura 5. Células MCF-7 al momento de ser tratadas con *P. mitiqui* en ETOH (superior) y a las 72hr de tratamiento (inferior).

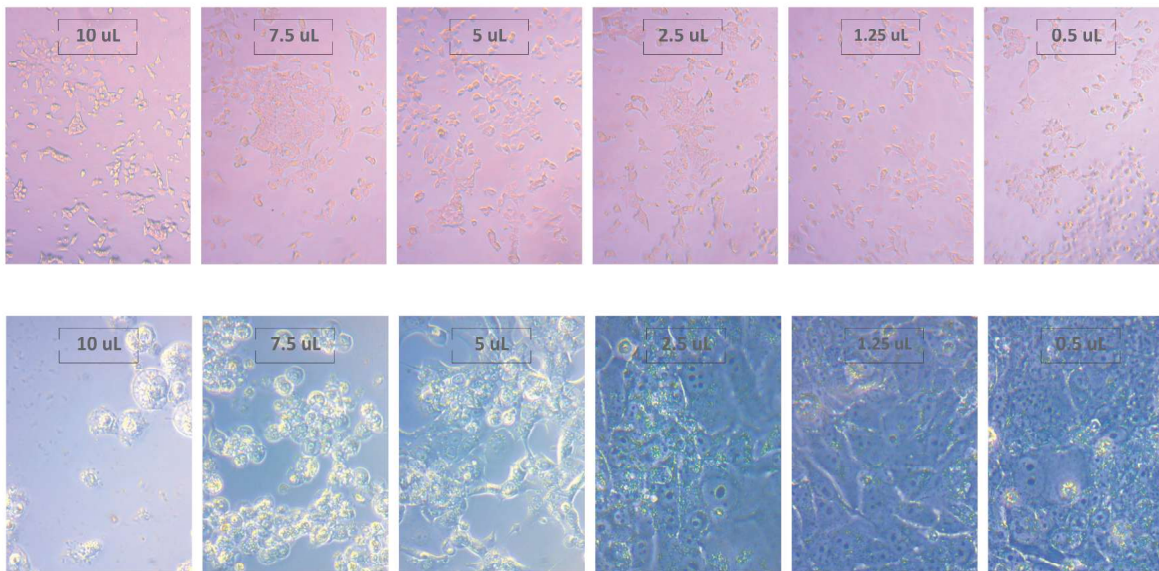


Figura 6. Células MCF-7 al momento de ser tratadas con *P. mitiqui* en ACOET (superior) y a las 72hr de tratamiento (inferior).

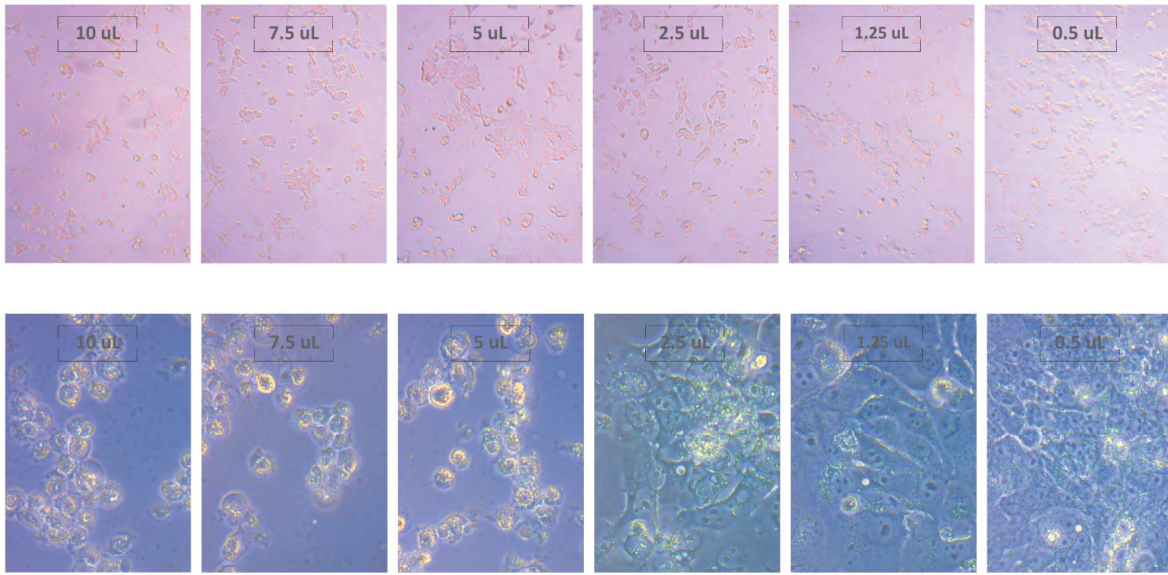


Figura 7. Células MCF-7 al momento de ser tratadas con *P. mitiqui* en DCM (superior) y a las 72hr de tratamiento (inferior).

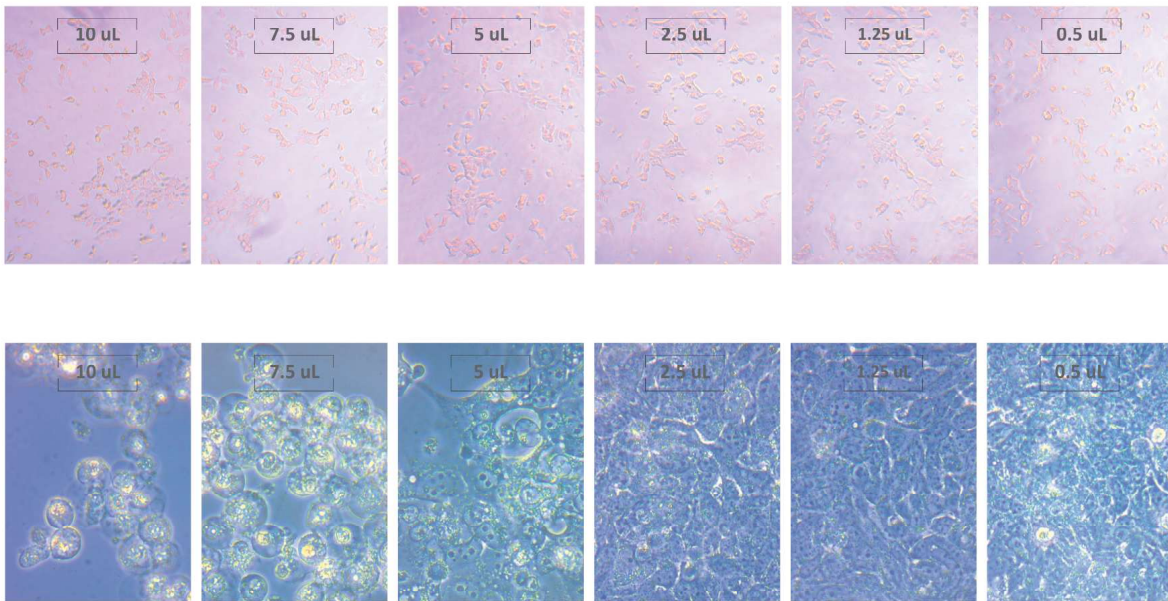


Figura 8. Células MCF-7 al momento de ser tratadas con *P. mitiqui* en n-HEX (superior) y a las 72hr de tratamiento (inferior).

Resultados

Análisis de extractos florales sobre líneas neoplásicas de cáncer de mama:

Para el proceso de análisis se utilizó el programa Microsoft Excel 2010. Los datos recolectados a partir de la lectura de placas de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB231 y MCF-10A, son expresados en absorbancia, estos datos fueron ordenados en una planilla de excel, y promediados entre sí, siguiendo el orden establecido de la placa. Para luego generar un gráfico para una mejor visualización de los resultados obtenidos.

Posterior al tratamiento y fijación, las placas son leídas por el lector de placas, éste mide el nivel de absorbancia presente, la cual a su vez indica el nivel de viabilidad celular, permitiendo analizar el nivel de citotoxicidad de los compuestos probados según la concentración utilizada. Se realizaron 3 repeticiones de cada tipo celular con los 2 extractos estudiados; es decir, 3 placas de MCF-7, 3 placas de MDA-MB231 y 3 placas de MCF-10A, esto repetido 2 veces, uno con *Podanthus ovatifolius* y otra con *Podanthus mitiqui*. Estos resultados se promediaron y graficaron para evaluar el nivel de viabilidad celular y realizar una comparación entre los solventes en los que se trabajó el extracto.

***Podanthus ovatifolius*:**

PROMEDIO	CONCENTRACIÓ N	ETOH	ACOET	DCM	n-HEX
C-	-	2,185	2,190	2,176	2,184
CS	0.1%	2,302	2,262	2,289	2,314
10 µL	50 µg/mL	2,297	1,690	1,728	0,630
7.5 µL	37.5 µg/mL	2,301	1,871	1,939	0,514
5 µL	25 µg/mL	2,338	2,041	2,083	0,510
2.5 µL	12.5 µg/mL	2,290	2,215	2,251	0,882
1.25 µL	6.250 µg/mL	2,250	2,261	2,250	1,421
0.5 µL	3.125 µg/mL	2,206	2,236	2,294	1,885

Tabla 2. Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MCF-7

Como se muestra en la *tabla 2*, para la línea celular **MCF-7** se observa que el solvente con mayor efecto citotóxico es el *n-HEX*, el cual a mayores concentraciones, elimina mayor cantidad de células respecto a los otros solventes. El segundo en hacer efecto es el ACOET, el cual a pesar de tener menor efecto que *n-HEX*, de todas maneras elimina una cantidad considerable de células tumorales, posteriormente le sigue DCM, que realiza un efecto similar al ACOET.

De los 4 solventes utilizados, tuvo menor repercusión en la citotoxicidad celular el ETOH, dando como resultado el efecto contrario sobre las células tumorales, permitiendo su proliferación. El resultado se observa más claramente en la *figura 9*.

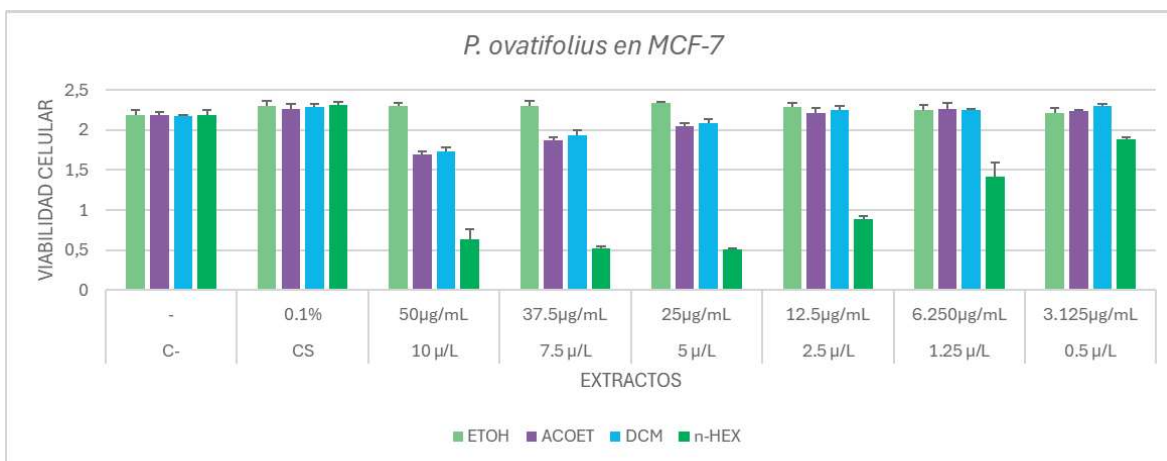


Figura 9. Gráfico de efecto de *P. ovatifolius* a diferentes concentraciones sobre línea celular MCF-7.

PROMEDIO	CONCENTRACIÓ N	ETOH	ACOET	DCM	n-HEX
C-	-	2,885	2,891	2,825	2,708
CS	0.1%	2,899	2,871	2,808	2,852
10 µL	50 µg/mL	2,581	2,428	2,607	0,427
7.5 µL	37.5 µg/mL	2,685	2,360	2,732	0,440
5 µL	25 µg/mL	2,789	2,436	2,698	0,656
2.5 µL	12.5 µg/mL	2,930	2,557	2,827	1,685
1.25 µL	6.250 µg/mL	2,910	2,702	2,833	2,333
0.5 µL	3.125µg/mL	2,959	2,921	2,883	2,797

Tabla 3. Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MDA-MB231

En la *tabla 3*, para la línea celular **MDA-MB231** se observa que el solvente con mayor efecto citotóxico a mayores concentraciones es el *n-HEX*, al igual que en la línea celular anterior, además la concentración del extracto en este solvente es directamente proporcional a la citotoxicidad celular. El segundo solvente con el que mejor trabaja el *P. ovatifolius* es el ACOET, el cual a diferencia del efecto en MCF-7 tiene un mayor efecto que el DCM. Este último, se observa que en las concentraciones 10 µL y 7.5 µL tiene un menor efecto citotóxico que el ETOH por lo cual en esas concentraciones el que menor efecto tiene es el DCM, pero en las concentraciones siguientes (menores) quien brinda un menor efecto es el ETOH, permitiendo igualmente la proliferación celular. El resultado se observa más claramente en la *figura 10*.

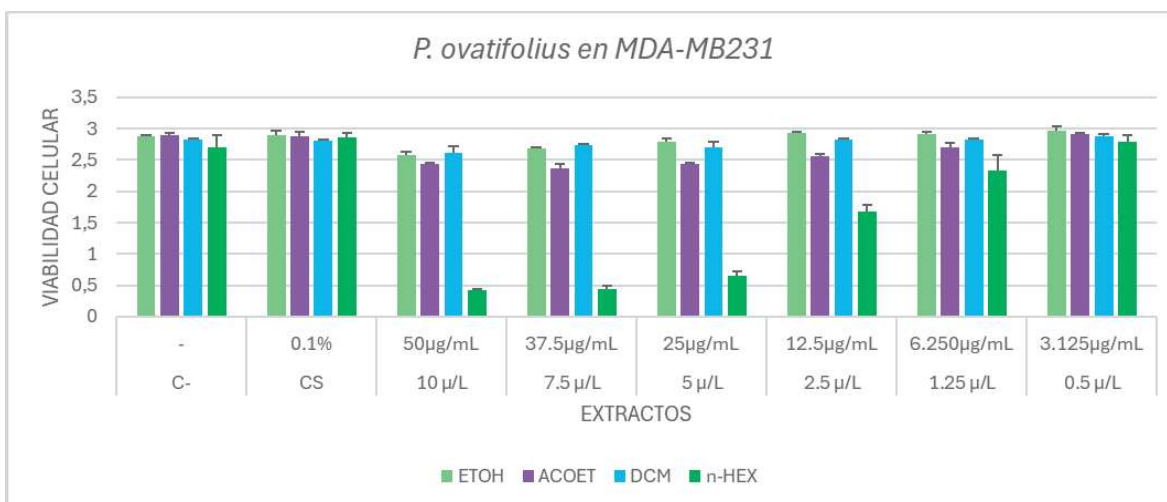


Figura 10. Gráfico de efecto de *P. ovatifolius* sobre la línea celular MDA-MB231.

PROMEDIO	CONCENTRACIÓ N	ETOH	ACOET	DCM	n-HEX
C-	-	2,517	2,523	2,599	2,376
CS	0.1%	2,793	2,811	2,710	2,449
10 µL	50 µg/mL	2,743	1,686	1,738	0,163
7.5 µL	37.5 µg/mL	2,724	1,972	1,885	0,289
5 µL	25 µg/mL	2,722	2,361	2,202	0,473
2.5 µL	12.5 µg/mL	2,646	2,599	2,508	0,883
1.25 µL	6.250 µg/mL	2,691	2,691	2,679	1,548
0.5 µL	3.125 µg/mL	2,604	2,627	2,637	1,949

Tabla 4. Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MCF-10A.

Como lo muestra la tabla 4, para la línea celular **MCF-10A** al igual que en los casos anteriores, en donde menor viabilidad hubo fue en los pocillos en los que se utilizó *n-HEX*, quien le sigue con mayor efecto citotóxico es el DCM, el cual tiene resultados similares al ACOET, existiendo una leve diferencia entre estos 2 últimos a la concentración de 10 µL, en donde ACOET logra menor viabilidad celular que DCM. Para finalizar, se evidencia que al

igual que en todas las líneas celulares anteriores, el ETOH es quien menor efecto tiene en la citotoxicidad celular, proliferando de manera normal las células. El resultado se observa más claramente en la *figura 11*.

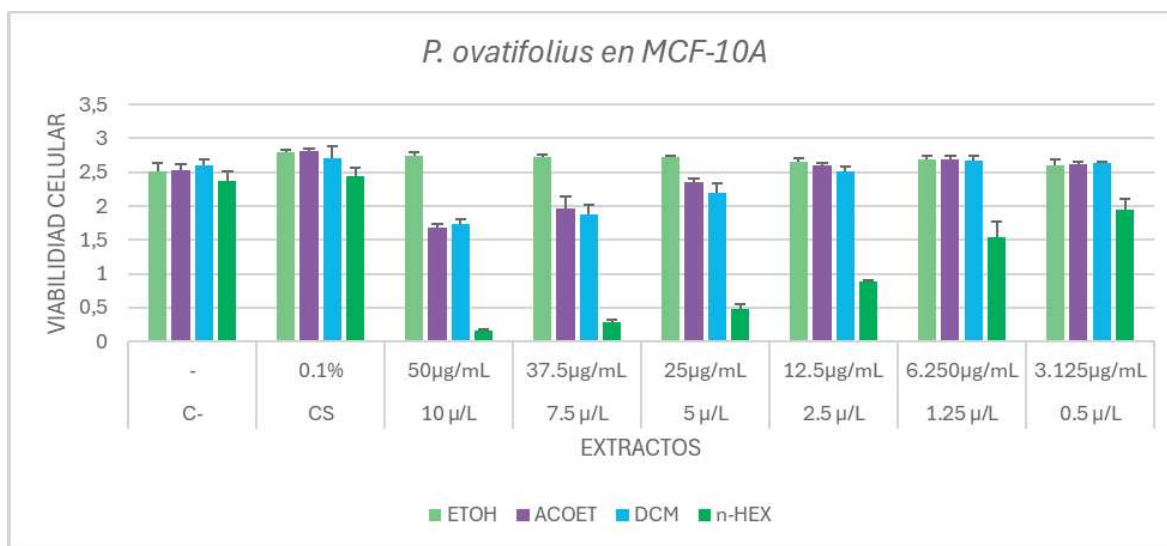


Figura 11. Gráfico de efecto de *P. ovatifolius* sobre la línea celular MCF-10A.

Se puede concluir que entre las 3 líneas celulares ya anteriormente mencionadas el solvente que potencia de mejor manera el efecto citotóxico del extracto de *P. ovatifolius* es el *n-HEX*, mostrando una citotoxicidad directamente proporcional a la concentración utilizada de la solución madre. Por desgracia se puede observar que así como destruye células tumorales, también destruye células no tumorales, hecho que se puede evidenciar en la *tabla 4* y en la *figura 11* de la línea celular MCF-10A, en donde se prueba que el extracto no posee citotoxicidad celular selectiva.

Podanthus mitiqui:

PROMEDIO	CONCENTRACIÓ N	ETOH	ACOET	DCM	n-HEX
C-	-	2,043	2,072	2,070	2,050
CS	0.1%	2,266	2,243	2,219	2,214
10 µL	50 µg/mL	0,641	0,243	0,210	0,191
7.5 µL	37.5 µg/mL	0,682	0,265	0,225	0,213
5 µL	25 µg/mL	0,910	0,449	0,227	0,287
2.5 µL	12.5 µg/mL	1,638	0,655	0,393	0,587
1.25 µL	6.250 µg/mL	1,977	1,160	0,775	1,201
0.5 µL	3.125 µg/mL	2,035	1,671	1,037	1,370

Tabla 5. Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MCF-7.

En la *tabla 5* para la línea celular **MCF-7** se observa que el solvente con mayor efecto citotóxico es el DCM, donde se puede constatar que a mayor concentración, elimina una mayor cantidad de células respecto a los otros solventes. También se puede notar que el *n-HEX*, aunque posee un efecto menor al DCM, también disminuye en gran número las células tumorales. El ACOET demuestra un efecto citotóxico menor a los dos solventes anteriores, sin embargo en concentraciones 10 µL y 7.5 µL el resultado fue muy parecido. Por otra parte el ETOH fue el solvente que tuvo el menor efecto citotóxico entre todos. El resultado se observa más claramente en la *figura 12*.

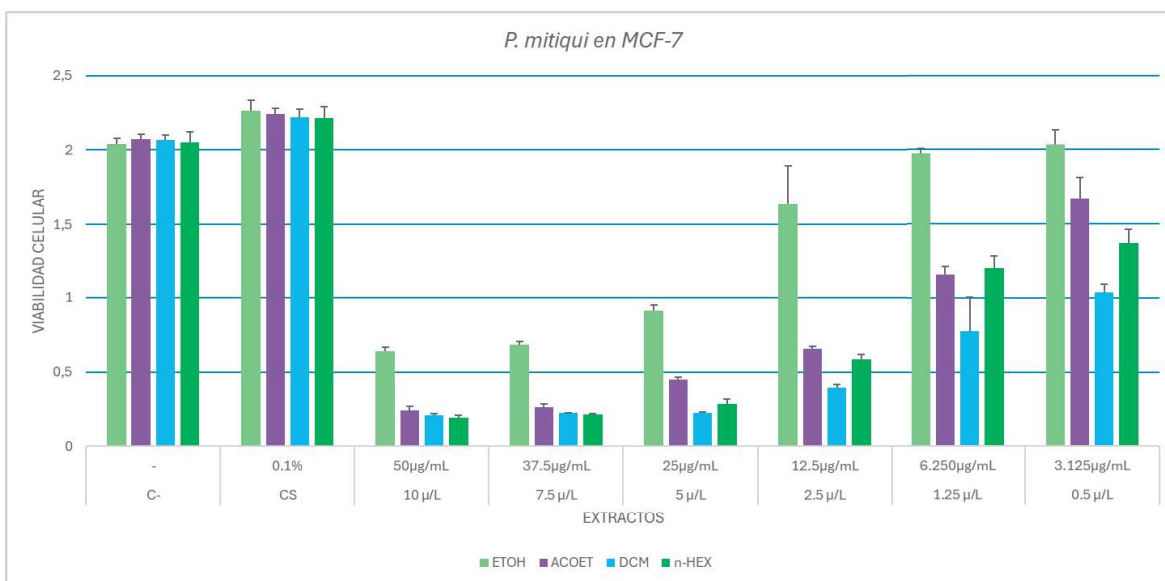


Figura 12. Gráfico de efecto de *P. mitiqui* sobre la línea celular MCF-7.

PROMEDIO	CONCENTRACIÓN	ETOH	ACOET	DCM	n-HEX
C-	-	3,065	3,063	3,066	3,028
CS	0.1%	3,072	2,871	3,079	3,064
10 µL	50µg/mL	2,046	0,895	0,352	0,551
7.5 µL	37.5µg/mL	2,557	0,706	0,406	0,685
5 µL	25µg/mL	2,950	1,407	0,634	1,098
2.5 µL	12.5µg/mL	2,998	2,569	1,250	2,053
1.25 µL	6.250µg/mL	3,024	2,995	2,678	2,950
0.5 µL	3.125µg/mL	3,015	3,026	3,015	3,004

Tabla 6. Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MDA-MB231.

En la tabla 6, para la línea **MDA-MB231** se observa que el DCM es el solvente con mayor efecto citotóxico, es notorio que a mayor concentración hay una mayor destrucción celular, sin embargo el impacto a la viabilidad comienza a ser relevante desde la concentración 2,5 µL. El n-HEX es quien le sigue, con el mismo comportamiento pero con un menor efecto, de la misma manera que los otros dos solventes, ACOET y ETOH, este

último teniendo un efecto bastante menor en la viabilidad de las células, e incluso las prolifera con 1,25µL de concentración. El resultado se observa más claramente en la *figura 13*.

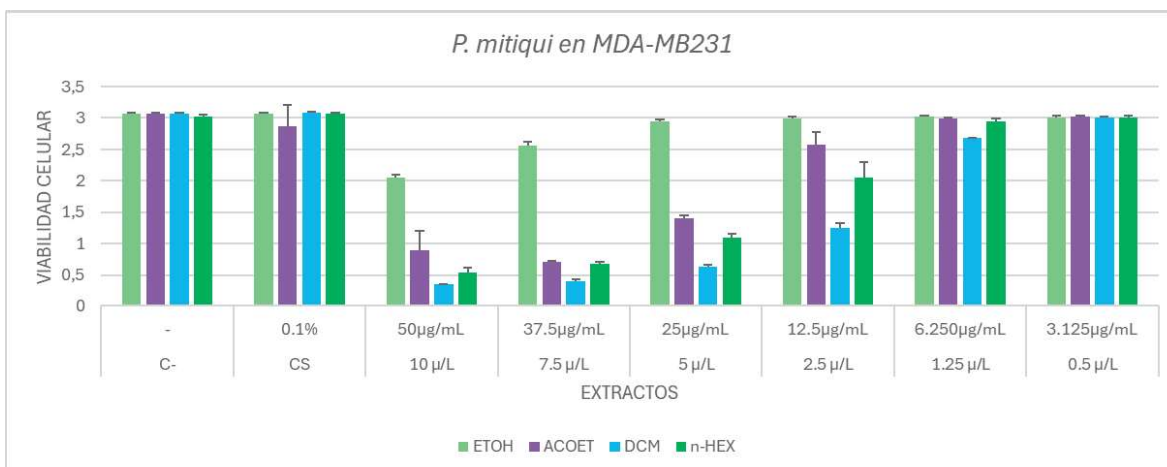


Figura 13. Gráfico de efecto de *P. mitiqui* sobre la línea celular MDA-MB231.

PROMEDIO	CONCENTRACIÓ N	ETOH	ACOET	DCM	n-HEX
C-	-	2,521	2,604	2,621	2,547
CS	0.1%	2,859	2,870	2,833	2,806
10 µL	50µg/mL	0,639	0,258	0,102	0,228
7.5 µL	37.5µg/mL	0,693	0,284	0,111	0,365
5 µL	25µg/mL	1,172	0,318	0,231	0,511
2.5 µL	12.5µg/mL	1,778	0,633	0,378	0,741
1.25 µL	6.250µg/mL	2,440	1,516	0,877	1,373
0.5 µL	3.125µg/mL	2,279	2,067	1,575	2,042

Tabla 7. Promedio de las absorbancias obtenidas post tratamiento con extractos florales y la viabilidad celular en MCF-10A.

En la tabla 7, para la línea **MCF10A** nuevamente es el DCM el solvente con mayor efecto citotóxico, llegando la viabilidad celular a valores notablemente bajos, en donde a mayor concentración del extracto hay mayor destrucción celular. El segundo solvente con mayor

efecto es el ACOET, exceptuando las concentraciones de 10 μ L, 1.25 μ L y 0.5 μ L, en donde quien le supera es el *n-HEX*, quedando en último lugar en efecto el ETOH, quien a pesar de tener un gran efecto, no supera a los demás solventes. El resultado se observa más claramente en la *figura 14*.

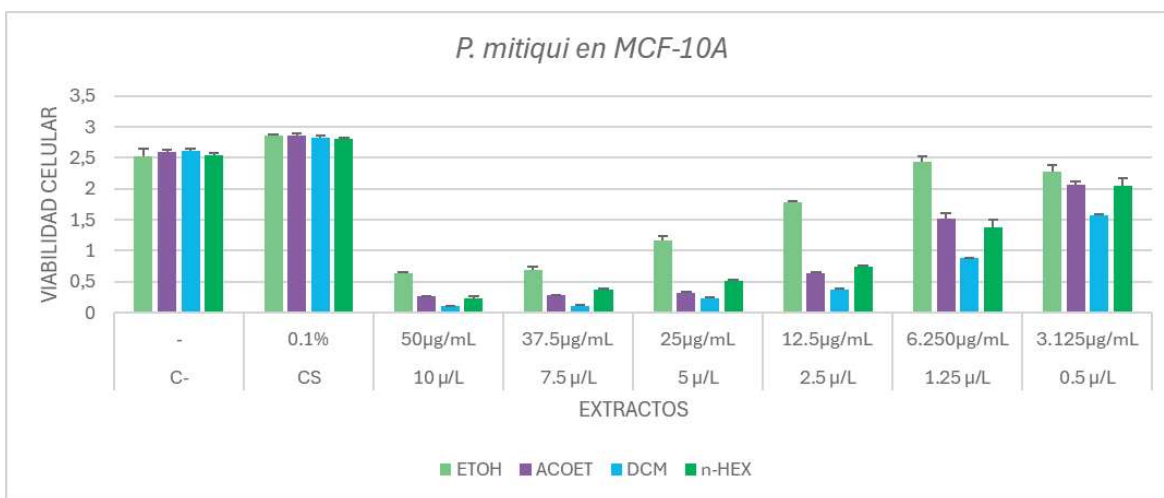


Figura 14. Gráfico de efecto de *P. mitiqui* sobre la línea celular MCF-10A.

Se puede concluir que entre las 3 líneas celulares ya anteriormente mencionadas, el solvente que potencia de mejor manera el efecto citotóxico del extracto de *P. mitiqui* es el DCM, mostrando una citotoxicidad directamente proporcional a la concentración utilizada de la solución madre. Por desgracia se puede observar que al igual que los extractos de *P. ovatifolius*; *P. mitiqui* destruye células tumorales y células no tumorales, por lo que se puede probar que este extracto tampoco tiene propiedades de citotoxicidad selectiva frente a la destrucción de células neoplásicas y no neoplásicas.

Por otra parte, se demuestra que *Podanthus mitiqui* tiene mucha mayor capacidad citotóxica a comparación de *Podanthus ovatifolius*, el cual manifiesta una mayor estabilidad al evaluar los resultados de viabilidad celular, mientras que en *P. mitiqui* se observa que la actividad destructiva es mucho mayor a mayores concentraciones obteniendo gráficos con una curva más marcada.

Finalmente, estos resultados indican que la hipótesis planteada al inicio de esta tesis se comprueba, ya que queda demostrado que el extracto de *P. mitiqui* no es un citotóxico selectivo, del mismo modo que el extracto de *P. ovatifolius* tampoco lo es, sin embargo, este último evidenció poseer una menor capacidad citotóxica.

Concentración media máxima:

Dado a los resultados anteriores, se buscó la concentración en la que el porcentaje de viabilidad celular sea de 50% y por lo tanto el porcentaje de muerte celular un 50%, a esto se le conoce como EC_{50} ; El EC_{50} es una medida cuantitativa de la potencia de un compuesto. Un EC_{50} más bajo indica una mayor potencia (se necesita menos cantidad para obtener el mismo efecto, o sea que es más eficaz en menores concentraciones), mientras que valores altos sugieren que el compuesto tiene una eficacia limitada o es menos potente, y por lo tanto a menor actividad, se requiere una concentración más alta para obtener efecto.

Para obtener este valor, se resolvió la ecuación $EC_{50} = (C1 + C2) / 2$. Donde C1 y C2 son las concentraciones del compuesto en las que se produce el efecto biológico del 25% y el 75%, respectivamente. [16] A continuación, se presentan los resultados graficados en la *figura 15* y comparados según extracto y solvente.

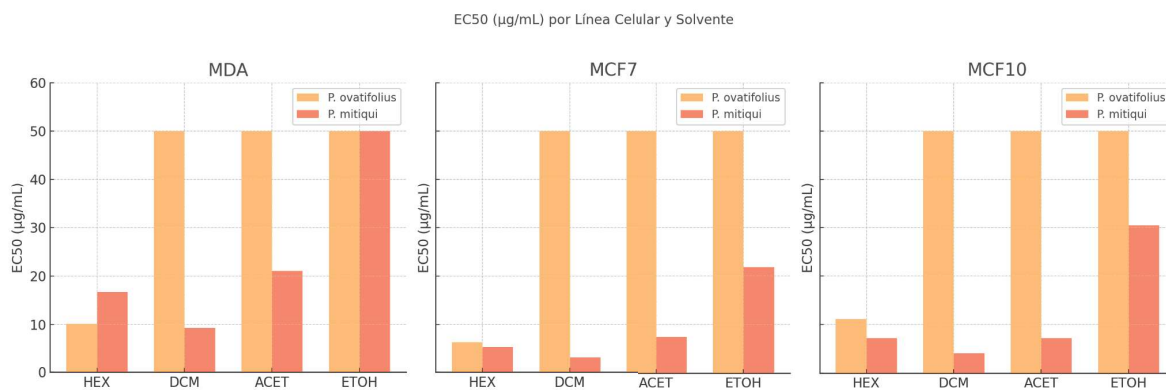


Figura 15. Gráfico comparativo de EC_{50} entre líneas celulares y solventes.

Como se puede observar en el gráfico anterior, respecto al extracto de *P. ovatifolius* en la línea celular MCF-7 el solvente *n*-HEX presenta un valor destacado ($EC_{50} = 6.4 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$), mostrando mayor actividad en comparación con MDA-MB231, mientras que los otros solventes son prácticamente inactivos ($EC_{50} > 50$).

La línea celular MDA-MB231 muestra que sólo el solvente *n*-HEX muestra actividad significativa ($EC_{50} = 10.2 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$) y los demás solventes (DCM, ACOET, ETOH) tienen valores de $EC_{50} > 50$, lo que indica baja eficacia.

Y por último, para la línea celular MCF-10A se observa que la actividad con *n*-HEX es moderada ($EC_{50} = 11.2 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$), mientras que los demás solventes (DCM, ACOET, ETOH) no muestran una actividad significativa ($EC_{50} > 50$).

Los resultados del extracto de *P. mitiqui* muestran que en la línea celular MDA-MB231 el solvente DCM es el más efectivo ($EC_{50} = 9.4 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$), mientras que *n*-HEX tiene actividad menor ($EC_{50} = 16.7 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$). Los solventes ACOET y ETOH no muestran una actividad significativa ($EC_{50} = 21.1 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ y $> 50 \mu\text{g/mL}$ respectivamente).

En la línea celular MCF-7 el solvente más activo es el DCM ($EC_{50} = 3.3 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$), pero el *n*-HEX al igual que el DCM es muy activo ($EC_{50} = 5.4 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$), El solvente ACOET también muy activo ($EC_{50} = 7.5 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$) pero no más que DCM, mientras que el ETOH presenta una moderada actividad ($EC_{50} = 21.8 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$) en comparación con los otros solventes.

El comportamiento de los solventes sobre la línea celular MCF-10A es similar a MCF-7, ya que el solvente más activo es el DCM ($EC_{50} = 4.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$), pero el *n*-HEX y el ACOET al igual que el DCM son muy activos ($EC_{50} = 7.2 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ y $EC_{50} = 7.2 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ respectivamente), mientras que el ETOH presenta escasa actividad, ($EC_{50} = 30.4 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$) en comparación con los otros solventes.

Si comparamos los resultados obtenidos entre los extractos de *P. mitiqui*. y *P. ovatifolius* este último parece tener mayor actividad general en *n*-HEX, especialmente en la línea

MCF-7, mientras que *P. mitiqui* muestra mejor actividad con el solvente DCM en la línea MDA-MB231.

Si se compara entre líneas celulares la línea celular MCF-7 es más sensible a *P. ovatifolius* en *n*-HEX y la línea MDA-MB231 responde mejor a *P. mitiqui* en DCM. Mientras que ACOET y ETOH no muestran eficacia significativa en ninguna combinación.

Solventes más eficaces

Dentro de la investigación realizada en esta tesis, como se puede observar en palabras anteriores, los extractos de palo negro tuvieron mayor éxito con disolventes de polaridad media y apolares, los cuales son el DCM y el *n*-HEX respectivamente.

Ambos extractos poseen lactonas sesquiterpénicas; hidrocarburos orgánicos volátiles, lipofílicos e incoloros, compuestos por 15 carbonos, dispuestos en forma alifática o cíclica. Estos son sintetizados por diversas plantas como mecanismo de defensa antimicrobiana, antialimentaria y como protección de los rayos UV. En las plantas predominan los sesquiterpenoides con esqueleto de germacrano, eudesmano y guayano, sobre todo, en la familia Asteraceae, familia al cual pertenece el palo negro. [17]

El *n*-HEX es un solvente elaborado a partir del petróleo crudo, es un líquido incoloro, con un olor particular, ligeramente desagradable, poco soluble en agua y altamente inflamable.

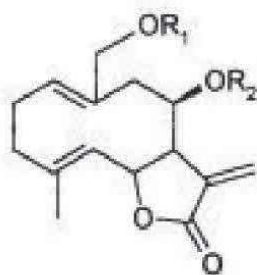
Pertenece al grupo de los disolventes apolares y como se sabe, los disolventes apolares se caracterizan por la ausencia de cargas eléctricas. “Esto significa que son incapaces de establecer enlaces de hidrógeno u otras interacciones polares significativas con otras moléculas” [18], por lo que resulta interesante que la mejor interacción lograda del *P. ovatifolius* es con *n*-HEX, dado que se asume que la capacidad de los disolventes apolares de “interaccionar” de mejor manera con compuestos grasos y aceites vegetales es la razón por la que los extractos de palo negro son muy eficaces con estos solventes.

El DCM o también conocido como cloruro de metileno es un líquido de olor levemente dulce, no volátil, ligeramente soluble en agua, el cual no se encuentra de forma natural en el medio ambiente, sino a partir de una reacción del metano a temperaturas cercanas a los 400-500 °C. Éste es un solvente de polaridad media, los solventes polares son moléculas que sin estar compuestas de iones, presentan exceso de carga positiva en uno de los lados y de carga negativa en el otro. [19]

El DCM es comúnmente utilizado como medio de extracción por su alta solvencia, pureza y es fácilmente destilable de productos finales. Es por esto mismo, por su alta solvencia que se asume que *P. mitiqui* obtuvo mejores resultados con este solvente.

Discusión

A pesar de los avances tecnológicos y la existencia de los distintos tratamientos, el cáncer de mama sigue situándose en los primeros lugares dentro de las causas de mortalidad en la población femenina a nivel mundial y nacional, desde este marco es que nace nuestra tesis, en pos de contribuir a la búsqueda de nuevas terapias, de gran efectividad y mejores pronósticos por medio de la fitofarmacología.



ovatifolin **3** ($R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{H}$)
ovatifolin acetate **4** (R_1 and $R_2 = \text{Ac}$)
deacetylovatifolin **5** (R_1 and $R_2 = \text{H}$)

Figura 16: Estructura de ovatifolina (3) y acetato de ovatifolina(4)

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo de terpenoides C 15 con un anillo

lactónico, que representan los componentes activos de muchas plantas medicinales de la familia Asteraceae. La Ovatifolina (ver figura 16) tiene una estructura química que incluye un anillo de lactona unido a un esqueleto sesquiterpénico, lo que le confiere propiedades antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral y antimicrobiana ya que los extractos de esta planta muestran actividad citotóxica contra cultivos de células KB . Acetato de ovatifolina (ver figura 16) es un derivado en el cual un grupo acetilo se ha unido a la molécula base, lo que puede modificar su solubilidad y actividad biológica. Una investigación realizada en nuestro país perteneciente a la Universidad de Concepción, arrojó resultados favorables sobre el compuesto Acetato de Ovatifolina de la *Podanthus Ovatifolia*. Estos resultados mostraron que el Acetato de Ovatifolina es un agente citotóxico con capacidad de modificar la proliferación de células de médula ósea y es un agente clastogénico capaz de inducir micro núcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón.[15]

En relación a esto es que el palo negro (*Podanthus ovatifolius* y *Podanthus mitiqui*) surge como propuesta para tratamiento quimiopreventivo, gracias a sus propiedades citotóxicas y antitumorales.

Según la investigación realizada por tesis de la carrera de Obstetricia y Puericultura de la Universidad de Valparaíso el año 2017, en la cual se trabajó únicamente con la especie *Podanthus mitiqui* sobre líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino, se obtuvo que esta especie tuvo un efecto citotóxico en la línea celular MCF-7, sin embargo su efecto no fue selectivo, ya que presentó citotoxicidad en células tumorales como no tumorales. En cuanto a la comparación entre diferentes extractos de la especie, se obtuvo que las concentraciones 50 como 12.5 µg/mL tenían una efectividad casi igual en Diclorometano y Acetato de etilo, en cambio en el extracto n-Hexano solo las mayores concentraciones (50 y 25 µg/mL) poseían significancia en el estudio y en Etanol no se observó una efectividad significativa en ninguna de sus distintas concentraciones. [13] En

contraste con los resultados del presente estudio, se presentan similitudes en el comportamiento citotóxico de *P. mitiqui* sobre células MCF-7, ya que en ambas investigaciones los solventes Diclorometano, Acetato de Etilo y n-Hexano presentan resultados favorables a concentraciones mínimas. En cuanto a las células de control utilizadas, no es posible establecer una comparación, ya que en el estudio previamente mencionado se trabajó con células no tumorales CCD 841 CON, línea celular correspondiente a epitelio de colon en lugar de células de epitelio mamario, por lo que se debe tener en cuenta que éstas células pertenecen a tejidos diferentes; tienen características bioquímicas y metabólicas distintas, por esto mismo no comparten la misma receptividad hormonal. Es necesario considerar también que las células de epitelio de colon, gracias a su función en el ambiente intestinal, expresan marcadores moleculares específicos como CK20 y producen citoquinas que responden a la inflamación y la respuesta inmune local. Esto significa que podrían responder de forma diferente al extracto, lo que dificulta interpretar si el efecto es específico para células de cáncer de mama o si simplemente es una respuesta general a células epiteliales.

Debido a la limitada cantidad de estudios previos sobre esta planta, se trabajó la especie *Podanthus ovatifolius* con la expectativa de resultados similares a los de *Podanthus mitiqui* sobre la poca selectividad de sus compuestos a la hora de actuar en los diferentes tipos de células. En la presente investigación se logró objetivar y comprobar la veracidad de la hipótesis planteada respecto a la citotoxicidad de los extractos sobre las células, pero, por el contrario, el comportamiento de los compuestos sobre los diferentes tipos de células, resultó muy distinto. El extracto diluido en n-Hexano, disolvente menos polar, fue el que mostró una actividad citotóxica más consistente en las tres líneas celulares evaluadas, con una mayor citotoxicidad a concentraciones elevadas. Por otro lado, Acetato de etilo junto a Diclorometano mantuvieron un efecto similar y muy escaso, que en concentraciones menores a 5 µL logra alcanzar un efecto nulo sobre las células y menores a 1.25 µL permite su proliferación. Finalmente fué el extracto de *Podanthus ovatifolius* en Etanol el que

obtuvo el peor de los resultados al igual que con *Podanthus mitiqui*, la diferencia radica en que el efecto citotóxico de *Podanthus ovatifolius* en Etanol fue nulo, por lo que a pesar de la alta capacidad antineoplásica con otros solventes, favoreció la proliferación celular de células tumorales.

En un estudio previo realizado en Chile, se utilizó el compuesto ovatifolina correspondiente a la planta *P. ovatifolius* y *P. mitiqui*, donde se observó un efecto inhibitor en la germinación y crecimiento de las plantas y además un efecto antioxidante. [17]

P. mitiqui:

De acuerdo a estudios realizados, se ha descubierto y demostrado que el extracto de *P. mitiqui* tiene actividad antineoplásica y antibacteriana en consecuencia del componente químico presente en esta planta, la lactona sesquiterpénica, un tipo de compuesto químico terpenoide (compuesto orgánico derivado del isopreno) clase de hidrocarburos orgánicos volátiles. [20] La lactona presente en esta planta es la “erioflorin”, la cual posee una poderosa actividad citotóxica debido a la estabilización del supresor tumoral Pcd4 mediante la inhibición de su interacción con la E3-ligasa β TrCP 1 y además interfiere con el ciclo de proliferación celular de las células tumorales. [21]

P. ovatifolius:

Esta planta, según escasos estudios muestra propiedades antineoplásicas en la prueba estándar de células KB, epidermoides de carcinoma nasofaríngeo humano. Siendo los antineoplásicos inductores potenciales de un amplio daño genético. [23] Además se demostró en este estudio que la lactona presente en *P. ovatifolius* el AO es un agente citotóxico con gran capacidad de modificar la proliferación de células de médula ósea y es un agente clastogénico capaz de inducir micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea de ratón. [22]

Conclusiones:

Los sesquiterpenos dentro de la rama de la fitofarmacología, están logrando tomar un importante puesto dentro de la medicina, tras la cantidad de estudios realizados con resultados favorables sobre un amplio espectro de actividades biológicas, destacando en esta investigación la capacidad antitumoral y citotóxica de las especies *Podanthus mitiqui* y *Podanthus ovatifolius*, además de ser una fuente de esperanza para los usuarios que utilicen este método como tratamiento quimiopreventivo frente al adenocarcinoma metastásico de mama.

En esta investigación se trabajó con una amplia variedad de concentraciones de los extractos *P. mitiqui* y *P. ovatifolius* con diferentes solventes sobre las líneas celulares MCF-7, MCF-10A y MDA-MB231, con el fin de observar contrastes específicos en el comportamiento celular. Conforme a esto, se concluye que *P. mitiqui* presenta mayor capacidad citotóxica tanto en células tumorales como no tumorales del tejido mamario, sobre todo en dilución con Diclorometano y en altas concentraciones. Cabe mencionar que las concentraciones bajo 1.25 μ L no alcanzan una capacidad citotóxica idónea.

P. ovatifolius también presenta la misma capacidad citotóxica indiscriminada, pero con una menor agresividad en comparación con *P. mitiqui*. Esto se puede distinguir en la tabla de absorbancia de *P. ovatifolius* sobre la línea celular MCF-10A, en dónde la viabilidad celular solo alcanza valores mínimos con el solvente n-Hex en las mayores concentraciones, no así *P. mitiqui* que logra los valores mínimos de viabilidad de estas células con todos los solventes utilizados y en diversas concentraciones.

Por lo tanto, según su eficiencia y la escasa selectividad de los compuestos, el extracto *P. mitiqui* podría resultar como un buen candidato con gran efectividad para la destrucción de células neoplásicas del tejido epitelial mamario, debido a que según la comparativa de EC_{50} , es este (*P. mitiqui*) en la solución con Diclorometano quien a una menor concentración logra un mayor efecto citotóxico en las 3 diferentes líneas celulares,

destacando mayormente su efecto en las células MCF-7 en donde logra el menor valor de EC_{50} (3.3 +/- 0.1 $\mu\text{g/ml}$).

Es importante mencionar que este trabajo investigativo, según las fases clínicas para el desarrollo de un fármaco, corresponde a un estudio preclínico *in vitro*, en el que los resultados, al demostrar un perfil de seguridad aceptable, permitirían su continuidad de estudio *in vivo* y profundización de la toxicología, farmacodinamia y farmacocinética de este posible medicamento a través de su aplicación en animales, para luego evaluar si se continúa con la evaluación, pasando a la fase I.

Si bien en la actualidad la información sobre sus efectos clínicos es limitada, ambas especies del arbusto de palo negro, han sido tradicionalmente utilizadas en infusiones por su actividad antioxidante; lo que puede ayudar a proteger las células del daño por radicales libres. Es por ello, que se podría recomendar como una opción preventiva el consumo de estas infusiones en dosis moderadas, complementando su uso con una dieta rica en antioxidantes y alimentos no procesados, sumado a un estilo de vida saludable y teniendo una especial precaución del consumo de estas tisanas durante el embarazo y lactancia, por lo que antes de utilizar este método, consulte siempre a profesionales de la salud.

Finalmente, es importante reconocer la existente necesidad de investigación en el área de la fitofarmacología, así como también es preciso la exploración de su contribución a la medicina oncológica. El continuo estudio y desarrollo de nuevas terapias basadas en plantas abre la puerta a enfoques más efectivos y menos invasivos para nuestros futuros usuarios, pero con la precaución de minimizar los efectos secundarios que estas terapias puedan ocasionar.

Referencias bibliográficas

1. Enfermedades no transmisibles [Internet]. Who.int. [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en:
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
2. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. SAS Visual Analytics. Informes DEIS. [Internet]. Informesdeis.minsal.cl [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en:
https://informesdeis.minsal.cl/SASVisualAnalytics/?reportUri=%2Freports%2Freports%2F4013de47-a3c2-47b8-8547-075525e4f819§ionIndex=0&sso_guest=true&reportViewOnly=true&reportContextBar=false&sas-welcome=false
3. Patología GES: Cáncer de mama y mamografías en Chile. [Internet]. Bcn.cl. [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en:
https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/34431/1/202307_BCN_Cancer_de_mama_y_mamografias.pdf
4. Células MCF-7 [Internet]. Cytion. [citado el 10 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.cytion.com/es/Celulas-MCF-7/300273>
5. Células MDA-MB-231 [Internet]. Cytion. [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.cytion.com/es/Celulas-MDA-MB-231/300275>
6. Células MCF10A [Internet]. Cytion. [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.cytion.com/es/Celulas-MCF10A/305026>
7. Obstetricia y Ginecología; Cancer de mama [Internet]. Sintesis. 2017 [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en:
<https://sintesis.med.uchile.cl/index.php/profesionales/informacion-paraprofesionales/medicina/condiciones-clinicas2/obstetricia-y-ginecologia/421-3-01-1-030>
8. Guías Clínicas AUGÉ Cáncer de Mama [Internet]. Minsal.cl. [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en:
<https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/GPC-CaMama.pdf>
9. Léniz Martelli Javiera, Van De Wyngard Vanessa, Lagos Marcela, Barriga María Isabel, Puschel Illanes Klaus, Ferreccio Readí Catterina. Detección precoz del cáncer

- cervicouterino en Chile: tiempo para el cambio. Rev. méd. Chile [Internet]. 2014 [citado el 10 de diciembre de 2024] ; 142(8): 1047-1055. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872014000800012&lng=es
10. Martín M, Herrero A, Echavarría I. El cáncer de mama. Arbor [Internet]. 30 de junio de 2015 [citado el 10 de diciembre de 2024];191(773):a234. Disponible en: <https://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/2037>
 11. Salinas Valero J. El próximo desafío de la fitofarmacología: su aplicación estandarizada en la atención Primaria de Salud. CMS [Internet]. 12 de mayo de 2022 [citado el 10 de diciembre de 2024];61(2):125-6. Disponible en: <https://cuadernosms.cl/index.php/cms/article/view/54>
 12. Podanthus mitiqui [Internet]. Fundación R.A. Philippi. 2023 [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://fundacionphilippi.cl/catalogo/podanthus-mitiqui/>
 13. Espíndola Morales Y, López Arancibia MJ, Robles Estrada F, Rojas Yañez V, Salinas Torres J, Vacarrea Castro S. Efecto de extractos de Mitique (Podanthus Mitique) sobre la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino. [Internet]. Repositoriobibliotecas.uv.cl. 2017 [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://repositoriobibliotecas.uv.cl/handle/uvsc/4827>
 14. Podanthus ovatifolius [Internet]. Fundación R.A. Philippi. 2023 [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://fundacionphilippi.cl/catalogo/podanthus-ovatifolius/>
 15. ALARCON M, WEIGERT G, DUK S, GARCIA M de los A. EFECTOS GENOTÓXICOS DEL ACETATO DE OVATIFOLINA, LACTONA SEQUITERPÉNICA AISLADA DE Podanthus ovatifolius Lag. (Compasitae). REV INT CONTAM AMBIENT [Internet]. 1992 [citado el 10 de diciembre de 2024];8(2):73-6. Disponible en: <https://www.revistascca.unam.mx/rca/index.php/rca/article/view/29845>

16. ¿Qué es Concentración Efectiva Media (EC50) y como se calcula? [Internet]. Com.mx. [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.capcot.com.mx/blogs/qu%C3%A9-es-concentraci%C3%B3n-efectiva-media-ec50-y-como-se-calcula>
17. Ruiz-Reyes, Enrique, Suárez Margarita. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Revista CENIC. Ciencias Biológicas [en línea]. 2015, 46(1), 9-24[citado el 11 de Diciembre de 2024]. ISSN: 0253-5688. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181238817002>
18. Disolventes Organicos: Disolventes Polares Y Disolventes No Polares [Internet]. Brofind S.p.A. 2024 [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.brofind.es/disolventes-organicos>
19. CLORURO DE METILENO [Internet]. 2018 [citado el 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/431980/DLEP+117+Cloruro+de+metileno+A%C3%B1o+2018.pdf/a59b39fe-589d-4eac-a655-c7df7ec7d23f?version=1.0&t=1551310406407#:~:text=El%20cloruro%20de%20metileno%20o,olor%20penetrante%20como%20a%20%C3%A9ter.&text=El%20vapor%20del%20cloruro%20de,m%C3%A1s%20denso%20que%20el%20aire>
20. ESPÍNDOLA Y, LÓPEZ MJ, ROBLES F, ROJAS V, SALINAS J, VACARREZA S. Efecto de extractos de Mitique (Podanthus Mitique) sobre la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino[Internet]. 2017 [citado 10 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://repositoriobibliotecas.uv.cl/items/8ecd411d-47fc-4d85-b529-7184a2ad06c7>
21. Blees JS, Bokesch HR, Rübsamen D, Schulz K, Milke L, Bajer MM, et al. Erioflorin stabilizes the tumor suppressor Pcd4 by inhibiting its interaction with the E3-ligase β -TrCP1. PLoS One [Internet]. 2012 [citado 10 de diciembre de

2024];7(10):e46567. Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046567>

22. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción [Internet]. Vol. 63. 1992. [citado 10 de diciembre de 2024]. Disponible en:

https://ia801007.us.archive.org/27/items/boletindelasocie6365199294soci/boletin_delasocie6365199294soci.pdf