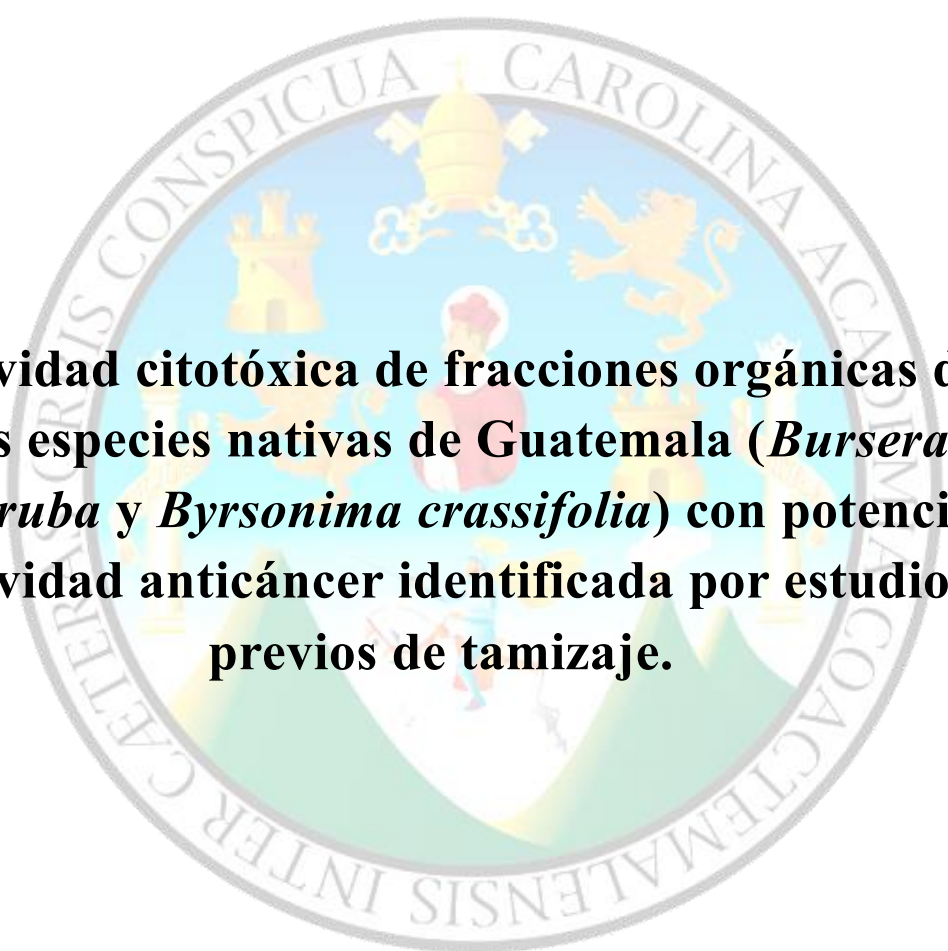


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a golden crown on top, a golden lion on the right, and a golden castle on the left. The shield is set against a blue background. The seal is surrounded by a grey border containing the Latin text "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CAETERIS CONSPICUA".

Actividad citotóxica de fracciones orgánicas de dos especies nativas de Guatemala (*Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*) con potencial actividad anticáncer identificada por estudios previos de tamizaje.

Sara Ester Barillas Aragón

Harlem Róterdam De León Natareno

Químicos Biólogos

Guatemala, noviembre 2017

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A LA SANTÍSIMA TRINIDAD Y
A LA VIRGEN MARÍA

Por acompañarnos, protegernos y guiarnos en esta etapa brindándonos esperanza, fortaleza y sabiduría. Por permitirnos alcanzar este logro.

A NUESTRAS FAMILIAS

Barillas Aragón, por su amor y apoyo incondicional; a mi prometido, por ser fuente de ánimo y amor.

De León Natareno, a mis padres por su esfuerzo y apoyo incondicional, a mis hermanos por su ejemplo y amistad, a mis sobrinos por su amor, a mis abuelitos y demás familia por su cariño y consejos.

A LA TRICENTENARIA UNIVERSIDAD
DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Por otorgarnos la preparación académica y la concientización por el servicio a la sociedad. Por permitirnos vivir momentos inolvidables.

A LAS UNIDADES DE INVESTIGACIÓN

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Lipronat; Instituto Clodomiro Picado, ICP. Por abrirnos sus puertas para realizar el estudio.

ÍNDICE

1. Ámbito de la investigación	1
2. Resumen.....	3
3. Antecedentes	5
3.1 Generalidades del cáncer.....	5
3.1.1 Factores genéticos involucrados.....	6
3.1.2 Otros factores endógenos y exógenos implicados	7
3.2 El cáncer en Guatemala y el mundo.....	10
3.3 Tratamiento convencional del cáncer.....	13
3.3.1 Tratamientos locales	13
3.3.1.1 Cirugía.....	13
3.3.1.2 Radioterapia	13
3.3.2 Tratamientos sistémicos.....	14
3.3.2.1 Inmunoterapia	14
3.3.2.2 Terapia hormonal	15
3.3.2.3 Quimioterapia	15
3.3.2.3.1 Limitaciones de la quimioterapia.....	16
3.4 Medicina complementaria y alternativa contra el cáncer (CAM).....	18
3.5 Plantas de uso medicinal como fuentes de moléculas activas para el tratamiento del cáncer..	18
3.5.1 La búsqueda de moléculas bioactivas continúa	23
3.6 Bioensayos empleados para evaluar la actividad anticáncer de los extractos.....	24
3.6.1 Tamizaje de citotoxicidad general en <i>Artemia salina</i>	24
3.6.2 Evaluación de la citotoxicidad en cultivo sobre líneas celulares tumorales	25
3.6.2.1 Tipos de ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i>	28
3.6.2.1.1 Viabilidad evidenciada por actividad reductasa del metabolismo	28
3.6.2.1.2 Ensayos de viabilidad que no son dependientes de la actividad reductasa del metabolismo	28
3.6.2.1.3 Determinación de la densidad celular	28

3.6.2.2	Parámetros a determinar en la evaluación de la capacidad citotóxica contra líneas celulares cancerosas en el ensayo con SRB	29
3.6.3	Ensayo de genotoxicidad general en <i>Allium cepa</i>	30
3.6.4	Evaluación de la capacidad antioxidante	32
3.7	Estudios previos de extractos vegetales con actividad anticancerígena.....	36
3.7.1	Estudios realizados en Asia, África y Europa.....	37
3.7.2	Estudios realizados en América	37
3.7.3	Estudios realizados en Guatemala	39
3.8.	Uso de antioxidantes en prevención y en tratamiento concomitante de cáncer	40
4.	Justificación	45
5.	Objetivos.....	47
5.1	Objetivo general	47
5.2	Objetivos específicos.....	47
6.	Hipótesis	48
7.	Materiales y métodos	48
7.1	Universo de trabajo	48
7.2	Muestra.....	48
7.3	Recursos	48
7.3.1	Humanos	48
7.3.2	Institucionales	48
7.3.3	Recursos materiales	49
7.3.3.1	Equipo	49
7.3.3.2	Reactivos y medios	49
7.3.3.3	Materiales varios	50
7.3.3.4	Cristalería.....	51
7.3.3.5	Otros	51
7.4	Procedimiento.....	51
7.4.1	Recolección de especies vegetales	51
7.4.2	Preparación de extractos vegetales (extracción fraccionada)	52
7.4.3	Evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales	52
7.4.3.1	Bioautografía (Cromatografía en capa fina- CCF).....	52

7.4.3.2 Método micrométrico de DPPH.....	53
7.4.3.3 Determinación micrométrica de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu	55
7.4.4 Ensayos biológicos (bioensayos)	56
7.4.4.1 Ensayo de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i>	56
7.4.4.2 Ensayo de citotoxicidad en cultivo celular por medio del ensayo de sulforodamina B	57
7.4.4.2.1 Cultivo celular	57
7.4.4.2.2 Ensayo de citotoxicidad por el método de sulforodamina B (SRB)	58
8. Diseño estadístico y validez del método	60
9. Resultados	61
10. Discusión de resultados.....	66
11. Conclusiones	71
12. Recomendaciones	72
13. Lista de referencias	73
Anexo 1. Fichas técnicas.....	96
Anexo 2. Quimioterapéuticos	106
Anexo 3. Imágenes de la fase experimental.....	108

1. **Ámbito de la investigación**

El cáncer es un problema de salud importante, pues es la segunda causa de mortalidad (21%) por enfermedades no transmisibles a nivel mundial (American Cancer Society, 2011). Actualmente se presume que el 57% de los casos de cáncer (excluyendo los de cáncer de piel no melanoma) ocurren en los países subdesarrollados (World Cancer Research Fund International, 2015a).

En Guatemala, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estimó que en el 2012 hubo una incidencia de 13,271 casos (excluyendo el cáncer de piel no melanoma), una prevalencia de 28,352 casos y una mortalidad proporcional por cáncer de 12%, que corresponde al fallecimiento de 9,871 personas (Bray et al., 2014; World Health Organization, 2014).

A pesar de que en la actualidad existe una amplia variedad de tratamientos farmacológicos para tratar el cáncer, muchos resultan inaccesibles por su alto costo económico y/o falta de disponibilidad en el país, sumado al hecho de producir efectos adversos severos que pueden llegar a producir la muerte del paciente, así como el apareamiento de resistencia tumoral al fármaco. Por estas razones, se reconoce a nivel mundial la necesidad de desarrollar medicamentos alternativos, para que puedan obtenerse mejores resultados con menores efectos adversos al emplearlos ya sea solos o combinados con alguna terapia convencional. Una estrategia importante para elaborar fármacos antineoplásicos efectivos es estudiar los agentes derivados de productos naturales (Abuzenadah et al., 2012).

En el presente estudio se evaluó la capacidad citotóxica de fracciones orgánicas de diferente polaridad de corteza y hojas de dos plantas nativas de Guatemala, *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*, con el fin de determinar si alguna fracción presentaba actividad antineoplásica con un índice de selectividad (IS) aceptable sin causar genotoxicidad. Se esperaba encontrar al menos una fracción orgánica que presentara dichas características, por lo que inicialmente se propuso continuar con su caracterización hasta lograr el aislamiento y evaluación de sus moléculas bioactivas como agentes terapéuticos *in vivo* dentro del marco de la “Red

Iberoamericana de investigación del cáncer. De la genómica al control” (RIBECANCER), en la cual se está participando.

La realización de estudios como este promueve la conservación y uso sostenible de los recursos naturales de países megadiversos como lo es Guatemala y además contribuye con la ampliación del conocimiento acerca del potencial antitumoral de especies que han sido previamente identificadas como activas contra una enfermedad de gran impacto social y económico.

2. Resumen

El cáncer es un problema de salud importante a nivel mundial, especialmente en países de medianos y bajos ingresos (World Cancer Research Fund International, 2015a). En Guatemala se estimó una incidencia de 13,271 casos en el 2012 (excluyendo el cáncer de piel no melanoma) (Bray et al., 2013a). A pesar de que existen múltiples tratamientos farmacológicos, varios de ellos resultan inaccesibles por su costo elevado y limitada disponibilidad en países en desarrollo, además de que producen efectos adversos capaces de comprometer incluso la vida del paciente. En países megadiversos como Guatemala, resulta entonces prometedora la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural, más seguros y menos costosos que los quimioterapéuticos convencionales, capaces de atenuar la formación de un tumor y su crecimiento por procesos antiproliferativos y/o pro-apoptóticos (Auyeung & Ko, 2012).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad citotóxica de cuatro extractos orgánicos de las hojas y corteza de dos especies nativas de Guatemala, *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*, cuyo potencial antitumoral ha sido previamente tamizado, habiéndose reportado que las fracciones acetónicas y metanólicas de la corteza son activas contra las líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa) y de mama (MCF-7) (Cates et al., 2013).

Se realizó de cada órgano una extracción fraccionada con un gradiente de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol). Su capacidad antitumoral se evaluó inicialmente mediante el bioensayo general de citotoxicidad en *Artemia salina* y posteriormente sobre células en cultivo de la línea de cáncer de mama MCF-7. Este ensayo de citotoxicidad se realizó por medio del método de tinción con sulforodamina B, en colaboración con la Dra. Cecilia Díaz, participante de RIBECANCER, en el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica.

En el ensayo de *Artemia salina* no se encontró toxicidad en las fracciones orgánicas evaluadas ($LD_{50} > 1$ mg/mL), mientras que en el cultivo celular se determinó que únicamente

la fracción hexánica de la corteza de *B. simaruba* fue citotóxica ($IC_{50} = 14.057 \mu\text{g/mL}$) contra las células MCF-7. Así mismo, la fracción hexánica de la hoja de *B. crassifolia* y las fracciones orgánicas extraídas de ambos órganos de las dos especies vegetales con diclorometano, fueron moderadamente citotóxicas en el ensayo ($20 \leq IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo, debido a que ninguno de los extractos resultó altamente citotóxico ($IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), de acuerdo a los criterios previamente establecidos en RIBECANCER, ninguno de ellos calificó para pasar a la siguiente fase del proyecto, en la que se evaluarían la IC_{100} , su potencial genotóxico y se calcularía el índice de selectividad utilizando células normales como control.

En cuanto a la determinación de la capacidad antioxidante de las fracciones orgánicas de las dos especies vegetales, se determinó en el tamizaje cualitativo primario realizado por cromatografía en capa fina que, de las 16 fracciones orgánicas, ocho presentaban actividad baja, dos tenían actividad moderada, cuatro tenían actividad fuerte y solamente dos presentaron actividad muy fuerte. Se estableció que la fracción con mayor capacidad antioxidante fue la extraída de la corteza de *B. crassifolia* con acetato de etilo, ya que se obtuvieron valores de $0.1040 \pm 0.0021 \text{ mg/mL}$ con el método de DPPH micrométrico y $0.3217 \pm 0.0082 \mu\text{g}$ de ácido gálico/g con el de fenoles totales.

Debido a que se ha demostrado que las líneas celulares tumorales pueden tener diferente sensibilidad a la acción tóxica de un mismo compuesto, deberá darse seguimiento al estudio de la bioactividad de los extractos evaluados contra otras líneas celulares tumorales. Además, se sugiere realizar investigaciones posteriores que permitan identificar las moléculas bioactivas en las fracciones que demostraron actividad citotóxica y antioxidante en el presente estudio.

3. Antecedentes

3.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es el conjunto de enfermedades originadas por una proliferación descontrolada de células anormales provenientes de cualquier tejido corporal que poseen la capacidad de invadir y destruir otros tejidos causando metástasis (Aguilera et al., 2011; National Cancer Institute, 2014).

Existen dos tipos de tumores, los benignos y los malignos, siendo estos últimos los que se consideran cancerosos. Las células cancerígenas comparten un grupo de características como la inmortalidad, que les permite proliferar por un tiempo indefinido independientemente de los factores de crecimiento disponibles en el entorno (hecho evidenciado al observar la longitud constante de sus telómeros), la capacidad de causar metástasis y la pérdida de su especialización ya que sus células hijas difieren de la madre debido a fallas en la reparación de su material genético (Aguilera et al., 2011; Cura, Maldonado & Santos, 2006). Del mismo modo, se ha reportado que las células cancerosas pueden liberar proteínas procoagulantes al sistema sanguíneo, por lo que los pacientes con cáncer presentan un estado de hipercoagulabilidad (Almagro, 2005; Letai & Kuter, 1999). Por otro lado, el cáncer también cursa con un aumento y creación de vasos sanguíneos (angiogénesis con origen multifactorial) que les permiten a las células obtener oxígeno y nutrientes (Bertoni, Hardin & Kleinsmith, 2012).

El proceso por medio del cual se da la transformación de una célula normal en cancerígena se denomina carcinogénesis y es el producto de un conjunto de mutaciones. Todo empieza cuando la célula sufre alguna mutación que le permite dividirse ilimitadamente entrando en la fase de iniciación que, aunque es irreversible, es insuficiente para producir cáncer. Si sigue actuando el agente cancerígeno sobre ella entonces pasa a la fase de promoción y, por último, si continúa mutando y adquiere la capacidad de invadir otros tejidos tanto a nivel local como distal, entra a la fase de progresión (Aguilera et al., 2011).

El cáncer puede clasificarse, según el sitio de origen en no hereditario (producido en las células somáticas) y hereditario (originado en las células germinales, convierte al individuo en un portador y responde a las leyes de Mendel); y en base al tipo de tejido que afecta en carcinoma, sarcoma, cáncer encefálico (glioma y no glioma), leucemia, linfoma y mieloma (Aguilera et al., 2011; Aguirre et al., 2014).

Los carcinomas son el tipo de cáncer más común, pues involucran a las células epiteliales que, por tener una mayor superficie, están más propensas a ser expuestas a agentes carcinogénicos. Por otro lado, los sarcomas son los tumores originados en el tejido conectivo o conjuntivo, incluidos los músculos, huesos, cartílagos y tejido adiposo. Dentro de los tumores encefálicos, que pueden ser benignos o malignos, están los gliomas (cuyo origen son las células gliales y se dividen en astrocitomas, oligodendrogliomas, y gliomas mixtos -formados por astrocitos y oligodendrocitos-) y los no gliomas (meningioma, con origen en las meninges; Schwannomas, etc) (American Cancer Society 2011; American Society of Clinical Oncology, 2014). Ahora bien, las leucemias implican a las células de la médula ósea mientras que los linfomas, también conocidos como tumores sólidos hematológicos para distinguirlos de las leucemias, son aquellos que afectan al sistema linfático. Por último, los mielomas abarcan las células plasmáticas, que son linfocitos B maduros encargados de producir anticuerpos (Aguirre et al., 2014; Leukaemia Foundation 2008).

3.1.1 Factores genéticos involucrados

El cáncer es una enfermedad genética provocada por la acumulación escalonada de mutaciones que afectan a los genes implicados en controlar la proliferación celular, a los genes que codifican por proteínas encargadas de reparar el ADN y de clasificar los cromosomas (genes supresores de tumores). A continuación se describen brevemente estos tipos de genes (Bertoni et al., 2012).

- Genes promotores del crecimiento o protooncogenes: estos regulan la división celular. Una mutación puntual o delección en la secuencia codificante del gen, mutación de la región reguladora del mismo, amplificación génica, o reordenamiento del cromosoma,

producen su forma mutada conocida como oncogén, el cual es dominante y codifica una oncoproteína que se mantiene activa independientemente de las señales reguladoras (Gariglio, 2007; Muñoz, 1997).

- Genes supresores de tumores (GST), antioncogenes u oncosupresores: estos son genes recesivos cuyos productos proteicos inhiben o previenen la tumorigénesis a través de diversas funciones biológicas como inhibir el crecimiento celular, actuar como receptores de factores inhibidores o de hormonas que frenan el crecimiento celular, promover la apoptosis o ser factores de transcripción (promover la expresión de genes cuyos productos detienen el ciclo celular o producen la muerte celular programada) (Aguirre et al., 2014). El cáncer producido por alteraciones en este tipo de genes puede ser hereditario o esporádico. En este último es necesaria la inactivación de ambos alelos por dos eventos sucesivos (hipótesis de Knudson *–two hits–*) en contraste con el cáncer hereditario, en donde un solo paso basta (Arroyo, Cuevas-Covarrubias, González-Huerta & Pérez, 2006; Knudson, 1996; Osorio, 2013). Algunos ejemplos son los genes de cáncer de mama 1 y 2 (por sus siglas en inglés: *BRCA1* y *BRCA2*) que codifican por proteínas que reparan el ADN dañado asegurando la estabilidad genética y se ha identificado que sus mutaciones aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama (Aguirre et al., 2014; Dávila, Debroy, Duarte & Juárez, 2013; Ibáñez, Pinto, Rangel, Ramírez, Sánchez & Vanegas, 2006).

La malignidad celular es entonces el resultado de la inactivación de genes supresores de tumores y la conversión de algunos protooncogenes en oncogenes, lo que origina proliferación celular descontrolada e inhibición de la apoptosis (Bertoni et al., 2012).

3.1.2 Otros factores endógenos y exógenos implicados

Los carcinógenos o agentes cancerígenos son factores externos que influyen en la aparición del cáncer, pueden ser físicos, químicos o biológicos. Dentro de los primeros se pueden mencionar la radiación ionizante y la luz UV; como ejemplos de agentes químicos están el asbesto, agentes alquilantes, colorantes azo, hidrocarburos aromáticos, y tratamientos farmacológicos como la quimioterapia; y como carcinógenos biológicos se encuentran algunos virus tanto ADN como ARN, tales como el virus del papiloma humano

(cáncer de cérvix), SV-40 (cáncer en cerebro, hueso, mesotelioma maligno y linfoma de No-Hodgking), virus de la Hepatitis B (hepatocarcinoma), virus de Epstein-Barr (linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, linfoma de células B en pacientes inmunosuprimidos), entre otros (Cantú, González, Meneses, Ramírez & Suchil, 2015; Cura et al., 2006; World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007).

Algunos factores adicionales que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer son la edad, la dieta, las hormonas, el estrés oxidativo y los hábitos de vida no saludables tales como el fumar o el sedentarismo (World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007).

En cuanto a la edad, se ha reportado que las tasas de incidencia aumentan con ésta para la mayoría de los cánceres (Cancer Research UK, 2014). Por otro lado, en relación a la alimentación, la literatura indica que una dieta balanceada podría reducir hasta el 30% de la incidencia de cáncer en los países industrializados (Aguilera et al., 2011; World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006), así mismo algunos cánceres infantiles se han visto asociados con el uso de sustitutos artificiales de la leche materna o lactancia materna a corto plazo, por lo que se recomienda un período de lactancia exclusiva prolongado que proteja tanto a los niños como a las madres de padecer no solo cáncer sino también otras enfermedades (World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006).

En las mujeres, el riesgo de padecer cáncer de mama se eleva en las nulíparas y en aquellas que tuvieron una menarquía temprana y menopausia tardía. Otra causa de este tipo de cáncer es la exposición a estrógenos, tanto endógenos como exógenos. Bajo el mismo contexto se puede mencionar la obesidad en mujeres postmenopáusicas, que se relaciona con un incremento de la exposición a estrógenos a largo plazo debido a que una importante fuente de los mismos se da luego de la conversión de androstenediona en estrona en el tejido adiposo; del mismo modo la cantidad y duración del consumo de alcohol ha sido sugerido como factor de riesgo, pues eleva las concentraciones del estradiol (Dávila et al.,

2013; World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006).

En lo que concierne al estrés oxidativo (consecuencia del desequilibrio entre la producción y la acumulación de radicales libres y especies reactivas, así como la disminución de la capacidad de defensa) (Badawi, Da Costa, & El-Sohemy, 2012), cabe mencionar que, aunque el cuerpo tiene sistemas de protección antioxidantes que previenen el daño, hay ciertas circunstancias que disminuyen la eficiencia de éstos, tal es el caso de los fumadores activos, quienes por estar expuestos al cigarrillo (que contiene al menos 80 mutágenos conocidos), tienen una concentración disminuída de los micronutrientes antioxidantes en su organismo. El fumar se encuentra entonces dentro de los hábitos de vida no saludables al cual se le atribuye, aunado al consumo de alcohol, más del 75% de los cánceres de la cavidad oral, faringe y esófago en los países desarrollados (World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007).

Por otro lado, se ha reportado que la producción de factores de crecimiento y hormonas se encuentra aumentada en personas obesas, por lo que se ha estipulado que un elevado peso corporal junto a la falta de ejercicio físico, son los responsables de la aparición de un tercio a un quinto de diversos cánceres, específicamente los de mama (en mujeres postmenopáusicas), colon, endometrio, riñón y esófago (World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006).

Por último, otro factor de riesgo importante en los países en vías de desarrollo es el empleo de leña para la calefacción o para cocinar, ya que se ha comprobado en modelos *in vitro* e *in vivo* que tanto el humo de la madera como los productos de combustión de la misma son carcinogénicos, y en ambientes poco ventilados la contaminación del aire resulta en niveles de humo 100 veces mayores a los aceptables. Un estudio realizado en México demostró que la exposición a humo de madera se asociaba con adenocarcinoma de pulmón en mujeres no fumadoras, mientras que estudios de Honduras y Colombia proveyeron evidencia que la exposición al humo aumentaba el riesgo de padecer neoplasia cervical (Arreola et al., 2013).

3.2 El cáncer en Guatemala y el mundo

El cáncer es un problema de salud importante a nivel mundial, dentro de las enfermedades no transmisibles es la segunda causa de la mayor mortalidad en el mundo (21%) (American Cancer Society, 2011). El 57 % de los cánceres (excluyendo el de piel no melanoma) ocurren en los países subdesarrollados, lo cual lo posiciona como una enfermedad que afecta a los países de medianos y bajos ingresos (World Cancer Research Fund International, 2015a).

Durante el 2012 se estimaron 14.1 millones de casos de cáncer en todo el mundo, de los cuales 7.4 millones fueron detectados en hombres y 6.7 millones en mujeres. Se espera que para el 2030 esta cifra se eleve hasta 24 millones, cobrando así 13.2 millones de vidas. Del total de los casos diagnosticados (involucrando ambos sexos), el cáncer de pulmón fue el más común (13%), seguido por el cáncer de mama (11.9%). Este último, a su vez, fue el más frecuente en las mujeres (25%), afectando aproximadamente a 1.7 millones durante ese año (World Cancer Research Fund International, 2015b; World Health Organization, 2011).

Ahora bien, en la región de las Américas, durante el 2012 se reportaron 2.8 millones de casos nuevos y 1.3 millones de muertes por cáncer, de las cuales aproximadamente el 47% sucedió en Latinoamérica (LA) y el Caribe. Durante el 2013 la incidencia de cáncer en LA (163 casos por cada 100,000 habitantes) fue menor comparada con la de Estados Unidos (EEUU) (300 por 100,000) y Europa (264 por 100,000), sin embargo la mortalidad fue mayor debido a que LA comprende 33 estados con diferentes factores que representan obstáculos para el cuidado óptimo de los pacientes con cáncer, tales como distintos sistemas de salud, situaciones socioeconómicas, áreas geográficas, y factores ambientales, culturales y étnicos. Por lo mismo se considera que LA está pobremente equipada para lidiar con el alarmante aumento en la incidencia de cáncer y con la desproporcional y alta mortalidad por el mismo, comparada con otras regiones mundiales (Arreola et al., 2013).

En LA las bajas tasas de detección del cáncer en estadios tempranos, el retraso en referir a los pacientes a centros especializados, y la falta de búsqueda de atención médica cuando los síntomas se están desarrollando, contribuyen al diagnóstico tardío del mismo. Esto

aunado a la centralización de recursos como los centros de atención en salud en las ciudades, favorece la desigualdad en la detección, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad entre los habitantes del área urbana en comparación con el área rural, debido a que estos últimos generalmente residen en lugares donde los oncólogos no están disponibles y los centros de salud locales no pueden proveer la atención debida por falta de equipos especializados, agravado por las barreras del idioma y las dificultades para tener acceso al transporte (Arreola et al., 2013).

En Guatemala, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), en el 2012 hubo una incidencia de 5,499 casos de cáncer en hombres y 7,772 en mujeres (excluyendo el cáncer de piel no melanoma), mientras que la prevalencia fue de 10,087 y 18,265 respectivamente (Bray et al., 2013a). Por otro lado, la mortalidad proporcional por cáncer (porcentaje del total de muertes en todas las edades para ambos sexos) fue de 12%, correspondiente al fallecimiento de 4,488 hombres y 5,383 mujeres (Bray et al., 2014; World Health Organization, 2014). La elevada mortalidad por cáncer a nivel nacional, al igual que en otros países del tercer mundo, se debe en gran medida a que más del 70% de los casos se diagnostican cuando la enfermedad es incurable (National Cancer Institute, 2014), lo cual representa un gran impacto socio-económico para el país (aproximadamente \$33 989 635 en el 2009) (Arreola et al., 2013).

A nivel nacional durante el 2012 se evidenció que el cáncer con mayor incidencia y el responsable de la mayor mortalidad, de acuerdo a los datos recopilados por la IARC, fue el de estómago (17.4% y 21.7% respectivamente), mientras que el que cursó con la mayor prevalencia fue el de cuello uterino (16.9%) (Bray et al., 2014). Se ha reportado que Guatemala tiene el doble de mortalidad por cáncer gástrico en comparación con otros países de Latinoamérica al igual que Perú (Arreola et al., 2013).

Guatemala es un país pluricultural y multiétnico y, aunque el 66% de la población pertenece a la etnia indígena, al igual que en el resto de LA, no se cuentan con registros nacionales que proporcionen información precisa sobre la estadística del cáncer en este tipo de población (Arreola et al., 2013). Un estudio del año 2006 reveló que el 77% de los

pacientes con cáncer no hematológico pertenecían a la etnia no indígena, sin embargo este dato puede no ser certero teniendo en cuenta la falta de cobertura de los servicios de salud en el área rural y la deficiencia de registros en la misma (Dávila et al., 2013). Por otro lado, se presume que el hepatocarcinoma es uno de los cánceres que afecta desproporcionadamente a este tipo de población, pues en comparación con el resto de LA, Guatemala (que es el segundo país con más población indígena) cursa con las tasas más altas y sufre el doble de mortalidad por éste cáncer. Su incidencia se atribuye a la prevalencia de hepatitis crónica, uso de alcohol, factores ambientales y exposición a aflatoxinas (Arreola et al., 2013).

Durante el año 2012, se reportó que los cánceres más prevalentes en el sexo masculino fueron el de próstata, estómago e hígado (27.6%, 18.1% y 5.8% respectivamente) (Bray, Ferlay, Masuyer & Ren, 2013b). Es interesante notar que, a pesar que la divulgación de programas y jornadas ha aumentado, “el sexo masculino no muestra interés por consultar por problemas oncológicos” (Villeda & Waldheim, 2014), pues en el 2011 según las estadísticas del INCAN, únicamente el 28.1% de pacientes fueron hombres (Villeda & Waldheim, 2014).

Por otro lado, los cánceres de mayor prevalencia en las mujeres durante ese mismo año fueron el de cuello uterino (26.2%), el del cuerpo del útero (16.2%) y el de mama (12.6%) (Bray et al., 2013b). El cáncer de mama en Guatemala ocupa entonces el tercer lugar de prevalencia y se estima que en el 2015 la incidencia será de 691 casos, con una mortalidad de 289 aproximadamente (Bray et al., 2013a). Las áreas geográficas con mayor mortalidad por este cáncer, de acuerdo a los datos recabados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) en los años 2004 y 2005, fueron Huehuetenango, Quetzaltenango, Izabal, Zacapa, El Progreso, Jalapa y Santa Rosa. Por consiguiente, las defunciones se acumulan en el centro sur y nororiente del país (Dávila et al., 2013). Del mismo modo, Dávila y colaboradores (2013) determinaron que el grupo etario más afectado son las mujeres mayores de 40 años, por lo que se considera que este padecimiento afecta los años potenciales de vida perdidos en nuestro país por ser una causa de muerte

prematura, siendo los factores predisponentes para tener un diagnóstico tardío el no tener pareja (OR 2.34, $p < 0.01$) y contar con una escolaridad primaria o menor (OR 4.89, $p < 0.01$),

3. 3 Tratamiento convencional del cáncer

3.3.1 Tratamientos locales

3.3.1.1 Cirugía

Procedimiento útil para remover el tumor primario. Generalmente se obtiene una biopsia, útil para dar un diagnóstico definitivo. Microscópicamente se buscan anormalidades características de las células cancerosas, por ejemplo un núcleo irregular grande con una alta relación de núcleo/citoplasma, pérdida de organización tisular, entre otras (Bertoni et al., 2012).

3.3.1.2 Radioterapia

Se emplea radiación ionizante capaz de depositar energía localizada arrancando electrones de los átomos con los que interactúa, dando lugar a la formación de iones y radicales libres (Upton, 2001). Generalmente se usa en cánceres sólidos, aunque también puede emplearse en leucemias, especialmente cuando se realizará un trasplante de células madre o de médula ósea. Esta terapia se puede combinar con cirugía y/o quimioterapia ya que esta última puede actuar como agente radiosensibilizante (Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2013a).

A pesar que la radiación puede ocasionar cáncer, irónicamente también puede destruir este tipo de células (Bertoni et al., 2012) induciendo daño en su ADN a través de una interacción directa (el ADN absorbe la radiación) o indirecta con él (el agua absorbe la radiación y, a partir de su radiólisis, se generan radicales libres que interactúan con el ADN) (Balart, 2001; Fundación Mapfre, 2014). La radiación ionizante al interactuar con el ADN puede provocarle: A) Sustitución o pérdida de una base nitrogenada, B) Ruptura de los puentes de hidrógeno y C) Ruptura mono o bicatenaria (Balart, 2001; Bertoni et al., 2012). Sin embargo, la muerte celular provocada no siempre es inmediata, pues la radiosensibilidad depende no solo de las características de la radiación empleada sino también de la cantidad de ADN presente, capacidad y velocidad de proliferación de las

células (las más radiosensibles son las que tienen una mayor capacidad de reproducción), fase del ciclo celular en la que se aplica la radiación (las fases más radiosensibles son la G2 tardía y la M), presencia de agentes radioprotectores (que disminuyen el daño producido a las células normales) y agentes que brindan radioresistencia al actuar como antioxidantes (Balart, 2001; Mompín, 1988; Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2013b).

La meta principal de la radioterapia es curar o reducir el tamaño del cáncer, disminuir su recurrencia o como tratamiento paliativo (Fundación Mapfre, 2014; Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2013b; Upton, 2001), sin embargo posee ciertas desventajas, por ejemplo, afecta no solo a las células malignas sino también a las normales causando mutagenicidad, requiere equipo especializado y algunas veces se dificulta direccionar el haz con efectividad (como en la radiación con neutrones) (Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2013b).

3.3.2 Tratamientos sistémicos

Involucran desde la prevención y la curación, hasta el cuidado paliativo (Delgado, 2010).

3.3.2.1 Inmunoterapia

También llamada bioterapia, involucra el uso del sistema inmune del paciente, lo que la convierte en una terapia más selectiva y con menor desarrollo de resistencia cruzada a los medicamentos en comparación con el resto de terapias (Bertoni et al., 2012; Fine, 2015; Ghirelli & Hagemann, 2014). El tumor posee mecanismos intrínsecos capaces de favorecer más la expresión de los reguladores de la supresión inmune que la de los efectores de la misma. Sin embargo, una forma de utilizar el sistema inmune para combatir el cáncer es por medio del empleo de proteínas que lo estimulan, tales como el interferón alfa y la interleucina 2 (IL-2), o a través del uso de anticuerpos monoclonales que son proteínas cuya habilidad para reconocer y unirse a los antígenos es altamente específica (Bertoni et al., 2012; Ghirelli & Hagemann, 2014). Estos últimos pueden ser empleados como una terapia dirigida si son diseñados para afectar específicamente a las proteínas críticas involucradas en el desarrollo del cáncer (blancos moleculares). Un ejemplo es la herceptina,

que se une e inactiva al receptor del factor de crecimiento codificado por *HER2*, presente en cantidades excesivas en el 25% de los cánceres de mama y ovario (Bertoni et al., 2012).

3.3.2.2 Terapia hormonal

El objetivo es controlar un tumor hormono sensible, que presenta receptores hormonales, modificando la actividad de las hormonas a las cuales responde (Calvagna, 2012). Cualquier medicamento que reduzca, bloquee, interfiera con la regulación, o antagonice los efectos hormonales inductores del crecimiento tumoral sirve para reducir o controlar el tamaño de la neoplasia (Armas, Calero & Celorio, 1986) ya sea de manera directa (actuando sobre la célula cancerígena) o indirecta (sobre las glándulas productoras de hormonas) (Calvagna, 2012).

Algunos terapéuticos son los estrógenos y antiestrógenos (moduladores selectivos de los receptores estrogénicos), andrógenos y antiandrógenos (se cree que los andrógenos desvían la síntesis de estrógenos en las glándulas suprarrenales, por lo que se utilizan en mujeres con cáncer metastásico de mama mientras que los antiandrógenos se emplean para tratar hombres con cáncer metastásico de próstata), progestina (forma sintética de la progesterona, útil para el cáncer de útero y, ocasionalmente, para el cáncer de próstata), análogos hormonales de liberación de gonadotropina (la administración continua disminuye la síntesis de andrógenos y estrógenos, siendo útiles como tratamiento de cáncer metastásico de próstata o de mama en las mujeres premenopáusicas), e inhibidores de la aromatasa (su bloqueo disminuye la cantidad de andrógenos convertidos a estrógenos) (Calvagna, 2012).

3.3.2.3 Quimioterapia

A pesar que la palabra significa el uso de productos químicos para tratar cualquier enfermedad, comúnmente se emplea para hacer referencia al uso de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Sus tres fines principales son: curación (aunque la cura es el objetivo no existen garantías), control (no es posible curar el cáncer pero se busca reducir su tamaño, detener su crecimiento y propagación), o paliativo (la única meta es mejorar la calidad de vida atenuando los síntomas del paciente) (Burlckhalter & Korolkovas, 1983;

Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2013c). Se puede utilizar ya sea como único tratamiento o junto con otros, como terapia adyuvante (se administra después de la cirugía o la radiación con el fin de remover las células cancerosas remanentes) o neoadyuvante (se utiliza antes del tratamiento principal para reducir el tamaño del tumor maligno y facilitar tanto la radiación como la extirpación por cirugía del mismo) (Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2013c).

Busca suprimir la proliferación celular actuando sobre el mecanismo de replicación del ADN o en componentes citoplasmáticos necesarios para la división celular como los microtúbulos (Peñaloza, 2010). Los quimioterapéuticos se clasifican de acuerdo a la fase del ciclo celular en la que actúan en: fase inespecíficos, es decir producen daño al ADN en cualquier etapa del ciclo celular y la respuesta es dosis dependiente (Anexo 2, Tabla 18), o específicos de fase (Anexo 2, Tabla 19).

3.3.2.3.1 Limitaciones de la quimioterapia

3.3.2.3.1.1 Factores externos

Debido a que prácticamente todos los quimioterapéuticos ingresan por difusión pasiva a la célula, la concentración extracelular es un factor determinante que puede ser alterado por la administración insuficiente de la droga, inactivación metabólica, barreras fisiológicas (o *santuarios*, por ejemplo, el sistema nervioso central y los testículos), y tejido intersticial tumoral o vascularización tumoral que dificultan el acceso y difusión del fármaco (Benítez-Bribiesca & Sánchez-Suárez, 2006).

3.3.2.3.1.2 Factores internos (resistencia)

Dentro de los factores que limitan la efectividad del tratamiento y empeoran el pronóstico del paciente se encuentra la heterogeneidad de las células, que se da cuando ocurren mutaciones espontáneas en las células cancerosas antes de exponerlas al quimioterapéutico volviéndolas resistentes al mismo (Dayerlin, 2013). Las células también pueden adquirir resistencia si aumentan su capacidad de reparación del ADN y logran evadir los puntos de control durante el ciclo celular (Benítez-Bribiesca & Sánchez-Suárez, 2006). Así mismo, la exposición al fármaco puede producir cambios adaptativos en las

proteínas de transporte de membrana que aumenten la cantidad de medicamento transportado al exterior de la célula o bien, que disminuyan el transporte del mismo hacia el interior, resultando en una disminución de la concentración del tratamiento y consecuente resistencia al mismo, al igual que sucede cuando hay alteraciones en la diana molecular (Dayerlin, 2013; Díaz-Rubio & García-Conde, 2000; Benítez-Bribiesca & Sánchez-Suárez, 2006). Cabe notar que aun cuando solo una droga se está empleando, es posible que el tumor adquiera mutaciones que lo hagan resistente a otras drogas no relacionadas entre sí, produciendo resistencia a múltiples drogas (MDR) que surge como consecuencia de la producción de proteínas transportadoras (transportadores ABC) que expulsan continuamente las drogas fuera de la célula (Bertoni et al., 2012).

3.3.2.3.1.3 Efectos adversos

Toxicidad gástrica (náuseas, vómitos, diarrea y estreñimiento), cutánea (flebitis, extravasación, dermatitis, eritrodisestesia -sensación de hormigueo con edema y eritema-, telangiectasias e hiperpigmentación), renal y de las vías urinarias, neurológica (toxicidad cerebelosa, encefalopatía aguda y crónica, parálisis de los nervios craneales, mielopatía, neuropatía periférica), hematológica (anemia, leucopenia que generalmente consiste en una neutropenia aumentando el riesgo de infección, y plaquetopenia) (Sociedad Española de Oncología Médica, 2013; Unidad de Atención al Cáncer, 2009).

Otros efectos secundarios son la hipertensión arterial, reacciones alérgicas, toxicidad pulmonar, cardiotoxicidad, alopecia, alteración de la piel, fiebre, cansancio o astenia, alteraciones electrolíticas y del metabolismo, daños o cambios transitorios en los óvulos y espermatozoides, alteraciones en los órganos de los sentidos y trastornos del sueño. Deben mencionarse también los cambios emocionales que puede sufrir el paciente (tristeza, ansiedad, enojo o cambios de carácter), lo que lo puede llevarlo a un abandono temprano del tratamiento con una disminución de la eficacia del mismo, que repercute desfavorablemente en su pronóstico (Sociedad Española de Oncología Médica, 2013; Unidad de Atención al Cáncer, 2009).

3.4 Medicina complementaria y alternativa contra el cáncer (CAM)

La medicina tradicional, también denominada complementaria, alternativa y no convencional, se refiere a la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, utilizadas para la prevención, mejora o tratamiento de enfermedades físicas y mentales. Incluye la utilización de partes de animales, minerales o plantas (Organización Mundial de la Salud, 2002).

Actualmente varios pacientes con cáncer utilizan la CAM (aromaterapia, homeopatía, meditación, yoga, acupuntura, medicina herbaria, hipnoterapia, etc) porque sienten que haciendo algo por sí mismos contribuyen a su propia mejoría y a la vez aumentan las probabilidades de alcanzar una cura total, o bien porque creen que la CAM aumenta la actividad de su sistema inmune (Davies et al., 2006).

Ahora bien, las plantas empleadas son usualmente utilizadas bajo el nombre de plantas medicinales, medicina herbaria o botánica, y comprenden materiales vegetales brutos tales como hojas, flores, frutos, semillas, tallos, corteza, madera, raíces y otras partes de la planta, ya sean enteras, fragmentadas o pulverizadas (Organización Mundial de la Salud, 2002).

3.5 Plantas de uso medicinal como fuentes de moléculas activas para el tratamiento del cáncer

Las plantas medicinales se han utilizado desde tiempos remotos, cuando el hombre descubrió por azar algunos de sus efectos terapéuticos. Esas propiedades fueron conocidas en varias culturas incluyendo la Maya, donde registros recopilados evidencian que usaban múltiples vegetales para curar sus padecimientos, cicatrizar sus heridas y, sobre todo, para contrarrestar el veneno de la serpiente de cascabel. Estos efectos curativos fueron atribuidos a la intervención de algunos dioses, por lo que el conocimiento de las propiedades de los recursos naturales llegó a representar una mezcla entre ciencia médica, magia y religión, que quedó en manos del denominado chamán, curandero, hechicero o sacerdote, figura que

aún existe en los pueblos indígenas (Barquero, 2007; Arteaga-Aureoles, Cortez-Gallardo, Espinosa-Galván, Hernández-Arroyo, Macedo-Ceja & Rodríguez-Landa, 2004).

A pesar que las plantas medicinales se han utilizado desde tiempos antiguos, no fue hasta en 1803 cuando surgió la idea de utilizar como medicamento un compuesto puro obtenido de ellas. Desde entonces han sido empleadas como fuente de compuestos bioactivos que pueden o no sufrir modificaciones químicas posteriores (Barquero, 2007; Kumar, 2004). En cuanto al tratamiento del cáncer, los fitoquímicos (metabolitos secundarios presentes naturalmente en las plantas) han despertado el interés de varios investigadores por ser productos de valor medicinal, origen natural, más seguros y menos costosos que los quimioterapéuticos convencionales (Auyeung & Ko, 2012), razón por la cual de 1981 al 2002, 48 de las 65 nuevas drogas reportadas contra el cáncer fueron de origen natural (Baradaran, Safarzadeh & Sandoghchian, 2014). Cabe mencionar que el aislamiento de diferentes grupos de fitoquímicos (donde posteriormente puede buscarse la molécula bioactiva específica) puede lograrse por medio de la extracción fraccionada, que utiliza un gradiente de polaridad creciente que permite separar las moléculas según su afinidad con el solvente bajo el principio de *lo similar disuelve lo similar* (Thiruvengadarajan & Yalavarthi, 2013).

La actividad antineoplásica de los fitoquímicos resulta de una combinación de diferentes eventos intracelulares, tales como la inhibición del crecimiento celular (modulado a través del arresto del ciclo celular), la inducción de la apoptosis, la inhibición de la angiogénesis, la actividad antioxidante, la capacidad anti-inflamatoria, y la inhibición de la invasividad (Tabla 1). Cabe mencionar que un mismo fitoquímico puede tener diferentes mecanismos de acción dependiendo de la planta a partir de la cual tuvo su origen (Tabla 2). Ahora bien, aparte del uso que posee cada molécula por sí misma, se ha demostrado que una mezcla de éstas puede prevenir, probablemente por los efectos sinérgicos producidos, la mutación del ADN, la proliferación de las células tumorales, modular la inflamación y la respuesta del sistema inmune, aumentar la probabilidad de la remisión del cáncer y aliviar efectos sistémicos producidos por el tratamiento principal (Auyeung & Ko, 2012).

Los agentes quimioterapéuticos nuevos derivados de fitoquímicos activos pueden ser también utilizados como adyuvantes para mejorar los resultados alcanzados con los tratamientos estándar por su habilidad para: estimular la médula ósea, elevar el conteo de células blancas en sangre periférica, revertir efectos inmunosupresores o alterar la farmacocinética de los quimioterapéuticos utilizados simultáneamente. No obstante, es importante tener en cuenta que si bien la terapia herbaria es menos costosa y tóxica, no significa que no produzca efectos adversos pues algunos agentes como los alcaloides de la vinca (aislados de las hojas de *Catharanthus roseus*) o el paclitaxel (extraído de la corteza de *Taxus brevifolia*), producen mielosupresión y otros efectos secundarios (Auyeung & Ko, 2012; Damery et al., 2009; Jordan & Wilson, 2004; Matesanz, 2009; Stanford University Medical Center, 2010).

Un obstáculo para el desarrollo clínico de la terapia botánica es que este tipo de medicamentos pueden provocar interferencias con otros fármacos ya que ejecutan diversas acciones por mecanismos desconocidos. Es por esto que se vuelve imprescindible determinar la molécula bioactiva presente en el extracto para poder así elucidar su mecanismo de acción y prevenir su interferencia con otras terapias (Auyeung & Ko, 2012).

Tabla 1. Fitoquímicos como agentes quimiopreventivos o quimioterapéuticos.

Mecanismos moleculares de acción de los fitoquímicos en el cáncer

Fenoles: Flavonoides		Saponinas triterpenoides	
<u>Modulación del metabolismo de carcinógenos:</u> Por interacción con enzimas de la fase I (Citocromo P ₄₅₀) o detoxificación de los mismos por inducción de las enzimas de la fase II (por ejemplo, UDP-glucuronil transferasa, quinona reductasa y glutatión S-transferasa). <u>Inhibición de la multidrogo resistencia:</u> En las células cancerígenas hay sobreexpresión de la gp-P o de la proteína asociada a la multidrogo resistencia (MRP), por lo que la quercetina (un flavonoide) inhibe la sobreexpresión del gen <i>MDR1</i> y de la actividad ATPasa.	<u>Efecto antioxidante:</u> Útil para la prevención del cáncer. Inhibición de enzimas prooxidantes como las lipooxigenasas, ciclooxigenasas, xantina oxidasa y ornitina descarboxilasa. <u>Inhibición de la angiogénesis.</u> <u>Efecto proapoptótico:</u> La quercetina afecta la expresión y actividad de las señales de pro-supervivencia y las apoptóticas, incluidas P53, Bcl-2, survivina, activación de las caspasas, y rotura de los microtúbulos. <u>Inhibición de la proliferación celular:</u> Inhiben proteín quinasas y CDK, causan el arresto celular.	<u>Autofagia:</u> Aumento: AMPK Disminución: Akt, mTOR, SERCA <u>Inflamación:</u> Disminución: C/EBP b, COX-2, citoquinas, iNOS, NF-kB, STAT3 <u>Antioxidante:</u> Aumento: ARE, HO-1, Nrf2 <u>Apoptosis:</u> Elevación: caspasas, CHOP, citocromo C, p53, DR4/5, Fas, GRP78/Bip Disminución: EpoR, STAT3, TRPM7, XIAP <u>MicroRNAs:</u> Aumento: miRNA-128, miR-148a Disminución: miR-424	<u>Multidrogo resistencia:</u> Disminución de: <i>MDR1</i> y gp-P <u>Invasión y metástasis:</u> Disminución: AQP-1, EGFR, MMPs, T bRII <u>En células madre del cáncer:</u> Aumento: caspasas, p21, p53 Disminución: ALDH1A1 <u>Proliferación:</u> Elevación: nSMase 2, p15, p21, p27, p53 Disminución: b catenina, CDKs, ciclinas, MDM2 <u>Angiogénesis:</u> Aumento: PEDF Disminución: bFGF, c-Met, HIF-1a, VEGF
<u>Efecto antioxidante:</u> preventivo. <u>Inhibición de la proliferación celular, angiogénesis y metástasis:</u> Se ha demostrado una relación negativa entre los fitoesteroles y la proliferación en cáncer de mama, ovario, pulmón y estómago.	<u>Esteroles</u> <u>Apoptosis:</u> Por disminución del colesterol, activación de caspasa 3 (regulación negativa de Bcl-2). Elevada actividad de enzimas proapoptóticas de la familia MAPK (ERK y p38MAPK) y reducción de la actividad de las enzimas anti-apoptosis de la misma familia (PI3 y Akt)	<u>Daño al ADN:</u> Interacción directa con ADN o ARN. Inhibición de enzima TopI, y formación de complejos covalentes. <u>Inhibición de invasión cancerosa:</u> Por inhibición de expresión de MMP-2 y MMP-9 y modulación de vía NF-κB.	<u>Alcaloides</u> <u>Antitumoral:</u> Interacción directa con glutatión, agotando sus niveles, induciendo la generación de ROS e inhibiendo selectivamente el MKP-1. <u>Detención del ciclo celular:</u> Por regulación de las proteínas CDK.
<u>Inhibición de promoción tumoral:</u> Inhibición de activación de la proteína quinasa C (promotor tumoral).	<u>Taninos</u> <u>Actividad antitumoral:</u> Inducción de IL-1β (apoptosis). <u>Efecto antioxidante:</u> preventivo.	<u>Inducción apoptótica:</u> Por regulación positiva de proteínas apoptóticas incluidas Bax y caspasas.	<u>β-Sitosterol</u> <u>Reducción tumorigénica:</u> Regulación negativa de MDSCs (disminuyen ROS y actividad arginasa).

ALDH1A1: aldehído deshidrogenasa 1A1; AMPK: proteína quinasa activada por AMP; AQP1: aquaporina 1; ARE: elemento de respuesta antioxidante; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblasto; CDK: Cinasas dependientes de ciclinas; C/EBP β: proteína β de unión al potenciador CCAAT; CHOP: proteína homóloga a C/EBP; c-Met: factor de transición c- mesenquimal- epitelial; COX-2: ciclooxigenasa-2; CDKs: ciclinas dependientes de kinasas; DR4/5: receptor de muerte 4 y 5; EpoR: receptor de eritropoyetina; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; gp-P: glucoproteína P; GRP78/Bip: proteína reguladora de glucosa 78/Bip; HIF-1 α: factor de hipoxia inducible 1 α; HO-1: hemo oxigenasa; IL-1β: Interleucina 1-Beta; iNOS: sintasa óxido nítrico inducible; MDSCs: células supresoras derivadas de mieloides ; *MDR1*: gen de multidrogo resistencia; MDM2: doble minuto murino; mTOR: blanco de rifampicina en mamíferos; MKP-1: Fosfatasa 1 de las quinasas activadas por mitógenos; MMPs: metaloproteinasas de matriz; NF-κB: factor nuclear kappa B; Nrf2: factor nuclear (similar al derivado eritroide 2); nSMase 2: esfingomielinasa neutral 2; PEDF: factor de pigmento derivado de epitelio; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción-3; PI3: fosfatidilinositol 3-quinasa; P-gp: glicoproteína P; ROS: especies reactivas de oxígeno; SERCA: ATPasa sarcoplásmica/retículo endoplásmico Ca²⁺; T bRII: receptor tipo II del factor de crecimiento transformante beta; TRPM7: receptor transitorio potencial de melastatina 7; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; XIAP: inhibidor de proteínas de apoptosis ligado a x. NOTA: Los fitoquímicos presentados se eligieron en base a la composición química de *B. simaruba* y *B. crassifolia* (Anexo 1). Tener en cuenta que la tabla presentado abarca los posibles mecanismos de acción que pueden tener los fitoquímicos, sin embargo, el mecanismo de cada uno varía dependiendo de la planta a partir de la cual se aísla.

Fuente: Bathaie & Tamanoi, 2015; Batra & Sharma, 2013; Chahar, Sharma, Dobhal & Joshi, 2011; Jones, Ramprasath & Woyengo, 2009; Kazłowska, Victor, Chang & Tsai, 2013; Lu, Bao, Chen, Huang & Wang, 2012; Miyamoto et al., 1993; Park et al., 2008; Yoshizawa, Horiuchi, Fujiki, Yoshida, Okuda & Sugimura, 1987.

Tabla 2. Ejemplos de compuestos bioactivos con efectos benéficos anti-cáncer.

Metabolito secundario	Efectos benéficos anti-cáncer
Fenoles	
Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Induce la inhibición del crecimiento de las células cancerígenas de colon. • Provoca la apoptosis independiente de p53, la producción de aniones superóxidos. • Tiene efecto preventivo al asociarse con catequinas.
Resveratrol	Causa la apoptosis en las células de cáncer de mama (T47D). <ul style="list-style-type: none"> • Disminuyen la incidencia de cáncer de colon y mama.
Flavonoides	<ul style="list-style-type: none"> • Genisteína: Induce la apoptosis en células leucemia promielocítica (HL-60), inhibe la angiogénesis y causa arresto celular en G2/M. <p>Por ejemplo, la epigallocatequina- 3-galato, proveniente del té verde:</p>
Catequinas	<ul style="list-style-type: none"> • Induce la apoptosis. • Inhibe la proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama.
Compuestos que contienen nitrógeno	
Alcaloides	<p>UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumenta los efectos citotóxicos y apoptóticos de cis-diaminodicloroplatino II en células de cáncer de ovario. • UCN-01 tiene un efecto sinérgico en la promoción de la apoptosis con 5-fluorouracilo. • La inhibición de la proliferación celular se da mayormente en la fase G1.
Terpenos	
Terpenoides	<p>Xantorrizol, obtenido de <i>Curcuma xanthorrhiza</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la formación y desarrollo de tumores. <p>Las provenientes de <i>Astragalus membranaceus</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inducen la inhibición del crecimiento y la apoptosis en líneas cancerígenas de hígado y colon. • Modulan la invasión celular y la angiogénesis en las células de adenocarcinoma gástrico. <p>Las provenientes de <i>Agave schottii</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inhiben el carcinoma 256 de Walker (cáncer de mama). <p>Las esteroideas de la yuca (<i>Yucca schidigera</i>):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Son carcinostáticas e inhibidoras de los efectos mutagénicos.
Saponinas	<p>Las de origen de <i>Balanites aegyptica</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poseen actividad citostática contra las células de leucemia linfocítica P-388. <p>Una mezcla de saponinas esteroideas (Bal 6/7), ha demostrado efectos antineoplásicos contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas (A549) y del glioblastoma (U373). También se ha notado que aumenta el tiempo de supervivencia de los ratones que portan la leucemia murina L1210 tanto como la vincristina, lo que sugiere que podría ser utilizada para generar un nuevo fármaco semisintético con mejor actividad antineoplásica y menor toxicidad <i>in vivo</i>.</p>
Taxoides	Son los antineoplásicos más efectivos. Varios estudios indican que, a pesar de los efectos secundarios y su poca solubilidad en agua, son la droga de primera elección para tratar el cáncer de mama, ovario, pulmón y otros cánceres metastásicos.

Fuentes: Abuzenadah et al., 2012; Auyeung & Ko, 2012; Baradaran et al, 2014; Guo et al., 2013.

3.5.1 La búsqueda de moléculas bioactivas continúa

La OMS, a partir de su conferencia internacional sobre atención primaria de salud de Alma-Ata en 1978, ha promovido el estudio de las plantas como fuente de medicamentos, impulsando la documentación y evaluación científica de aquellas utilizadas en la medicina tradicional (Mendoza-Espinoza & Schlaepfer, 2010; Bermúdez, Oliveira & Velázquez, 2005). En Guatemala, uno de los nueve países megadiversos de América (es decir, aquellos con mayor índice de biodiversidad de la Tierra) que cuenta con aproximadamente 10,317 especies de flora, una amplia variedad de especies vegetales ya han sido botánicamente caracterizadas y analizadas para validar científicamente las propiedades que la población les atribuye para poder emplearlas de forma segura (Cáceres, 2008; Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente de la Universidad Rafael Landívar, 2012).

Sin embargo, relativamente pocos productos naturales nacionales han sido tamizados para evaluar su actividad contra distintos tipos de líneas celulares cancerígenas y, teniendo en cuenta la fascinante riqueza del país, aunada al precio inaccesible y los efectos secundarios que poseen los medicamentos, las dificultades para acceder y tener disponibilidad del conocimiento biomédico occidental por parte de la población guatemalteca que habita en las áreas rurales, y la cosmovisión indígena que valora considerablemente el uso de terapias naturales (Cates et al., 2013; Cáceres, 2008), resulta muy útil explorar nuevos agentes terapéuticos de origen natural que puedan ser activos contra esta enfermedad de gran impacto social y económico.

Actualmente, la investigación de la actividad farmacológica de las plantas contra el cáncer continúa en varios países, sin ser la excepción Guatemala, que forma parte de la Red Iberoamericana de Investigación en Cáncer, RIBECANCER, que pretende crear un marco de cooperación científica para el descubrimiento y desarrollo de nuevas sustancias eficaces contra el cáncer, con el estudio de la biodiversidad terrestre y marina iberoamericana, a través del aislamiento e identificación de nuevos principios activos, su transformación y síntesis para mejorar las cualidades terapéuticas de sus principios y generar nuevos tratamientos quimioterapéuticos (Cechinel-Filho, 2012).

3.6 Bioensayos empleados para evaluar la actividad anticáncer de los extractos

3.6.1 Tamizaje de citotoxicidad general en *Artemia salina*

La citotoxicidad es la capacidad de producir toxicidad a las células. Su evaluación general puede realizarse por medio de diversos bioensayos. Una microtécnica utilizada consiste en establecer la letalidad en *Artemia salina*, un crustáceo de aguas saladas, cuyas hembras producen quistes que, en condiciones adecuadas, eclosionan produciendo larvas llamadas nauplios. Normalmente se alimentan de algas y bacterias y son el único género animal cuyo estado criptobiótico (quistes) se encuentra disponible comercialmente (Jorge & Pino, 2010).

Este ensayo se empleó inicialmente en 1956, luego fue estandarizado y validado a través de un estudio colaborativo entre diversos centros de investigación que determinaron la concentración letal media de compuestos químicos analizados (LD_{50} , concentración del compuesto analizado a la cual el 50% de los organismos expuestos mueren durante un tiempo determinado) (Abramovitz, Michael, & Thompson, 1956; Jorge & Pino, 2010; Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1995). La reproducibilidad y repetibilidad observadas fueron similares a las obtenidas en el ensayo con *Daphnia* spp (otro género de crustáceo) (Persoone & Vanhaecke, 1984) y, teniendo en cuenta que el 70% de los laboratorios involucrados no estaban familiarizados con el método, se concluyó que la prueba en *Artemia* requiere poca experiencia y tiempo, lo que la convierte en un “valioso instrumento como prueba en una primera evaluación para categorizar la toxicidad de productos químicos y como prueba de referencia para el ambiente marino” (Jorge & Pino, 2010).

Seguidamente, en 1982, Meyer y colaboradores analizaron por primera vez fracciones vegetales estableciendo que existía una correlación entre la mortalidad de los nauplios con la citotoxicidad contra la leucemia y las células de carcinoma nasofaríngeo (Meyer, Jacobsen, McLaughlin, Ferrigni, Nichols & Putnam, 1982). A pesar que la prueba no es altamente específica para la determinación de la actividad antitumoral, se sugiere como un ensayo de monitoreo general para la misma (Persoone & Vanhaecke, 1984). Es así como en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Pardue Cancer Center, utilizando este bioensayo en la pre-evaluación, se han descubierto una amplia variedad de compuestos antitumorales (Jorge & Pino, 2010). En la India también ha resultado útil para identificar especies de plantas

utilizadas en la medicina tradicional que poseen actividad citotóxica (Krishnaraju, Rao, Subbaraju, Sundararaju, Tsay & Vanisree, 2005).

Durante más de 40 años este microbioensayo ha sido empleado en múltiples investigaciones debido a sus múltiples ventajas, tales como la disponibilidad permanente de los huevos de *Artemia*, la falta de necesidad de mantener una colonia viva permanentemente, la homología fisiológica de todos los individuos evaluados, la rapidez y sencillez con que se ejecuta, la facilidad de poder realizarse en cualquier lugar y momento sin necesidad de contar con equipamiento especial, la poca cantidad de muestra necesaria y la alta sensibilidad de los nauplios que les permite evaluar la actividad tóxica de una manera general (Harwig & Scott, 1971; Jorge & Pino, 2010; Krishnaraju et al., 2005; Molina, 2004).

3.6.2 Evaluación de la citotoxicidad en cultivo sobre líneas celulares tumorales

La toxicidad es un proceso muy complejo en los animales y, debido a que la medición *in vitro* de los efectos fisiológicos y sistémicos es complicada, se han desarrollado ensayos que permiten investigar los efectos a nivel celular determinando la citotoxicidad de los compuestos estudiados. La palabra *citotoxicidad*, en referencia a los cultivos celulares *in vitro*, involucra la interferencia de la unión celular ya sea con su matriz o entre sí mismas, alteración de la morfología o afectación de la tasa de crecimiento. Una sustancia citotóxica puede ser citostática si produce el cese de proliferación, o citocida si provoca la muerte de la célula ya sea por necrosis, apoptosis o autofagia (Kuetze, 2014).

Un cultivo celular es el resultado del crecimiento *in vitro* de células derivadas de organismos pluricelulares (Grau Ríos, M. & Grau Sáenz, M. 2010). Inicialmente se obtiene un cultivo celular primario con proliferación limitada (Langdon, 2004), luego se realiza un subcultivo, pasaje o repique (transferencia) a un nuevo contenedor originando un cultivo celular secundario, que puede dar origen a líneas celulares finitas o limitadas (las células se dividen un número limitado de veces antes de entrar en estado de senescencia) y a líneas continuas o infinitas (las células se someten a procesos de transformación que les confieren la capacidad ilimitada de división) (Universidad Nacional de Quilmes, 2002.). Dentro de las principales diferencias se pueden mencionar que las finitas no han sido transformadas, ni son tumorales

por lo que mantienen funciones especializadas, tienen limitación del crecimiento por densidad y responden a la inhibición por contacto aunque son dependientes de anclaje y tienen bajas tasas tanto de crecimiento como de rendimientos en cultivos, mientras que las continuas son todo lo contrario (Cultek, 2007).

Según el crecimiento celular los cultivos pueden ser en monocapa (las células se multiplican hasta cubrir todo el sustrato de la superficie del recipiente) o en suspensión (generalmente se aplican a las células que *in vivo* se encuentran circulantes) (Cultek, 2007). En general, las principales ventajas y desventajas de los cultivos celulares se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales ventajas y desventajas de los cultivos celulares.

Cultivos celulares	
Ventajas	
Permite controlar todos los factores del medio extracelular, tanto los físico-químicos como los fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, etc).	Facilita el aislamiento guiado de las moléculas bioactivas, que son aquellas presentes en el extracto vegetal, responsables de la actividad antineoplásica.
La muestra es homogénea y brinda una alta reproducibilidad, pues la línea celular posee morfología uniforme, lo cual provee un número elevado de réplicas idénticas.	Presenta una menor controversia ética y moral ya que no supone el sacrificio de un gran número de animales de experimentación.
Disminuye el gasto porque utiliza poca cantidad de muestra.	Permite evaluar una amplia variedad de compuestos, como lo son cosméticos, drogas, aditivos alimenticios, entre otros.
Accesibilidad inmediata, pues actualmente existe una gran cantidad de bancos de líneas celulares, como ATCC (American Type Culture Collection), ECACC (European Collection of Animal Cell Culture), ICLC (Interlab Cell Line Collection), JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources), entre otros.	Las células pueden ser obtenidas de diversas fuentes según el objetivo del estudio, por ejemplo, aquellas provenientes de la placenta humana sirven para evaluar si los medicamentos pueden atravesar o no la placenta. Del mismo modo, las células de las articulaciones permiten estudiar medicamentos contra enfermedades reumáticas, etc.
Desventajas	
Posibilidad de contaminación debido a que el medio contiene una mezcla de nutrientes aunado a que las células animales crecen a una menor velocidad que las de los contaminantes.	Inestabilidad genómica, especialmente en los cultivos continuos debido a que el apareamiento de subpoblaciones más competitivas puede resultar en cambios genotípicos y fenotípicos de los subcultivos. Sin embargo, esto puede evitarse parcialmente utilizando células congeladas con un número limitando de pasajes.
Costo más elevado ya que se ha reportado que 1 gramo de tejido en cultivo es 10 veces más costoso que el obtenido en el animal.	

Fuentes: Adegá, Chaves & Ferreira, 2013; Cultek, 2007; Langdon, 2004; Pontificia Universidad Javeriana, 2004.

Si bien el uso de los cultivos celulares ha disminuido el empleo de animales de experimentación, es necesario comprender que estos últimos modelos no pueden sustituirse ya

que es necesario relacionar el efecto no solo con el metabolismo celular sino también con la respuesta sistémica. En cuanto a la farmacocinética de los compuestos bioactivos, es importante tener en cuenta que el comportamiento *in vivo* difiere del observado *in vitro* en ciertos aspectos tales como la capacidad de la droga de penetrar en un tejido y las modificaciones que puede sufrir en su paso por el hígado, por ejemplo puede ocurrir que un compuesto *inofensivo* aumente su toxicidad o viceversa. A fin de mejorar esta técnica y que se aproxime más a la realidad se han planteado alternativas como incorporar la incubación del compuesto de interés con enzimas microsomales de hígado o cocultivar con hepatocitos activos (Kuete, 2014).

Actualmente los ensayos de citotoxicidad *in vitro* son ampliamente utilizados para las investigaciones etnobotánicas, sin embargo, debe de tenerse en cuenta que los componentes que alcanzan el sitio diana pueden ser distintos en cuanto a su composición con respecto al extracto original como consecuencia de las diferencias en la biodisponibilidad. Así mismo es de esperarse que la elucidación de las interacciones existentes entre las sustancias presentes en cada extracto sea un reto debido a la complejidad en su composición (Kuete, 2014).

Así mismo, se ha reportado que entre líneas celulares existe diferente sensibilidad hacia un mismo extracto (Monks et al., 1991). Por ejemplo, Caamal-Fuentes y colaboradores (2011) evaluaron la actividad citotóxica de 41 extractos metanólicos contra siete líneas celulares cancerosas, demostrando que 12 de los extractos presentaron actividad citotóxica contra al menos una línea celular, y que las líneas de cáncer sobre las que se obtuvo mayor actividad citotóxica fueron la de cáncer de cérvix (HeLa) y la de cáncer nasofaríngeo (KB). También puede citarse el trabajo de Longato y colaboradores (2011), quienes evaluaron la actividad antiproliferativa del eupomatenoide-5, obtenido de las hojas de *Piper regnellii*, contra ocho líneas celulares de cáncer: mama (MCF7), melanoma (UACC-62), riñón (786-0), pulmón (NCI-H460), próstata (PC-3), ovario (OVCAR-3), colon (HT29) y leucemia (K-562). Este estudio demostró que la mejor actividad antiproliferativa del compuesto se presentó contra las líneas celulares de cáncer de próstata, ovario, riñón y mama, mientras que su efecto fue limitado contra las demás líneas tumorales.

3.6.2.1 Tipos de ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La viabilidad, supervivencia o muerte celular puede evaluarse con distintos ensayos. La elección del método depende de la naturaleza del compuesto bajo estudio, la respuesta esperada y la célula blanco (Freshney, 2007). A continuación se describen algunos ejemplos.

3.5.2.1.1 Viabilidad evidenciada por actividad reductasa del metabolismo

También conocidos como *ensayos de tetrazolio*, se basan en la reducción de una sal de tetrazolio por medio de distintas enzimas del metabolismo celular produciendo un cambio de color que puede ser cuantificado. El tetrazolio más utilizado, mejor caracterizado y el estándar de oro es el MTT (metil tiazol tetrazolio), que se reduce por medio de las succinato-deshidrogenasas mitocondriales, por lo que la intensidad del color producido es proporcional a la viabilidad. Otro ejemplo es el método de reducción de resazurina (el compuesto se reduce a resorufina tomando un color rosado) en presencia de enzimas reductasas o diaforasas de las mitocondrias y el citosol (Aristizábal & Cordero, 2002; Kuete, 2014).

3.6.2.1.2 Ensayos de viabilidad que no son dependientes de la actividad reductasa del metabolismo

Se utilizan para medir la proporción de células viables. Dependen de la pérdida de la integridad de la membrana determinada por la captación de un colorante al cual la célula normalmente es impermeable, como el azul de tripano, eritrosina, naftaleno negro o yoduro de propidio. Por el contrario, la viabilidad también puede estimarse midiendo la cantidad de algún colorante que normalmente es absorbido por las células viables, como por ejemplo la diacetil fluoresceína, o el rojo neutro (Freshney, 2007; Innoprot, 2015).

3.6.2.1.3 Determinación de la densidad celular

El método de tinción con sulforodamina B (SRB), desarrollado por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI), es un ensayo colorimétrico de punto final que permite identificar tanto células vivas como muertas calculando la cantidad de contenido proteico (McMahon, Monks, Scudiero, Skehan, Storeng & Vistica, 1990; Voigt, 2005). La SRB es un colorante de aminoxantano que posee dos grupos sulfónicos con carga negativa que, en condiciones ácidas (ácido acético 1%), aumentan su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas si las células fueron previamente fijadas con ácido tricloroacético (TCA) (Alfonso, Aristizábal &

Escobar, 2009). Luego de eliminar el colorante libre, se calcula la densidad celular a través de la medición de la cantidad de proteína presente extrayendo el colorante fijado con medio alcalino y leyendo la absorbancia (McMahon et al., 1990).

La quimiosensibilidad de este ensayo fue comparada con la de MTT en el estudio de Ark-Otte y colaboradores (Ark-Otte, Keepers, Peters, Pinedo, Pizao & Winograd, 1991), encontrándose que la tinción con SRB proporcionaba una mejor linealidad y sensibilidad independientemente de la línea celular de cáncer utilizada. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Voigt (2005) donde se reportó que los resultados guardaban una linealidad con respecto al número de células y la proteína celular presente si la densidad de confluencia se encontraba entre el 1-200%.

Dentro de las principales ventajas que presenta se encuentra que el producto final de SRB es estable por tiempo indefinido y que el proceso puede ser interrumpido en varios pasos, a la vez que pueden trabajarse varias muestras al mismo tiempo requiriendo equipo simple y proporcionando una rentabilidad costo-efectividad alta (Kirtikara & Vichai, 2006; Voigt, 2005). Estas ventajas hacen que el ensayo con SRB sea apropiado para medir la citotoxicidad inducida por drogas con una aplicación incluso a gran escala (Voigt, 2005).

3.6.2.2 Parámetros a determinar en la evaluación de la capacidad citotóxica contra líneas celulares cancerosas en el ensayo con SRB

La evaluación de la capacidad citotóxica de un compuesto sobre una línea celular cancerígena requiere la determinación de un conjunto de parámetros, tales como la concentración inhibitoria tanto total como media de crecimiento y el índice de selectividad (Freile-Peigrín, Moo-Puc, & Robledo, 2009).

La concentración inhibitoria total IC_{100} (también conocida como inhibición total de crecimiento, TGI), se refiere a la concentración requerida para detener completamente el crecimiento de las células, evidencia la actividad antiproliferativa (Freile-Peigrín et al., 2009). Se clasifica de acuerdo a Cragg y colaboradores (2006) en: inactivo ($TGI > 50 \mu\text{g/mL}$), actividad débil ($15 \mu\text{g/mL} < TGI < 50 \mu\text{g/mL}$), actividad moderada ($6.25 \mu\text{g/mL} < TGI < 15$

$\mu\text{g/mL}$) y actividad potente ($\text{TGI} < 6.25 \mu\text{g/mL}$). Aquellos compuestos que se encuentran entre las últimas dos categorías se consideran promisorios. Por otro lado, la concentración inhibitoria media del extracto (IC_{50} , concentración a la cual se inhibe el 50% del crecimiento) de acuerdo al NCI puede clasificarse en moderadamente citotóxica ($20 \leq \text{IC}_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$), citotóxica ($10 < \text{IC}_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$), y altamente citotóxica ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) (Ellithey, Hussein, Lall & Meyer, 2014).

Ahora bien, la especificidad de la actividad citotóxica se determina a través del índice de selectividad (IS), que indica el nivel de nocividad de cada extracto sobre las células normales (Freile–Pelegrín et al., 2009) y se obtiene con la relación del valor de la citotoxicidad media (CC_{50} , concentración del extracto crudo que mata el 50% de las células con respecto a un control que no fue expuesto al compuesto bajo estudio) del extracto sobre células normales entre el valor de la citotoxicidad media sobre células cancerosas ($\text{IS} = \text{CC}_{50} \text{ células normales} / \text{CC}_{50} \text{ células cancerosas}$) (Caamal-Fuentes, Cantillo-Ciau, Cedillo-Rivera, Flores-Guido, Mena Rejon & Moo-Puc, 2009). El IS permite distinguir los compuestos altamente activos pero tóxicos de aquellos que son selectivamente activos contra ciertas líneas celulares. Es por esto que es deseable obtener un IS elevado ($\text{IS} > 10$), y los extractos que lo posean merecen ser estudiados, pues podrían ser fuentes de compuestos con actividad promisoria. En algunas ocasiones se ha encontrado que los extractos fraccionados pueden presentar una mayor actividad y menor toxicidad como consecuencia de remover los compuestos tóxicos, aunque también puede ocurrir el efecto inverso dada la sinergia existente entre sus compuestos (Acuña, Caballero, Fernández-Calienes, Gutiérrez, Mendiola & Scull, 2011; Kuete, 2014).

3.6.3 Ensayo de genotoxicidad general en *Allium cepa*

La genotoxicidad, capacidad genotóxica o potencial genotóxico de una sustancia se refiere a la capacidad que tiene de producir un efecto destructivo sobre el material genético de la célula (Shah, 2012). Su determinación adquiere importancia por la alta correlación que existe entre el daño al ADN con las enfermedades hereditarias y con las afectaciones somáticas (como el cáncer), por lo que resulta imprescindible su evaluación en las plantas medicinales

para que puedan ser incorporadas sin representar riesgo alguno para la salud (Piloto, Remigio, Rodríguez & Vega, 2008).

Se han descrito diferentes métodos (tanto *in vitro* como *in vivo*) para la determinación de la genotoxicidad, su clasificación comprende: A) Ensayos para mutaciones génicas como: mutación reversa en *Salmonella typhimurium*, mutaciones génicas en cultivos celulares de mamífero, entre otros; B) Ensayos para evaluar aberraciones cromosómicas: ensayo de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*, ensayo de micronúcleos, ensayo citogenético de células germinales de mamífero, etc; C) Ensayos para otros efectos en el material genético: recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*, intercambio de cromátidas hermanas *in vitro*, entre otros (De la Peña, 2012).

Sin embargo, en la búsqueda de pruebas a corto plazo, las metodologías donde se emplean materiales vegetales han demostrado ser muy útiles en la investigación básica (Leme & Marin-Morales, 2009). Las principales ventajas son el bajo costo, fácil almacenamiento y manipulación y, lo más importante, la buena correlación con otros ensayos. Las plantas que han sido utilizadas son: *Vicia faba*, *Allium cepa* (cebolla blanca) y *Tradescantia* (Cortés et al., 2013; Cotelle, Féraud & Masfarau, 1999; Dizer, Fischer, Hansen & Wittekindt, 2002; Fiskesjö, 1985; Nikoloff, 2014).

La prueba en *Allium cepa* es sencilla y de bajo costo, con ventaja sobre otros métodos por no requerir preparaciones previas ni la adición de sistemas metabólicos exógenos (Leme & Marin-Morales 2009). Ha sido propuesta como el procedimiento estándar para llevar a cabo el monitoreo ambiental y la evaluación de aguas residuales (Abdel, El-Sahaby, Mashaly & Soliman & 2003). Aparte de su uso como determinante de genotoxicidad química, también se ha validado como una alternativa para el monitoreo del potencial genotóxico de extractos vegetales desde 1999 (Laughinghouse & Tedesco, 2012), en donde se evalúan distintos parámetros de uso estándar tanto microscópicos como macroscópicos (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros microscópicos y macroscópicos a evaluar en la prueba de *A. cepa*

Parámetro	Característica microscópica
Índice mitótico (IM)	Número de divisiones celulares por 1000 células observadas en un tiempo de determinado. Estima la velocidad del crecimiento tisular. Valores de IM inferiores al del control negativo (agua) indican alteraciones inhibitorias, al contrario, los valores superiores indican incremento en la división celular, evidenciando la capacidad de formar tejido tumoral. La concentración donde ocurre el 50% de mitodepresión se considera el umbral citotóxico.
Aberraciones cromosómicas (ACs)	Cambios cromosomales que pueden sufrir las estructuras genéticas (efectos clastogénicos, como rupturas en ADN, inhibición en su síntesis y replicación) o el total de los cromosomas (efectos aneugénicos, es decir, alteraciones numéricas).

*Continúa en página siguiente.

Continuación Tabla 4. Parámetros microscópicos y macroscópicos a evaluar en la prueba de *A. cepa*

Parámetro	Característica macroscópica (en raíz)
Caracterización de la mitosis	Metafase y anafase normal, 100 observaciones por lámina.
Anafase temprana	Grupos celulares en anafase no separadas completamente. Su incremento en número indica una división celular lenta.
Puentes o fragmentos cromosómicos	Efecto clastogénico que resulta de la rotura de cromosomas (y cromátidas).
Cromosomas errantes	Efecto c-mitótico débil indicativo de riesgo de aneuploidia (C-mitosis: efecto tóxico débil, provocado por alteración o inhibición en la formación del huso mitótico).
Pegajosidad (stickiness)	Cromosomas pegajosos que se agrupan por fallas en su proceso de condensación e indican alta toxicidad, usualmente irreversible y probablemente produzca apoptosis.
Cambio de color	Ciertas sales pueden provocar cambio de color. El viraje a un color marrón en las raíces dependerá del efecto tóxico del tratamiento que provoca la muerte celular.
Forma	Formación de tumor: evidenciado por hinchazón en las puntas de la raíz. Doblamiento: de la raíz o su punta, puede darse por el tratamiento con ciertas sales metálicas.
Longitud	El valor medio de la longitud radicular se puede representar gráficamente, comparando concentraciones del tratamiento, versus longitud radicular media respecto al percentil del control y, por medio de la curva, se puede obtener la concentración efectiva (CE) causando 10, 50 o 90% de restricción del crecimiento en relación al control negativo.

Nota: cabe mencionar que el extracto bajo estudio debe ser citotóxico mas no genotóxico.

Fuentes: Cortés et al., 2013; Fiskesjö, 1985; Kouznetsov, Ortiz, Restrepo, Reyes & Rojas, 2012; Sharma, 1983.

3.6.4 Evaluación de la capacidad antioxidante

Los radicales libres (RL) son especies químicas, cargadas o no, con un electrón desapareado en el orbital externo que los convierte en inestables, altamente reactivos, y con una vida media corta, por lo que actúan cerca del sitio en el que se forman. Son producidos por diferentes mecanismos, como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y las reacciones de oxidación (Venereo-Gutiérrez, 2002).

Las fuentes de RL pueden ser endógenas (fosforilación oxidativa, cadena respiratoria mitocondrial, oxidación enzimática de L-arginina, citocromo P450, activación de células inflamatorias y por actividad de enzimas como NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa y xantina oxidasa) o exógenas (luz UV, radiación ionizante, patógenos, dieta hipercalórica y algunas drogas) (García-Gasca, Martínez-Dávila, Mejía & Reyes, 2009). Los RL pueden producirse de manera accidental o natural. Cuando se encuentran en niveles fisiológicos normales participan en la fagocitosis, presentación de antígeno, detoxificación, activación enzimática en la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, favorecen la quimiotaxis, la apoptosis por la activación de las caspasas y la síntesis tanto de colágeno como de prostaglandinas (Begoña & Cadena, 2014; Garewal, 1997; Salganik, 2001; Venereo-Gutiérrez, 2002).

Por otro lado, los RL dañinos se dividen en especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Para referirse a ambos grupos se les denomina especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNOS). Entre estas especies reactivas hay radicales libres y agentes que pueden convertirse fácilmente en radicales (Tabla 5) (García-Gasca et al., 2009; Gupta, 2015).

Tabla 5. Ejemplos de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Especies reactivas de oxígeno		Especies reactivas de nitrógeno	
Radicales	No radicales	Radicales	No radicales
Anión superóxido (O ₂ ^{•-})	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Óxido nítrico (NO [•])	Acido nitroso (HNO ₂)
Hidroxilo (OH [•])	Ozono (O ₃)	Dióxido de nitrógeno (NO ₂ [•])	Ión nitronio (nitriilo) (NO ₂ ⁺)
Peroxilo (ROO [•])	Oxígeno singlete (¹ O ₂)		Peroxinitrito (ONOO [•])
Alcoxilo (RO [•])	Acido hipocloroso (HOCl)		Peroxinitrito alquilo (ROONO)
Hidroperoxilo (HO ₂ [•])	Peroxinitrito (ONOO [•])		Anión nitroxilo (NO ⁻)
	Acido hipobromoso (HOBr)		Catión nitrosilo (NO ⁺)
			Cloruro de nitriilo (NO ₂ Cl)

Fuente: Adaptado de Rigas & Sun, 2008.

En cuanto a las ROS, es necesario comprender que estas especies poseen *múltiples personalidades biológicas*, es decir, a bajas concentraciones protegen a las células, pero en concentraciones más altas pueden dañar ciertas moléculas (ADN, proteínas y lípidos – causando peroxidación lipídica-) ya sea por una alteración directa de la estructura y función, por la aceleración de la proteólisis endógena selectiva o por el incremento de la función enzimática, provocando lo que se denomina estrés oxidativo (Rigas & Sun, 2008).

El daño o estrés oxidativo es un mecanismo general de daño celular que produce alteraciones de la relación estructura-función de cualquier célula y, por ende, de cualquier órgano y sistema. Si bien éste se asocia a patologías (neurológicas, aterosclerosis, infarto al miocardio, etc), también existen condiciones fisiológicas que lo producen (por ejemplo, ejercicio muscular, fagocitosis de bacterias, y envejecimiento natural) (Hermes-Lima, 2005).

El estrés oxidativo resulta de la exposición de la materia viva a un desequilibrio entre las sustancias o factores prooxidantes y los antioxidantes encargados de eliminarlos, producto de un aumento en la producción de RL, una reducción de los sistemas antioxidantes, o de una combinación de ambos (Venereo-Gutiérrez, 2002). Los antioxidantes son sustancias que se oponen a las reacciones oxidativas o inhiben las promovidas por las ROS. Funcionan por diferentes mecanismos, como agentes preventivos de la formación de RL, agentes eliminadores de radicales que inhiben la iniciación y propagación en cadena, como enzimas reparadoras la membrana celular y como agentes adaptadores que generan enzimas antioxidantes (Blumberg, Kelly, Ladas, Lawenda, Sagar & Vickers, 2008; Zeisel, 2004).

Teniendo en cuenta que del 1 al 4% del oxígeno se convierte en ROS, las células se defienden de los RL a través de los siguientes sistemas de defensa antioxidante (García-Gasca et al., 2009; Hermes-Lima, 2005; Begoña & Cadena, 2014):

- Endógenos: principalmente enzimáticos (superóxido dismutasa –SOD- , glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa), aunque también hay defensas no enzimáticas como melanina, ácido úrico, melatonina, etc.
- Exógenos: mediante la ingestión de nutrientes que los contienen. Actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar RNOS, por lo que su reposición debe ser continua. Éstos comprenden la vitamina E, vitamina C, β -caroteno, licopeno y zeaxantina, presentes especialmente en plantas.

Aunque la capacidad antioxidante no puede determinarse directamente, sí puede evaluarse en un proceso de oxidación controlado. Sin embargo, actualmente no existe un método estándar a nivel mundial, pues hay que tener en cuenta que la capacidad

antioxidante de una muestra no depende solo de la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes (los cuales pueden interactuar entre sí produciendo efectos tanto sinérgicos como inhibitorios), sino también del microambiente en el que se encuentra el compuesto (Asurero, Fett, Kuskoski, Mancini-Filho & Troncoso, 2005; Londoño, 2012; Tovar, 2013). Los métodos para determinar la capacidad antioxidante pueden ser indirectos, si estudian la habilidad del antioxidante de estabilizar algún radical libre; o directos, si miden el efecto sobre la degradación oxidativa de un sistema (ejemplo: lípidos, proteínas, entre otros) (Londoño, 2012). Así también pueden clasificarse en ensayos *in vitro* o *in vivo*. En los primeros generalmente se emplea una sustancia cromógena, cuya pérdida de color es proporcional a la concentración, aunque es solo una aproximación de lo que ocurre *in vivo* (Tabla 6). Por el contrario, los ensayos *in vivo* pueden presentar inconvenientes como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo (Asurero et al., 2005).

Tabla 6. Clasificación de modelos de ensayo *in vitro* según modo de reacción

Categoría	Ensayo
Ensayos basados en la transferencia de electrones (TE).	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS•). 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•). Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP). N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD). Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC).
Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).	Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC). Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP). Inhibición de la oxidación del ácido linoleico. Inhibición de la oxidación de lípidos de baja densidad (LDL).

Fuente: Tovar, 2013.

Dentro de los métodos indirectos, *in vitro*, más empleados se encuentran el ABTS• y el DPPH•. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones aunque el DPPH• tiene la ventaja de poder obtenerse directamente sin una preparación previa, es más rápido, simple y de menor costo pero solo puede disolverse en medio orgánico a diferencia del ABTS• que se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos pero tiene que ser preparado previamente (Asurero et al., 2005; Tovar, 2013).

El DPPH es un radical orgánico estable de color violeta disponible a nivel comercial (Londoño, 2012). La estabilidad relativa se debe a la deslocalización del electrón

desapareado, cuando este radical entra en contacto con otro radical o con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno se produce su forma reducida DPPH-R o DPPH-H, induciéndose una disminución del color y, por consiguiente, de la absorbancia (Oropeza, 2012). Los resultados del ensayo DPPH se expresan como el valor de la concentración inhibitoria media (IC₅₀), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración del DPPH al 50% (Tovar, 2013).

Por otra parte un método que, aunque no se utiliza específicamente para medir la capacidad antioxidante es útil para determinar el contenido de polifenoles (los cuales se asocian a la misma), es el de Folin- Ciocalteu. En este ensayo los polifenoles se oxidan en solución alcalina por el heteropolianión molibdotungstosfosfórico amarillo, dando como resultado el molibdotungstosfosfato azul. Este método es sensible, cuantitativo y relativamente independiente del grado de polimerización de los fenoles (Gupta, 2015; Tovar, 2013). Entre los compuestos fenólicos más importantes y de origen natural encuentran los flavonoides, tocoferoles y ácidos fenólicos (Gutiérrez & Muñoz, 2011).

3.7 Estudios previos de extractos vegetales con actividad anticancerígena

A nivel mundial los extractos de plantas han sido investigados para determinar su posible acción anticancerígena con el fin de desarrollar medicamentos alternativos distintos a los quimioterapéuticos que, en algunas ocasiones, resultan inaccesibles y producen efectos adversos que pueden llevar al paciente a abandonar el tratamiento (Abuzenadah et al., 2012).

El interés para el estudio de los mismos ha aumentado desde que se conoce que algunos de los compuestos derivados de las plantas medicinales son capaces de atenuar la formación de un tumor y su crecimiento por procesos antiproliferativos y/o pro-apoptóticos (Auyeung & Ko, 2012). Sin embargo, de acuerdo al estudio realizado por Mazzio y Soliman (2009), las plantas con efecto anticancerígeno se encuentran expandidas a lo largo de todo el reino vegetal ya que no existe un patrón definido que correlacione ese efecto entre diversas plantas de familias o géneros similares. Así mismo cabe resaltar que lo ideal es que el extracto sea citotóxico únicamente para las células cancerígenas y que no produzca genotoxicidad a las células normales.

3.7.1 Estudios realizados en Asia, África y Europa

En la Tabla 7 se presentan algunos ejemplos de estudios que evidencian la capacidad citotóxica que poseen diversas plantas analizadas.

Tabla 7. Ejemplos de estudios que han investigado la actividad citotóxica de extractos vegetales sobre líneas celulares tumorales.

Lugar	Descripción
Bangladesh	Costa y colaboradores evaluaron once especies, de las cuales identificaron que tres (<i>Oroxylum indicum</i> , <i>Moringa oleífera</i> y <i>Aegle marmelos</i>) eran potencialmente activas contra el cáncer.
Tailandia	Se estudiaron 40 plantas usadas en la medicina tradicional, y se demostró que el 60% de los extractos acuosos presentaban actividad anti proliferativa en líneas celulares HeLa por el ensayo de SRB debido a la inducción de apoptosis.
Europa	Se está utilizando la terapia con extracto vegetal de <i>Viscum album</i> para el tratamiento del cáncer de mama y ginecológico.
Irlanda	Se investigaron 20 extractos de plantas para determinar su potencial antineoplásico en células de cáncer laríngeo (Hep-2), reportando que <i>Psoralea corylifolia</i> y <i>E.grandidens</i> fueron las especies más eficaces con IC ₅₀ de 22 y 57 µg/ml respectivamente.
Italia	Se evaluó la citotoxicidad de plantas de la familia Labiatae y Lauraceae en líneas celulares de melanoma amelanótico (C32), adenocarcinoma renal (ACHN), carcinoma de próstata hormona dependiente (LNCaP) y carcinoma mamario (MCF-7) por el método SRB encontrando que el extracto con mayor actividad contra C32 y ACHN fue <i>L. nobilis</i> , con IC ₅₀ de 75.45 y 78.24 µg/ml respectivamente.
África	Se reportaron aproximadamente 25 especies de plantas con citotoxicidad contra células cancerígenas, el 56% de ellas son arbustos y los órganos más utilizados fueron las cortezas y las raíces, el extracto más utilizado fue el metanólico (60%). Las líneas celulares más empleadas para la evaluación fueron: células de leucemia, cáncer mamario, cáncer de colon y cáncer de pulmón.

Fuentes: Amaral et al., 2005; Boonpisuttinant, Manosroi, A., Manosroi, J. & Manosroi, W. 2012; Dicato, Diederich, Sawadogo, Schumacher & Teiten, 2012; Glockmann, Kiene, Kienle & Schink, 2009; Loizzo, Menichini, Saab, Statti & Tundis, 2007; Ryan & Whelan, 2003.

3.7.2 Estudios realizados en América

En México, una investigación realizada por Barrientos-Benítez y colaboradores (2006) reportó que el extracto de *Helianthella quinquenervis*, uno de los treinta y un extractos crudos de plantas medicinales mexicanas evaluados contra adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón (A-549), poseía actividad significativa contra MCF-7. Por otro lado, en el 2011 se evaluaron 21 de 51 especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional maya mexicana para tratar síntomas similares a los de cáncer en siete líneas celulares cancerígenas [cáncer de pulmón (A549), de cérvix (HeLa), laríngeo (Hep-2), nasofaríngeo (KB), de mama (MCF-7), prostático (PC-3), escamoso de cérvix

(SiHa)] y en una línea celular normal de riñón embrionario (HEK-293), encontrándose que *Aeschynomene fasciculatus* y *Bonellia macrocarpa* presentaban la mayor actividad (Caamal-Fuentes et al. 2011). Así mismo, en otra investigación del mismo país se analizaron 181 especies vegetales empleadas en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer, descubriendo que 88 (29.3%) mostraron actividad citotóxica en modelos celulares *in vitro* (Alonso-Castro, Dominguez, Garcia-Carranca, Gomez-Sanchez, Salazar-Olivo & Villarreal, 2011).

De modo similar, en Puerto Rico se tamizó la citotoxicidad de siete especies nativas del lugar, revelándose que los extractos que mostraron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de la línea celular de cáncer de mama fueron los de *Simarouba tulae*, *Croton discolor* y *Guaiacum officinale* (Carvajal-Vélez et al., 2015). Así también, en Colombia se evaluaron 51 extractos de 31 plantas de uso medicinal, demostrándose una mayor actividad con los extractos de etanol y diclorometano de las hojas de *Acnistus arborescens* contra los fibroblastos de pulmón de hámster chino (V79) (Calle, López, Marín, Monge & Pinzón, 1996). Por otra parte, en Perú se demostró que el extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* poseía actividad antineoplásica en un modelo *in vivo* de carcinosarcoma de células Walker-256 (Acco et al., 2010).

Del mismo modo, en Brasil se estudió una planta medicinal empleada tradicionalmente llamada *Bauhinia platyptala*, y se encontró que su extracto etanólico tenía actividad antioxidante mientras que su fracción etérea era mutagénica a altas concentraciones. Sin embargo, tanto el extracto etanólico como la fracción etérea, fueron capaces de inducir la citotoxicidad de las células V79 (Caramão et al, 2012). Otro estudio realizado en el mismo país, demostró la capacidad de *Passiflora alata* (una especie utilizada como planta medicinal) para inducir genotoxicidad (Barbosa et al, 2010) y el potencial antiproliferativo que posee *Piper regnellii* (Longato et al., 2011).

Por otro lado, en Sur América, la preparación botánica con *Pao pereira*, ha sido ampliamente utilizada en los pacientes con cáncer. En el estudio realizado por Chen & Yu (2014) se demostró su potencial utilidad como tratamiento del cáncer de ovario al obtener una

inhibición de crecimiento del 79% y una disminución de ascitis en un 55%. Así mismo, al combinarla con el carboplatino, se inhibió el crecimiento tumoral hasta un 97%.

3.7.3 Estudios realizados en Guatemala

A nivel nacional durante el período de 2001-2004, se ejecutó un proyecto multinacional de la Organización de los Estados Americanos (OEA) que involucró, además de este país, a Argentina, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Nicaragua y Panamá. Se investigaron 310 especies con 452 extractos en total, utilizando las siguientes líneas celulares: cáncer de mama (MCF-7), de pulmón (H-460) y de sistema nervioso central (SF-268). Se identificó que la planta más activa contra las tres líneas celulares cancerígenas fue *Thevetia ahouai*, mientras que dos plantas mostraron actividad selectiva: *Blepharocalyx salicifolius* contra MCF-7 y *Senna occidentalis* contra SF-268 (Cáceres et al., 2012).

Posteriormente, en el año 2006, se ejecutó una encuesta etnobotánica a partir de la cual se procedió a evaluar la citotoxicidad en células de cáncer de riñón (RCC7) de las hojas de *Argemone mexicana*, *Cornutia pyramidata*, *Petiveria alliacea*, *Persea americana* y el rizoma de *Phlebodium pseudoaureum*. La viabilidad celular se evaluó por la técnica de MTT, obteniéndose los mejores resultados con *P. alliacea* y *P. americana*, pues tuvieron el mayor efecto proapoptótico. Cabe mencionar que las otras tres plantas tuvieron un efecto proporcional a la dosis (Saravia, 2009).

Seguidamente, en el 2011, se realizó un estudio de extractos con metanol y diclorometano de dos especies, *Piper jacquemontianum* y *Piper variable*, encontrándose que la extracción con diclorometano de ambas era citotóxica contra células de cáncer de mama (MCF-7), de pulmón (H-460) y de sistema nervioso central (SF-268) (Cáceres, 2011).

Posteriormente, en el 2013 se evaluó la actividad citotóxica de los extractos acetónicos y metanólicos de 73 plantas medicinales utilizadas en Guatemala, contra cuatro líneas celulares cancerígenas (cáncer de mama [MCF-7], piel [A-375], lengua [CAL 27] y cérvix [HeLa]) y una línea celular normal (obtenida de la transformación de células epiteliales renales del mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, células Vero) (Ammerman, Azad & Beier-Sexton,

2008; Cates et al., 2013). Dentro de las especies que presentaron actividad anticáncer se encontraron *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*, los principales resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento de líneas celulares cancerosas y una línea celular normal de *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*.

Especie	Extracto	Línea celular (% inhibición)		
		MCF-7 ^a	HeLa ^b	Vero ^c
<i>Bursera simaruba</i>	Acetónico	85±13 ^d	85±1	0
	Metanólico	86±3	74±7	0
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Acetónico	98±1	90±2	31±8
	Metanólico	98±1	70±18	29±1

^alínea celular de cáncer de mama; ^blínea celular de cáncer de cérvix; ^clínea celular normal (Vero); ^dpromedio del porcentaje de inhibición ± SD. Los autores consideraron activos aquellos extractos que presentaron un porcentaje de inhibición mayor a 60% empleando una concentración de 200 µg/mL. No fue reportado el índice de selectividad.

Fuente: Adaptado de Cates et al., 2013.

3.8. Uso de antioxidantes en prevención y en tratamiento concomitante de cáncer

El estrés oxidativo asociado al daño celular ha sido indicado en desordenes como el cáncer, diabetes mellitus, arterosclerosis, desordenes neurodegenerativos, etc. Sin embargo, su relación con el cáncer ha sido tema de debate, especialmente por el hecho que las células cancerosas están bajo altos niveles de estrés oxidativo comparadas con las células normales (Begoña & Cadena, 2014).

La modificación de la expresión génica mediada por ROS afecta directamente el balance entre la proliferación y la apoptosis celular, por lo que pueden actuar como agentes antitumorigénicos, pero a su vez, su desbalance interviene en enfermedades crónicas como la transformación neoplásica (Tabla 9) (García-Gasca et al., 2009). Es significativa, aunque incompleta, la evidencia del rol de RNOS en el cáncer, ya que se ha indicado que estos inducen genotoxicidad, promoción del crecimiento de células transformadas y angiogénesis, así como la regulación de la apoptosis. Un estrés oxidativo persistente en el cáncer se ha considerado como contribuyente en la activación oncogénica, inestabilidad genómica, resistencia a la quimioterapia e incluso en invasión y metástasis. (Rigas & Sun, 2008).

Por otro lado, los antioxidantes, en condiciones fisiológicas, eliminan los RL con el fin de mantener la homeostasia y pueden jugar un papel protector en individuos sanos. Algunos de sus mecanismos de acción son: intervención en la proliferación celular, apoptosis y angiogénesis; modulación de citocromo P450; disminución de la oxidación del ADN; bloqueo de la proliferación celular relacionado a la señal de transducción y disminución de migración celular (Blumberg et al., 2008).

Tabla 9. Efecto y/o función de las ROS según su concentración en células normales y cancerosas.

[ROS] ^a	Células normales	Células cancerosas
Niveles fisiológicos (Homeostasis).	Señalización celular. Fagocitosis. Detoxificación. Equilibrio entre proliferación y apoptosis.	Niveles elevados en células cancerosas. Alto estado oxidativo
Altas concentraciones (Estrés oxidativo).	Daño al ADN. Daño mitocondrial. Daño a la membrana. Desbalance proliferación y apoptosis. Envejecimiento prematuro. Enfermedades crónicas. Transformación celular.	Inestabilidad genética. Daño acumulativo al ADN. Proliferación celular. Progresión y metástasis
Muy elevadas concentraciones (Alto estrés oxidativo).	Muerte celular: apoptosis/necrosis	Muerte celular: apoptosis/necrosis

^aespecies reactivas de oxígeno.

Fuente: Adaptado de García-Gasca et al., 2009.

Aunque los antioxidantes pueden jugar un rol en la prevención primaria de cáncer, al secuestrar RNOS, la misma acción podría esperarse como contraproducente en la terapia con radiación y agentes quimioterapéuticos, que actúan a través de la producción de RNOS y la inducción de apoptosis, por lo que podría proteger a las células tumorales y potencialmente reducir la eficacia de los tratamientos (Blumberg et al., 2008; Cai et al., 2012).

El principal efecto terapéutico de la radiación, se da indirectamente por la ionización de moléculas de agua que reactivan especies de oxígeno como el superóxido y radicales hidroxilo. Estos radicales libres reaccionan con el ADN nuclear creando enlaces estructurales potencialmente dañinos para las células induciendo una muerte celular (Blumberg et al., 2008). Del mismo modo, los agentes quimioterapéuticos también pueden inducir la

producción de RNOS e inducir la muerte celular en varios tipos de cáncer a través de estrés oxidativo (Rigas & Sun, 2008). Los antioxidantes pueden inhibir la apoptosis o muerte celular vía la inactivación de RNOS y tal inhibición, en un tumor en desarrollo, puede acelerar su crecimiento al bloquear los mecanismos que inducen la muerte celular. Así los antioxidantes pueden ejercer un efecto promotor canceroso (Begoña & Cadena, 2014; García-Gasca et al, 2009).

Datos de algunos estudios indican que los suplementos con antioxidantes a dosis intermedias y altas, pueden reducir la eficacia de la radiación contra células cancerosas o estimular el crecimiento celular. Sin embargo, la interpretación de estos datos experimentales es difícil, porque las dosis que inhiben el crecimiento de células cancerosas varían entre especies y tipos de tumor, y la distribución de antioxidantes varía entre células tumorales y células normales (Blumberg et al., 2008). Por lo que son necesarias investigaciones adecuadamente fundamentadas o estudios observacionales en pacientes con un diagnóstico específico de cáncer que reciben tratamiento con un régimen específico para abordar la problemática de estas asociaciones (Fleischauer, Jacobson, Kelly, Kennedy, Ladas & Teel, 2004).

En una investigación realizada por Carlson y colaboradores (2015) se buscó información en 78 instituciones de cáncer en Norteamérica respecto a las políticas y directrices que tiene cada una de ellas sobre el uso de antioxidantes tanto en la prevención como durante y después del tratamiento. Se encontró que el uso de suplementos de antioxidantes durante el tratamiento de cáncer es más restrictivo que lo que la evidencia podría sugerir, o sea que se evita el consumo de estos suplementos sin demostraciones científicas que fundamenten un efecto contraproducente al tratamiento principal. Ellos concluyeron que con la comunicación apoyada en investigaciones exhaustivas se podrían desarrollar más políticas y directrices basadas en evidencia.

Respecto al tratamiento de cáncer de mama, Cai y colaboradores (2012) realizaron un estudio prospectivo donde se concluyó que existía asociación entre el uso de suplementos antioxidantes (vitamina E, vitamina C y multivitaminas) con la disminución de la mortalidad

y el riesgo de recurrencia. Sin embargo, en una revisión retrospectiva de 22 estudios respecto al uso de suplementos antioxidantes durante el tratamiento de cáncer de mama, ninguna evidenció una conclusión específica sobre los efectos de éstos durante el tratamiento convencional en relación a la toxicidad, respuesta del tumor, recurrencia o supervivencia, solo pocos de ellos sugirieron que los antioxidantes podían disminuir algunos efectos secundarios asociados al tratamiento, pero no de manera general, lo cual indica que la evidencia es insuficiente para brindar información específica respecto al uso de antioxidantes durante tratamiento de cáncer de mama (Greenlee, Hershman & Jacobson, 2009).

Ahora bien, en cuanto a los estudios realizados en plantas como fuentes importantes de antioxidantes, se ha reportado que la corteza de pino (*Pino cubensis* G.) tiene propiedades antioxidantes además de presentar actividad anticáncer. Así mismo, estudios previos han demostrado que el aceite de palma real (*Roystonea regia* Kunth.), que contiene antioxidantes naturales que previenen el cáncer, inhiben el desarrollo de cáncer de mama en ratas (García Bacallao, García Gomez, Rojo & Sánchez, 2001). Por otro lado, el brócoli también ha sido considerado como un vegetal con posibles propiedades antineoplásicas por contener diversos compuestos que actúan como antioxidantes (sulforafano e indol-3-carbinol) y por alterar los niveles de estrógeno en el cuerpo modificando el riesgo de padecer cáncer de mama (American Cancer Society, 2008).

Sobre *Bursera simaruba* (Anexo 1), en un estudio realizado en México en el 2014, se evaluó la actividad antioxidante de extractos obtenidos de ramas de corteza utilizando diferentes metodologías y se determinó que el extracto con hexano evaluado por dos métodos (DPPH y ABTS) produjo insignificante poder antioxidante, mientras que el extracto metanólico presentó actividad antioxidante con un IC_{50} de 2.117 mg/mL y 2.574 mg/mL para los métodos DPPH y ABTS respectivamente, indicando una pobre actividad antioxidante, la cual correlacionó con la baja cuantificación de compuestos fenólicos (Bah, Castañeda, Gutiérrez-Avella, Mendoza, Moreno & Rodríguez, 2014). Sin embargo, se sugiere que los métodos más comunes pueden subestimar la verdadera capacidad antioxidante de los extractos de plantas, pues en este mismo estudio se evaluó también la actividad antioxidante por técnicas electroquímicas para extractos naturales por volumetría de pulso diferencial

(DPV), la cual reveló que el extracto metanólico contiene compuestos electroactivos que indican una buena capacidad antioxidante (Bah et al., 2014).

En cuanto a *Byrsonima crassifolia*, un estudio comparativo realizado en Brasil, reportó que esta planta obtuvo los valores más altos de actividad antioxidante ($IC_{50} 17.31 \mp 5.34$ mg/mL) en comparación con otras dos plantas analizadas (Abadio, Oliveira & Silva, 2012). Se ha informado que sus compuestos fenólicos, tales como el ácido gálico y flavonoides, tienen actividad antioxidante, al igual que sus proantocianidinas oligoméricas (Anexo 1). Otros compuestos que han recibido especial atención por mostrar una potente actividad antioxidante son las unidades monómeras (catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina) (Fernández, 2012; Carvalho et al., 2012).

4. Justificación

El cáncer es un problema de salud importante a nivel mundial que afecta principalmente a los países de medianos y bajos ingresos. En Guatemala, durante el 2012 se estimó una incidencia de 13,271 casos (excluyendo el cáncer de piel no melanoma). Esta enfermedad tiene un gran impacto social y económico, pues aumenta los años potenciales de vida perdidos (por el fallecimiento de personas jóvenes) e incrementa la inversión monetaria que el país realiza para el cuidado de los pacientes.

A pesar que en la actualidad existe una amplia variedad de tratamientos farmacológicos para tratar esta enfermedad, muchos producen efectos adversos, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos antineoplásicos que sean citotóxicos sobre células cancerosas pero no sobre las normales y que no produzcan genotoxicidad. Estas características harán que produzcan menos efectos secundarios sin perder su actividad primaria.

Una estrategia importante para elaborar nuevos fármacos anticancerígenos ha sido el estudio de agentes derivados de productos naturales, ya que se ha descrito que compuestos provenientes de las plantas medicinales son capaces de atenuar la formación de un tumor y su crecimiento por procesos antiproliferativos y/o pro-apoptóticos. Teniendo en cuenta que Guatemala cuenta con una fascinante riqueza natural por ser un país megadiverso, y que la cosmovisión indígena valora considerablemente el uso de terapias naturales, resulta entonces particularmente prometedora la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural.

En este trabajo se estudiará la capacidad citotóxica de dos plantas nativas de Guatemala (*Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*), cuyos extractos acetónicos y metanólicos han sido reportados por Cates y colaboradores (2013) como activos contra líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa) y de mama (MCF-7), siendo esta última sobre la cual se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición. Se evaluarán cuatro diferentes fracciones orgánicas (hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol) de la corteza y hojas sobre la línea celular MCF-7, con el fin de facilitar la identificación de las familias de moléculas

responsables del efecto antineoplásico. Esta información, puesta a la disposición de la comunidad científica, permitirá el diseño y posterior ensayo de nuevos fármacos antineoplásicos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad citotóxica de cuatro fracciones orgánicas de dos especies nativas de Guatemala (*Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*), con potencial actividad anticáncer identificada por estudios previos de tamizaje.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad citotóxica general por inhibición de nauplios de *Artemia salina* de las fracciones orgánicas obtenidas de las especies en estudio.
- Determinar la actividad citotóxica de los extractos sobre la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y la línea normal (Vero), por medio del cálculo de la concentración inhibitoria media (IC₅₀), el índice de selectividad (IS) y la inhibición total del crecimiento (IC₁₀₀).
- Evaluar la actividad genotóxica por medio del ensayo de *Allium cepa* de las fracciones que presenten actividad citotóxica.
- Determinar la actividad antioxidante de las fracciones bajo estudio por las técnicas de DPPH y fenoles totales por métodos micrométricos.

6. Hipótesis

Al menos una de las fracciones orgánicas estudiadas presentará actividad citotóxica con potencial anticáncer, índice de selectividad aceptable y sin efectos genotóxicos.

7. Materiales y métodos

7.1 Universo de trabajo

Constituido por las especies de plantas a analizar: *Bursera simaruba* (L.) Sarg. y *Byrsonima crassifolia* (L.) HBK.

7.2 Muestra

La muestra del estudio la conformaron 16 extractos orgánicos, cuatro de cada órgano vegetal en estudio, hojas y corteza, de *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*, obtenidos por extracción fraccionada con hexano, acetato de etilo, diclorometano y butanol.

7.3 Recursos

7.3.1 Humanos

Seminaristas: Sara Ester Barillas Aragón, Harlem Róterdam De León Natareno

Asesoras: Dra. Patricia Saravia, PhD; Licda. Rosario Hernández, MSc.

Co-Asesora: Dra. Carolina Arévalo, PhD.

7.3.2 Institucionales

-Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

-Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

-Unidad de Biología Celular del Departamento de Bioquímica

7.3.3 Recursos materiales

7.3.3.1 Equipo

Agitador orbital

Balanza analítica

Balanza semianalítica

Cámara cromatográfica

Campana de flujo laminar

Centrífuga

Desecador

Equipo de computación e impresión

Espectrofotómetro de microplacas

Estereoscopio

Hemocitómetro

Incubadora de CO₂

Micro pecera

Microdestilador Neocleavenger

Microscopio de luz

Placa cromatográfica de silica gel 60F₂₅₄

Refrigeradora

Rotavapor

7.3.3.2 Reactivos y medios

Acetato de etilo

Ácido acético

Ácido ascórbico

Ácido gálico

Ácido tricloroacético

Azúl de tripan

Butanol

Carbonato de sodio
Clorhidrato de dexorrubicina
Diclorometano
Dimetilsulfóxido (DMSO)
Estándar antioxidante
Gentamicina
Glutamina
Hexano
Horno
Medio de cultivo DMEM o RPMI-1640
Reactivo de Folin
Solución DPPH
Solución tampón de fosfato estéril (PBS)
Solución tripsina-EDTA 0.25%
Suero bovino fetal
Sulforodamina B (SRB) 0.4%
Tris base

7.3.3.3 Materiales varios

Agua destilada
Algodón
Baño de maría
Bata de manga larga
Bolsas plásticas
Botellas y placas de cultivo celular estériles
Cubre objetos
Guantes
Hielera
Hielo
Láminas porta objetos
Marcador permanente

Micropipetas automáticas de diversos volúmenes

Papel filtro

Percolador

Pipetas plásticas

Pipeteador automático para pipetas de plástico

Plástico oscuro

Regla

Sal de mar

Tips con y sin filtro

Tubos de plástico

7.3.3.4 Cristalería

Balón de 1000 mL

Balón recolector de extracción.

Beaker 50mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL

Cristalizadores

Erlenmeyer 50mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL

Material de vidrio para la extracción y análisis de laboratorio:

Probeta 1000 mL

Varilla de agitación

7.3.3.5 Otros

Línea celular cancerosa (MCF-7)

Línea celular normal (Vero)

Nauplios de *A. salina*

7. 4 Procedimiento

7.4.1 Recolección de especies vegetales

El material se colectó en una semana en los municipios de Samayac y San Bernardino, del departamento de Suchitepéquez (corteza y hojas de *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*), donde también se secaron. De las muestras colectadas se obtuvo la georeferencia específica y un

número de voucher (*B. crassifolia*: CFEH 1216; *B. simaruba*: CFEH 1217) como referencia de determinación botánica de las plantas que quedó en el Herbario de Farmaya.

7.4.2 Preparación de extractos vegetales (extracción fraccionada)

El procedimiento consistió en moler el material vegetal y colocarlo en el percolador cubriéndolo con el disolvente correspondiente aplicando un gradiente de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol), dejando reposar por 24 h con cada solvente por triplicado. Posteriormente se recuperó la fase líquida del percolador y se concentró en el rotavapor ajustando la temperatura, presión y rotación según el tipo de solvente utilizado para la evaporación del disolvente y posterior condensación. Luego se colocó nueva porción del disolvente al percolador donde estaba el material vegetal, se dejó reposar nuevamente por 24 horas, y se repitió el procedimiento en el rotavapor hasta un total de tres veces para cada solvente. El material obtenido se colocó finalmente en un desecador para obtener el extracto; luego se agregó el siguiente solvente al percolador con el material para preparar las demás fracciones a evaluar (Cechinel-Filho & Yunes, 2001).

7.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales

7.4.3.1 Bioautografía (Cromatografía en capa fina- CCF)

Tamizaje cualitativo primario que forma parte del protocolo de evaluación de las muestras cuya actividad antioxidante será cuantificada por el método micrométrico de DPPH en LIPRONAT. Se aplicó con capilares 10 μ L de muestra en una placa cromatográfica de sílica gel 60F₂₅₄. Se colocó la placa en una cámara de vidrio saturada con la fase móvil compuesta de acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26). Luego se esperó hasta que el eluyente migrara por capilaridad hasta el punto superior de la placa (3 cm antes del borde). Se dejó secando 30 min y se asperjó con DPPH (1 mg/mL en metanol) para revelar el corrimiento (Badarinath, Gnanaprakash, Mallikarjuna, Rajan, Ramkanth & Sudhana, 2010). Los extractos con actividad antioxidante presentaron decoloración del DPPH y, dependiendo de la cantidad (área) de decoloración visualizada, la actividad se clasificó como baja (+), moderada (++) , fuerte (+++) y muy fuerte (++++).

7.4.3.2 Método micrométrico de DPPH

Se pesaron 20 mg de extracto seco y se agregó 1 mL de metanol, se sonificó 30 min y se procedió a preparar diluciones para tener las siguientes concentraciones: 4, 8, 12, 16, 20 mg/mL. El mismo día se preparó el DPPH a utilizar pesando 1.7 mg del reactivo DPPH y disolviendo con metanol en un balón aforado de 25 mL.

Según la distribución de la microplaca de 96 pozos de fondo plano (Figura 1), se colocaron los pozos de reacción para: las muestras (las cinco diluciones se determinaron por triplicado), blanco de muestra (consiste en la muestra con metanol, para asegurar que la absorbancia medida fuera la correspondiente a la reacción; se realizó para cada dilución ya que tenían una concentración distinta), control (realizado con metanol ya que fue el disolvente del DPPH, se midió por duplicado, a cada lado de la placa, con el fin de obtener un valor representativo para esa mitad de datos) y blanco control (por duplicado, fue únicamente metanol por ser el solvente utilizado para la prueba) (Tabla 10). Se siguió el mismo procedimiento con los controles positivos (que poseían una alta capacidad antioxidante) para validar la corrida (Tabla 11).

Figura 1. Distribución de la microplaca para determinar la capacidad antioxidante por el método de DPPH.

	H	G	F	E	D	C	B	A	
1	D1	D1	D1	B D1	B D1	D1	D1	D1	1
2	D2	D2	D2	B D2	B D2	D2	D2	D2	2
3	D3	D3	D3	B D3	B D3	D3	D3	D3	3
4	D4	D4	D4	B D4	B D4	D4	D4	D4	4
5	D5	D5	D5	B D5	B D5	D5	D5	D5	5
6	BC							BC	6
7	CC							CC	7
8	D1	D1	D1	B D1	B D1	D1	D1	D1	8
9	D2	D2	D2	B D2	B D2	D2	D2	D2	9
10	D3	D3	D3	B D3	B D3	D3	D3	D3	10
11	D4	D4	D4	B D4	B D4	D4	D4	D4	11
12	D5	D5	D5	B D5	B D5	D5	D5	D5	12
	H	G	F	E	D	C	B	A	

*Mx: muestra, D1: dilución 4 mg/mL, D2: dilución 8mg/mL, D3: dilución 12 mg/mL, D4: dilución 16 mg/mL, D5: dilución 20 mg/mL, BC: blanco control, CC: control; B: blanco.

Fuente: Laboratorio de investigación de productos naturales, 2013a.

Tabla 10: Serie de pozos para la determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH

Pozo	Reactivo	Muestra(μL^a)	Metanol (μL)	Solución de DPPH ($150\mu\text{M}$)
Blanco control		-- ^b	220	--
Control		--	20	200
Blanco de ensayo		20	200	--
Ensayo		20	--	200

^a μL :microlitro; ^bno aplica.

Fuente: Laboratorio de investigación de productos naturales, 2013a.

Tabla 11. Preparación de los controles positivos de la prueba micrométrica de DPPH.

Estándar	Solución madre	No.	Dilución	Concentración (mg/mL)
Vitamina C	20mg ^a / 1mL ^b MetOH ^c	D1 ^d	10 μL /5mL MetOH	0.04
		D2	15 μL /5mL MetOH	0.06
		D3	20 μL /5mL MetOH	0.08
		D4	25 μL /5mL MetOH	0.10
		D5	30 μL /5mL MetOH	0.12
Quercetina	2mg/ 1mL MetOH	D1	100 μL /5mL MetOH	0.04
		D2	125 μL /5mL MetOH	0.05
		D3	150 μL /5mL MetOH	0.06
		D4	175 μL /5mL MetOH	0.07
		D5	200 μL /5mL MetOH	0.08
Rutina	20mg/ 1mL MetOH	D1	20 μL /5mL MetOH	0.08
		D2	30 μL /5mL MetOH	0.12
		D3	40 μL /5mL MetOH	0.16
		D4	50 μL /5mL MetOH	0.20
		D5	60 μL /5mL MetOH	0.24
Terbutil-hidroxi-quinona (TBHQ)	10mg/ 5mL MetOH	D1	200 μL /5mL MetOH	0.08
		D2	250 μL /5mL MetOH	0.10
		D3	300 μL /5mL MetOH	0.12
		D4	350 μL /5mL MetOH	0.14
		D5	400 μL /5mL MetOH	0.16
Trolox	MetOH	D1	200 μL /5mL MetOH	0.08
		D2	300 μL /5mL MetOH	0.12
		D3	400 μL /5mL MetOH	0.16
		D4	500 μL /5mL MetOH	0.20
		D5	600 μL /5mL MetOH	0.24

^a:miligramo; ^b mililitro; ^c metanol; ^d dilución.

Fuente: Laboratorio de investigación de productos naturales, 2013b.

Se dejó incubando a temperatura ambiente la placa por 30 min, cubierta con papel aluminio para protegerla de la luz y se leyó en un fotómetro de microplacas a 490 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de la siguiente manera:

1. Obtener el promedio de absorbancias para cada dilución.
2. En cada dilución calcular el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo}) \times 100}{\text{Absorbancia del control}}$$

NOTA:

Absorbancia del control= absorbancia del control – absorbancia del blanco de control.

Absorbancia del ensayo= absorbancia del ensayo – absorbancia del blanco respectivo.

Al menos uno de los puntos obtenidos para la muestra (sin importar en cuál dilución se determinó) debió estar en el rango de 60-70% de inhibición, para asegurar la validez del método, de lo contrario se realizaron nuevas diluciones con diferentes concentraciones hasta conseguirlo.

Con los valores de porcentaje de inhibición de la curva de lectura (Y) y la concentración (X) se realizó la regresión lineal y se calculó el valor de r^2 , el cual tuvo que ser lo más cercano a 1 (>0.97) para tomar como válida la curva realizada (Badarinath et al., 2010; Bhat & Sharma, 2009; Kamal-Eldin, Ruales, & Vasco, 2008).

Seguidamente, se expresó la inhibición obtenida en términos de concentración inhibitoria media (IC_{50} , concentración a la cual el extracto inhibió el 50% de la actividad del radical DPPH) obtenida a través de la siguiente ecuación:

$$IC_{50} = \frac{50 - \text{intercepto}}{\text{Pendiente}}$$

Los IC_{50} obtenidos se compararon con los estándares antes descritos, en donde se consideró que los extractos que obtuvieron un menor IC_{50} que los estándares, poseían una eficiencia antioxidante significativa.

7.4.3.3 Determinación micrométrica de compuestos fenólicos por el método de Folin- Ciocalteu

Se preparó una curva patrón con ácido gálico disuelto en agua en concentraciones de 0.02, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las muestras se prepararon realizando las diluciones en las cuales se

determinó la concentración de compuestos antioxidantes capaces de inhibir el 50% del radical DPPH, según método micrométrico de DPPH empleado para la determinación de actividad antioxidante de los extractos.

En una microplaca de 96 pozos se colocaron en el siguiente orden los ensayos, por triplicado: en el primer pozo se colocó el blanco de reacción consistente en 25 μL de agua, en los siguientes 5 pozos se colocó la curva patrón de ácido gálico empleando 25 μL de cada dilución para cada pozo, en los siguientes pozos se colocaron 25 μL de las diluciones preparadas de los extractos. A todos los pozos se les agregaron 50 μL de reactivo de Folin y 200 μL de Na_2CO_3 2% (de 100 en 100 μL para evitar efervescencia). Se mezcló e incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se leyó en un espectrofotómetro de microplacas a 630 nm.

A partir de las concentraciones y densidades ópticas medidas del ácido gálico (compuesto de referencia), se realizó una curva de calibración, que permitió obtener la ecuación de la recta: $y = mx + b$, donde y: densidad óptica a 630nm; y x: concentración de ácido gálico. Por medio de esa ecuación se calculó para cada muestra (con base en su absorbancia) la concentración de compuestos fenólicos totales, la cual se dividió entre el peso de muestra empleado para el ensayo. Los resultados obtenidos se expresaron como μg de ácido gálico/g de peso seco (Paladino, 2008).

7.4.4 Ensayos biológicos (bioensayos)

7.4.4.1 Ensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*

Se preparó una solución de agua de mar disolviendo 35 g de sal de mar en un litro de agua destilada, se marcó el volumen ocupado por la solución y se hirvió por 30 minutos. Luego, se agregó nuevamente agua destilada hasta completar el volumen de agua perdido por evaporación; la solución se filtró y se almacenó en refrigeración hasta el momento de ser utilizada, siendo estable por 30 días a temperatura de 6 a 8°C. Se forró la mitad de una micro pecera (extremo izquierdo) con plástico oscuro (lado oscuro), dejando la otra mitad (extremo derecho), con iluminación normal (lado con luz) (Laboratorio de investigación de productos naturales, 2013c).

Se colocaron 200 ml de la solución de agua de mar y se dejaron airear 30 minutos a temperatura ambiente; luego esta solución aireada se colocó en el lado oscuro de la pecera y se agregaron 40

mg de huevecillos de *A. salina* distribuidos comercialmente, y se incubaron por 48 h a temperatura ambiente con luz artificial. Al eclosionar los nauplios pasaron al lado con luz y se utilizaron en el ensayo (Laboratorio de investigación de productos naturales, 2013c).

Se pesó 1 mg de la fracción a ensayar y se disolvió en 1 ml de agua pura, se homogenizó hasta lograr una disolución uniforme de la fracción. En una microplaca de 96 pozos estéril (fondo plano) se agregó por triplicado 100 μ L de la solución preparada con 100 μ L de agua de mar conteniendo 10 nauplios (los nauplios se pescaron de dos en dos, con un tip amarillo que tuviera la punta cortada para evitar lesionarlos). Como control negativo se utilizó, en lugar de los 100 μ L de la solución preparada, 100 μ L de agua pura. Se incubó la placa a temperatura ambiente con luz artificial 24 h, luego se contaron con la ayuda de un estereóscopo, el número de nauplios muertos por pozo. Posteriormente, para determinar la cantidad total de nauplios colocados en cada pozo, se mataron todos agregando 100 μ L de metanol a cada pozo. Si se observaban nauplios muertos en el control negativo, la prueba quedaba invalidada. Si el extracto demostraba tener 100% de actividad, es decir, mataba todos los nauplios (se alcanzaba la dosis letal, LD₁₀₀), se realizaban diluciones para alcanzar las concentraciones de 0.5 mg/mL y 0.25 mg/mL, con el fin de determinar la dosis letal media, LD₅₀. El criterio de toxicidad fue el siguiente: LD₅₀>1mg/mL (no tóxico), $\geq 0.5 \leq 1$ mg/mL (toxicidad débil), <0.5 mg/mL (tóxico) (Abramovitz et al., 1956; Anderson, Goetz, McLaughlin & Suffness, 1991; Berger, Cáceres, González, López, Maki & Tada, 1998; Bürgi, Jaki, Orjala, & Sticher, 1999; Laboratorio de investigación de productos naturales, 2013c; Leos-Rivas, Verde, Cruz, Barrón, Rivas & Oranday, A, 2013; Meyer et al., 1982).

7.4.4.2 Ensayo de citotoxicidad en cultivo celular por medio del ensayo de sulforodamina B

7.4.4.2.1 Cultivo celular

Los extractos fueron analizados en el laboratorio de la Dra. Cecilia Díaz, participante de RIBECANCER, en el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

Inicialmente se descongelaron las células criopreservadas y se cultivaron monitoreando diariamente su crecimiento, asegurándose que no existiera contaminación. Seguidamente se cultivó la línea tumoral en botellas de cultivo de 75 cm² conteniendo 15-18 mL de medio de cultivo

DMEM o RPMI 1640 suplementado a 37°C en atmósfera húmeda con 5-7% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 48 h hasta que las células alcanzaran el 80% de confluencia (Caamal-Fuentes et al., 2011; Longato et al., 2011).

Para el ensayo de citotoxicidad se retiró todo el medio de la botella y se colocaron 10 ml de PBS, se mezcló y sacó el volumen total de PBS. Seguidamente, se despegaron las células de la botella de cultivo por tripsinización con 1.5 mL de tripsina 1X. Se incubó 3-5 minutos a 37°C con 5-7% de CO₂. A continuación se agregó 1.5 mL de medio para neutralizar la tripsina y lavar las paredes de la botella, seguidamente se retiró todo el volumen y se pasó a un tubo de plástico y se centrifugó 4 minutos. Se decantó y agregó 1 mL de medio y se mezcló. El contenido se colocó en un eppendorf y se tomaron 20 µL para hacer el conteo de células en un hemocitómetro, en cinco cuadrantes, diluyendo 1:5 o 1:10, según la necesidad, en azul de tripan para calcular el número de células por mL que se tenían en solución. Se centrifugó a 1200 rpm (300g) por 7 minutos. El sobrenadante se aspiró y se agregó medio de cultivo suplementado fresco y se resuspendieron las células en un volumen apropiado para sembrarlas a la densidad deseada (Helgason, 2004).

7.4.4.2.2 Ensayo de citotoxicidad por el método de sulforodamina B (SRB)

Se preparó con el medio suplementado la cantidad de volumen necesario que permitiera inocular una densidad de 1,000-200,000 células por pozo en un volumen de 100 µL en una placa y media de cultivo de 96 pozos. Se incubó toda la noche para permitir que se adhirieran a la placa (Kirtikara & Vichai, 2006; McMahan et al., 1990).

A las células se les agregaron diferentes concentraciones de los extractos vegetales (0.5, 5, 25 y 50 µg/mL), provenientes de un stock de 2.5 mg de extracto, diluidos con 0.05 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y disueltos en el medio de cultivo sin ciprofloxacina. Se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5-7% de CO₂ por 48 hrs (Longato et al., 2011). Posteriormente, las células fueron fijadas con ácido tricloroacético al 50% (con el propósito de tener una concentración final del 10%) por 1 h a 4°C sin agitación (notar que media placa fue fijada a las 24h luego del sembrado, ya que no se le agregó tratamiento y sirvió para determinar el crecimiento basal). Se descartó el sobrenadante y se lavaron todos los pozos 5 veces con agua dejando secar la placa al aire. Luego se tiñeron las células con SRB al 0.4% por 20-30 minutos a temperatura ambiente. Se

removió el colorante no adherido lavando 4 veces con ácido acético al 1% y se dejó secar la placa al aire. El colorante adherido a las células fue solubilizado con Trisma base 10 mM (pH 10.5) por 5 minutos en un agitador orbital. Después se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro a 540 nm (Longato et al., 2011; McMahon et al., 1990) restando el ruido leído a 690 nm. Como control positivo se utilizó clorhidrato de doxorubicina (Kirtikara & Vichai, 2006) en concentraciones de 0.0005, 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.25, 0.5 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$, y como control negativo DMSO en concentraciones de 0.5, 5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$.

Luego se determinaron los valores de concentración inhibitoria media del extracto (IC_{50} , concentración a la cual se inhibe el 50% del crecimiento) (Caamal-Fuentes et al., 2011) utilizando los datos obtenidos en gráficas de dosis-respuesta, aplicando un análisis de regresión no lineal por medio del software *SlideWrite Plus*. Cada extracto evaluado se clasificó, de acuerdo al NCI, como moderadamente citotóxico ($20 \leq \text{IC}_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$), citotóxico ($10 < \text{IC}_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$), y altamente citotóxico ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) (Ellithey, Hussein, Lall & Meyer, 2014). Según el criterio de selección establecido en RIBECANCER, únicamente aquellos extractos altamente citotóxicos calificarían para las siguientes fases del estudio, en donde se determinaría su IC_{100} , índice de selectividad y genotoxicidad. La razón para seleccionar este punto de corte fue que se consideró que una dosis citotóxica del extracto superior a 10 $\mu\text{g/mL}$ no es biológicamente relevante para el aislamiento posterior de moléculas bioactivas.

8. Diseño estadístico y validez del método

El presente estudio fue experimental. El ensayo biológico en *Artemia salina* se realizó por triplicado y la validez del procedimiento se determinó por la falta de nauplios muertos en el control negativo de la prueba.

Por otro lado, para el estudio de citotoxicidad se realizó un modelo de regresión no lineal dosis-respuesta utilizando el software *SlideWrite Plus* con el fin de determinar no sólo la concentración inhibitoria media (IC_{50}) sino también el error estándar. Del mismo modo se aseguró que el DMSO (dimetil sulfóxido) no fuera tóxico para las células y que la curva dosis-respuesta del control positivo (doxorrubicina) fuera la esperada.

Por último, en cuanto a la actividad antioxidante, el análisis estadístico se llevó a cabo por medio de una curva de lectura, empleando también controles positivos, a partir de la cual se realizó la regresión lineal. La validez del estudio se obtuvo a partir de un coeficiente de correlación cercano a uno.

9. Resultados

Se recolectaron la corteza y las hojas de dos plantas nativas de Guatemala, *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*, en dos viajes a distintas fincas del departamento de Suchitepéquez. La georeferencia se muestra en la Tabla 12 (Anexo 3, fotografías 1 y 2).

Tabla 12. Recolección del material vegetal

Nombre común	Especie vegetal	Órgano	Estado	Procedencia	Coordenadas geográficas
Nance	<i>Byrsonima crassifolia</i>	Corteza	Fresco	Ecoparcela el Kakawatal.	Latitud: 14° 33' 07.7"
		Hoja	Fresco	Samayac, Suchitepéquez	Longitud: 091° 27' 59.4"
Palojiote	<i>Bursera simaruba</i>	Corteza	Fresco	San Bernardino,	Latitud: 14° 33' 43.9"
		Hoja	Fresco	Suchitepéquez	Longitud: 091° 27' 16.7"

°Grados, 'minutos, "segundos.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente en fincas ubicadas en Suchitepéquez.

Cada órgano vegetal recolectado fue secado y sometido a una extracción fraccionada realizada por percolador y rotavapor (Anexo 3, fotografía 3), utilizando distintos solventes en un gradiente de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol). A partir del peso seco de cada extracto se calculó su porcentaje de rendimiento (Tabla 13), evidenciándose que el mejor resultado se obtuvo con la fracción butanólica de la corteza de *B. crassifolia*.

Tabla 13. Porcentaje de rendimiento de las fracciones obtenidas

Especie vegetal	Solvente	Órgano	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Hexano	Corteza	4.9763	2.48815
	Diclorometano	Corteza	0.6192	0.3096
	Acetato de etilo	Corteza	1.2177	0.6089
	Butanol	Corteza	35.7015	17.8508
	Hexano	Hoja	2.8698	1.4349
	Diclorometano	Hoja	2.9704	1.4852
	Acetato de etilo	Hoja	1.1744	0.5872
	Butanol	Hoja	3.6156	1.8078
<i>Bursera simaruba</i>	Hexano	Corteza	2.3434	1.1717
	Diclorometano	Corteza	0.7268	0.3634
	Acetato de etilo	Corteza	0.5495	0.2748
	Butanol	Corteza	1.7664	0.8832
	Hexano	Hoja	4.0651	2.0325
	Diclorometano	Hoja	1.5870	0.7935
	Acetato de etilo	Hoja	0.7978	0.3989
	Butanol	Hoja	0.8559	0.4280

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

Por otro lado, en la Tabla 14 se reportan los resultados del tamizaje de citotoxicidad general realizado en nauplios de *Artemia salina* (Anexo 3, fotografía 4), expresados como dosis letal media (LD₅₀). Se puede observar que ningún extracto fue tóxico, pues no mataron a más del 50% de la población inicial de nauplios.

Tabla 14. Tamizaje de citotoxicidad general con *Artemia salina*.

Especie vegetal	Solvente	Órgano	LD₅₀^a
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Hexano	Corteza	> 1mg/mL
	Diclorometano	Corteza	> 1mg/mL
	Acetato de etilo	Corteza	> 1mg/mL
	Butanol	Corteza	> 1mg/mL
	Hexano	Hoja	> 1mg/mL
	Diclorometano	Hoja	> 1mg/mL
	Acetato de etilo	Hoja	> 1mg/mL
	Butanol	Hoja	> 1mg/mL
<i>Bursera simaruba</i>	Hexano	Corteza	> 1mg/mL
	Diclorometano	Corteza	> 1mg/mL
	Acetato de etilo	Corteza	> 1mg/mL
	Butanol	Corteza	> 1mg/mL
	Hexano	Hoja	> 1mg/mL
	Diclorometano	Hoja	> 1mg/mL
	Acetato de etilo	Hoja	> 1mg/mL
	Butanol	Hoja	> 1mg/mL

^aDosis letal media. De acuerdo al criterio de toxicidad empleado en el estudio, concentraciones >1mg/mL, fueron consideradas no tóxicas.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

La evaluación de la capacidad citotóxica de los extractos sobre la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) se realizó cuantificando la densidad celular por medio de la tinción de sulforodamina B (SRB). Todos los ensayos se validaron utilizando como control positivo clorhidrato de doxorrubicina. Los resultados se presentan en la Tabla 15, expresados como concentración inhibitoria media [IC₅₀]. Debido a que ninguna de las fracciones orgánicas evaluadas demostró ser altamente citotóxica según el protocolo establecido por RIBECANCER (IC₅₀ <10 µg/mL), no se realizó la determinación de ninguno de los demás parámetros (cálculo de la concentración inhibitoria total [IC₁₀₀], la capacidad citotóxica sobre la línea celular normal Vero, el cálculo del índice de selectividad [IS] y determinación del potencial genotóxico) para dichos extractos.

Tabla 15. Evaluación de la capacidad citotóxica sobre línea celular de cáncer de mama (MCF-7).

Especie vegetal	Solvente	Órgano	IC ₅₀ ^a	
			Promedio (µg /mL)	Error estándar
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Hexano	Corteza	- ^b	-- ^c
	Diclorometano	Corteza	45.455	0.298
	Acetato de etilo	Corteza	-	--
	Butanol	Corteza	-	--
	Hexano	Hoja	30.913	2.838
	Diclorometano	Hoja	29.259	2.042
	Acetato de etilo	Hoja	-	--
	Butanol	Hoja	-	--
<i>Bursera simaruba</i>	Hexano	Corteza	14.057	2.019
	Diclorometano	Corteza	22.589	0.569
	Acetato de etilo	Corteza	-	--
	Butanol	Corteza	-	--
	Hexano	Hoja	-	--
	Diclorometano	Hoja	22.517	7.508
	Acetato de etilo	Hoja	-	--
	Butanol	Hoja	-	--
Doxorrubicina	Control	Control positivo	0.0397	0.015

^aConcentración inhibitoria media, ^b> 50 µg/mL, ^cno aplica.

Fuente: Extractos evaluados en el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

Seguidamente se analizó la capacidad antioxidante de cada extracto por un método cualitativo a través de una cromatografía en capa fina (CCF) (Anexo 3, fotografía 7). Los extractos que mostraron actividad antioxidante fueron sometidos a dos estudios cuantitativos: evaluación micrométrica de DPPH y cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Tabla 16). Tanto para la prueba cualitativa como para una de las pruebas cuantitativas (método micrométrico de DPPH), se utilizaron estándares de referencia de metabolitos secundarios con actividad antioxidante conocida para comparar los resultados obtenidos (Anexo 3, fotografía 8).

En la Tabla 16 se puede observar que todos los extractos mostraron actividad antioxidante en el tamizaje cualitativo primario (CCF) y, con la prueba micrométrica del DPPH y la cuantificación de fenoles totales, fue posible determinar que la fracción más activa de todas fue la extraída de la corteza de *B. crassifolia* con acetato de etilo. En relación a esta especie, las siguientes fracciones que mostraron la mayor actividad fueron las extraídas de la corteza con butanol y de las hojas con acetato de etilo, respectivamente, mientras que para *B. simaruba*, se observó que la fracción con

mayor capacidad antioxidante fue la butanólica de la corteza, seguida de la extraída con acetato de etilo del mismo órgano (Tabla 16).

Tabla 16. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos evaluados.

Especie vegetal	Extracto	Órgano	Pruebas		
			CCF ^a /DPPH ^b	IC ₅₀ ^c (mg/mL)	Fenoles totales (µg de ácido gálico/ g de extracto)
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Hexano	Corteza	+ ^f	28.3139 ± 1.1981	0.0079 ± 0.0002
	Diclorometano	Corteza	++	1.8704 ± 0.0148	0.0379 ± 0.0011
	Acetato de etilo	Corteza	++++	0.1040 ± 0.0021	0.3217 ± 0.0082
	Butanol	Corteza	+++	0.2229 ± 0.0004	0.1905 ± 0.0051
	Hexano	Hoja	+	6.1581 ± 0.2838	0.0087 ± 0.0003
	Diclorometano	Hoja	+	2.3196 ± 0.1581	0.0324 ± 0.0011
	Acetato de etilo	Hoja	+++	0.2875 ± 0.0032	0.0158 ± 0.0004
	Butanol	Hoja	+++	2.3382 ± 0.0801	0.2251 ± 0.0081
<i>Bursera simaruba</i>	Hexano	Corteza	+	16.0147 ± 0.3589	0.0132 ± 0.0004
	Diclorometano	Corteza	+	2.7207 ± 0.0070	0.0414 ± 0.0014
	Acetato de etilo	Corteza	++	0.6016 ± 0.0056	0.0080 ± 0.0002
	Butanol	Corteza	++++	0.1350 ± 0.0069	0.2932 ± 0.0075
	Hexano	Hoja	+	6.3862 ± 0.1654	0.0184 ± 0.0006
	Diclorometano	Hoja	+	2.5414 ± 0.0282	0.0477 ± 0.0016
	Acetato de etilo	Hoja	+	4.5956 ± 0.2008	0.0453 ± 0.0015
	Butanol	Hoja	+++	0.7665 ± 0.0169	0.0689 ± 0.0019
Rutina	Estándar		++++	0.1671 ± 0.0062	- ^d
Quercetina	Estándar		++++	0.0749 ± 0.0004	-
Trolox	Estándar		++++	0.1180 ± 0.0008	-
TBHQ^e	Estándar		++++	0.1147 ± 0.0007	-
Vitamina C	Estándar		++++	0.0896 ± 0.0105	-

^aCromatografía en capa fina, ^b1,1-difenil-2-picril-hidrazilo, ^cconcentración inhibitoria media, ^dno aplica, ^eterbutil hidroxiquinona, ^fla actividad se clasificó como baja (+), moderada (++) , fuerte (+++) y muy fuerte (++++).

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT).

Por último, en la Tabla 17 se presenta un resumen de los resultados expuestos anteriormente, con el fin de facilitar la comparación de las diversas pruebas para todas las fracciones analizadas.

Tabla 17. Resumen de resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad antioxidante y citotoxicidad de cuatro fracciones orgánicas de *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*.

Especie vegetal	Extracto	Órgano vegetal	Rendimiento de la extracción (%)	Evaluación de la capacidad antioxidante			Evaluación de la citotoxicidad		
				Evaluación de la capacidad antioxidante		General (<i>A. salina</i>) ^j	MCF-7 ^e		
				CCF ^a / DPPH ^b	IC ₅₀ ^c (mg/mL)	Fenoles Totales (µg de ácido gálico/g de extracto)	LD ₅₀ ^d (mg/mL)	Promedio (µg/mL)	Error estándar
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Hexano	Corteza	2.48815	+ ⁱ	28.3139 ± 1.1981	0.0079 ± 0.0002	> 1	-- ^f	-- ^g
	Diclorometano	Corteza	0.3096	++	1.8704 ± 0.0148	0.0379 ± 0.0011	> 1	45.455	0.298
	Acetato de etilo	Corteza	0.6089	++++	0.1040 ± 0.0021	0.3217 ± 0.0082	> 1	--	-
	Butanol	Corteza	17.8508	+++	0.2229 ± 0.0004	0.1905 ± 0.0051	> 1	--	-
	Hexano	Hoja	1.4349	+	6.1581 ± 0.2838	0.0087 ± 0.0003	> 1	30.913	2.838
	Diclorometano	Hoja	1.4852	+	2.3196 ± 0.1581	0.0324 ± 0.0011	> 1	29.259	2.042
	Acetato de etilo	Hoja	0.5872	+++	0.2875 ± 0.0032	0.0158 ± 0.0004	> 1	--	-
	Butanol	Hoja	1.8078	+++	2.3382 ± 0.0801	0.2251 ± 0.0081	> 1	--	-
<i>Bursera simaruba</i>	Hexano	Corteza	1.1717	+	16.0147 ± 0.3589	0.0132 ± 0.0004	> 1	14.057	2.019
	Diclorometano	Corteza	0.3634	+	2.7207 ± 0.0070	0.0414 ± 0.0014	> 1	22.589	0.569
	Acetato de etilo	Corteza	0.2748	++	0.6016 ± 0.0056	0.0080 ± 0.0002	> 1	--	-
	Butanol	Corteza	0.8832	++++	0.1350 ± 0.0069	0.2932 ± 0.0075	> 1	--	-
	Hexano	Hoja	2.0325	+	6.3862 ± 0.1654	0.0184 ± 0.0006	> 1	--	-
	Diclorometano	Hoja	0.7935	+	2.5414 ± 0.0282	0.0477 ± 0.0016	> 1	22.517	7.508
	Acetato de etilo	Hoja	0.3989	+	4.5956 ± 0.2008	0.0453 ± 0.0015	> 1	--	-
	Butanol	Hoja	0.4280	+++	0.7665 ± 0.0169	0.0689 ± 0.0019	> 1	--	-
Rutina	Estándar	-	++++	0.1671 ± 0.0062	-	-	-	-	
Quercetina	Estándar	-	++++	0.0749 ± 0.0004	-	-	-	-	
Trolox	Estándar	-	++++	0.1180 ± 0.0008	-	-	-	-	
TBHQ ^h	Estándar	-	++++	0.1147 ± 0.0007	-	-	-	-	
Vitamina C	Estándar	-	++++	0.0896 ± 0.0105	-	-	-	-	
Doxorrubicina	Control positivo	-	-	-	-	-	0.0397	0.015	

^aCromatografía en capa fina, ^b1-difenil-2-picril-hidrazilo, ^cconcentración inhibitoria media, ^ddosis letal media, ^elínea celular de cáncer de mama, ^f> 50 µg/mL, ^gno aplica, ^hterbutil hidroxiquinona, ⁱla actividad antioxidante en CCF se clasificó como baja (+), moderada (++) y muy fuerte (++++), ^jel ensayo con *A. salina*, se reporta como >1mg/mL si la cantidad de nauplios muertos con el compuesto puro no sobrepasaba el 50% de la población inicial.

Fuente: Datos obtenidos experimentalmente en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) con excepción de los resultados de citotoxicidad contra la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), que fueron evaluados en el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

10. Discusión de resultados

Inicialmente se realizó una extracción fraccionada con un gradiente de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol) de los órganos vegetales colectados (Anexo 3, fotografías 1, 2 y 3), obteniendo variaciones en el rendimiento de cada extracción (Tabla 13). Esto se debió a que cada especie vegetal tiene una composición única y sus metabolitos fueron extraídos según su afinidad con cada solvente bajo el principio de: *lo similar disuelve lo similar* (Thiruvengadarajan & Yalavarthi, 2013).

En el presente estudio se encontró que ninguna fracción tuvo actividad citotóxica en el tamizaje de citotoxicidad general contra nauplios de *Artemia salina* (Anexo 3, fotografía 4), pues la dosis letal media (LD₅₀) fue mayor a 1mg/dL en todas las fracciones (Tabla 14). Los resultados obtenidos con los extractos de *Bursera simaruba* fueron similares a los obtenidos por Villavicencio y Pérez (2005), que reportaron una baja toxicidad del extracto etanólico. Así mismo, en el caso de los extractos de *B. crassifolia* los resultados obtenidos coincidieron con los reportados por Blanco y Láñez (2002), que tampoco encontraron tóxico el extracto etanólico de la corteza, y el de Berger y colaboradores (1998), quienes reportan una baja toxicidad de las fracciones hexánicas, etanólicas y acuosas de hoja y corteza de *B. crassifolia*.

Algunos estudios han reportado que los extractos acetónicos y metanólicos de *B. simaruba* y de *B. crassifolia* poseen actividad antitumoral contra líneas de cáncer de mama (MCF-7) y de cérvix (HeLa) (Cates et al., 2013, 2014). Sin embargo, los resultados del presente estudio demostraron que las fracciones orgánicas evaluadas, de hoja y corteza de estas especies, poseen predominantemente una actividad citotóxica de moderada a nula contra la línea tumoral MCF-7. Por esta razón, únicamente se logró determinar la IC₅₀ en seis de las 16 fracciones evaluadas (Tabla 15), debido a que las otras fracciones tenían una actividad tan baja que tendrían que haber sido ensayadas en concentraciones superiores a las recomendadas por el NCI (> 50 µg/mL) para alcanzar la dosis necesaria para inhibir el 50% de crecimiento celular, por lo que se consideraron inactivas (Ellithey, Hussein, Lall & Meyer, 2014).

Estos resultados difieren de los publicados por Cates y col. (2013), quienes reportaron que, a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, los extractos acetónicos y metanólicos de *B. simaruba* y *B. crassifolia* eran activos contra las líneas celulares MCF-7 y HeLa, inhibiendo más del 60% de crecimiento en ambas líneas celulares (Tabla 8).

Las diferencias encontradas entre estudios pueden atribuirse a que las concentraciones evaluadas en el estudio de Cates y col. (2013) fueron considerablemente mayores a las utilizadas como punto de corte en el presente estudio (10 $\mu\text{g/mL}$). Esto sugiere la posibilidad de que el efecto antitumoral sea dosis-dependiente, y que al elevar las dosis de los extractos orgánicos se podría lograr una mayor citotoxicidad. Sin embargo, de acuerdo a los criterios establecidos por expertos de RIBECANCER, dosis mayores a las utilizadas ya no serían biológicamente relevantes. No obstante, dado que se ha demostrado que las líneas celulares tumorales pueden tener diferente sensibilidad a la acción tóxica de un mismo compuesto (Caamal-Fuentes et al., 2011; Longato et al., 2011), puede considerarse la necesidad de evaluar la actividad citotóxica de los extractos del presente estudio contra la línea celular de cáncer de cérvix (HeLa).

Otro factor que debe tomarse en cuenta para explicar los resultados obtenidos en las pruebas de citotoxicidad contra MCF-7 en este estudio es que el fraccionamiento con solventes orgánicos ocasiona una separación selectiva de los metabolitos secundarios, dando como consecuencia una mezcla única de metabolitos en cada fracción, lo que en algunas ocasiones puede resultar en una mayor actividad antitumoral por la remoción de compuestos tóxicos, pero que en otras puede provocar una pérdida de la misma al separar metabolitos que actuaban de forma sinérgica (Acuña et al., 2011; Kuete, 2014). Así mismo, la variación entre resultados pudo deberse a la diferencia en la época y lugar de colecta de las especies vegetales analizadas, así como al clima, humedad del suelo, y cantidad de luz a la que estuvieron expuestas (Arango, Hurtado, & Toro, 2012; Osorio, 2009; Ruíz, Venegas, Chávez, & Eustaquio, 2010).

Es importante mencionar que un hallazgo interesante del presente estudio fue determinar que la fracción hexánica de la corteza de *B. simaruba* era citotóxica contra la línea celular MCF-7. Su valor de IC_{50} (14.057 $\mu\text{g/mL}$) fue muy cercano al establecido como punto de corte en RIBECANCER (10 $\mu\text{g/mL}$). Como se mencionó anteriormente, Cates y col. (2013, 2014)

reportaron actividad antitumoral en los extractos acetónicos y metanólicos de la corteza de esta especie; según la metodología utilizada, en dichas fracciones orgánicas se esperaba que estuvieran presentes metabolitos secundarios polares y apolares (Arboleda, Guzman, & Mejía, 2012; Arcila, Loarca, Lecona, & González, 2004). En el presente estudio, los extractos se prepararon en solventes de polaridad creciente con el fin de lograr un aislamiento más selectivo de las moléculas bioactivas. Los resultados obtenidos sugieren entonces que las moléculas con actividad antitumoral de la corteza de *B. simaruba* son predominantemente apolares, posiblemente sesquiterpenlactonas y triterpenos, cuya actividad anti-cáncer ha sido reportada en otros estudios (Jaimes, 2009; Pérez & López, 2010).

Se requerirá realizar estudios posteriores para identificar a las moléculas responsables de la actividad antitumoral de este extracto. Así mismo, deberá darse seguimiento al estudio de su bioactividad contra las líneas celulares tumorales propuestas por el NCI para tamizaje de productos naturales con posible actividad anti-cáncer (National Cancer Institute, 2015), ya que podrían encontrarse líneas tumorales más sensibles a sus compuestos. Adicionalmente, el hecho de que el extracto hexánico no haya producido citotoxicidad a los nauplios de *A. salina*, plantea la posibilidad de que su toxicidad esté dirigida principalmente hacia células tumorales y no hacia células normales, debido a que este ensayo puede correlacionar tanto con citotoxicidad hacia células normales como malignas (Meyer et al., 1982; Zelada, Carvalho & Cáceres, 2016), lo cual supondría que su índice de selectividad sería aceptable.

Finalmente, debido a que ninguno de los extractos resultó altamente citotóxico ($IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), de acuerdo a los criterios previamente establecidos, ninguno de ellos calificó para pasar a la siguiente fase del proyecto, en la que se evaluarían la IC_{100} , su potencial genotóxico y se calcularía el índice de selectividad. Por esta razón se descartó la hipótesis del estudio.

Con respecto a la actividad antioxidante, es importante mencionar que se ha descrito que juega un papel importante en la prevención del cáncer, ya que disminuye los radicales libres que provocan el estrés oxidativo asociado a desórdenes como el cáncer (Begoña & Cadena, 2014). En el presente estudio se realizó un tamizaje cualitativo primario de la actividad antioxidante en una cromatografía en capa fina (CCF) (Tabla 16), donde se evidenció que todas las fracciones

obtenidas de las dos plantas mostraron capacidad antioxidante (Anexo 3, fotografía 7). Estos resultados correlacionan con la composición química de las plantas, pues se ha encontrado que ambas especies contienen metabolitos secundarios que actúan como antioxidantes, por ejemplo: taninos, sesquiterpenlactonas, polifenoles (flavonoides) y triterpenos (Hasegawa & Marcano, 2002; Thomas et al., 2001) (Anexo 1).

En cuanto a *B. simaruba*, los ensayos cuantitativos (método micrométrico del DPPH y fenoles totales) mostraron que la fracción con mayor capacidad antioxidante fue la extraída de la corteza con butanol, $IC_{50} = 0.1350 \pm 0.0069 \mu\text{g/mL}$, seguida de la extraída de la corteza con acetato de etilo, $IC_{50} = 0.6016 \pm 0.0056 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 16). Esto era de esperarse debido a que estos solventes fueron los más polares empleados durante el fraccionamiento, y la mayoría de antioxidantes vegetales son solubles en solventes polares tales como los flavonoides -responsables de la mayor capacidad antioxidante de los vegetales por ser los polifenoles más abundantes-, las agliconas - otros polifenoles- y las sesquiterpenlactonas (Martínez, 2011; Pérez, Lugo, Gutiérrez & Del-Toro, 2013; Quiñones, Miguel & Aleixandre, 2012).

De igual modo, en cuanto a *B. crassifolia*, se observó que la fracción antioxidante más activa fue la extraída con acetato de etilo de la corteza, $IC_{50} = 0.1040 \pm 0.0021 \mu\text{g/mL}$, seguida de la obtenida con butanol de la corteza, $IC_{50} = 0.2229 \pm 0.0004 \mu\text{g/mL}$. En cuanto a la primera, es importante notar que fue la fracción más activa de todo el estudio, llegando a tener una actividad antioxidante considerable, ya que al compararla con tres de los cinco estándares empleados (cuya actividad ha sido previamente reportada) (Tabla 16), se observó que requirió una menor concentración para inhibir el 50% del radical libre DPPH• (IC_{50}), por lo cual se recomienda realizar un análisis fitoquímico (Lock, 2001), con el fin de identificar las moléculas responsables de esa propiedad ya que podría resultar útil aislarlas y emplearlas en la prevención de enfermedades asociadas a la producción de radicales libres, como el cáncer.

Es importante mencionar que las fracciones antioxidantes más activas (menor IC_{50}) de cada especie, presentaron la mayor cantidad de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu, lo que indica que para estas fracciones la actividad antioxidante pudo deberse a los compuestos fenólicos,

entre los que se podrían mencionar los flavonoides, tocoferoles y ácidos fenólicos (Gutiérrez & Muñoz, 2011).

11. Conclusiones

- Ninguna de las fracciones orgánicas evaluadas de *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia* demostró toxicidad contra nauplios de *Artemia salina* a las dosis estudiadas.
- Ninguna de las fracciones orgánicas de las dos especies nativas evaluadas (*Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*) presentó alta actividad anticáncer ($IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) sobre la línea tumoral MCF-7, índice de selectividad aceptable o efectos genotóxicos, por lo que se descartó la hipótesis inicial.
- La fracción hexánica de la corteza de *B. simaruba* fue citotóxica contra la línea celular MCF-7 ($IC_{50} = 14.057 \mu\text{g/mL}$).
- Todas las fracciones de las dos especies vegetales estudiadas presentaron actividad antioxidante, obteniéndose mayor actividad en la fracción extraída de la corteza de *B. crassifolia* con acetato de etilo ($IC_{50} = 0.1040 \pm 0.0021 \mu\text{g/mL}$), seguida de la butanólica de la corteza de *B. simaruba* ($IC_{50} = 0.1350 \pm 0.0069 \mu\text{g/mL}$).

12. Recomendaciones

- Tamizar la actividad citotóxica del extracto hexánico de la corteza de *B. simaruba* contra líneas tumorales recomendadas por el NCI, porque se ha identificado que la actividad anticáncer de un mismo extracto puede variar de una línea tumoral a otra.
- Evaluar la citotoxicidad de los extractos de *B. simaruba* y *B. crassifolia* contra la línea tumoral HeLa debido a que estudios previos han reportado actividad antitumoral de ambas especies contra esta línea celular.
- Realizar el análisis fitoquímico de la fracción extraída con acetato de etilo de la corteza de *B. crassifolia* para determinar las moléculas responsables de su capacidad antioxidante, ya que podría resultar útil aislarlas para su posterior empleo en la prevención de enfermedades asociadas a la producción de radicales libres, como el cáncer.

13. Lista de referencia

- Abadio, F., Oliveira, R. & Silva, I. (2012). Physicochemical characteristics and antioxidant activity of three native fruits from *Brazilian savannah* (cerrado). *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 23(2), 179-185.
- Abdel, H., El-Sahaby, O., Mashaly, I & Soliman, M. (2003). Genotoxicity Screening of Industrial Wastewater Using the *Allium cepa* Chromosome Aberration Assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(1), 23-28.
- Abramovitz, M., Michael, A. & Thompson, C. (1956). *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science* 123(3194), 464. doi: 10.1126/science.123.3194.464
- Abuzenadah, A., Ali, R., Ansari, S., Ashraf, G., Chaudhary, A., Damanhour, G., Kamal, M. ...Sheikh, I. (2012) New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. *Anticancer Research*, 32(7), 2999-3005.
- Acco, A., Aguilar, J., Ávila, T., Bastos-Pereira, A., Dreifuss, A., Rivero, A. & Soley, B. (2010). Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Wild. Ex Roem. & Schult) in an *in vivo* carcinosarcomal model. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1), 127-133
- Acuña, D., Caballero, Y., Fernández-Calienes, A., Gutiérrez Y., Mendiola J. & Scull R., (2011). Actividad antimalárica y citotoxicidad de extractos hidroalcohólicos de seis especies de plantas usadas en la medicina tradicional cubana. *Revista Cubana*, 63(2), 52-57.
- Adega, F., Chaves, R. & Ferreira, D. (2013). The importance of cancer cell lines as *in vitro* models in cancer methylome analysis and anticancer drugs testing. En C. López-Caramillo, & E. Aréchaga-Ocampo (Edits.), *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*. doi:10.5772/1745
- Aguilera, R., Araya, P., González, F., López, M., Pereda, C., Plaza, C. ... Tittarrelli, A. (2011). *Canceronline: Una guía científica y social*. Recuperado de <http://issuu.com/canceronline/docs/2011>

- Aguirre, M., Brandan, N., García, D., Heitrich, M., Stoyanoff, T. & Todaro, J. (2014). Genética del cáncer: Protooncogenes y genes supresores de tumores. Recuperado de <http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/Oncogenes%20y%20Genes%20Supresores%20de%20Tumores%202014.pdf>
- Alcocer, M., Batis, A., Gual, M., Sánchez, C. & Vásquez-Yanes, C. (1999). *Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación*. Proyecto J084. CONABIO - Instituto de Ecología, UNAM, 73-76, 138-140.
- Alfonso, P., Aristizábal, F. & Escobar, L. (2009). Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 49-56.
- Almagro, D. (2005). Hemostasia y cáncer. I. Participación del mecanismo de la coagulación en el cáncer. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 21(2), 1-12.
- Alonso-Castro, A., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., Gomez-Sanchez, M., Salazar-Olivo, L. & Villarreal, M. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Ethnopharmacol*, 13 (3), 945-972.
- Amaral, M., Atherc, A., Hassan, M., Jimenez, P., Odorico, M., Pessoa, C., Veras, D. & Veras, L. (2005). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 21–30.
- American Cancer Society (2008). Brocoli. Recuperado de <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/complementaryandalternativemedicine/dietandnutrition/broccoli>
- American Cancer Society. (2011). *Global Cancer. Facts & Figures*. (2nd edition). Atlanta. Autor.
- American Society of Clinical Oncology. (2014). *Brain Tumor: Overview*. Recuperado de <http://www.cancer.net/cancer-types/brain-tumor/overview>

- Ammerman, N., Azad, A. & Beier-Sexton, M. (2008). Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Current Protocols in Microbiology*, Appendix-4E, 11, 4E.1-4E.7. doi: 10.1002/9780471729259.mca04es11
- Anderson, J., Goetz, C., McLaughlin, J. & Suffness, M. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, 2(3), 107-111. doi: 10.1002/pca.2800020303
- Arango, O., Hurtado, A., & Toro, I. (2012). Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas en el rendimiento y el contenido de timol de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. *Acta agronómica*.
- Arboleda, F., Guzman, Ó., & Mejía, L. (2012). Efecto de extractos cetónicos de higuera (*Ricinus communis* Linneo.) sobre el nematodo barrenador [*Radopholus similis* (Cobb.) Thorne] en condiciones in vitro. *Luna Azul* 35, 28-47.
- Arcila, C., Loarca, G., Lecona, S., & González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1).
- Aristizábal, F. & Cordero, C. (2002). Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4 (1). 100-106.
- Ark-Otte, J., Keepers, Y., Peters, G., Pinedo, H., Pizao, P. & Winograd, B. (1991). Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer*, 27(7), 897-900.
- Armas, A., Calero, F. & Celorio J. (1986). *Fundamentos de oncología ginecológica*. Bilbao: Ediciones Díaz de Santos, S.A.
- Arreola, H., Azambuja, E. de, Badovinac-Crnjevic, T., Barrios, C., Batura, R., Blaya, M., ... Zorilla, A. (2013). Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. En *The Lancet Oncology* 14(5), 391-436. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70048-2.
- Arroyo, M., Cuevas-Covarrubias, S., González-Huerta, L. & Pérez, F., (2006). Retinoblastoma en gemelas monocigotas resultado de un evento postcigótico. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 80(1), 41-43.
- Arteaga-Aureoles, G., Cortez-Gallardo, V., Espinosa-Galván, D., Hernández-Arroyo, M., Macedo-Ceja, J. & Rodríguez-Landa, J. (2004). Farmacognosia: breve historia de

- sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. En *Revista Biomédica*, 15, 123-136.
- Asurero, A., Fett, R., Kuskoski, E., Mancini-Filho, J. & Troncoso, A. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 25(4), 726-732.
- Auyeung, K. & Ko, J. (2012). Target-oriented Mechanisms of Novel Herbal Therapeutics in the Chemotherapy of Gastrointestinal Cancer and Inflammation. *Current Pharmaceutical Design*, 19(1), 48-66. doi: 10.2174/1381612811306010048
- Badarinath, A., Gnanaprakash, K., Mallikarjuna, K., Rajan, T., Ramkanth, S. & Sudhana, C. (2010). A review of in vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.
- Badawi, A., Da Costa, L. & El-Sohemy, A. (2012). Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 60(3), 27-36.
- Bah, M., Castañeda, V., Gutiérrez-Avella, D., Mendoza, S., Moreno, R. & Rodríguez, V. (2014). Chemical constituents and antioxidant activity of extracts obtained from branch bark of *Bursera simaruba*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(6), 527-536.
- Balart, J. (2001). Análisis de la radiosensibilidad de las células tumorales pancreáticas humanas y su modulación por 5-fluorouracilo (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.
- Baradaran, B., Safarzadeh, E. & Sandoghchian S. (2014). Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(1), 421-427. doi:10.5681/apb.2014.062
- Barbosa, P., Betti, A., Boeira, J., Corrêa, A., Da Silva, J., Dall'Alba, M. ... Rates, S., (2010). Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 526-532. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.037.
- Barquero, A. (2007). Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Revista Química Viva*, 6(2), 54-59.

- Barrientos-Benítez, T., Bye, R., Gutiérrez-Lugo, M., Linares, E., Luna, B., Mata, R. & Ramírez-Gama, R., (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican Medicinal Plants. *Phytomedicine*. 2(4), 341-347.
- Bautista, E. & Gonzales, D. (2007) *Análisis cualitativo y cuantitativo de taninos en las cortezas de Byrsonima crassifolia (nance), Pithecollobium dulce (Mongollano) y en la raíz de Púnica granatum (Granado)* (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.
- Begoña, M. & Cadena, S. (2014). *Papel del aporte de antioxidantes en cáncer y su relación con la quimioterapia*. (Tesis de Maestría). Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Querétaro. México.
- Benítez-Bribiesca, L. & Sánchez-Suárez, P. (2006). Procesos biomoleculares de la resistencia a drogas. En *Cancerología, Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, 1, 187-199.
- Berger, I., Cáceres, A., González, S., López, B., Maki, J. & Tada, I. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(3), 195-202.
- Bermúdez, A., Oliveira, M., Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 453-459.
- Bertoni, G., Hardin, J., Kleinsmith, L. (2012). *Becker's world of the cell*. (6a ed.). Barcelona: Pearson.
- Bhat, T. & Sharma, O. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Palo mulato*. Recuperado de http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Bursera_simaruba&id=7736
- Blanco, G. & Laínez, G. (2002). Determinación de la bioactividad citotóxica de extractos de veinticinco especies vegetales mediante el bioensayo con *Artemia salina* (Tesis de pregrado). Universidad de El Salvador, El Salvador.

- Blumberg, J. Kelly, K., Ladas, E., Lawenda, B., Sagar, S. & Vickers, A., (2008). Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *Journal of the National Cancer Institute* 100(11), 773-783.
- Boonpisuttinant, K., Manosroi, A., Manosroi, J. & Manosroi, W. (2012). Anti-proliferative activities on HeLa cancer cell line of Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. *Journal of Ethnopharmacology* 142(2), 422-431.
- Botanical-online. (01 de 2016). *Botanical-online*. Obtenido de <http://www.botanical-online.com/monografias/saponina.htm>
- Brandão, H., Couto, R., David, J. M., David, J. P. & Nascimento, J. (2010). Química y farmacología de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, 33(6), 1359-1369.
- Bray, F., Dikshit, R., Ervik, M., Eser, S., Ferlay, J., Forman, D., Mathers, C. ... Soerjomataram, I. (2013a). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Recuperado de <http://globocan.iarc.fr>
- Bray, F., Ferlay, J., Masuyer, E. & Ren, J. (2013b). Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer*, 132(5), 1133-1145. doi: 10.1002/ijc.27711
- Bray, F., Dikshit, R., Eser, S., Ferlay, J., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. ... Soerjomataram, I. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 359–386. doi: 10.1002/ijc.29210 PMID:25220842
- Brown, T. & Brown, T., Jr. (2005). *Nucleic Acids Book*. Recuperado de <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>
- Bürgi, H., Jaki, B., Orjala, J. & Sticher, O. (1999). Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 37(2), 138-143. doi: 10.1076/phbi.37.2.138.6092
- Burlckhalter, H. & Korolkovas, A. (1983). *Compendio esencial de química farmacéutica*. Barcelona: Reverte.

- Caamal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J., Mena Rejon, G. & Moo-Puc, R. (2009). In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(3), 462-465. doi: 10.1016/j.jep.2008.11.012.
- Caamal-Fuentes, E., Moo-Puc, R., Peraza-Sánchez, S., Simá-Polanco, P. & Torres-Tapia, L. (2011) Screening of plants used in Mayan tradicional medicine to treat cancer-like symptoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(7), 719-724. doi: 10.1016/j.jep.2011.04.004
- Cáceres, A. (Ed.). (2005). *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Centro de Estudios Urbanos y Regionales.
- Cáceres, A. (Ed.). (2008). *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Centro de Estudios Urbanos y Regionales.
- Cáceres, A. (2011) Caracterización de la actividad antioxidante de extractos de especies nativas del género *Piper* y cuantificación de metabolitos secundarios con potencial de desarrollo. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONCYT-. Recuperado de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202009.17.pdf>
- Cáceres, A., Cruz, S. M., Gaitán, I., Gattuso, M., Gattuso, S., Martínez, V. & Santizo, A. (2012). Ethnobotanical, pharmacognostical, phrmacological and phytochemical studies in *Smilax domingensis* in Guatemala. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22, 239-248.
- Cai, H., Gu, K., Lu, W., Nechuta, S., Shu, X., Zheng, Y. & Zheng, W. (2012). Vitamin supplement use during breast cancer treatment and survival: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 20(2), 262-271. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-1072
- Calderón, G., Medina, R. & Rzedowski, J. (2004). Las especies de *Bursera* de la cuenca del río Papaloapan, México. *Acta Botánica Mexicana*, 66, 126-130.
- Calle, J., López, A., Marín, A., Monge, A. & Pinzón, R. (1996). Cytotoxic Activities of Colombian Plant Extracts on Chinese Hamster Lung Fibroblasts. *Phytotherapy Research*, 10(5), 431–432. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199608)10:5<431

- Calvagna, M. (2012). Terapia hormonal para el cáncer [EBSCO databases]. Recuperado de <http://www.scasouthjersey.com/apps/healthgate/article.aspx?chunkiid=126064>
- Cancer Research UK. (2014). *Cancer incidence by age*. Recuperado de <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/incidence/age/>
- Cantú, A., González, F., Meneses, A., Ramírez, E. & Suchil, L. (Eds). (2015). *Guía Médica del Cáncer: Tomo I. Generalidades del cáncer y cómo prevenirlo*. Recuperado de <http://issuu.com/incanmex/docs/incan-tomo1-20feb>
- Caramão, E., Cavalcante, A., Moura, D., Péres, V., Saffi, J., Santos, F. & Sperotto, A., (2012). Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(3), 474-482. doi: 10.1016/j.jep.2012.08.047
- Caroline, T., Connie, O., Hernandez-Boussard, T., Howard, M., Marsh, Sh., Russ, A. & Teri, K. (2012). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7), 440-446.
- Carlson, L., Hong, G., White, J. & Zhong, L., (2015). Survey of Policies and Guidelines on Antioxidant Use for Cancer Prevention, Treatment, and Survivorship in North American Cancer Centers: What Do Institutions Perceive as Evidence? *Integrative Cancer Therapies*, 14(4), 305-317. doi:10.1177/1534735415572884.
- Carvajal-Vélez, A., Claudio-Campos, K., Hernández-Rivera, J., Ortiz-Rivera, I., Ospina-Millán, C., Pagán-Ortiz, M., Pérez-Torres, M. & Rivera-Gutiérrez, J. (2015). Biological screening of select Puerto Rican plants for cytotoxic and antitumor activities. En *Puerto Rico Health Sciences Journal*, 34(1), 25-30.
- Carvalho, J., Monteiro, K., Pompeu, D., Rogez, H. & Tinti, S. (2012). Capacidad antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. En *Acta Amazónica*, 42(1), 165-172.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Canadá: IDRC, IMTA
- Cates, R., Prestwich, B., Innes, A., Rowe, M., Stanley, M., Williams, S., ... Martínez, J. (2013). Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and microbes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(35), 2616-2627. doi: 10.5897/ JMPR2013.4478

- Cates, R., Thompson, A., Brabazon, H., McDonald, S., Lawrence, M., Williams, S., . . . Ancheta, F. (2014). Activities of guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and selected microbes: Evidence for their conservation. *Journal of medicinal plant research*, 8(33), 1040-1050.
- Cechinel-Filho, V. (Coordinador) (2012). Red Iberoamericana de Investigación en Cáncer. De la genómica al control. Brasil: -RIBECANCER-CYTED 212RT0464. Recuperado de: <http://ribecancer.com.br/ribiofar.php>
- Cechinel-Filho, V. & Yunes R. (2001). Estudio químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. En Calixto J. & Yunes R. (eds.) *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos Editora Universitária.
- Chabner, B. & Longo, D. (2010). *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*. (5ta ed). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW).
- Chaudhary, S., Chandrashekar, K., Pai, K., Setty, M., Devkar, R., Reddy, N., & Shoja, M. (2015). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of extract and fractions of *Nardostachys jatamansi* DC in breast carcinoma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(50). doi.org/10.1186/s12906-015-0563-1
- Chen, Q. & Yu, J. (2014). The plant extract of *Pao pereira* potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 36-43. doi: 10.3109/13880209.2013.808232.
- Contreras, A. (2008). Terapia Biológica en Cáncer de Mama conceptos básicos. *Scielo*, 20(3), 165-171.
- Cortés, J., Fernández, S., Gómez-Arroyo, S., Sánchez-Alarcón, J., Valencia-Quintana, R., Villalobos-Pietrini, R. & Waliszewski, S. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 133-157
- Cortijo-Cascajares, S., Herreros, A. & Jiménez-Cerezo, M. (2012). Revisión de las reacciones de hipersensibilidad a antineoplásicos. *Farmacia Hospitalaria*, 36(3), 148-158.

- Cotelle, S., Férard, J. & Masfarau, J., (1999). Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426(2), 167-171. doi: 10.1016/S0027-5107(99)00063-9.
- Cragg, G., Fouche, G., Kolesnikova, N., Maharaj, V., Pillay, P. & Senabe, J. (2008). In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 455-461.
- Cultek. (2007). Documento de aplicación: cultivos celulares. Recuperado de http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf
- Cura, M., Maldonado, L. & Santos, N. (2006). Tema 16: Neoplasias: Bases moleculares. Biología del crecimiento. Recuperado de http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema_16.pdf
- Damery, S., Gratus, C., Greenfield, S., Grieve, R., Warmington, S., Wilson, S. ... Routledge, P. (2009). The use of herbal medicines by people with cancer: a qualitative study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 9-14. doi:10.1186/1472-6882-9-14
- Dávila, P., Debroy, P., Duarte, W. y Juárez, M. (2013). *Factores biológicos, socioeconómicos y demográficos que predisponen al diagnóstico de cáncer de mama avanzado*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Dayerlin, A. (2013). Principios de la quimioterapia. Recuperado de <http://es.slideshare.net/PRINCESSANITA/principios-de-la-quimioterapia-25223941>
- De la Peña, E. (2012). *Mutaciones y carcinogénesis química*. Sevilla: Editorial M. Repetto.
- Delgado, L. (2010). Tratamientos sistémicos del cáncer. Recuperado de <https://www.google.com.gt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&ved=0CE0QFjAH&url=http%3A%2F%2Fwww.higiene.edu.uy%2Fcefa%2Ftratsist.pps&ei=3ExKVdLsLci-ggSAtYCgCA&usq=AFQjCNHjJ1HXaFkskX4qYqLJfGIHEXLL2Q>

- Díaz-Rubio, E. & García-Conde, J. (2000). *Oncología clínica básica*. Madrid: Aran Ediciones.
- Dicato, M., Diederich, M., Sawadogo, W., Schumacher, M. & Teiten, M., (2012) Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 84, 1225-1240.
- Dizer, H., Fischer, B., Hansen, P. & Wittekindt, E., (2002). The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. *Chemosphere*, 46(2), 225-233.
- Dorr, R. (1992). Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. En *Seminars in Oncology*, 19(2), 3-8.
- Ellithey, M., Hussein, A., Lall, N. & Meyer, D. (2014). Cytotoxic and HIV-1 enzyme inhibitory activities of Red Sea marine organisms. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 77-85. doi:10.1186/1472-6882-14-77
- Ensminger, W., Maybaum, J., Pratt, W. & Ruddon, R. (1994). *The Anticancer Drugs*. (2th ed). Oxford: Oxford University Press.
- Erkoç, F. E. (2010). Quantum chemical treatment of β -sitosterol molecule. *Pharmaceutical Biology*, 48(6), 637-642.
- Fernández, M. (2012). *Byrsonima crassifolia (L.) H.B.K.: estudio fitoquímico y farmacológico* (Tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid. España.
- Fine, D. (2015). Cancer immunotherapy pioneer wins prestigious Lasker Award. *Nature Publishing Group*. Recuperado de <http://www.nature.com/news/cancer-immunotherapy-pioneer-wins-prestigious-lasker-award-1.18340>
- Fiskejö, G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 98-112.
- Fleischauer, A., Jacobson, J., Kelly, K., Kennedy, D., Ladas, E. & Teel, K., (2004). Antioxidants and Cancer Therapy: A Systematic Review. *Journal of Clinical Oncology*, 22(3), 517-528. doi: 10.1200/JCO.2004.03.086
- Flórez, J. (1997). Quimioterapia antineoplásica II. Agentes alquilantes. Antibióticos. Agentes varios. En Armijo, J., Flórez, J. y Mediavilla, Á. (Eds), *Farmacología Humana* (3a ed.) (pp. 1039-1058). Barcelona, España: Masson, S.A.

- Francis, J. (1990). *Bursera simaruba* (L.) Sarg. Almácigo, gumbo limbo. SO-ITF-SM-35. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry. Recuperado de: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/Burserasimaruba.pdf>
- Freile-Peegrín, Y., Moo-Puc, R. & Robledo, D. (2009). In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Marinas international journal of marine sciences*, 35(4), 345–358.
- Freshney, I. (2007). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. (6th ed.). New Jersey: Wiley-Blackwell. doi: 10.1002/9780470649367
- Fundación Mapfre. (2014). Evaluación de la radiosensibilidad del personal sanitario en procedimientos de tratamiento o diagnóstico médico con radiaciones. *Seguridad y Medio Ambiente*, 34(134), 14-25.
- García Bacallao, L., García Gómez, L., Rojo, D. & Sánchez, E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 20(3), 231-235.
- García-Gasca, T., Martínez-Dávila, I., Mejía, C. & Reyes, P. (2009). Apoptosis: The role of radicals in physiological and pathological states. *Research Signpost* 37(2), 85-104.
- Garewal, H. (Ed.). (1997). *Antioxidants and disease prevention*. United State of America: US Government.
- Gariglio, P. (2007). Genes implicados en el desarrollo del cáncer cervicouterino en etapas múltiples. *Mensaje bioquímico*, 31, 92-113.
- Geiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D. & Rimpler, H. (1995). Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry* 39(3), 635-643. doi:10.1016/0031-9422(94)00934-L.
- Ghirelli, C. & Hagemann, T. (2014). Targeting immunosuppression for cancer therapy. *The journal of clinical investigation*, 123(6), 2355-2357. doi:10.1172/JCI69999.
- Glockmann, A., Kiene, H.; Kienle, G & Schink, M. (2009) *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 28(79), 1-33. doi:10.1186/1756-9966-28-79

- Grau Ríos, M. & Grau Sáenz, M. (2010). *Riesgos ambientales en la industria*. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Greenlee, H., Hershman, D. & Jacobson, J. (2009). Use of antioxidant supplements during breast cancer treatment: a comprehensive review. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115(3), 437-452.
- Guo, L., Chen, X., Hu, Y., Liu, J., Wang, D. & Yu, Z (2013). Curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells by activating the mitochondria apoptotic pathway. *Phytotherapy Research*, 27(3), 422-30. doi: 10.1002/ptr.4731.
- Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6(2), 546-566.
- Gutiérrez, D. & Muñoz, M. (2011) Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca* Gram., *Nicotiana trigonophylla* Dunal y *Solanum rostratum* Dunal. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. Recuperado de: <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/1397/1/RI000945.pdf>
- Harwig, J. & Scott, P. (1971). Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Larvae as a Screening System for Fungal Toxins. En *Journal of Applied Microbiology*. 21(6), 1011–1016
- Hasegawa, M. & Marcano, D. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas: Universidad Central de Venezuela.
- Helgason, C. (2004). Culture of primary adherent cells and a continuously growing nonadherent cell line. En Helgason, C. & Miller, C. (Eds.), *Basic Cell Culture Protocols* (3rd ed.) (pp. 1-12). Totowa, NJ: Humana Press.
- Hermes-Lima, M. (2005). Oxidative stress and medical sciences. En Storey, K. (Ed), *Functional metabolism, regulation and adaptation*. doi: 10.1002/047167558X.ch13
- Hurley, L. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 188-200. doi:10.1038/nrc749
- Ibáñez, M., Pinto, Y., Rangel, N. Ramírez, S., Sánchez, W. & Vanegas, D. (2006). Polimorfismos del gen P53 en cáncer mamario familiar en una población colombiana. *Revista Colombiana de Cirugía*, 22(1), 17-26.

- Innoprot. (2015). Kit de Citotoxicidad por LDH. Referencia: P40104. Recuperado de http://www.innoprot.com/es_productos.asp?idp=106&id=13
- Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente de la Universidad Rafael Landívar – IARNA-URL-. (2012). *Perfil Ambiental de Guatemala 2010-2012. Vulnerabilidad local y creciente construcción de riesgo* (Serie Perfil Ambiental No. 12). Guatemala: Autor. Recuperado de <http://www.url.edu.gt/PortalURL/Biblioteca/Contenido.aspx?o=3989&s=49>
- Instituto Nacional del Cáncer (2015). Diccionario. Recuperado de <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?CdrID=597173>
- Jaimes, J. (2009). *Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de los extractos en petrol y en etanol de hojas y corteza de la planta Bursera tomentosa (JACQ) Tr. & Pl.* Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Jamnadass, R., Kindt, R., Mutua, A. & Orwa, C. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 [Agroforestry databases]. Recuperado de http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Byrsonima_crassifolia.PDF.
- Jimenez, H., Melo, V. Muñiz, I., Schettino, B. & Vargas, N. (2012). Estudio etnobotánico de *Byrsonima crassifolia* L (K) y su composición nutricional. *Revista Latinoamericana de Química* (39), 196.
- Jordan, M. & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), 253-65.
- Jorge, F. & Pino, O. (2010). Artemia Bioassay: useful working tool for ecotoxicologists and chemists of natural products. *Revista Cultura*, 22(1), 34-43.
- Kamal-Eldin, A., Ruales, J. & Vasco, C. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816-823. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.054
- Kirtikara, K. & Vichai, V. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, 1(3). 1112-1116. doi:10.1038/nprot.2006.179
- Knox, S., Oronsky, B., Reid, T. & Scicinski, J. (2012). The scarlet letter of alkylation: a mini review of selective alkylating agents. *Translational Oncology*, 5(4), 226-229.

- Kouznetsov, V., Ortiz, M., Restrepo, R., Reyes, D. & Rojas, F. (2012). Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolínicas. *Universitas Scientiarum*, 17(3), 253-261.
- Krishnaraju, A., Rao, T., Subbaraju, G., Sundararaju, D., Tsay, S. & Vanisree, M. (2005). Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *International Journal of Applied Sciences and Engineering*, 3, 125-134.
- Kuete, V. (2014). *Toxicological survey of african medicinal plants* [versión DX Reader]. Recuperado de <https://books.google.com.gt/books?id=FV8TAgAAQBAJ&pg=PA184&lpg=PA184&dq=It+is+generally+considered+that+biological+efficacy+is+not+due+to+in+vitr+o+cytotoxicity+when+SI+%E2%89%A5+10.&source=bl&ots=QTxfMCZc7K&sig=xAmgjsptFuhAs8qzOWcfSz9jXr8&hl=es&sa=X&ei=KnFFVaXEGcmUNrufgPgH&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=It%20is%20generally%20considered%20that%20biological%20efficacy%20is%20not%20due%20to%20in%20vitro%20cytotoxicity%20when%20SI%20%E2%89%A5%2010.&f=false>
- Knudson, A. (1996). Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 122(3), 135-40. doi: 10.1007/BF01366952
- Kumar, P., (2004). Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *Current science* 86(7), 930-937.
- Laboratorio de investigación de productos naturales. (2013a). *Determinación de la actividad antioxidante por el método micrométrico del DPH*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de investigación de productos naturales. (2013b). *Estandarización de método micrométrico de DPPH para determinación de actividad antioxidante*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de investigación de productos naturales. (2013c). *Tamizaje de la actividad citotóxica contra Artemia salina*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Langdon, S. (2004). *Cancer cell culture: methods and protocols* [versión DX Reader]. Recuperado de

- <http://scrc.tbzmed.ac.ir/uploads/90/CMS/user/file/196/Cancer%20Cell%20Culture%20Methods%20and%20Protocols.pdf>
- Laughinghouse, & Tedesco, S. (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. En Srivastava, J. *Environmental Contamination*. (pp. 137-156). Croatia: In Tech Open.
- Leme, D. & Marin-Morales, M. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682(1), 71-81.
- Leos-Rivas, C., Verde, M., Cruz, D., Barrón, M., Rivas, C. & Oranday, A. (2013). Actividad biológica de extractos metanólicos de *Heliotropium amplexicaule*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 44(3), 19-23.
- Letai, A. & Kuter, D. (1999). Cancer, Coagulation, and Anticoagulation. *The Oncologist*, 4(6), 443-449.
- Leukaemia Foundation (2008). *Understanding Leukaemias, Lymphomas, Myeloma and related blood disorders: a guide for patients and families*. Recuperado de https://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/Patientanddonorpublications/Documents/3.%20AusLF_2008_booklet_LLM.pdf
- Lock, O. (2001). Análisis fitoquímicos y metabolitos secundarios. En M. Villar y O, Villavicencio (Comps.), *Manual de fitoterapia* (pp. 41-64). Lima: Organización Panamericana de la Salud.
- Loizzo, M., Menichini, F., Saab, A., Statti, G. & Tundis, R., (2007). Cytotoxic Activity of Essential Oils from Labiatae and Lauraceae Families Against *In Vitro* Human Tumor models. *Anticancer Research*. 27(5A), 3293-3300
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En Corporación Universitaria Lasallista, *Desarrollo y Transversalidad*, (Serie Lasallista Investigación y Ciencia). Antioquia: Corporación Universitaria Lasallista.
- Longato, G., Rizzo, L., de Olivera, I., Tinti, S., Possenti, A., Figueira, G., Tasca, A., Foglio, M. & Carvalho, J. (2011). In vitro and In vivo anticancer activity of extracts, fractions, and eupomatenoide-5 obtained from *Piper regnelli* leaves. *Planta Medica*, 77(13), 1482-1488. doi: 10.1055/s-0030-1270889.

- Martínez, B. (2011). *Análisis bromatológico del carambolo (Averrhoa carambola L.) y determinación de su capacidad antioxidante* (Tesis de pregrado). Universidad Veracruzana, México.
- Matesanz, R. (2009). *Optimización de la interacción microtúbulo-taxol diseño de taxanos de alta afinidad* (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Mazzio, E. & Soliman, K. (2009). *In Vitro* screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. En *Phytotherapy Research*, 23(3), 385–398. doi: 10.1002/ptr.2636
- McMahon, J., Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Storeng, R. & Vistica, D. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. En *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.
- Mendoza-Espinoza, J. & Schlaepfer, L. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.
- Meyer, B., Jacobsen, L., McLaughlin, L., Ferrigni, N., Nichols, D. & Putnam, J. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45(5), 31-34.
- Molina, G. (2004). *Aislamiento y Caracterización de Compuestos con Actividad Bactericida y/o Bacteriostática de Plantas del Noreste de México sobre Cepas de Mycobacterium tuberculosis sensibles y multidrogoresistentes*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Mompín, P. J. (1988). *Introducción a la bioingeniería* [Version digital PDF]. Barcelona: Marcombo. Recuperado de <https://books.google.com.gt/books?id=aqcaSGADoo4C&pg=PA117&dq=radiacion+cancer+enlaces+covalentes+mecanismo&hl=en&sa=X&ei=ZZVkVfnnLcOagWTmooHgDg&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=radiacion%20cancer%20enlaces%20covalentes%20mecanismo&f=false>
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C. ... Boyd, M. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757-766. doi: 10.1093/jnci/83.11.757

- Muñoz, A. (1997). *Cáncer: Genes y nuevas terapias*. Recuperado de https://books.google.com.gt/books?id=BV-p7tv6IvIC&pg=PA130&dq=oncogen+protooncogen+proteina+anormal&hl=es&sa=X&ei=QBw1VcWiBaewsATL_oHYDQ&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=oncogen%20protooncogen%20proteina%20anormal&f=false
- Murugan, R. & Parimelazhagan, T. (2013). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. – An in vitro approach. *Journal of King Saud University Science*, 26(4), 267-275. doi:10.1016/j.jksus.2013.09.006
- National Cancer Institute. (2014). Drug Dictionary. Recuperado de <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/terminologyresources/ncidictionaries>
- National Cancer Institute. (26 de 08 de 2015). *NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen*. Recuperado el 27 de 04 de 2017, de Division of cancer treatment & diagnosis: https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.htm
- National Center for Biotechnology Information (2015). Dactinomycin PubChem Compound Database. Recuperado de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/457193>
- Nikoloff, N. (2014). *Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica en Argentina* (Tesis de Doctorado). Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad de La Plata. Argentina. Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/34614>
- Organización Mundial de la Salud, (2002). *Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional*. Recuperado de <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4930s/s4930s.pdf>
- Oropeza, M. (2012). *Alcaloides totales y actividad antioxidante de extractos metanólicos de hojas de Ipomoea murucoides (casahuate)*. (Tesis de licenciatura). Universidad Tecnológica de la Mixteca. México.

- Osorio, A. (2013). Cáncer hereditario, importancia y necesidad de detectarlo. En *Mètode* 77, 59-63. doi: 10.7203/metode.77.2473
- Osorio, J., (2009). *Aspectos básicos de Farmacognosia*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Pabón, L., Vanegas, J., Rendón, M., Santos, A., & Hernández, P. (2013). Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de cuatro especies agroforestales de la Orinoquía colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 57-70.
- Paladino, S. (2008). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (Vitis vinífera l.)*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.
- Peñaloza, J. (2010). Oncología: principios de quimioterapia. Recuperado de http://es.slideshare.net/maur_jmp/clase-ciclo-celular-y-citostaticos-jmp
- Pérez, J., & López, J. (2010). *Etnobotánica medicinal de la Isla de Ometepe (Nicaragua)*. Nicaragua. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Jose_Antonio_Lopez-Saez/publication/235921025_Etnobotanica_medicinal_de_la_Isla_de_Ometepe_Nicaragua/links/02bfe514310a5b94f7000000.pdf
- Pérez, V., Lugo, E., Gutiérrez, M. & Del-Toro, C. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 15(3), 18-22.
- Persoone, G. & Vanhaecke, P. (1984). The arc-test: a standardized short term routine toxicity test with *Artemia* nauplii. Methodology and evaluation. *Ecotoxicological testing for the marine environment*, 2, (588), 143-157.
- Piloto, J., Remigio, A., Rodríguez, J. & Vega, Y. (2008) Genotoxicidad de *Justicia pectoralis* Jacq. (Tilo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(2).
- Pontificia Universidad Javeriana. (2004). Cultivos celulares. *Biología celular: programa*. (Modulo 1). Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cultivos.htm>
- Quiñones M., Miguel M. & Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.

- Rigas, B. & Sun, Y. (2008). Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. *British Journal of Cancer*. 98(7), 1157-1160. doi: 10.1038/sj.bjc.6604225.
- Ruíz, S., Venegas, E., Chávez, M., & Eustaquio, C. (2010). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV-Scientia*, 2(2), 11-22.
- Ryan, M. & Whelan, L. (2003). Ethanolic extracts of Euphorbia and other ethnobotanical species as inhibitors of human tumour cell growth. En *Phytomedicine*, 10(1), 53-58. doi:10.1078/094471103321648665
- Salazar-Olivo, L. & Villarreal, M. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Ethnopharmacol*, 133 (3), 945-972.
- Salganik, R. (2001). The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(5).
- Saravia, A. (2009) Validación farmacológica y evaluación fitoquímica de extractos de plantas medicinales de uso popular en Guatemala como anticancerígenos. (Informe Final FODECYT 11-2006). Guatemala, CONCYT.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (México). Análisis de agua – evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* Kellogg (crustácea - anostraca) – método de prueba. Norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI. 1995, México, 1995. 26.
- Shah, S. (2012). Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(2), 43-54.
- Sharma, S. (1983). Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Current Science*, 52(21), 1000-1002.
- Sistema de Información para la Reforestación [SIRE]. (2011). Paquetes tecnológicos *Bursera simaruba* (L) Sarg. Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), Consejo nacional para la conservación de la Biodiversidad (CONABIO). Recuperado de:

- <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/894Bursera%20simaruba.pdf>
- Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2013a). La ciencia que sustenta la radioterapia. Recuperado de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003020-pdf.pdf>
- Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2013b). Trasplante de células madre para la leucemia mieloide aguda. Recuperado de <http://www.cancer.org/espanol/cancer/leucemiamieloidenaaguda/guiadetallada/leucemia-mieloide-mielogena-aguda-treating-bone-marrow-stem-cell-transplant>
- Sociedad Americana Contra El Cáncer. (2013c). Principios de la quimioterapia. Recuperado de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002996-pdf.pdf>
- Sociedad Española de Oncología Médica. (2013). *Efectos secundarios de la quimioterapia*. Recuperado de <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/guia-actualizada/efectos-secundarios-de-la-quimioterapia?start=7#content>
- Stanford University Medical Center. (2009). Bleomycin patient education. Recuperado de <http://healthlibrary.stanford.edu/patient/bleomycin.pdf>
- Stanford University Medical Center. (2010). Paclitaxel: Instrucciones para el paciente. Recuperado de http://healthlibrary.stanford.edu/patient/paclitaxel_spanish.pdf
- Thiruvengadarajan, V. & Yalavarthi, C. (2013). A review on identification strategy of phyto constituents present in herbal plants. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 123-140.
- Thomas, A., Rao, J., Subrahmanyam, V., Chandrashekhar, H., Maliyakkal, N., Kisan, T., Joseph, A., & Udupa, N. (2011). In vitro anticancer activity of microbial isolates from diverse habitats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(2), 279-287.
- Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera* (Tesis de Pregrado). Escuela de Tecnología Química, Facultad de Tecnología, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

- Tripathi, K. (2008). *Farmacología en odontología: fundamento*. Madrid: Médica Panamericana.
- Unidad de Atención al Cáncer (Ed). (2009). *Quimioterapia: guía para pacientes*. Asturias: Gráficas Cano.
- Universidad Nacional de la Patagonia. (2009). *Farmacognosia*. Obtenido de <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads>
- Universidad Nacional de Quilmes. (2002). *Biología celular y molecular. Guía de TP Nro. 2: Mantenimiento de líneas celulares*. Recuperado de <http://cancer.unq.edu.ar/Tpnro2bis.pdf>
- Upton, A. (2001). Biología radiológica y efectos biológicos. En Organización Internacional del Trabajo –OIT-, *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. (48.4-48.11). España: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.
- Venereo-Gutiérrez, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2), 126-133.
- Villar, A. (Ed.). (1999). *Farmacognosia general*. Madrid: Síntesis Editorial.
- Villeda, M. y Waldheim, C. (2014). Registro hospitalario del Instituto de Cancerología y Hospital “DR. Bernardo Del Valle S”. *Revista del Colegio Médico de Guatemala*, 151, 8-14.
- Villavicencio, M. & Pérez, B. (2005). Vegetación e inventario de la flora útil de la huasteca y la zona otomí-tepehua de Hidalgo. *Boletín Científico de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, 1. Recuperado de <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1796/Vegetaci%F3n%20e%20inventario%20de%20la%20flora%20FAtil%20de%20la%20huasteca%20y%20la%20zona%20otom%ED-tepehua%20de%20Hidalgo.pdf?sequence=1>
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, 110, 39-48.
- Wary, K. (2011). Pharmacology of antineoplastic agents. Recuperado de <http://www.uic.edu/classes/pcol/pcol331/Antineoplastic%20Agents%202011%20Dental%20MARCH-1.pdf>

- World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research. (2007). *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. [versión DX Reader]. Washington, DC, United States of America: RR Donnelley. Recuperado de: http://www.dietandcancerreport.org/cancer_resource_center/downloads/Second_Expert_Report_full.pdf
- World Cancer Research Fund International. (2015a). Comparing more & less developed countries: Here you can find out more about differences in age-standardised rates of cancer between more and less developed countries. *World Cancer Research Fund International*. Recuperado de: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/comparing-more-less-developed-countries>.
- World Cancer Research Fund International. (2015b). Worldwide data: Here you can find information about world cancer statistics for the most common cancers (excluding non-melanoma skin cancer) in 2012, the latest year available. *World Cancer Research Fund International*. Recuperado de <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>
- World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Recuperado de http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_916.pdf
- World Health Organization. (2011) Global status report on noncommunicable diseases. Recuperado de http://www.who.int/nmh/publications/ncd_profiles_report.pdf
- World Health Organization. (2014). Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles. Recuperado de http://www.who.int/nmh/countries/gtm_en.pdf?ua=1
- Xterides. (2007). Informe de Ensayo de Citotoxicidad. Recuperado de <http://www.xterides.com/pdf/Infome%20Producto%20Final.pdf>
- Zeisel, S. (2004). Antioxidants Suppress Apoptosis. *The Journal of Nutrition*. 134(11), 3179-3180.
- Zelada, V., Carvalho, J., & Cáceres, A. (2016). Evaluation of the antioxidant, genotoxic and cytotoxic activity of organic fractions from leaves and roots of *Piper patulum* Bertol. from Guatemala. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 3(08), 1-6. doi:10.15171/ijpni.2016.08

Anexo 1. Fichas técnicas

Bursera simaruba



Fuente: (Cáceres, 2005).

Nombres

Nombre científico: *Bursera simaruba* (L) Sarg. (Burseraceae)

Sinonimias: *Bursera gummifera* L.; *B. ovalifolia* Engler; *Elaphium ovalifolium* Schlecht.; *E. simaruba* (L) Rose; *E. subpubescens* Rose; *Pistacia simaruba* L.; *Terebinthus arborea* Rose; *T. acuminata* Rose, *T. attenuata* Rose (Cáceres, 2005).

Nombres populares: Palo de jiote, Almácigo (español), Chacah, Chino, Chicahuite, Ginicuite, Indio desnudo, Jiote, Solpiem, Xacago-que, Palo mulato, Gumbo-limbo (inglés), Fragon caranne Jobo (Cáceres, 2005; Sistema de Información para la Reforestación [SIRE], 2011).

Descripción de la planta

Forma: árbol resinoso, de 5 a 20 m (hasta 35 m) de altura, con un diámetro de 40 a 80 cm (hasta 1 m). Copa/Hojas: Copa irregular y dispersa, con follaje ralo. Sus ramas se extienden y forman una copa ancha y abierta; hojas compuestas, alternas, de 4 a 9 cm de largo por 1.8 a 3.5 cm de ancho. Tronco/Ramas: Tronco con pocas ramas gruesas y torcida, es fornido y con frecuencia se bifurca a 2 m del suelo. Corteza: lisa, rojiza y se despega en jirones (exfoliante). Flor(es): panículas tirsiformes terminales o pseudoracimos, de 6 a 13 cm de largo incluyendo el pedúnculo; con flores masculinas individuales, con 4 a 5 pétalos rosados, verde amarillentos o blancos; flores femeninas con solo tres pétalos. Fruto(s). Cápsula trivalvada (con tres ángulos) con sólo el exocarpio dehiscente, de 10 a 15 mm de largo, de 7 a 10 (15) mm de diámetro, triangular, moreno rojiza, dehiscente; se mantiene durante partes terminales de las ramas y en gran número (Alcocer, Batis, Gual, Sánchez & Vásquez-Yanes, 1999).

Lugar de crecimiento

Especie distribuida desde el norte de México y extremo sureste de Estados Unidos, a través de Centroamérica y las Antillas, hasta el norte de Brasil. Crece en bosques secos y tropicales, desde el nivel del mar hasta 1,800 msnm. Se ha descrito en climas tropicales y subtropicales (Calderón, Medina & Rzedowski, 2004)

Figura 2. Distribución natural de *Bursera simaruba*, en América Tropical.



Fuente: Francis, 1990.

Composición química

La corteza contiene taninos (7-10%); según el tamizaje fitoquímico presenta saponinas, esteroides insaturados, leucoantocianinas, taninos, polifenoles, alcaloides, sesquiterpenlactonas y aceite esencial. La goma resinosa contiene canfeno, elemicina, amireno y lignanos. El género *Bursera*, en general, contiene triterpenos, bilignanos, lignanos del tipo podofilotoxina y flavonoides, con actividad antiviral. Otras moléculas bioactivas son α -amirina, β -sitosterol y elemicina (Cáceres, 2005).

Composición nutricional

No se ha reportado.

Partes usadas como alimento

No se ha reportado.

Cómo se produce y cuando se colecta como alimento

No se ha reportado su uso como alimento. Sin embargo, el material medicinal se obtiene por recolección silvestre, es relativamente frecuente ya que se acostumbra sembrar como cerco vivo. Crece en clima tropical, soporta sequías prolongadas. Se propaga por semillas y estacas que enraízan fácilmente, en época lluviosa se sugiere su siembra para mejorar su enraizamiento. Se utiliza la corteza que se obtiene de árboles botados para leña o bien se cortan tiras longitudinales de la corteza a finales de la época lluviosa. La corteza troceada se seca al sol (Cáceres, 2005).

Usos medicinales populares

A la corteza se le atribuye propiedad antiinflamatoria, astringente, diurética, laxante, sudorífica y vulneraria; a la raíz se le atribuye propiedad astringente. La goma resinosa se usa como medicina e incienso en los ritos religiosos (Cáceres, 2005). En algunos lugares se utiliza la infusión que se obtiene para bajar de peso (Alcocer et al., 1999; SIRE, 2011).

La decocción de corteza y hojas se usa para tratar anemia, afecciones gastrointestinales y respiratorias, fiebre, gota, hernia, hidropesía, mal de orín, reumatismo, sífilis, hinchazón, gonorrea, presión alta, paludismo, paperas y sarampión (Cáceres, 2005).

La decocción de corteza se aplica de forma tópica en afecciones dermatomucosas (abscesos, cicatrices, heridas, lesiones venéreas, leucorrea, piodermia, rasquiña, sarna, tiña, varicela), picaduras de insectos y otros animales ponzoñosos (Cáceres, 2005).

Propiedades medicinales demostradas

Farmacología experimental y clínica

Los extractos tanto acuoso como etanólico de las partes aéreas, mostraron actividad espasmolítica en íleon de cobayos. El extracto etanólico presentó actividad vasodilatadora en un estudio realizado *in vitro* con órgano de ratas, así como actividad estimulante del músculo liso probado en duodeno de conejos (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

La decocción de la planta, evaluada por vía nasogástrica en ratas, mostró actividad diurética a la dosis de 1 g/kg. Extractos obtenidos con cloruro de metileno (MeC12) a partir de frutos, hojas y corteza del tallo presentaron actividad citotóxica en cultivo de células humanas de carcinoma de colon-115. Se ha reportado actividad antifúngica para *Neurospora crassa* esta con un extracto etanólico (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Los extractos tanto acuoso como etanólico de la corteza son activos contra *S. aureus*, pero inactivos contra *E. coli*, el extracto diclorometánico de corteza es activo contra *C. albicans*. La decocción de corteza es activa contra *E. floccosum* de cuatro dermatofitos; el extracto etanólico es activo contra *N. crassa*. El extracto hexánico de hojas y sus fracciones presenta una potente actividad antiinflamatoria comparable a fenilbutazona por la técnica carragenina-adyuvante (Cáceres, 2005).

Otros usos de la planta

El exudado se utiliza como adhesivo, la resina se usa como sustituto de la cola y como cemento para pegar piezas rotas de loza, vidrio y porcelana; también se usa como aromatizante el exudado y los frutos, hervidos en agua y endurecidos son utilizados como incienso; la resina aromática exudada se usa para repeler insectos, por lo que tiene uso insecticida (Alcocer et al., 1999).

La madera tiene uso artesanal, combustible y se usa en la construcción. El nombre común de la madera es “chacán mulato”. Es madera suave, su gravedad específica es 0.32 g/cm³. Se puede trabajar con facilidad y se puede dar un fino acabado. Por su propiedad blanda y ligera se usa en la elaboración de artesanías, juguetes y artículos torneados. Se usa como leña y carbón, a pesar de que su alto contenido de humedad, pero seca se usa como leña de ignición por su alta inflamabilidad. En la construcción rural la madera se usa para interiores de la vivienda y no es apropiada para uso externo (Alcocer et al., 1999; SIRE, 2011).

En la industria la madera y el exudado se usa como pulpa para papel y fabricación de barnices y lacas (Alcocer et al., 1999; SIRE, 2011).

Efectos tóxicos de la planta

Los extractos etanólico y acuoso de la corteza y hojas (500mg/kg) son tóxicos contra peces del género *Mollinesia*. Los extractos clorofórmicos de resina muestran potente actividad citotóxica en *A. salina* (CL₅₀: 33 mg/ml). La podofilotoxina es irritante de la piel, tiene DL₅₀ en ratas por vía intravenosa de 8.7 mg/kg y de 15 mg/kg por vía intraperitoneal (Cáceres, 2005). La toxicidad del extracto acuoso preparado con las partes aéreas (hojas más tallos), indica dosis tóxica mínima en ratones, por la vía intraperitoneal equivalente a 0.5ml/animal (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Byrsonima crassifolia



Fuente: (Cáceres, 2005).

Nombres

Nombre científico: *Byrsonima crassifolia* (L.) HBK (Malpighiaceae).

Nombre común: Nance.

Sinonimias: *Byrsonima cinérea* Dec., *B. cotinifolia* HBK, *B. cubensis* Juss., *B. ferruginea* Kunth., *B. karwinskiana* Juss., *B. pulchra* DC., *B. rufescens* Bertol., *B. laurifolia* HBK. Var *guatemalensis* Niedenzu, *Malpighia crassifolia* L. (Cáceres, 2005).

Otros nombres populares: Chi, craboo, nanche, nanzin, tapal, zacpah, changugu, nance agrio, nance dulce, nancen, nananche, nancito, crabo, maache (Alcocer et al., 1999; Bautista & Gonzales, 2007; Cáceres, 2005;).

Descripción de la planta

Forma: Árbol grande o arbusto de crecimiento lento, de 3-10 metros de alto (has 15 metros de alto). Copa/hojas: Compa amplia y abierta o irregular. Hojas alargadas, simples, opuestas ovaladas, de 5 a 20 cm de largo por 3 a 7 cm de ancho, puntiagudas, el haz es liso de color verde oscuro y el envés con tegumento ferruginoso de color verde amarillento grisáceo. Tronco/ramas: varían en la forma de redonda a tortuosa, pueden ser torcidos o derechos, las ramas jóvenes están cubiertas por densos pelos pelirrojos. Corteza: la externa es escamosa que se desprende en pedazos rectangulares, de color gris parda a moreno clara; la corteza interna es fibrosa de color crema rosado; el grosor total es de 12 a 25 mm. Flores: 1.5 cm de diámetro, contienen fino ramaje visible color rojo, miden de 10 a 20 cm de largo, son de 5 pétalos redondeados de color amarillo al principio pero luego cambian a naranja-rojo. Fruto: en drupa carnosa, 8.22 mm de diámetro, portados aisladamente en racimos, piel delicada, amarilla; carnaza blanca, jugosa, ácida, olor peculiar; una semilla negra muy dura (Alcocer et al., 1999; Bautista & Gonzales, 2007; Cáceres, 2005).

Lugar de crecimiento

Crece en climas tropicales y subtropicales. En Centro y Sur América, crece desde el nivel del mar hasta 1,800 m de altitud. Es nativo y abundante en la naturaleza, en bosques de pino abiertos, desde el sur de México, a través del lado del Pacífico de América Central, a Perú y Brasil; también crece en Trinidad, Barbados, Dominica, Guadalupe, Puerto Rico, Haití, República Dominicana y en Cuba. Es muy tolerante a la sequía. Los árboles son tolerantes a una amplia gama de entornos (Jamnadass, Kindt, Mutua, & Orwa, 2009)

Composición química

De sus hojas se han aislado diferentes principios activos como: triterpenos (betulinaldehído, betulina, ácido betulínico, lupeol, ácido oleanólico, ácido 2- β -hidroxioleanólico, ácido 2- α -hidroxioleanólico y ursenaldehído), esteroles (β - sitosterol y su glucósido, daucosterol), flavonoides, su 3-O- β -D-glucopiranosido y su 3- O-(6''-galoíl) galactósido, un éster aromático (galato de metilo), cuatro aminoácidos comunes (alanina, ácido aspártico, prolina y valina), dos aminoácidos no protéicos (ácido piperólico y ácido 5-hidroxipiperólico) y numerosos sulfonoglicolípidos y glicolípidos (Fernández, 2012).

Respecto a la composición química de la corteza, se han aislado compuestos triterpénicos (β -amirina, β -sitosterol) acetato triterpénico y proantocianidinas dímeras y trímeras (Béjar et al., 2000). También contiene catequina y (+)- epicatequina, junto con ácido gálico, taninos (20-30%), glucósidos, saponinas, sesquiterpenlactonas, cardenólidos, bufadienólicos, flavonoides (catequina, epicatequina, guayaverina, hiperina, quercetina, galoilgalactósido), leucoantocianinas, triterpenoides (birsonimol); terpenos (betulinaldehído, betulina, lupeol), éster aromático (metilgalato) y glicolípidos. La β -amirina está presente en plantas officinales chinas activas en el sistema cardiovascular y genitourinario (Cáceres, 2005; Geiss, Heinrich, Hunkler & Rimpler, 1995).

Composición nutricional

Análisis de macronutrientes y minerales: humedad 74.87%, en base seca: proteínas 0.63%; lípidos 9.89%; fibra 5.2%, minerales 3.8%, carbohidratos solubles 80.48% y calcio 125 mg/100g, fósforo 26 mg/100g. Rico en vitamina C 90-240 mg/100g (Jiménez, Melo, Muñiz, Schettino & Vargas, 2012).

Partes usadas como alimento

La fruta fresca se consume entera, cruda o cocida preparada como postre. Se pueden hacer jugos, sopas, paletas heladas, nieves y se utiliza para la obtención de bebidas fermentadas, comúnmente conocidas como *chicha* (Jiménez et al., 2012).

Cómo se produce y cuándo se colecta como alimento:

Crece en clima cálido y húmedo, tropical o subtropical, suelo rocoso, arenoso y alcalino, se adapta a oxisoles y ultisoles bien drenados, requiere precipitación pluvial alta. Se propaga por semillas en semillero. Se pasa a bolsas, a los 2 años se siembra en el campo definitivo. Al establecerse su crecimiento inicial es relativamente rápido, es necesaria una poda. Empieza a producir frutos a los años. La corteza se colecta en época seca y se seca al sol por 2-3 semanas (Cáceres, 2005).

Usos medicinales populares

El cocimiento de la corteza se usa por vía oral para tratar afecciones respiratorias y digestivas, dolor de muelas y hemorragias, picadura de culebra, parásitos y favorecer el parto y la expulsión de la placenta. Por vía tópica se usa para tratar afecciones dermatomucosas (estomatitis, leucorrea, piodermia, tinea, úlcera, vaginitis), tumores y dolor de dientes. Se le atribuye propiedad acaricida, antifúngica, antineurálgica, antitusiva, astringente, cicatrizante, desinflamante, digestiva, emenagoga, febrífuga y tónica (Cáceres, 2005). Son muy conocidas las propiedades del nance para curar afecciones de la piel como sarna, salpullido y heridas, mediante el uso de la cocción de corteza de nance y trozos de corteza de cedro, además resulta eficaz para afianzar las encías y otros dolores corporales (Alcocer et al., 1999).

Toda la planta es antitusiva, antiasmática, antibacteriana, antifúngica, desinflamante, contra la disentería y diarrea. El tallo y la raíz hervidos tienen actividad antibacteriana (Alcocer et al., 1999). El fruto se come fresco, es muy apreciado en la región, el mesocarpio representa hasta el 40% del fruto y se prepara en numerosas formas (dulce, jalea, helado, refresco y bebida) (Cáceres, 2005).

Propiedades medicinales demostradas

El extracto acuoso de hojas, corteza y raíz es activo contra *E. coli*, y *S. aureus*, la tintura de corteza contra enterobacterias, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *C. albicans*; la decocción contra *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. La corteza es el órgano más activo contra bacterias y el etanol el mejor disolvente por bioactividad y rendimiento. El extracto con acetato de etilo de la raíz tiene potente actividad. El extracto metanólico de hojas tiene actividad contra trofozoitos de *G. lamblia* (CI₅₀ 15 µg/ml). En tres grupos de pacientes con lesiones confirmadas de candidiasis oral, agrupadas y tratadas aleatoriamente, se demostró mejoría y negativización del examen microscópico en 70% de los tratados con trociscos a base de extracto etanólico de corteza, 90% de los tratados con un enjuague a base de tintura de corteza y 83% en los tratados con clotrimazol (Cáceres, 2005).

Otros usos de la planta

Se usa como colorante, la cáscara del fruto produce un tinte de color castaño claro que se usa para pigmentar tejidos de algodón, especialmente usado en Guatemala (Alcocer et al., 1999).

La madera se usa como combustible (leña) y en construcción por ser dura y flexible, fuerte y pesada. También se emplea en elaboración de muebles, gabinetes, pisos, torneados, puertas, marcos para puertas y ventanas, molduras, marcos de cuadros, entre otros (Alcocer et al., 1999).

La corteza se utiliza como curtiente, esta es rica en taninos (28.6 %) útiles en la elaboración y tinción de cueros. La hoja se usa como forrajero, que es apetecido por los cerdos y otros animales domésticos y silvestres (Alcocer et al., 1999; Bautista & Gonzales, 2007).

Efectos tóxicos de la planta

La corteza se ha atribuido cierta toxicidad, pero no hay estudios específicos. Los extractos acuosos y etanólicos de hojas, corteza y raíz son tóxicos a peces del género *Mollinesia*. La infusión de corteza por vía oral en ratón no tiene toxicidad aguda en dosis de 1-5 g/kg (Cáceres, 2005).

Anexo 2. Quimioterapéuticos

Tabla 18. Ejemplificación de quimioterapéuticos fase inespecíficos.

Antineoplásico	Descripción
Agentes alquilantes	<p>Unen covalente e irreversiblemente su grupo alquilo con biomoléculas nucleofílicas como los nucleótidos y los aminoácidos. Pueden ser monofuncionales (realizan solamente una alquilación) o bifuncionales (logran unir con enlaces covalentes dos moléculas y son capaces de generar en los ácidos nucleicos enlaces cruzados ya sea intra o intercatenarios, causando así desde el arresto de la replicación hasta la muerte celular). Algunos ejemplos son la mecloretamina, el clorambucil, la ciclofosfamida, la ifosfamida y el melfalán. Debido a que estos causan daño en el ADN, es posible, aunque poco común, que le produzcan daño a la médula ósea (debido a que afectan especialmente a las células que cursan con una alta tasa de replicación sin diferenciar la malignidad de las mismas) ocasionando leucemia aguda dosis dependiente. Otros grupos terapéuticos son los alquilsulfonatos (presentan mayor reactividad con los grupos tiolos de los aminoácidos que con el N7 de la guanina), las nitrosoureas, los alquilantes atípicos, las etileniminas con sus derivados y las sales de platino, dentro de las cuales el cisplatino y el carboplatino son ampliamente utilizadas en tumores de pulmón, ovario, testículo, cabeza, cuello y vejiga. Ambos forman enlaces covalentes entre el platino y el nitrógeno de la adenina o la guanina, sin embargo el cisplatino es más nefrotóxico, neurotóxico y emetógeno.</p>
Inhibidores de la topoisomerasa	<p>Las topoisomerasas son enzimas que mantienen, controlan y modifican la topología del ADN, según su mecanismo de acción se clasifican en tipo I y II dependiendo si los cortes transitorios los realizan en una o ambas hebras. La enzima se une covalentemente con el ADN y, en este punto, actúa el antineoplásico, estimulando y estabilizando este complejo provocando así la escisión permanente de la cadena y la pérdida de su función. Los inhibidores de topoisomerasas tienen una estructura y composición diversas, pueden inhibir a la topoisomerasa I (topotecan e irinotecan) y a la topoisomerasa II (podofilotoxinas como el etopósido y tenipósido que son derivados semisintéticos; antibióticos antraciclínicos como la doxorubicina, etc), sin embargo estos últimos aumentan el riesgo de padecer leucemia mieloide aguda en 2-3 años después de iniciada la terapia.</p>
Antibióticos	<ul style="list-style-type: none"> • Antraciclina: interfieren con la replicación del ADN al intercalarse entre pares de bases adyacentes, generar radicales libres (provocando daño al ADN, peroxidación lipídica y estrés oxidativo que conduce a la muerte celular) e inhibir las topoisomerasas. Entre éstas se pueden mencionar la doxorubicina y la daunorrubicina aisladas de <i>Streptomyces</i>. La doxorubicina es un agente intercalante capaz de formar un complejo ternario estable (ADN-fármaco-topoisomerasa II) que facilita la rotura irreversible de las cadenas de ADN y que también provoca alteraciones en la membrana e inhibición de la fosforilación oxidativa producida en las mitocondrias; no obstante, se ha sugerido que esta disfunción mitocondrial junto a la producción de radicales libres contribuyen más a la acción cardiotoxica que a la citotóxica. • Actinomicina D (dactinomicina): proveniente de <i>Streptomyces</i>, afecta más a las polimerasas ARN dependientes de ADN que las polimerasas ADN, por lo que la principal consecuencia funcional es la inhibición de la transcripción y, secundariamente, la inhibición de la traducción del mismo. Este antineoplásico produce citotoxicidad no solo por su acción intercalante sino también por provocar la rotura de las cadenas de ADN (probablemente mediante la producción de radicales libres o como resultado de la inhibición de la topoisomerasa II). • Mitoxantrona: Es un producto sintético con estructura similar a las antraciclina que, aunque no es específico de fase, actúa especialmente al final de la fase S enlenteciendo el ciclo celular y provocando roturas del ADN por la estabilización del complejo ADN- topoisomerasa y por la producción de radicales libres. Debido a que su capacidad para crear radicales libres tipo quinona es limitada, su cardiotoxicidad también lo es, lo que explica la tolerancia aumentada que presenta en comparación con las antraciclina

Fuentes: Brown & Brown, Jr., 2005; Caroline et al, 2011; Chabner & Longo, 2010; Contreras, 2008; Cortijo-Cascajares, Herreros & Jiménez-Cerezo, 2012; Dayerlin, 2013; Flórez, 1997; Hurley, 2002; Knox, Oronsky, Reid & Scicinski, 2012; National Center for Biotechnology Information, 2015; Peñaloza, 2010; Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2013c; Wary, 2011.

Tabla 19. Ejemplificación de quimioterapéuticos específicos de fase.

Fase	Descripción
Fase S: Anti-metabolitos	Interfieren con la síntesis del ADN sustituyendo bases o inhibiendo enzimas claves del proceso. En general, su efecto es el máximo cuando la tasa de proliferación celular es alta y son comúnmente utilizados como tratamiento de leucemias, cáncer de mama, de ovario, del tracto intestinal, entre otros. Como ejemplos se pueden citar a los análogos de las pirimidinas (citarabina -arabinósido de citosina- inhibidor competitivo de la ADN polimerasa; 5-fluorouracilo), análogos de las purinas (6-mercaptopurina) y antagonistas del ácido fólico (metotrexato, inhibe la dihidrofolato reductasa).
Fase G2	<ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos: como la bleomicina aislada de <i>Streptomyces verticillus</i>, es la preparación comercial fabricada por una mezcla de bleomicina A₂ y B₂. Produce la fragmentación del ADN, especialmente el de hebra simple, y contiene dos dominios, uno que actúa como agente intercalante del ADN y otro que funciona como ligando para la coordinación de metales aunque solo el hierro en estado reducido es su ligando activo. Es entonces necesario que tanto el Fe²⁺ como el oxígeno estén disponibles para que por medio de su acción oxidasa, la bleomicina catalice el paso de Fe²⁺ a Fe³⁺ y la reducción del oxígeno, favoreciendo así no solo la producción de radicales libres sino que también la unión a la hebra de ADN en sitios 5' purina-pirimidina 3'. Dentro de los principales efectos adversos se encuentra la mielosupresión, debilitamiento de las uñas, decoloración de la piel y la alopecia. • Inhibidores de la topoisomerasa.
Fase M: Antimitóticos o inhibidores de la mitosis	<p>Su diana es la unidad funcional de los microtúbulos: la α/β tubulina. Los microtúbulos forman parte del citoesqueleto y participan en el mantenimiento de la forma celular, transporte vesicular, señalización celular y formación de cilios y flagelos. Así mismo están involucrados en la división celular, pues constituyen el huso mitótico que es imprescindible para la segregación correcta de los cromosomas. El último fin de los antimicrotúbulos es producir la apoptosis luego de una mitosis fallida a través del mecanismo conocido como <i>catástrofe mitótica</i>, en el cual hay formación de micronúcleos asociado con la activación de la caspasa 2. Los agentes antimitóticos también colaboran con la apoptosis al inhibir la angiogénesis, pues al no haber vascularización tampoco habrán nutrientes disponibles necesarios y la célula morirá. Se dividen en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agentes desestabilizadores de los microtúbulos: Disminuyen el crecimiento de los microtúbulos y los acortan, aumentando el tiempo que éstos gastan en estado atenuado o pausado, en donde no hay ni crecimiento ni acortamiento detectable. La fase más sensible es en la metafase, donde los cromosomas quedan atascados en los husos de los polos y son incapaces de migrar hacia el ecuador de la célula. Como resultado, la señal del complejo promotor de la anafase queda bloqueada y eventualmente ocurre apoptosis. Un ejemplo son los alcaloides de la vinca, tales como la vincristina y la vinblastina, aislados de las hojas de <i>Catharanthus roseus</i>, previamente conocida como <i>Vinca rosea</i>. Dentro de los principales efectos secundarios se encuentran las neuropatías periféricas y la mielosupresión reversible. La resistencia a los alcaloides puede surgir a raíz que las células carezcan el sistema transportador de los mismos, o por la incapacidad de fijación a la tubulina. • Agentes estabilizadores de los microtúbulos: taxanos. Tal como con los alcaloides de la vinca, la supresión de la dinámica de los microtúbulos ejercida por los taxanos conduce a un bloqueo mitótico que evita el progreso de metafase a anafase causando en algunos casos apoptosis y provocando como principales efectos adversos mielosupresión y la neurotoxicidad. Los productos más destacados son el paclitaxel (extraído de la corteza del árbol de tejo <i>Taxus brevifolia</i>) y el docetaxel (copuesto semisintético obtenido del tejo <i>Taxus baccata</i>). Ambos son empleados para tratar el cáncer de mama, ovario, sarcoma de Kaposi, entre otros. Por sí mismos se unen pobremente a la tubulina soluble pero, su afinidad con la tubulina a lo largo del microtúbulo es grande. En cuanto al paclitaxel, a bajas concentraciones estabiliza al microtúbulo, mientras que a altas concentraciones también aumenta la polimerización de la tubulina.

Fuentes: Brandão, Couto, David J.M., David J.P. & Nascimento, 2010; Delgado, 2010; Dorr, 1992; Ensminger, Maybaum, Pratt & Ruddon, 1994; Flórez, 1997; Instituto Nacional del Cáncer, 2015; Jordan & Wilson, 2004; Matesanz, 2009; Peñaloza, 2010; Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2013c; Stanford University Medical Center, 2009; Tripathi, 2008.

Anexo 3. Imágenes de la fase experimental

La Fotografía 1 y 2 muestran la recolección y secado de distintos órganos de dos especies nativas de Guatemala, *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*.

Fotografía 1. Recolección y secado de la corteza de *Bursera simaruba*.



Fuente: Ecomercado el Kakawatal. Samayac, Suchitepéquez.

Fotografía 2. Recolección y secado de la corteza y hojas de *Byrsonima crassifolia*.



Fuente: San Bernardino, Suchitepéquez.

La Fotografía 3 demuestra cómo se realizó la extracción con percolador (cada órgano seco se sometió a tres extracciones con cada uno de los cuatro solventes empleados con un gradiente de polaridad creciente- hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol-) y la concentración por rotavapor.

Fotografía 3. Proceso de extracción por percolador y rotavapor



NOTA: Estas imágenes corresponden a la extracción con hexano de la hoja de *Bursera simaruba* y su posterior rotavaporación.

Fuente: Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT), USAC.

En la Fotografía 4 se muestra el montaje del ensayo de tamizaje de citotoxicidad general realizado con nauplios de *Artemia salina*. Se observa una pecera que contiene quistes (en el lado cubierto de la luz) iluminada con luz artificial para que cuando eclosionen los quistes, los nauplios naden al lado con luz y se facilite su pesca.

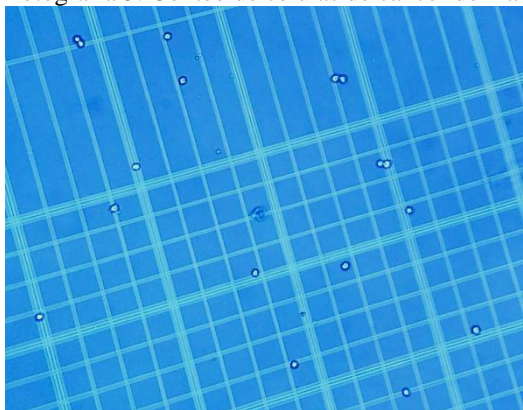
Fotografía 4. Cultivo de nauplios de *Artemia salina* para tamizaje de citotoxicidad general



Fuente: Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT), USAC.

Para la evaluación de la citotoxicidad en células de cáncer de mama (MCF-7), inicialmente se determinó la viabilidad celular con un conteo celular en la cámara de Neubauer con un azul de tripan, tal como muestra la Fotografía 5.

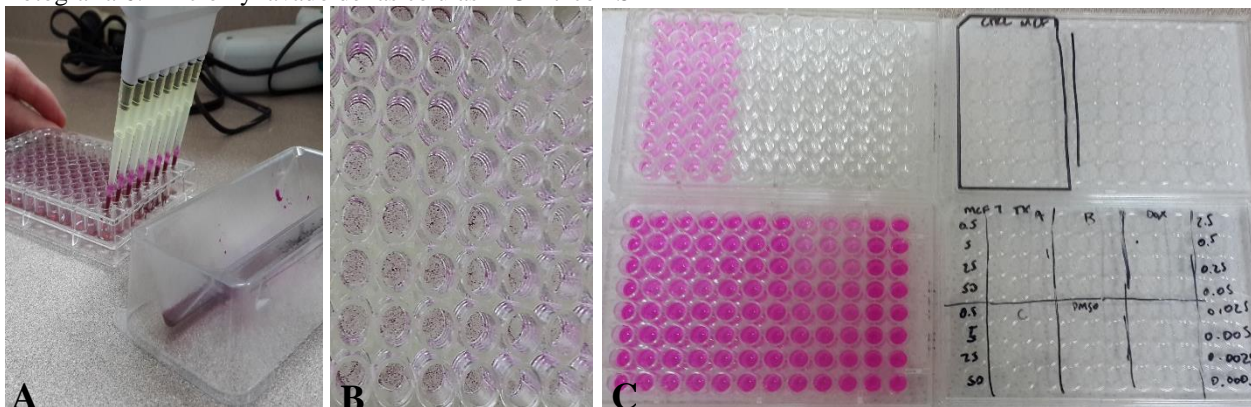
Fotografía 5. Conteo de células de cáncer de mama (MCF-7) en cámara de Neubauer.



NOTA: al centro se observa una célula muerta (toda teñida) acompañada de varias vivas (contorno teñido).
Fuente: Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

En la Fotografía 6 se muestra la tinción de las células MCF-7 por el método de sulforodamina B (SRB). El colorante no adherido se lavó mientras que el fijado fue solubilizado para determinar la densidad óptica de cada pozo y así se calculó la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los extractos.

Fotografía 6. Tinción y lavado de las células MCF-7 con SRB



A. Tinción de las células de cáncer de mama (MCF-7) con sulforodamina B (SRB).

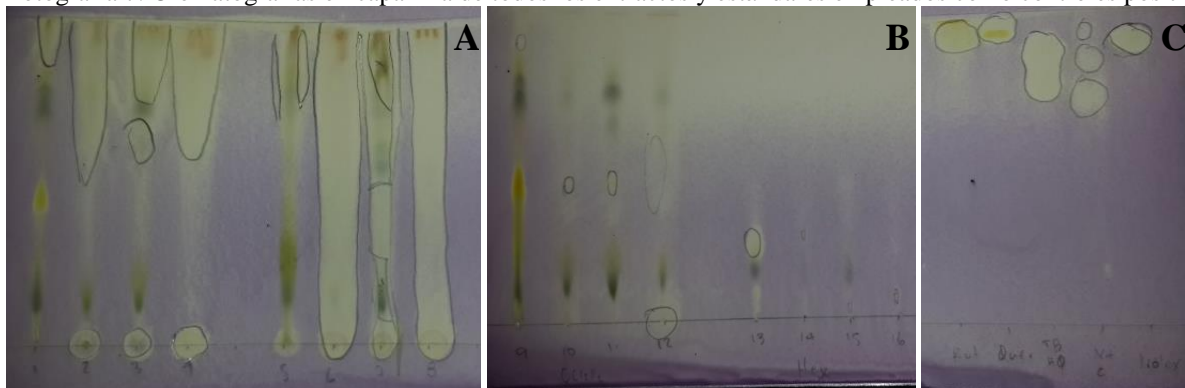
B. Células con colorante fijado, luego de lavar el no adherido.

C. Solubilización del colorante fijado para determinar su densidad óptica. Se distribuyeron las muestras tal como se rotuló en la tapa., siendo la placa superior el control del crecimiento basal (células sin tratamiento a las 24h) y la placa inferior la que contenía el tratamiento y los controles. Tx A: hojas *B. simaruba* con acetato de etilo; B: hojas *B. simaruba* con butanol; C: hojas *B. crassifolia* con butanol; DMSO: dimetilsulfóxido dox: clorhidrato de doxorubicina. Los números que se indican corresponden a la concentración evaluada por triplicado en cada fila ($\mu\text{g/mL}$).

Fuente: Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

En la Fotografía 7 se observan los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la capacidad antioxidante, por cromatografía en capa fina (CCF).

Fotografía 7. Cromatografías en capa fina de todos los extractos y estándares empleados como controles positivos.



NOTA: De izquierda a derecha:

A. *Bursera simaruba*: Hoja 1: hexano, 2: diclorometano, acetato de etilo, 4: butanol; Corteza 5: hexano, 6: diclorometano, 7: acetato de etilo 8: butanol.

B. *Byrsonima craassifolia*: Hoja: 9. hexano, 10. Diclorometano, 11. Acetato de etilo, 12. Butanol; Corteza: 13: hexano, 14: diclorometano, 15: acetato de etilo, 16: butanol.

C. Estándares: rutina, quercetina, terbutil hidroxiquinona, vitamina C y trolox.

Fuente: Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT), USAC.

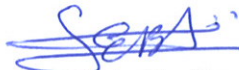
La Fotografía 8 ejemplifica la evaluación cuantitativa de la capacidad antioxidante por el método micrométrico de DPPH. La placa de ELISA se leyó posteriormente a 490 nm para realizar la gráfica respectiva, obtener la ecuación de la recta y determinar la concentración inhibitoria media (IC_{50}).

Fotografía 8. Evaluación de la capacidad antioxidante de la corteza de *Bursera simaruba* por el método micrométrico de DPPH



DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo. De izquierda a derecha, partiendo de la parte inferior, se evaluaron los extractos con hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol, en las siguientes concentraciones: 4,8,12,16 y 20 mg/mL.

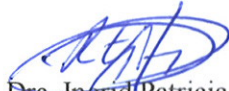
Fuente: Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT), USAC.



Sara Ester Barillas Aragón
Autora



Harlem Boterlán de León Natareno
Autor



Dra. Ingrid Patricia Saravia Otten
Asesora



M.Sc. Rosario Damaris Hernández Hernández
Asesora



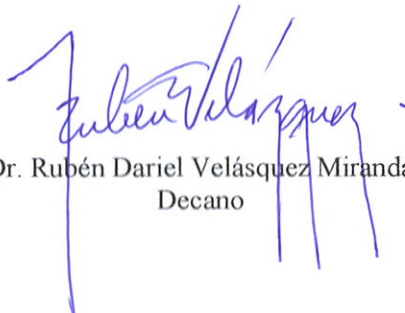
Dra. Edna Carolina Arévalo Valdez
Co-Asesora



M.A. Ana Margarita Paz de Ramírez
Revisora



M.Sc. Alba Marina Valdés de García
Directora de Escuela



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano