

Evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica de los extractos de *Malachra alceifolia* Jacq, *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn sobre la línea celular de osteosarcoma canino OSCA-8.

Erika Johana Lozano
Karen Alejandra Reyes

Para optar al título de:
Bacteriologa y laboratorista clinico

Asesores:
Orlando Alfredo Torres, PhD
Ana Luisa Muñoz, PhD



Contenido

- Introducción
- Objetivos
- Metodología
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

Introducción

Cáncer

Mutaciones genéticas

Resistencia a la muerte celular

Evasión de supresores tumoral

Crecimiento incontrolado de células

Habilidad para invadir y dañar tejido

OMS

2015:
8.8 millones de defunciones

Osteosarcoma



Figura 1. Partes del hueso donde se desarrolla el osteosarcoma. Fuente: <https://cancersintomas.com/cancer-de-huesos-oseo>

1% de todos los cánceres

5% de cánceres en la edad pediátrica y adolescencia

Metástasis
90%

QT: cisplatino, la doxorubicina y el metotrexato

RT

Cirugia

Plantas en estudio

Malachra alceifolia Jacq: **MA**



Figura 2. Magnoliopsida | Flora de Costa Rica. Fuente: <http://floracostaricensis.myspecies.info/magnoliopsida/malachra-alceifolia>

Familia: Malvaceae

Aspectos medicinales:
Infecciones del tracto respiratorio

Fitoquímicos: Sin determinar

Cordia dentata Poir: **CD**



Figura 3. Cordia dentata | TRAMIL. Fuente: <http://www.tramil.net/es/plant/cordia-dentata>

Familia: Boraginaceae

Aspectos medicinales:
Actividad antibacterial,
antiinflamatoria y antioxidante

Fitoquímicos: Alcaloides,
cumarinas, triterpenos, quinonas,
flavonoides.

Heliotropium indicum Linn: **HI**



Figura 4. Heliotropium indicum. PlantFiles: Heliotropium Species, Bright Eye, Indian Heliotrope, Scorpion Bush. Fuente: PlantFiles: Heliotropium Species, Bright Eye, Indian Heliotrope, Scorpion Bush

Familia: Boraginaceae

Aspectos medicinales:
Curar heridas, inflamación, úlceras
cutáneas y conjuntivitis.

Fitoquímicos: Flavonoides,
quinonas, terpenoides.

Antecedentes

La actividad antiproliferativa de los extractos de *Sida rhombifolia* fue evaluada sobre las líneas celulares de hepatocarcinoma y cáncer de estómago.

Mah SH y colaboradores.

El efecto citotóxico *in vitro* de *Heliotropium indicum* Linn sobre líneas celulares de carcinoma de cérvix, y líneas celulares de cáncer de pulmón.

Subhabrata y cols. Chunthorng-Orn y cols.

Los extractos de *Cordia verbenacea* mostraron actividad anticancerígena sobre línea celular de adenocarcinoma y en ratones con EAC.

Parisotto y colaboradores

Objetivos

Objetivo general

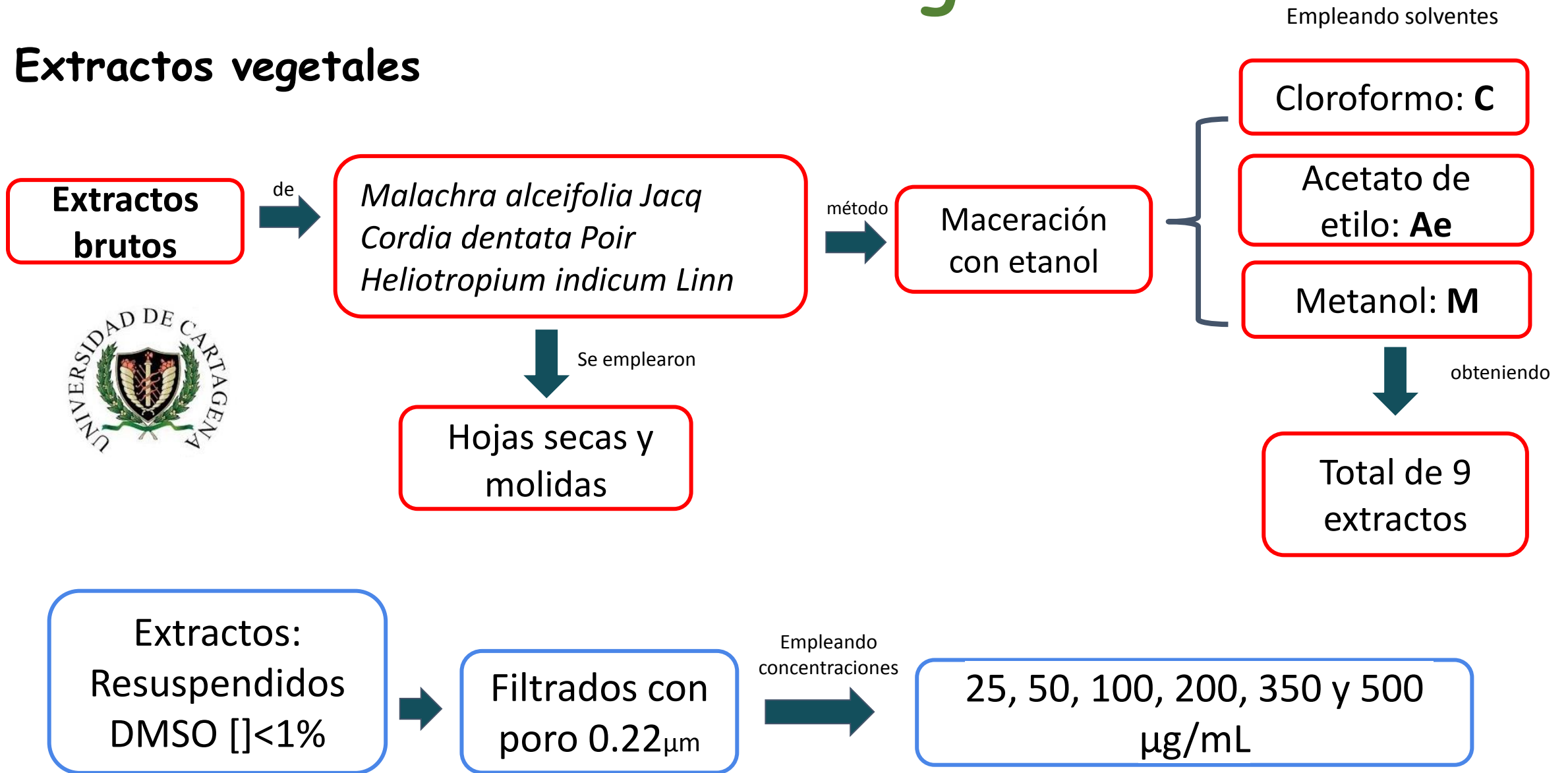
- ✓ Evaluar el efecto citotóxico de los extractos obtenidos de las especies vegetales *Malachra alceifolia Jacq*, *Cordia dentata Poir* y *Heliotropium indicum Linn* sobre la línea celular de osteosarcoma canino OSCA-8.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar la tasa de proliferación de las líneas celulares OSCA-8 (Osteosarcoma canino) y MDCK (fibroblastos renales de canino).
- ✓ Determinar el porcentaje de inhibición en las líneas celulares OSCA-8 y MDCK expuestas a los extractos de *Malachra alceifolia Jacq*, *Cordia dentata Poir* y *Heliotropium indicum Linn* por medio del ensayo MTT.
- ✓ Determinar la IC50 de cada extracto vegetal sobre las líneas celulares OSCA-8 y MDCK.
- ✓ Evaluar el efecto genotóxico de los extractos vegetales seleccionados sobre las líneas celulares OSCA-8 y MDCK por medio del ensayo de cometa.

Metodología

Extractos vegetales



Cultivo celular

Líneas celulares

OSCA-8

Kerafast Inc.®

MDCK

ATCC CCL-34®

Condiciones de cultivo

DMEM
SFB 5%
L-glutamina 1%
Pen/Estr 1%
37°C y 5% CO₂

Se realizó

Stock celular

Se conservó

Congelación
SFB 80%
DMSO 20%

Para realizar

Ensayo de MTT

Ensayo de Proliferación celular

Se realizó en

Placas de 96 pocillos

empleando

Cell Proliferation Kit I. MTT (Roche)

Ensayo de citotoxicidad

Tto con extractos

usando

Controles:
Doxorrubicina (C+)
DMSO (Diluyente)
Células con DMEM (C-)

Ensayo de cometa

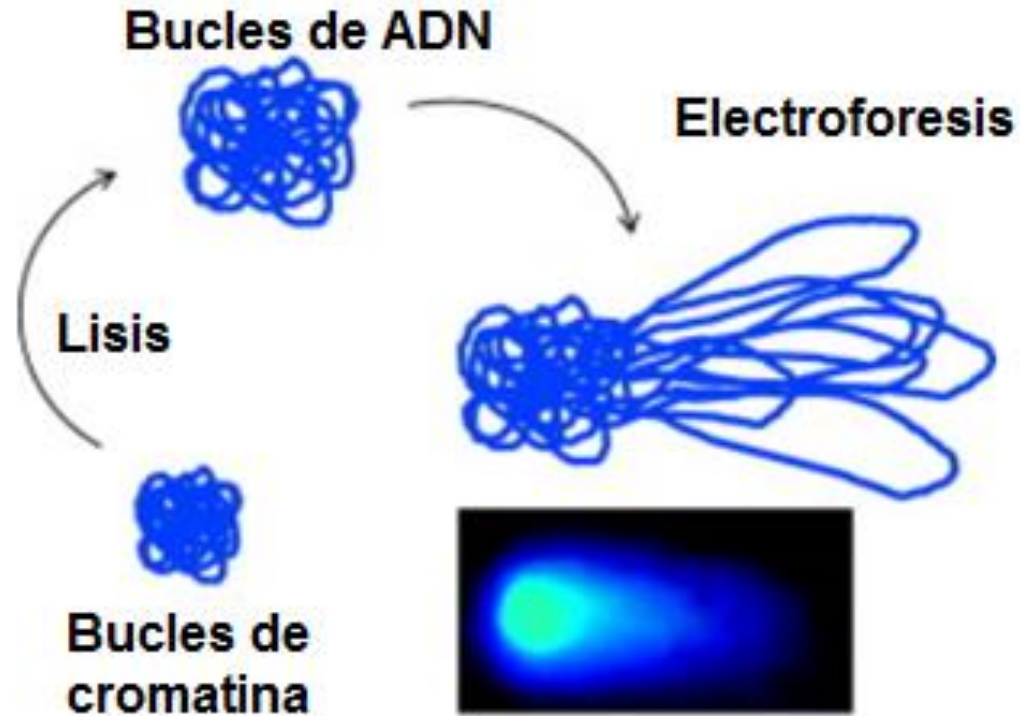


Figura 5. Principio del ensayo de cometa. Las células se embeben en agarosa en la superficie de un portaobjetos, se lisan y se someten a electroforesis para obtener cometas.

Se realizó

Preparación
de agarosa
con células
 1×10^5



Se efectuó

Lisis
celular



Se realizó

Electroforesis

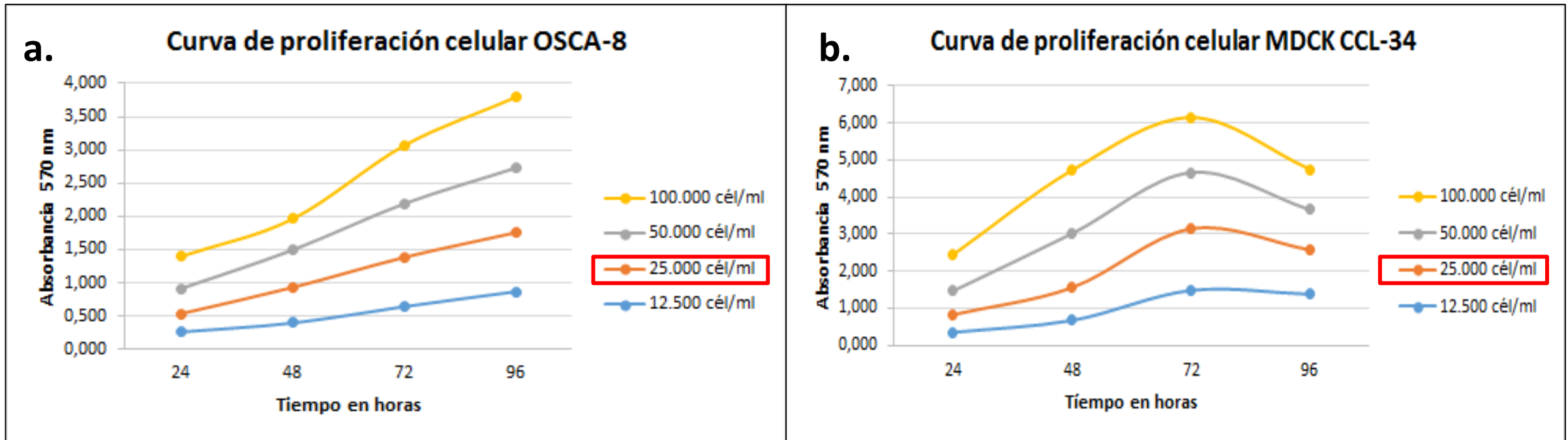


Se realizó tinción

Bromuro de
etidio

Resultados y discusión

Tasa de proliferación celular



Daucus carota 1000 células/mL MCF-7.
Noha Khalil y colaboradores (2018)

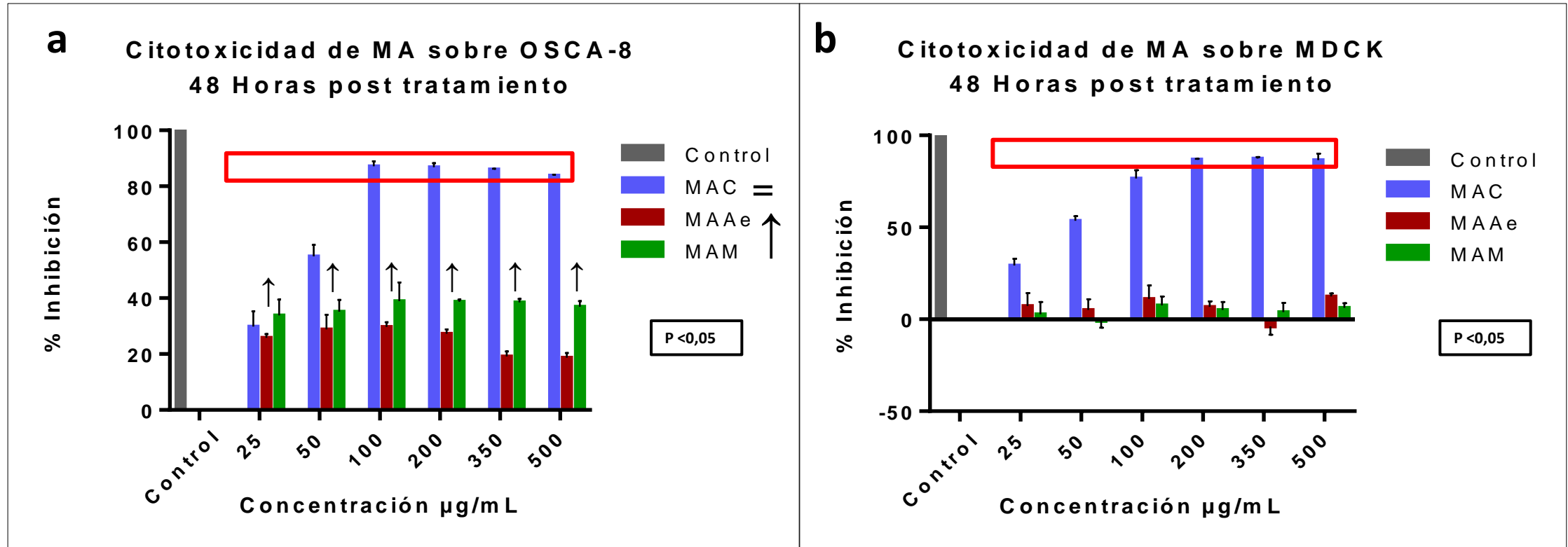
Centella asiática, *Warburgia salutaris*, *Curtisia dentata* 230.000 células/pozo. Caco2, MCF-7, HeLa, HEK293.

Sewanu y colaboradores (2018)

Figura 6. Ensayo de proliferación celular empleando el método MTT **a.** Curva de proliferación OSCA-8. **b.** Curva de proliferación MDCK CCL-34.

Evaluación de la actividad citotóxica

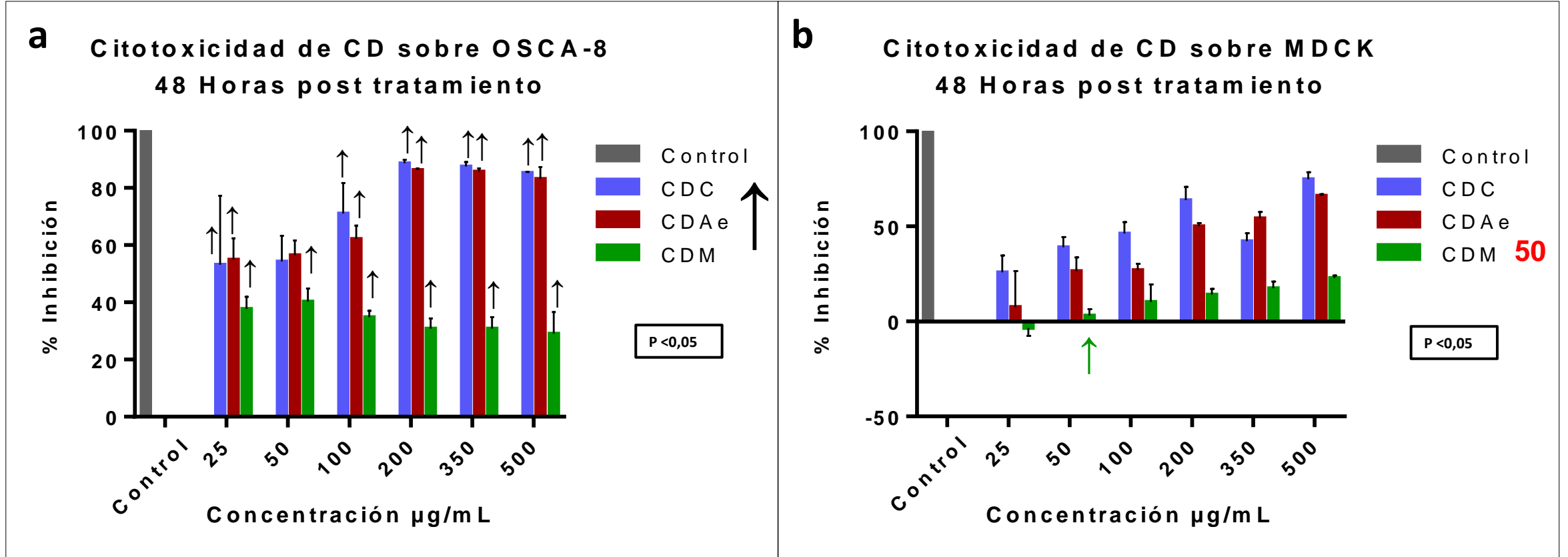
$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs control negativo} - \text{Abs del tratamiento}}{\text{Abs control negativo}} \times 100$$



Sida rhombifolia, SNU-1 y Hep2 con extracto hexano. Triterpenos.

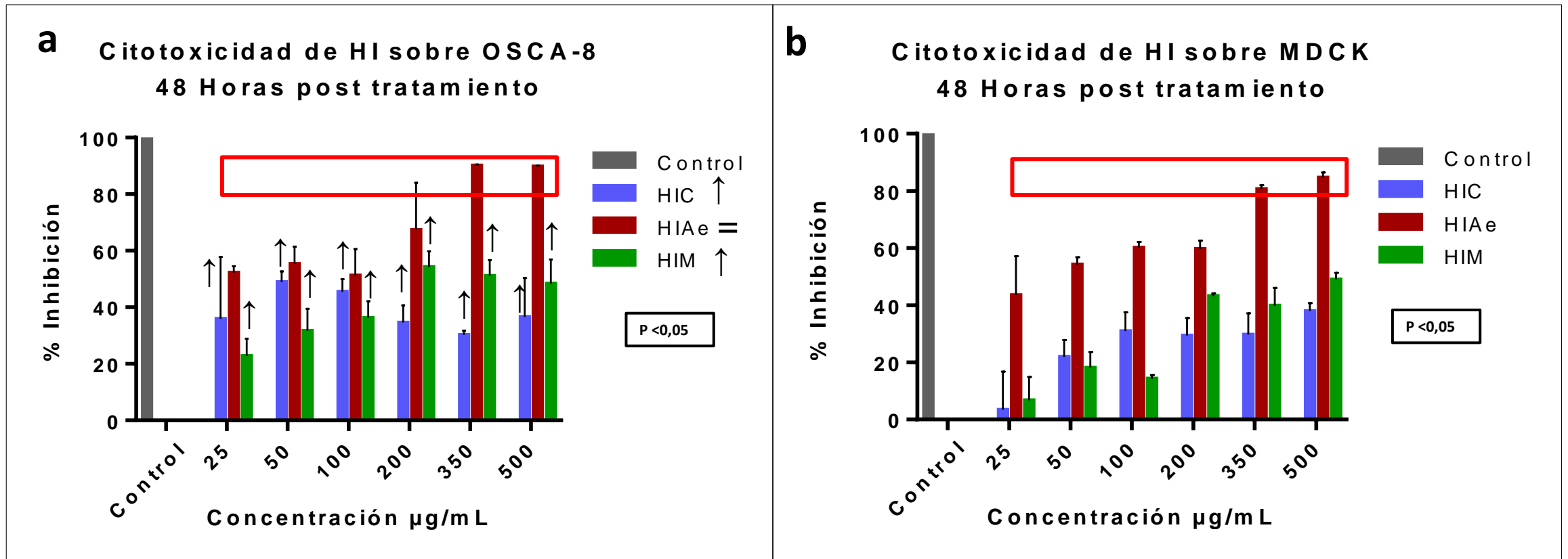
Mah SH y colaboradores (2017)

Figura 7. Evaluación de la actividad citotóxica de *Malachra alceifolia* Jacq (MA), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT. **a.** Citotoxicidad de los extractos de MA sobre OSCA-8 **b.** Citotoxicidad de los extractos de MA sobre MDCK **MAC:** *Malachra alceifolia* Jacq cloroformo **MA Ae:** *Malachra alceifolia* Jacq Acetato de etilo **MAM:** *Malachra alceifolia* Jacq Metanol. **Control:** Control positivo Doxorrubicina a una concentración 16 µM.



Cordia dichotoma, semillas, HeLa y A549 con extracto Ae. Usmani y colaboradores (2017)

Figura 8. Evaluación de la actividad citotóxica de *Cordia dentata* Poir (CD), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT. **a.** Citotoxicidad de los extractos de CD sobre OSCA-8 **b.** Citotoxicidad de los extractos de CD sobre MDCK **CDC:** *Cordia dentata* Poir cloroformo **CDAe:** *Cordia dentata* Poir Acetato de etilo **CDM:** *Cordia dentata* Poir Metanol. **Control:** Control positivo Doxorrubicina a una concentración 16 µM.



HI, Extracto M (tallo y hojas) HeLa, 48 H, Extracto mas efectivo con 54,26% vs 49,67% a 200µg/mL
Sivajothi y colaboradores (2015)

Figura 9. Evaluación de la actividad citotóxica de *Heliotropium indicum* Linn (HI), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT. **a.** Citotoxicidad de los extractos de HI sobre OSCA-8 **b.** Citotoxicidad de los extractos de HI sobre MDCK **HIC:** *Heliotropium indicum* Linn cloroformo **HIAe:** *Heliotropium indicum* Linn Acetato de etilo **HIM:** *Heliotropium indicum* Linn Metanol. **Control:** Control positivo Doxorrubicina a una concentración 16 µM.

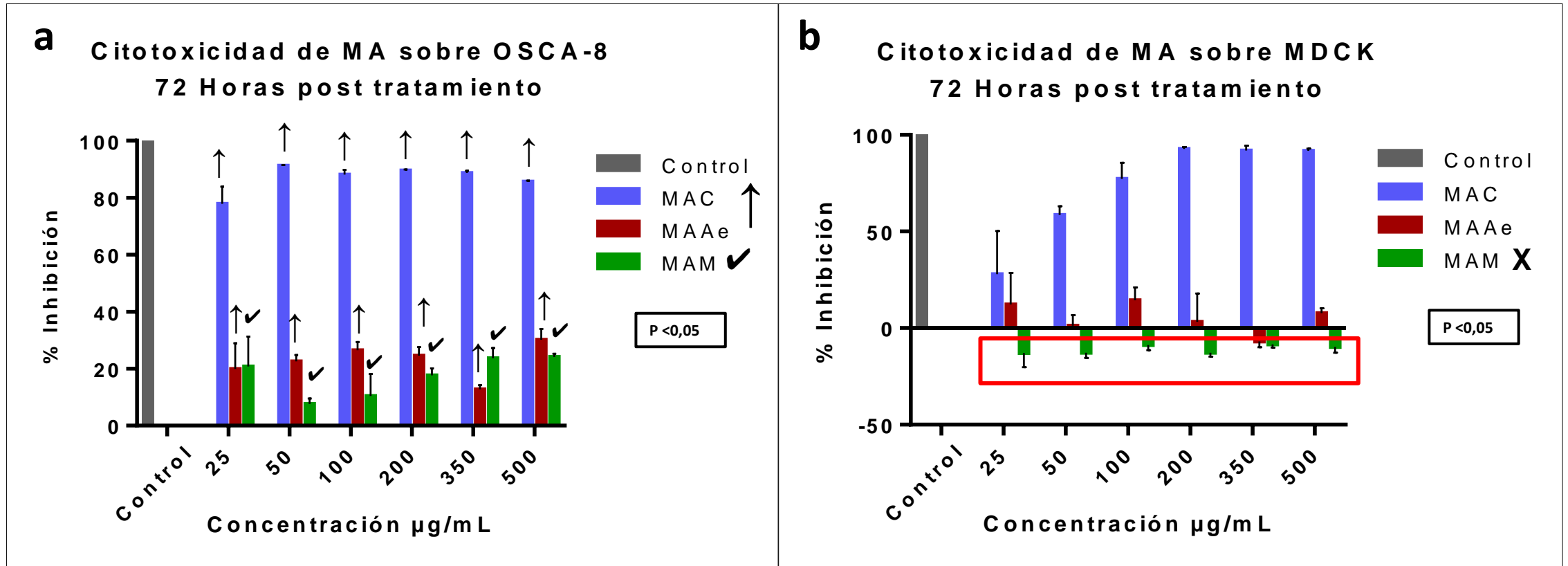


Figura 10. Evaluación de la actividad citotóxica de *Malachra alceifolia* Jacq (MA), 72 horas post tratamiento empleando el método MTT. **a.** Citotoxicidad de los extractos de MA sobre OSCA-8 **b.** Citotoxicidad de los extractos de MA sobre MDCK **MAC:** *Malachra alceifolia* Jacq cloroformo **MA Ae:** *Malachra alceifolia* Jacq Acetato de etilo **MAM:** *Malachra alceifolia* Jacq Metanol. **Control:** Control positivo Doxorrubicina a una concentración 16 μM .

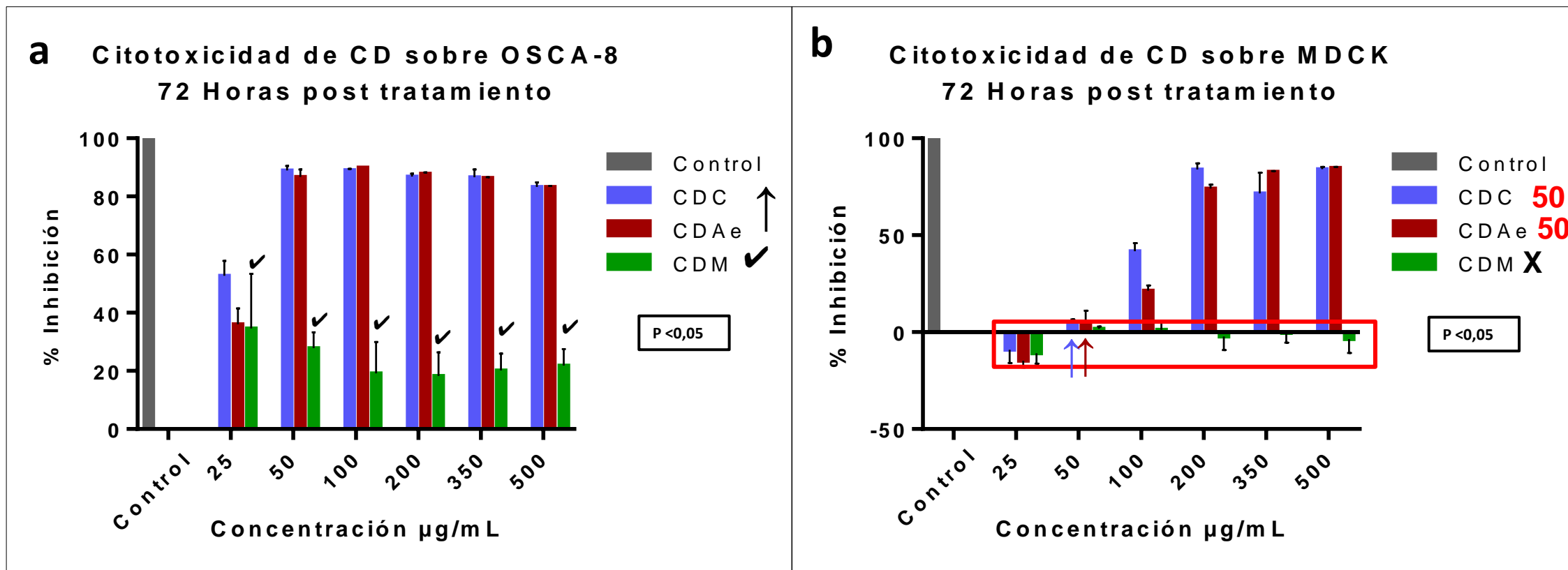
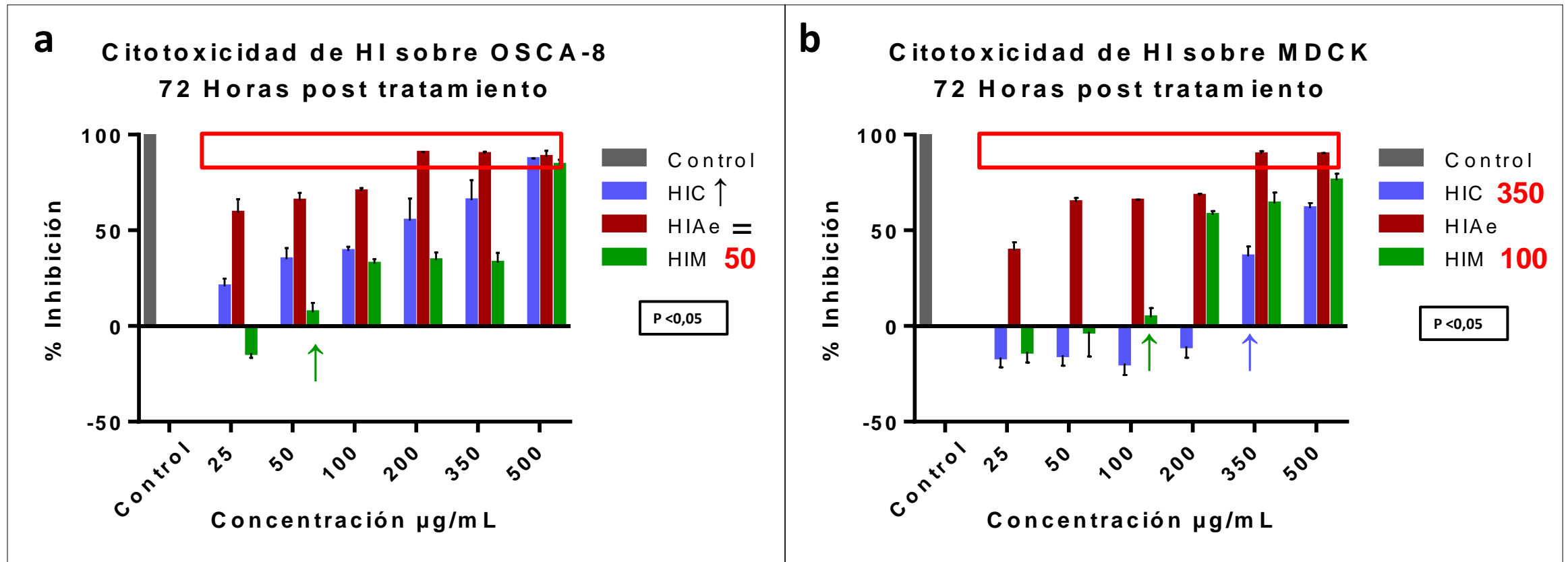


Figura 11. Evaluación de la actividad citotóxica de *Cordia dentata* Poir (CD), 72 horas post tratamiento empleando el método MTT. **a.** Citotoxicidad de los extractos de CD sobre OSCA-8 **b.** Citotoxicidad de los extractos de CD sobre MDCK **CDC:** *Cordia dentata* Poir cloroformo **CDAe:** *Cordia dentata* Poir Acetato de etilo **CDM:** *Cordia dentata* Poir Metanol. **Control:** Control positivo Doxorubicina a una concentración 16 μM .



Actividad citotóxica de *Heliotropium indicum* Linn en células A549 y NCI-H226.

Chunthorng-Orn J y colaboradores (2016)

Figura 12. Evaluación de la actividad citotóxica de *Heliotropium indicum* Linn (HI), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT. **a.** Citotoxicidad de los extractos de HI sobre OSCA-8 **b.** Citotoxicidad de los extractos de HI sobre MDCK **HIC:** *Heliotropium indicum* Linn cloroformo **HIAe:** *Heliotropium indicum* Linn Acetato de etilo **HIM:** *Heliotropium indicum* Linn Metanol. **Control:** Control positivo Doxorubicina a una concentración 16 µM.

Cálculo de la concentración Inhibitoria 50 - IC50

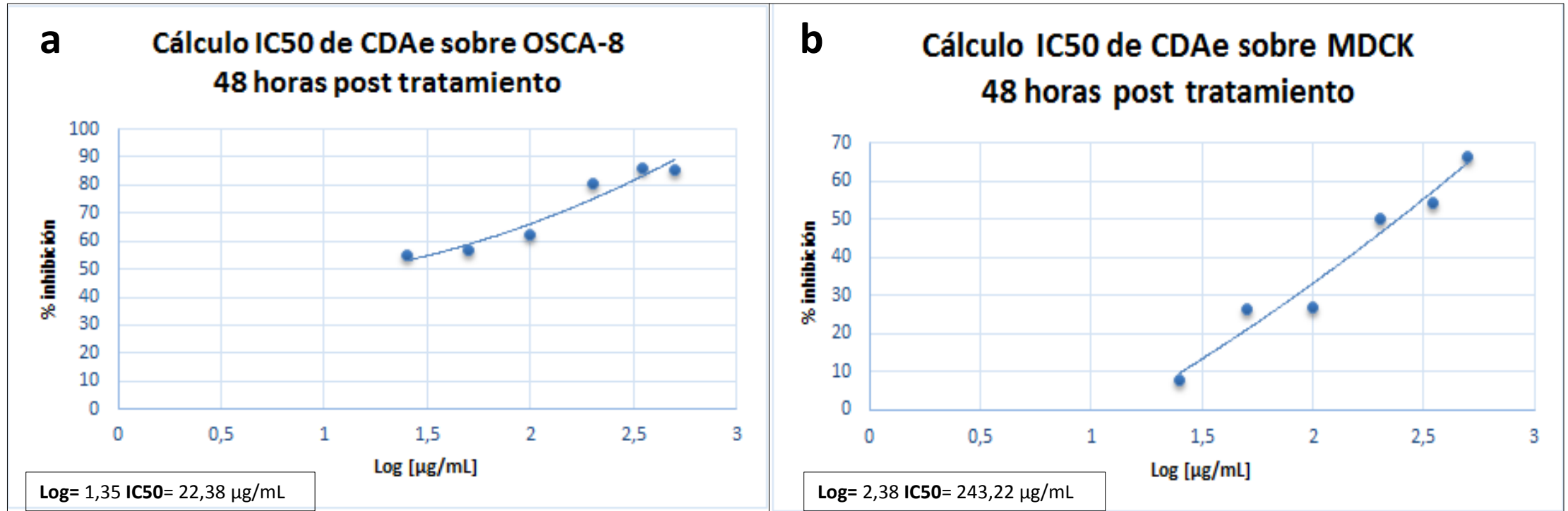


Figura 13. Cálculo de la IC₅₀ para CDAe a las 48 horas post tratamiento. a. Cálculo IC50 para CDAe sobre OSCA- 8. b. Cálculo IC50 para CDAe sobre MDCK.

Concentración Inhibitoria 50 - IC50

Dosis IC ₅₀ (µg/mL) 48 Horas post tratamiento									
	MAC	MAAe	MAM	CDM	CDC	CDAe	HIC	HIAe	HIM
OSCA-8	44,31 ± 4.14	-	300,6 ± 1.65	-	9,44 ± 24.17	22,38 ± 7.46	-	38,9 ± 4.35	173,38 ± 7.54
MDCK	42,16 ± 2.47	-	-	-	103,03 ± 6.03	243,22 ± 2.99	-	40,84 ± 3.88	524,82 ± 10.11

Dosis IC ₅₀ (µg/mL) 72 Horas post tratamiento									
	MAC	MAAe	MAM	CDM	CDC	CDAe	HIC	HIAe	HIM
OSCA-8	4,22 ± 2.23	-	-	-	17,94 ± 5.18	29,24 ± 7.46	158,56 ± 5.83	15,85 ± 2.18	222,08 ± 6.59
MDCK	41,31 ± 3.32	-	-	-	112,49 ± 4.22	158,12 ± 2.67	424,62 ± 5.85	35,81 ± 3.90	247,68 ± 3.57

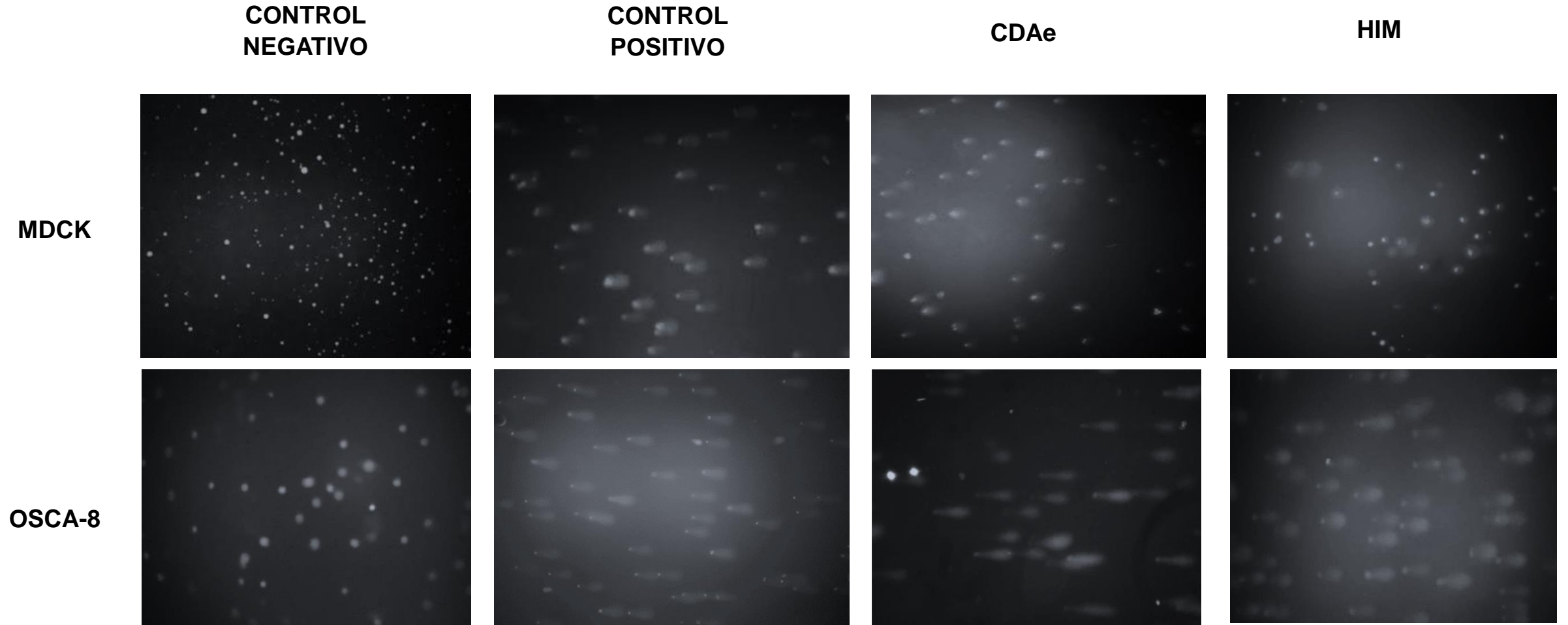
Extracto ideal:
IC50 <100µg/mL

Chunthorng-Orn J y cols.
(2016)

Subhabrata y cols. (2015)

Tabla 1. Citotoxicidad en términos de dosis IC₅₀ para cada extracto empleado a 48 y 72 horas de tratamiento sobre las líneas celulares OSCA- 8 y CCL-34.

Evaluación del efecto genotóxico



HI, daño DNA en SiHa, C33A, HeLa.
Subhabrata y colaboradores (2015)

Metabolitos secundarios: flavonoides,
terpenoides

Figura 14. Ensayo de cometa a las 48 horas post tratamiento en las dos líneas celulares OSCA-8 y MDCK.
Control negativo: células sin tratamiento. **Control positivo:** Doxorubicina IC_{50} 0,5 μ M. **CDAe:** *Cordia dentata* Poir Acetato de etilo IC_{50} 22.38 μ g/ml. **HIM:** *Heliotropium indicum* Linn Metanol IC_{50} 173,38 μ g/ml.
Zeiss Scope.A1, 10X.

Limitaciones

Concentraciones
de los extractos
empleadas

El extracto CDC
no se logro
manipular

Determinación
cuantitativa de
la genotoxicidad

Conclusiones

- La concentración óptima a cultivar de las líneas celulares OSCA-8 y MDCK según la curva de proliferación celular correspondió a 25.000 células/mL para las dos líneas celulares.
- Los extractos vegetales presentaron actividad citotóxica dosis dependiente exhibiendo un mejor comportamiento los extractos *Cordia dentata* Poir en solvente Acetato de etilo (CDAe) y *Heliotropium indicum* Linn en solvente Metanol (HIM).
- Los solventes empleados no tienen el mismo comportamiento en las tres especies vegetales estudiadas.
- Los porcentajes de inhibición varían entre líneas celulares; el efecto citotóxico se evidencia más en las células cancerosas que en las células normales.

Conclusiones

- La concentración inhibitoria 50 - IC_{50} se calculó para cada extracto a las 48 y 72 horas post tratamiento. La concentración de extractos vegetales requerida para inhibir el crecimiento de las células control fue mucho mayor en comparación a la requerida para inhibir las células cancerígenas.
- El ensayo de genotoxicidad sugiere que tanto CDAe como HIM ejercen marcado efecto genotóxico sobre la línea celular OSCA-8 y de mayor proporción en comparación con el efecto genotóxico causado en la línea celular control MDCK.

Recomendaciones

- Obtener extractos de diferentes partes de las plantas a estudiar.
- Realizar la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos vegetales estudiados en distintos tipos de líneas celulares .
- Realizar la caracterización fitoquímica de las especies vegetales estudiadas.
- Emplear técnicas que puedan evaluar la actividad antitumoral de los extractos vegetales: inducción de la muerte celular por daño en el material genético, por inhibición de proteínas y promotores tumorales, por vías de señalización tales como el ensayo de LDH, marcaje con Yoduro de propidio, marcaje fluorescente de Hoechst, detección de apoptosis de anexina V, entre otros.

Referencias

OMS. (2018). Cáncer. 06 Sep 2018, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer>

Dash, G; Abdullah, M. (2013). A REVIEW ON HELIOTROPIUM INDICUM L. (BORAGINACEAE). International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research, 4(4), 1253.

López, P., Álvarez, S., & González, J. L. (2011). Actualización del osteosarcoma para el médico de familia. SEMERGEN - Medicina de Familia, 37(1), 22–29.

Matias, E. F. F., Alves, E. F., do Nascimento Silva, M. K., de Alencar Carvalho, V. R., Coutinho, H. D. M., & da Costa, J. G. M. (2015). The genus Cordia: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. Revista Brasileira de Farmacognosia, 25(5), 542–552.

Paoloni, M., Davis, S., Lana, S., Withrow, S., Sangiorgi, L., Picci, P., ... Khanna, C. (2013). Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression. BMC Genomics, 10(1), 625.

Referencias

- Chunthorng-Orn J, Dechayont B, Phuaklee P, Prajuabjinda O, Juckmeta T, Itharat A. Cytotoxic, Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of Heliotropium indicum Extracts. J Med Assoc Thai [Internet]. 2016 Jul [cited 2018 Sep 15];99 Suppl 4:S102-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29919994>
- Subhabrata P, Shuvechha C, Mukherjee A, Kundu R. Evaluation of cytotoxicity and DNA damaging activity of three plant extracts on cervical cancer cell lines. Int J Pharm Sci Rev Res. 2015;31(1):183–9.
- Mah SH, Teh SS, Ee GCL. Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of Sida Rhombifolia. Pharm Biol. 2017;55(1):920–8.
- Gómez-Estrada H, Díaz-Castillo F, Franco-Ospina L, Mercado-Camargo J, Guzmán-Ledezma J, Medina JD, et al. Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. J Ethnobiol Ethnomed [Internet]. 2011 Sep 22 [cited 2018 Sep 15];7:27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21939522>

SEGUNDO ENCUENTRO INTERNACIONAL DE
**INVESTIGACION
UNIVERSITARIA**



LA UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS - SECCIONAL TUNJA
Y LA UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

CERTIFICAN QUE

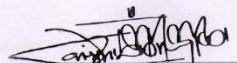
**ERIKA JOHANA
LOZANO AGUILAR**

Participaron en calidad de **PONENTE** con el proyecto titulado

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE
MALACHRA ALCEIFOLIA, CORDIA DENTATA POIR Y HELIOTROPIMUM INDICUM LINN
SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE OSTEOSARCOMA CANINO OSCA-8.**

En el Segundo Encuentro Internacional de Investigación Universitaria
realizado los días 5, 6 y 7 de septiembre de 2018.

Dado en Tunja, a los siete (7) días del mes de septiembre de 2018.


FRAY JAVIER ANIBAL MORENO MOJICA O.P.
Vicerrector Académico
Universidad Santo Tomás - Seccional Tunja


DR. ENRIQUE VERA LÓPEZ
Vicerrector de Investigación y Extensión
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia



SEGUNDO ENCUENTRO INTERNACIONAL DE
**INVESTIGACION
UNIVERSITARIA**



LA UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS - SECCIONAL TUNJA
Y LA UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

CERTIFICAN QUE

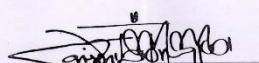
**KAREN ALEJANDRA
REYES ÁLVAREZ**

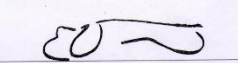
Participaron en calidad de **PONENTE** con el proyecto titulado

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE
MALACHRA ALCEIFOLIA, CORDIA DENTATA POIR Y HELIOTROPIMUM INDICUM LINN
SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE OSTEOSARCOMA CANINO OSCA-8.**

En el Segundo Encuentro Internacional de Investigación Universitaria
realizado los días 5, 6 y 7 de septiembre de 2018.

Dado en Tunja, a los siete (7) días del mes de septiembre de 2018.


FRAY JAVIER ANIBAL MORENO MOJICA O.P.
Vicerrector Académico
Universidad Santo Tomás - Seccional Tunja


DR. ENRIQUE VERA LÓPEZ
Vicerrector de Investigación y Extensión
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia



UAN
UNIVERSIDAD
ANTONIO NARIÑO

Una Universidad con Presencia
Nacional y Vocación Regional

Bogotá, Marzo 29 de 2019.

Dra
ANA LUISA MUÑOZ RAMIREZ

Asunto: Aceptación artículo de divulgación revista génesis

deseo comunicarle gratamente la aceptación para su publicación en la sección de divulgación científica de la revista Génesis de su manuscrito titulado: "**Prometedor hallazgo de tres plantas con actividad anticancerígena**" con los siguientes autores: Karen Alejandra Reyes Álvarez, Erika Johana Lozano Aguilar, Harold Gómez Estrada, Nelitza Linárez Alvarez, Orlando Alfredo Torres García y Ana Luisa Muñoz Ramirez.

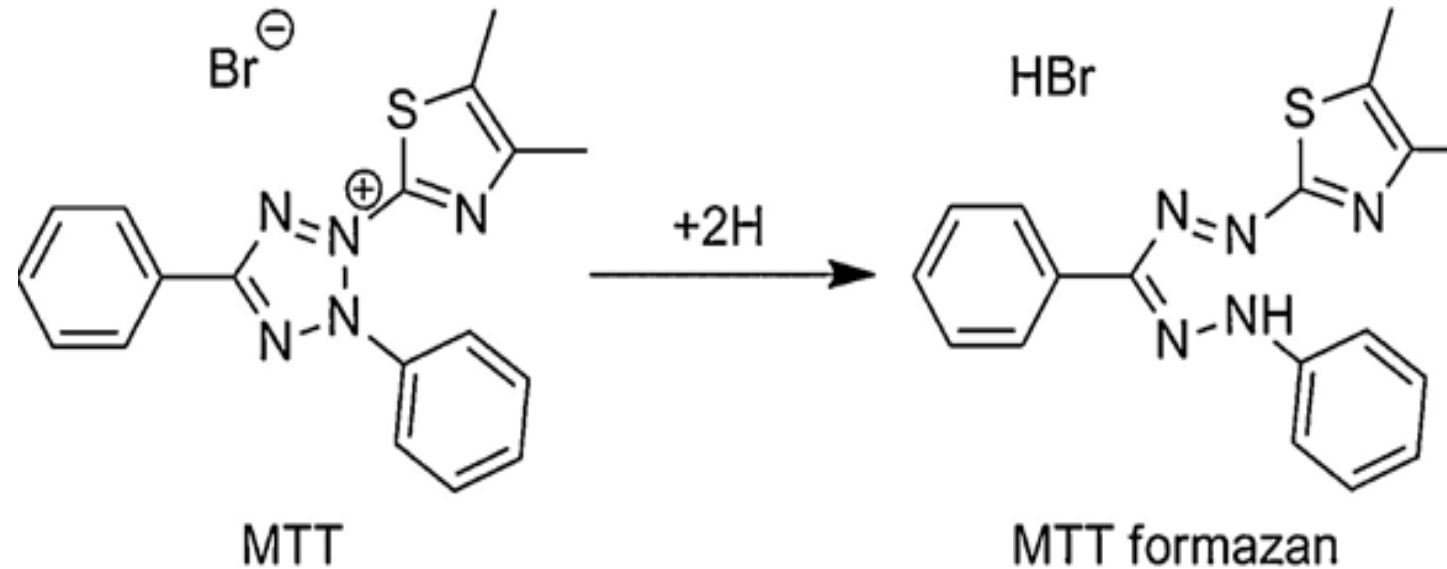
Agradezco la atención prestada.

Atentamente,



MONICA LOSADA BARRAGÁN
Editora en Jefe - Revista Génesis
Facultad de Ciencias
Universidad Antonio Nariño

Cálculo de la concentración Inhibitoria 50 - IC50



Estructura del MTT y su producto coloreado el formazán