

## **DEDICATORIA**

A Dios, por permitirnos culminar esta importante etapa de nuestra vida.

A nuestras familias y amigos por su constante apoyo y compañía a lo largo de toda nuestra carrera universitaria.

A nuestros asesores por permitirnos incursionar en el fascinante mundo de la investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a todos los que de alguna forma contribuyeron a la ejecución de este proyecto.

A nuestros asesores por las enseñanzas y el apoyo incondicional durante el desarrollo del proyecto, la Dra. Ana Luisa Muñoz Ramírez del grupo de investigación Biología celular y funcional e ingeniería de biomoléculas de la Universidad Antonio Nariño y el Dr. Orlando Alfredo Torres García del grupo de investigación Bienestar salud y producción animal-Quirón de la Universidad Antonio Nariño.

Al Dr. Harold Gómez Estrada del grupo de investigación en Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena por la donación de los extractos, a la Dra. Nelitza Linárez Álvarez por incentivar y generar el trabajo en equipo entre instituciones, al Dr. Jaime Fabián Cruz que contribuyó con su conocimiento.

A David Gutiérrez Estudiante de Doctorado de Ciencias de la Salud de la Universidad Antonio Nariño por su amistad y aporte de su conocimiento, y a Taylor Díaz Biólogo de la Universidad Militar Nueva Granada.

A la Universidad Antonio Nariño por la prestación de sus instalaciones y laboratorios, por la financiación para el desarrollo del proyecto.

Agradecemos a nuestras Familias por el amor y el apoyo incondicional.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
1. OBJETIVOS .....	13
1.1. OBJETIVO GENERAL .....	13
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
2. ANTECEDENTES .....	14
3. MARCO TEÓRICO.....	19
3.1. LAS PLANTAS COMO FUENTES NATURALES DE PRINCIPIOS ACTIVOS .....	19
3.2. CONCEPTOS GENERALES DEL GÉNERO <i>MALACHRA</i> .....	19
3.2.1. Clasificación, descripción y distribución geográfica de <i>Malachra alceifolia</i> <i>Jacq.</i> .....	19
3.2.2. Fitoquímica de <i>Malachra alceifolia Jacq.</i> .....	21
3.2.3. Aplicaciones clínicas de <i>Malachra alceifolia Jacq.</i> .....	21
3.3. CONCEPTOS GENERALES DEL GÉNERO <i>CORDIA</i> .....	21
3.3.1. Clasificación, descripción y distribución geográfica de <i>Cordia dentata Poir.</i> 21	
3.3.2. Fitoquímica de <i>Cordia dentata Poir</i> .....	23
3.3.3. Aplicaciones clínicas de <i>Cordia dentata Poir</i> .....	23
3.4. CONCEPTOS GENERALES DEL GÉNERO <i>HELIOTROPIUM</i> .....	23
3.4.1. Clasificación, descripción y distribución geográfica de <i>Heliotropium</i> <i>indicum Linn.</i> .....	23
3.4.2. Fitoquímica de <i>Heliotropium indicum Linn</i> .....	25
3.4.3. Aplicaciones clínicas de <i>Heliotropium indicum Linn</i> .....	25
3.5. EL CÁNCER, UNA DE LAS PRINCIPALES CAUSAS DE MUERTE EN EL MUNDO .....	25
3.5.1. Ciclo celular y origen del cáncer .....	26
3.5.1.1. Fase G1 o gap 1 .....	27

3.5.1.2. Fase S o síntesis.....	28
3.5.1.3. Fase G2 .....	28
3.5.1.4. Fase M .....	29
3.6. OSTEOSARCOMA (OS).....	30
3.6.1. Epidemiología .....	31
3.6.2. Factores de riesgo .....	31
3.6.3. Etiología y patogenia .....	31
3.6.4. Presentación clínica .....	32
3.6.5. Clasificación de los osteosarcomas .....	32
3.6.5.1. Osteosarcomas primarios .....	33
3.6.5.2. Osteosarcomas secundarios .....	34
3.6.6. Diagnóstico.....	35
3.6.7. Tratamiento .....	35
3.6.7.1. Quimioterapia.....	35
3.6.7.2. Cirugía.....	37
3.6.7.3. Radioterapia (RT) .....	37
3.7. CULTIVO CELULAR .....	38
4. DISEÑO METODOLÓGICO .....	39
4.1. ÁREA DE ESTUDIO .....	39
4.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	39
4.3. UNIVERSO .....	39
4.4. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	39
4.5. MUESTRA.....	39
4.6. HIPÓTESIS .....	40
4.6.1. Hipótesis alterna .....	40
4.6.2. Hipótesis nula .....	40
4.7. VARIABLES E INDICADORES .....	40
4.8. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	40
4.8.1. Extractos .....	41

4.8.2. Cultivo celular .....	41
4.8.3. Curva de proliferación celular.....	42
4.8.4. Ensayo de viabilidad celular .....	43
4.8.5. Cálculo de la Concentración inhibitoria 50 ( IC <sub>50</sub> ).....	44
4.8.6. Ensayo de cometa .....	44
4.8.7. Análisis estadístico.....	46
5. RESULTADOS .....	47
5.1. TASA DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	47
5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA.....	48
5.3. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (IC <sub>50</sub> ) .....	54
5.4. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA. ENSAYO DE COMETA .....	55
6. DISCUSIÓN.....	57
7. CONCLUSIONES .....	64
8. RECOMENDACIONES.....	66
REFERENCIAS .....	67
ANEXOS.....	80

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Malachra alceifolia Jacq</i> .....	20
Figura 2. <i>Cordia dentata Poir</i> .....	22
Figura 3. <i>Heliotropium indicum Linn</i> .....	24
Figura 4. Actividad de los complejos ciclina-cinasa a lo largo del ciclo celular .....	27
Figura 5. Clasificación de los osteosarcomas .....	33
Figura 6. Estructura del MTT y su producto coloreado el formazán .....	43
Figura 7. Principio del ensayo de cometa. ....	45
Figura 8. Ensayo de proliferación celular empleando el método MTT. ....	47
Figura 9. Evaluación de la actividad citotóxica de <i>Malachra alceifolia Jacq</i> (MA), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT .....	48
Figura 10. Evaluación de la actividad citotóxica de <i>Cordia dentata Poir</i> (CD), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT .....	49
Figura 11. Evaluación de la actividad citotóxica de <i>Heliotropium indicum Linn</i> (HI), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT. ....	50
Figura 12. Evaluación de la actividad citotóxica de <i>Malachra alceifolia Jacq</i> (MA), 72 horas post tratamiento empleando el método MTT. ....	51
Figura 13. Evaluación de la actividad citotóxica de <i>Cordia dentata Poir</i> (CD), 72 horas post tratamiento empleando el método MTT. ....	52
Figura 14. Evaluación de la actividad citotóxica de <i>Heliotropium indicum Linn</i> (HI), 72 horas post tratamiento empleando el método MTT .....	53
Figura 15. Ensayo de cometa a las 48 horas post tratamiento en las dos líneas celulares OSCA-8 y MDCK. ....	56

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Variables e indicadores de la investigación.....	40
Tabla 2 Extractos vegetales en estudio.....	41
Tabla 3. Citotoxicidad en términos de dosis IC <sub>50</sub> para cada extracto empleado a 48 y 72 horas de tratamiento sobre las líneas celulares OSCA- 8 y MDCK. El guion (-) empleado en algunas casillas indica imposibilidad en la obtención de la IC.....	54

## RESUMEN

El osteosarcoma es el cáncer más común de tejido óseo, afecta en un mayor porcentaje a niños, adolescentes y adultos jóvenes. Éste se caracteriza por ser un tumor maligno de mal pronóstico con tratamiento agresivo que abarca quimioterapia, cirugía y radioterapia, que aunque buscan mejorar la salud global del paciente pueden causar efectos secundarios indeseables tales como náuseas, vómitos, mielosupresión, inmunosupresión, ototoxicidad y cardiotoxicidad entre otros, además de no alcanzar el 100% de efectividad, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

La medicina herbolaria es una herramienta que favorece el tratamiento del cáncer, ya que numerosos estudios demuestran que los metabolitos secundarios de las plantas interfieren en el control de la supervivencia y muerte de las células malignas, lo que permite su planteamiento como una nueva forma de tratar el osteosarcoma.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad citotóxica de los extractos obtenidos de las plantas *Malachra alceifolia* Jacq, *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn sobre las líneas celulares OSCA-8 (Osteosarcoma canino) y MDCK (fibroblastos caninos renales, empleados como control celular de citotoxicidad) empleando el ensayo de viabilidad celular por reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Los extractos vegetales mostraron 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). En cuanto a la línea celular OSCA-8 se demostró que el extracto CDAe ejerció inhibición con una IC<sub>50</sub> de 22,38 µg/ml y 29,24 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente, mientras que el extracto HIM ejerció inhibición en esta línea celular con una IC<sub>50</sub> de 173,38 µg/ml y 222,08 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente. En las células empleadas como control de citotoxicidad se observó que la concentración de extractos vegetales requerida para inhibir su crecimiento fue mucho mayor en comparación a la requerida para inhibir las células cancerígenas: el extracto CDAe inhibió la línea celular control con una IC<sub>50</sub> de 243,22 µg/ml y 158,12 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento,



respectivamente, mientras que el extracto de HIM ejerció inhibición con una IC<sub>50</sub> de 524,81 µg/ml y 247,68 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente.

Como prueba complementaria en la evaluación de la actividad citotóxica, se realizó el ensayo de cometa donde fueron evaluados los extractos CDAe y HIM, obteniendo resultados sugestivos de genotoxicidad, debido a la observación de la pérdida de integridad del ADN en células individuales a las 48 horas post tratamiento.

Los resultados sugirieron que ambos extractos tienen la capacidad de causar un marcado efecto genotóxico sobre la línea celular OSCA-8, evidenciándose en mayor proporción que el observado sobre la línea celular control MDCK.

Los resultados obtenidos son prometedores en la investigación contra el cáncer, exactamente en la investigación de nuevas alternativas terapéuticas para tratar el osteosarcoma. Sin embargo, es necesario continuar con más investigaciones al respecto.

**Palabras clave:** *Malachra alceifolia Jacq*, *Cordia dentata Poir*, *Heliotropium indicum Linn*, osteosarcoma, citotoxicidad, genotoxicidad, osteosarcoma.

## INTRODUCCIÓN

A través del tiempo el hombre ha desarrollado diversas estrategias terapéuticas para tratar las enfermedades basándose en las creencias populares (1). En Oriente y en algunas zonas del tercer mundo, predomina la medicina alternativa donde destaca la medicina herbolaria (2).

Una hierba es una planta que produce semillas ya sea de forma anual o perenne, la cual no desarrolla tejidos leñosos a diferencia de los árboles o arbustos y que perece al final de su temporada de crecimiento. Otra definición de hierba es “una planta o parte una planta que se aprecia por sus propiedades medicinales, sabor o cualidades aromáticas” (3,4).

En la medicina herbolaria se emplea un gran número de sustancias extraídas de plantas medicinales o sus partes a las que se atribuye por conocimiento popular, el alivio de alguna enfermedad o sus síntomas. La mayoría de los remedios herbolarios son obtenidos por extracciones acuosas, alcohólicas o acetónicas, aunque en algunas ocasiones no se realiza manipulación de las semillas, hojas, tallos y raíces de las plantas (5). Estos productos gozan de gran aceptación ya que se les considera como productos naturales, de fácil acceso, que al ser consumidos no generarán los efectos adversos que producen los medicamentos industrializados (6).

La gran diversidad de especies vegetales que habitan el territorio colombiano ha permitido que desde tiempos remotos las poblaciones hayan usado las plantas con fines medicinales creando un vínculo entre las sociedades y los beneficios que estas proveen. Las creencias populares en la medicina herbolaria han hecho que los usos tradicionales de las plantas trasciendan hasta el punto en que, actualmente, aproximadamente el 39% de los medicamentos son de origen natural (7). Es importante destacar que Colombia, según lo plantean Giraldo y colaboradores (8), es un país privilegiado al ser reconocido a nivel mundial como el segundo país con mayor diversidad vegetal; sin embargo, aunque se reportan más de 6000 especies con aplicación medicinal, se desconocen las propiedades terapéuticas de muchas otras.

El osteosarcoma o tumor osteogénico, es el cáncer de tejido óseo más común que afecta en un mayor porcentaje a niños, adolescentes y adultos jóvenes. Es un tumor caracterizado por la formación de hueso u osteoide tumoral por parte de las células

neoplásicas, que debe su importancia a la población a la que afecta, a su tratamiento agresivo y a su mal pronóstico (9). El tratamiento para el osteosarcoma abarca la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia que aunque contribuyen a que las tasas de supervivencia mejoren, generan efectos secundarios como malestar general, náuseas, vómitos, mielosupresión, inmunosupresión, ototoxicidad y cardiotoxicidad entre otros (10) debido a la falta de selectividad y especificidad de acción contra células tumorales ya que actúan también sobre las células normales (11). Por estas razones, se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento del osteosarcoma de modo que se puedan disminuir tanto los efectos colaterales como los elevados gastos médicos, repercutiendo en la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

Diversas investigaciones han demostrado el potencial anticancerígeno de algunas plantas medicinales al evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de sus extractos sobre líneas celulares cancerígenas. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad citotóxica de los extractos de tres plantas encontradas en el país: *Malachra alceifolia* Jacq, *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn, sobre la línea celular de Osteosarcoma canino OSCA-8, considerada un modelo de experimentación, con características moleculares y comportamientos biológicos similares a las líneas celulares del osteosarcoma humano (12), empleando el ensayo de viabilidad celular por reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) con el fin de buscar alternativas terapéuticas para el tratamiento del osteosarcoma.

En el transcurso de la investigación, se determinó inicialmente la tasa de proliferación para cada línea celular con el fin de hallar la concentración celular adecuada para la realización de los subsiguientes ensayos y se evaluó la actividad citotóxica de nueve extractos vegetales sobre la línea celular de osteosarcoma canino OSCA-8, empleando como células control fibroblastos renales caninos normales MDCK, con el fin de observar si el comportamiento de los extractos era similar en las dos líneas celulares o estos ejercían su efecto únicamente en las células cancerígenas. La concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de cada extracto vegetal fue determinada sobre ambas líneas celulares a las 48 y 72 horas post tratamiento. Finalmente, para evaluar si existía actividad genotóxica de los extractos CDAe y HIM sobre las líneas celulares

estudiadas, se realizó el ensayo de cometa, usando la concentración de los extractos determinada por los valores  $IC_{50}$  previamente obtenidos, observando pérdida de la integridad del ADN, resultados sugestivos de genotoxicidad donde las alteraciones se vieron reflejadas en mayor proporción sobre la línea celular OSCA-8.

Los resultados obtenidos permiten dilucidar el uso de algunos de los extractos estudiados como una posible alternativa terapéutica en el tratamiento del osteosarcoma. Sin embargo, se requiere la realización de más investigaciones que den continuidad a estos hallazgos dado que son prometedores.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. 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.

### 1.2. 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.

## 2. ANTECEDENTES

El osteosarcoma (OS) es una neoplasia maligna de origen mesenquimatoso, que representa aproximadamente el 85% de todos los tumores primarios de hueso en caninos, cuya biología es idéntica a la encontrada en pacientes humanos. Por este motivo se ha considerado al osteosarcoma canino como un excelente modelo para estudiar el osteosarcoma humano (13). Los perros desarrollan osteosarcoma en los mismos sitios anatómicos que en los humanos, además de tener una histología, respuesta a tratamientos y capacidad metastásica muy similares. Por otro lado, genes involucrados en la progresión del osteosarcoma humano también se han caracterizado en el canino, tales como los genes PTEN, Rb, ezrin, villin-2, c-met, ErbB-2, oncogen homólogo derivado de neuro/glioblastoma y p53; de acuerdo con un análisis comparativo de especies el osteosarcoma humano y canino no se distinguen por el perfil global de expresión de genes (14).

Al-Khan y colaboradores (15), demuestran que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión de los marcadores tumorales probados en muestras de tejido de osteosarcoma canino y humano. Para este estudio se empleó marcaje inmunohistoquímico donde se reveló que la vimentina, fosfatasa alcalina (ALP), el factor de transcripción Runx2 y la proteína morfogénica ósea BMP4 estaban altamente expresados en las muestras tanto de tejido de osteosarcoma canino como de tejido de osteosarcoma humano. Las proteínas desmina, S100, y la isoenzima NSE se expresaron de forma variable para ambos tipos de tejido, por lo tanto la similitud de presentación del OS en caninos y humanos indica la posibilidad de realizar estudios *in vitro* empleando el OS canino como modelo de dicha enfermedad en humanos (15).

Las plantas han sido ampliamente utilizadas a través del tiempo para tratar numerosas enfermedades, por ello son muchos los medicamentos que se han desarrollado a partir de fuentes vegetales (16).

Al realizar una revisión bibliográfica se han encontrado numerosos estudios que demuestran el importante papel de las plantas en la medicina al comprobar que poseen componentes fitoquímicos que les otorgan capacidad antitumoral y que las convierten en una alternativa de tratamiento para el cáncer.

En México se ha demostrado que las plantas *Colubrina macrocarpa*, *Acacia pennatula*, y *Hemiangium excelsum* utilizadas en la medicina tradicional mexicana para tratar la sintomatología del cáncer tienen actividad citotóxica frente a líneas celulares UISO-SQC1 (cáncer de cérvix), KB (carcinoma nasofaríngeo) y carcinoma de colon HCT-15 (17).

La actividad antitumoral de algunas especies del género *Cordia* ha sido evaluada en algunas investigaciones; Parisotto y colaboradores (18) realizaron en el año 2012 una evaluación comparativa de la actividad antitumoral de los extractos de *Cordia verbenacea* obtenidos por extracción de fluido supercrítico (SFE) y por extracción clásica con disolvente orgánico etanol (CE) en células EAC (Carcinoma de ascitis de Ehrlich derivado de ratón) y MCF-7 (Línea celular de adenocarcinoma de pecho); la evaluación también se realizó *in vivo* con ratones portadores del tumor EAC. Los efectos antitumorales de los extractos (CE y SFE) se evaluaron empleando el método MTT, determinando que ambos extractos vegetales demostraron un alto potencial de inhibición del crecimiento tumoral en los ratones al realizar una comparación con el control negativo. El extracto SFE presentó el mejor rendimiento ya que también generó inhibición del crecimiento tumoral en el ensayo *in vitro*.

Una investigación realizada en el año 2015 reveló el efecto citotóxico *in vitro* de *Heliotropium indicum* Linn sobre la línea celular de carcinoma de cérvix HeLa. Los extractos brutos de las hojas y tallos se prepararon para dar origen a los respectivos extractos metanólicos, los cuales se usaron en los ensayos. Se determinó el porcentaje relativo inhibición con cada extracto, para las hojas este porcentaje correspondió al 49.67% y 14.82% empleando dosis de 200 y 400 µg/ml respectivamente. Los extractos de tallo mostraron una actividad más efectiva en comparación con los extractos de las hojas, con porcentajes de inhibición que oscilaron entre 64.52% y 16.11% a 200-1000 µg/ml de una manera inversamente dependiente de la dosis. La concentración inhibitoria 50 de los extractos de hojas y tallos correspondió a 200 µg/ml (19).

La actividad citotóxica de los extractos de *Rhoeo discolor*, una planta usada ampliamente en México para fines medicinales y ornamentales fue determinada en el año 2016 mediante ensayo de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) y citometría de flujo. La citotoxicidad

se evaluó en tres líneas celulares cancerígenas de origen humano, aunque de linajes completamente diferentes: la línea celular de carcinoma de colon HT29, línea de carcinoma hepático Hep-G2 y la línea celular de carcinoma prostático PC3, empleando como control la línea celular de fibroblastos normales NIH 3T3. Los resultados demostraron efectos citotóxicos específicos contra las células cancerígenas, la inhibición de la proliferación celular se observó hasta en un 94.2% en HT-29, 92.9% en Hep-G2 y 61.8% en PC-3, con poco daño a la línea celular de control no más de 28.3 (20).

La actividad antitumoral de *Heliotropium indicum* Linn ha sido determinada en algunas investigaciones. Chunthorng-Orn y colaboradores (21), evaluaron en el año 2016 la actividad citotóxica de los extractos acuoso y etanólico de *Heliotropium indicum* Linn sobre líneas celulares de cáncer de pulmón humano A549 y NCI-H226 empleando el ensayo sulforodamina B (SRB). El extracto etanólico reveló actividad citotóxica únicamente contra la línea celular NCI-H226 mientras que el extracto acuoso no mostró señal de dicha actividad para ninguno de los dos tipos celulares evaluados, se demostró la especificidad de la planta cuando se emplean solventes etanolicos sobre la línea celular NCI-H226 (21).

Diferentes familias botánicas han sido estudiadas por tener una posible actividad citotóxica o anticancerígena. Un estudio realizado en el año 2017 en Nigeria evaluó la capacidad de dos extractos vegetales obtenidos de las plantas *Macaranga barteri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) y *Calliandra portoricensis* Benth (Leguminosae) para inhibir significativamente una línea celular de Rabdomiosarcoma, un sarcoma de tejidos blandos, empleando como células control las líneas celulares VERO (células de riñón del mono verde africano) y PNT2 (línea celular de próstata normal). El índice de selectividad indicó que los extractos no ejercieron citotoxicidad sobre las líneas celulares empleadas como control. Esta determinación se realizó empleando el método MTT (22).

La familia Boraginaceae abarca un gran grupo de plantas incluyendo arbustos, árboles y hierbas distribuidas en todo el mundo y que se han venido investigando por su actividad antitumoral. Un estudio realizado en el año 2018 demostró la actividad citotóxica de *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst en células de carcinoma hepatocelular SMMC-7721, HepG2 y QGY-7703. La actividad antiproliferativa dada por



meroterpenoides, compuestos fitoquímicos abundantes de la especie, fue medida empleando el método MTT; los resultados arrojaron una  $IC_{50} >12,0 \mu M$ , siendo inclusive más potente que el fármaco cisplatino empleado como control (23).

La actividad citotóxica del aceite esencial del *Glandora rosmarinifolia*, otra especie de la familia Boraginaceae, fue evaluada sobre líneas celulares de hepatocarcinoma celular HA22T / VGH, HepG2 y Hep3B, y líneas celulares de cáncer de mama SUM 149 y MDA-MB-231. En esta investigación se determinó que el aceite esencial de *G. rosmarinifolia* fue capaz de inhibir del crecimiento en todos los modelos de líneas celulares empleados de una forma dependiente de la dosis, es decir, que a mayor concentración de este aceite esencial, mayor porcentaje de inhibición ejercido (24).

La familia *Malvaceae*, por el contrario, ha sido poco estudiada farmacológicamente. La actividad antiproliferativa de los extractos de la planta *Sida rhombifolia* en solventes hexano, acetato de etilo y metanol fue evaluada sobre las líneas celulares de hepatocarcinoma celular Hep-G2 y cáncer de estómago SNU-1. Los resultados demostraron que el extracto en solvente hexano ejerció la actividad antiproliferativa más fuerte en ambas líneas celulares ya que fue capaz de inhibir el 68,52% y el 47,82% de las células SNU-1 y Hep-G2 respectivamente. Los extractos en solventes acetato de etilo y metanol mostraron actividad antiproliferativa más débil (25).

En una investigación realizada en el año 2018, se logró el aislamiento de seis flavonoides en la especie *Alcea rosea L.*, una planta perteneciente a la familia *Malvaceae*. El compuesto flavonoide kaempferol-3 -O- $\beta$ -d-glucopiranosido mostró una potente actividad citotóxica contra la línea celular Hep-G2 con alta selectividad y una  $IC_{50}$  de 3,8  $\mu g/ml$ . Por otro lado, los flavonoides restantes mostraron actividad antioxidante e inmunoestimulante significativa (26).

El ensayo de cometa o electroforesis de células individuales ha sido ampliamente utilizado para evaluar el efecto genotóxico de extractos vegetales sobre células cancerígenas. Un estudio realizado en India para el año 2015, evaluó el efecto citotóxico y genotóxico de los extractos de *Solanum nigrum*, *Phyllanthus amarus* y *Heliotropium indicum* sobre las líneas celulares de cáncer de cérvix SiHa, HeLa, y C33A empleando los solventes cloroformo, hexano y agua; el efecto citotóxico se evaluó empleando el método MTT. En esta investigación los extractos vegetales fueron considerados eficientes cuando presentaban una  $IC_{50}$  menor o igual a 100

µg/ml, por lo tanto, se consideraron como los extractos más eficientes el extracto en cloroformo de *S. nigrum* sobre las líneas celulares SiHa y C33A con una IC<sub>50</sub> de 86.5 y 100 µg/ml respectivamente, el extracto en cloroformo de *P. amarus* sobre la línea celular SiHa con una IC<sub>50</sub> de 50 µg/ml y por último, el extracto en hexano de *H.indicum* sobre las líneas celulares HeLa y SiHa con una IC<sub>50</sub> de 100 y 50 µg/ml respectivamente. En cuanto a la evaluación de la genotoxicidad, se determinó que la línea celular C33A presentó mayor daño en el material genético en comparación a las líneas celulares HeLa y SiHa. Los porcentajes de la cola de ADN en la línea celular C33A oscilaron entre 14.81% y 85.72%, para los 9 extractos probados siendo más potentes los extractos de las tres plantas donde fueron empleados los solventes cloroformo y hexano (27).

El uso de la medicina herbolaria ha llevado al descubrimiento de importantes sustancias bioactivas en las plantas, lo que sin duda, ha tenido gran impacto en el área de la salud, pues muchos medicamentos han sido desarrollados a partir de estas fuentes naturales.

Por otro lado, los estudios citados anteriormente permiten considerar las especies vegetales *Malachra alceifolia* Jacq, *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn como una interesante fuente de investigación, ya que se ha demostrado que estas mismas plantas, plantas del mismo género o familia ejercen efecto citotóxico en líneas celulares cancerígenas.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. LAS PLANTAS COMO FUENTES NATURALES DE PRINCIPIOS ACTIVOS

La práctica de la fitoterapia es una actividad tan antigua como la humanidad y por eso es considerada la medicina probada más remota. En las sociedades prehistóricas, los individuos mantenían una fuerte relación con la naturaleza, aprendían de forma accidental el papel que tenían las plantas al enfrentarse a diferentes situaciones cotidianas como la ingesta de vegetales tóxicos, la picadura de los insectos, entre otras, lo que les daba el conocimiento acerca de los beneficios o perjuicios que producía el uso de determinadas plantas. A pesar del daño que sufrían por el uso de algunas especies vegetales, se comprendía que algunas eran provechosas al mostrar propiedades curativas; esta experiencia permitió entonces que las personas a través de los siglos seleccionaran las plantas que les serían útiles (28).

#### 3.2. CONCEPTOS GENERALES DEL GÉNERO *MALACHRA*

El género *Malachra* pertenece a la familia Malvaceae, es neotropical (29) y se distribuye en América tropical. Este es un género compuesto por hierbas y arbustos, comprende alrededor de 30 especies notificadas, seis de ellas nativas en el territorio Colombiano presentes en los Andes y llanuras del Caribe (30).

3.2.1. Clasificación, descripción y distribución geográfica de *Malachra alceifolia* Jacq.  
La clasificación taxonómica de *Malachra alceifolia* Jacq es (31):

**Reino:** Plantae

**Phylum:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Malvales

**Familia:** Malvaceae

**Género:** *Malachra*

**Especie:** *alceifolia*

**Autor:** Jacq



**Figura 1.** *Malachra alceifolia* Jacq (32).

*Malachra alceifolia* Jacq conocida comúnmente como malva, quesillo o urticaria, es una hierba o subarbusto de 0,5 a 2 metros de altura que presenta tallos hispídos, hojas pecioladas, orbiculares a ovadas de 4 a 9 cm de largo, angulares o ligeramente truncadas y aserradas. En cuanto a la inflorescencia presenta una serie de glomérulos compactos axilares, cortamente pedunculados a sésiles; brácteas florales varias, especializadas, cordadas con divisiones lineares en la base, acuminadas frecuentemente con tejido blanco reticulado basalmente. Los pétalos son amarillos de 1 a 1.5 cm de largo, los frutos son esquizocárpicos y las semillas solitarias y glabras. Esta es una planta que crece al margen de pantanos y pastizales, habita a una altitud menor de 150 metros y florece a través de todo el año. Su distribución geográfica comprende México, Centroamérica, norte de Sudamérica incluida Colombia y Las Antillas (33).

3.2.2. Fitoquímica de *Malachra alceifolia* Jacq. La caracterización fitoquímica de *Malachra alceifolia* Jacq no ha sido registrada en la literatura, o por lo menos no en lo revisado para esta investigación. Sin embargo, en estudios preliminares del grupo de investigación en Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena, se determinó cualitativamente la presencia de metabolitos como cumarinas, flavonoides, antraquinonas y terpenos en esta especie (datos no publicados).

3.2.3. Aplicaciones clínicas de *Malachra alceifolia* Jacq. Los usos medicinales de *Malachra alceifolia* Jacq han sido poco investigados. Sin embargo, en la Costa Caribe Colombiana las hojas frescas se emplean tradicionalmente para tratar la inflamación (34), en el Chocó, el tallo es usado como antigripal y las hojas como antihelmíntico (35).

### **3.3. CONCEPTOS GENERALES DEL GÉNERO *Cordia***

El género *Cordia* es el género más grande de la familia Boraginaceae, comprende alrededor de 350 especies que son ampliamente estudiadas en diversos aspectos etnobotánicos y etnofarmacológicos como la actividad antibacterial, antifúngica, antiinflamatoria, anti picadura de serpiente, hipolipidémica y antioxidante, entre otras. Los miembros del género *Cordia* se encuentran principalmente en regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur, India, Asia y África; son incluidas especialmente en estudios de productos naturales de origen vegetal debido a su diversidad de propiedades químicas, biológicas y farmacológicas (36).

3.3.1. Clasificación, descripción y distribución geográfica de *Cordia dentata* Poir. La clasificación taxonómica de *Cordia dentata* Poir es (37):

**Reino:** Plantae

**Phylum:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Lamiales

**Familia:** Boraginaceae

**Género:** Cordia

**Epíteto específico:** dentata

**Autor:** Poir.



**Figura 2.** *Cordia dentata* Poir (38).

*Cordia dentata* Poir conocida comúnmente como uvito, uvillo, jiguilote o chachalaco, es un árbol pequeño de 2 a 10 metros de altura que presenta un tronco corto frecuentemente torcido y una copa muy ramificada. La corteza es gris pardo o grisácea muy fisurada, las ramas son largas y extendidas y las hojas simples, alternas de 3 a 13.5 cm de largo y de 2 a 7 cm de ancho, elípticas-ovaladas a redondeadas con ápice redondeado que poseen un borde dentado. Las flores son de color amarillo pálido a blanco y la inflorescencia se dispone en cimas paniculadas de hasta 20 cm de ancho con abundantes flores. Los frutos son ovoides de 1 a 1.5 cm de largo y 0.6 cm de diámetro, blancos o casi transparentes cuando maduran. Es un árbol que forma parte de los bosques secos, secos premontanos o espinosos que crece en orillas de caminos y carreteras, así como en orillas de manglares y terrenos temporalmente inundados. Su distribución geográfica comprende México, Panamá, Las Antillas, Colombia y Venezuela (39).

3.3.2. Fitoquímica de *Cordia dentata* Poir. La caracterización fitoquímica de los frutos de *Cordia dentata* Poir muestra la presencia de taninos, alcaloides, cumarinas y heterósidos cianogénéticos (40), en cuanto a las hojas se determinó la presencia de alcaloides, triterpenos/esteroides, cumarinas y quinonas (41).

3.3.3. Aplicaciones clínicas de *Cordia dentata* Poir. Las flores de *Cordia dentata* Poir son usadas tradicionalmente como tónico pectoral, sudorífico y emoliente (42), poseen propiedades de antioxidantes y demostraron ser un buen inhibidor enzimático de glucosidasa, amilasa, galantamina y acarbosa empleando extractos metabólicos (43).

#### **3.4. CONCEPTOS GENERALES DEL GÉNERO *HELIOTROPIUM***

El género *Heliotropium* comprende alrededor de 200 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales de todos los continentes. Abarca hierbas o arbustos glabros o densamente pubescentes que presentan inflorescencia escorpioide, en espigas o racimos, o flores solitarias. Las flores son perfectas actinomorfas o zigomorfas, pediceladas o sésiles, el cáliz posee 5 sépalos más o menos connatos basalmente, persistentes o caducos, la corola es asalvillada a infundibuliforme, blanca, amarilla o azul, los estambres se encuentran adheridos al tubo de la corola, los filamentos son cortos o ausentes, el ovario 4-locular, con anillo glandular en la base. Los frutos son secos, lobulados o no lobulados que se separan en 2–4 nuececillas cada una con 1–2 semillas (44).

3.4.1. Clasificación, descripción y distribución geográfica de *Heliotropium indicum* Linn. La clasificación taxonómica de *Heliotropium indicum* Linn es (45):

**Reino:** Plantae

**Phylum:** Tracheophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Boraginales

**Familia:** Boraginaceae  
**Género:** Heliotropium  
**Epíteto específico:** indicum  
**Autor:** Linn.



**Figura 3.** *Heliotropium indicum* Linn (46).

*Heliotropium indicum* Linn conocida comúnmente como heliotropio indio, es una hierba o subarbusto de 50 cm de altura que presenta tallos cilíndricos de 1 a 5 mm de grosor, densamente pubescentes hacia el ápice, glabros cuando adultos; hojas simples, opuestas y alternas puberulas sobre todo en las venas, pecíolo de 0,5 a 2 cm de longitud, acanalado y alado. Las inflorescencias salen de las axilas de nudos y hojas terminales como cimas escorpioides de 2 a 30 cm de longitud, pubescentes. Las flores son sésiles y hermafroditas; el cáliz consta de 5 sépalos y la corola de 5 piezas. El ovario tiene 0,5 mm de longitud con estilo único, estigma capitado bilobado. El fruto es de tipo esquizocarpo globoso con ápice agudo y lignificado de 2 a 2.5 mm de longitud, las semillas se encuentran adheridas al mericarpo y poseen de 1 a 1,5 mm de longitud (47).

Esta es una de las especies más ampliamente distribuidas del género, se encuentra en las Américas, desde México hasta Argentina incluyendo Las Antillas, África Tropical, Asia y Australia (48).



3.4.2. Fitoquímica de *Heliotropium indicum* Linn. *Heliotropium indicum* Linn posee en sus semillas componentes como glicósidos cardiotónicos, flavonoides y quinonas (41), y en sus raíces alcaloides de pirrolizidina (helindicine y licopsamina) (49).

3.4.3. Aplicaciones clínicas de *Heliotropium indicum* Linn. Esta planta es común en muchos países del mundo por sus usos medicinales atribuidos tradicionalmente. Estudios realizados en modelos animales han reportado que esta especie botánica posee propiedades antioxidantes, antibacterianas (50), antiinflamatorias (51) y cicatrizantes (52). Para tratar problemas oculares como las cataratas y la conjuntivitis (53,54). Por otra parte, la actividad antitumoral de diferentes extractos de *H. Indicum* han mostrado efectos significativos contra algunos tumores (27,55) siendo los alcaloides y flavonoides de heliotropio agentes potenciales en la quimioterapia. Sin embargo las aplicaciones clínicas de *H. Indicum* Linn están limitadas debido a falta de estudios sobre la toxicidad de la planta(56).

### **3.5. EL CÁNCER, UNA DE LAS PRINCIPALES CAUSAS DE MUERTE EN EL MUNDO**

Según García, el cáncer es una enfermedad genética que se produce como resultado de alteraciones generalmente en oncogenes y genes supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas para el buen funcionamiento, crecimiento y muerte celular (57). Las mutaciones que inician el cáncer pueden desarrollarse espontáneamente por defectos en la replicación del DNA o carcinógenos químicos y físicos que pueden facilitar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Cuando existe un aumento descontrolado en la formación de ERO, se pueden inducir daños en las macromoléculas incluido el DNA, las proteínas y los lípidos, generando inestabilidad genómica y cambios en el crecimiento celular. Las especies reactivas de oxígeno pueden coordinar el progreso del ciclo celular al influir en la actividad de algunas proteínas como el inhibidor p21 de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) o de la Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) serina/treonina quinasa (58).

Según la OMS, para el año 2015 el cáncer ocasionó 8,8 millones de muertes a nivel mundial. Se estima que el 70% de las defunciones que produce son registradas en

países en vía de desarrollo y que al menos una tercera parte de estas se deben principalmente a factores de riesgo asociados a la dieta y la conducta: índice de masa corporal elevado, bajo consumo de frutas y verduras, falta de actividad física y el consumo de tabaco y alcohol.

Los siguientes son los cinco tipos de cáncer con mayor número de defunciones en el mundo:

- Cáncer pulmonar (1,69 millones de defunciones)
- Cáncer hepático (788.000 defunciones)
- Cáncer colorrectal (774.000 defunciones)
- Cáncer gástrico (754.000 defunciones)
- Cáncer mamario (571.000 defunciones) (59)

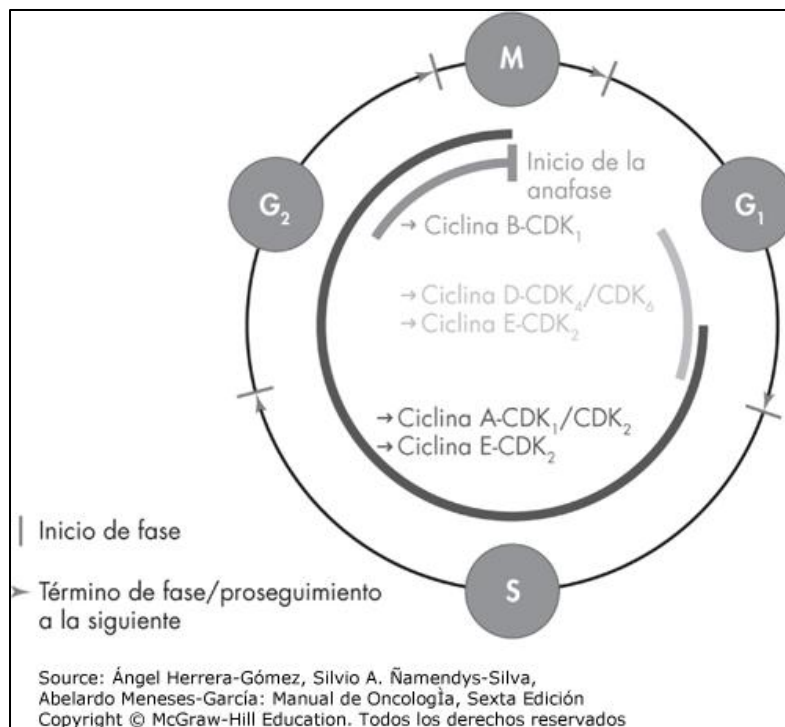
3.5.1. Ciclo celular y origen del cáncer. El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos en la vida de una célula eucariota que consta de varias etapas en las que la célula prolifera aumentando por un lado su contenido de moléculas y orgánulos y por otro duplicando y segregando sus cromosomas. Estos procesos permiten que la célula, posteriormente, se divida en dos células hijas genéticamente iguales (60).

El ciclo celular se divide en dos fases principales: la fase M o fase mitótica, y la interfase, que incluye a su vez a G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> (61). El correcto funcionamiento de sus procesos requiere de cambios en complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina). Las formas activas de los complejos CDK-ciclina están constituidas por dos proteínas: una cinasa y una ciclina. Las cinasas son enzimas encargadas de fosforilar proteínas, lo que resulta importante para la regulación del ciclo celular. Los complejos CDK-ciclina dirigen la célula de una fase a otra en el ciclo celular. En consecuencia, la dinámica del ciclo dependerá de las formas activas o inactivas de los complejos CDK-ciclina, entre otros procesos (62).

Los complejos característicos que se distinguen en cada fase del ciclo celular son los siguientes:

- Ciclina D en complejo con la CDK<sub>4</sub> o CDK<sub>6</sub> durante G<sub>1</sub>.
- Ciclina E en complejo con la CDK<sub>2</sub> en la transición G<sub>1</sub>/S y durante S.

- Ciclina A en complejo con la CDK<sub>1</sub> o CDK<sub>2</sub> durante S y G<sub>2</sub>.
- Ciclina B en complejo con la CDK<sub>1</sub> durante M.



**Figura 4.** Actividad de los complejos ciclina-cinasa a lo largo del ciclo celular (66)

La progresión de una célula por el ciclo celular se encuentra regulada en varios puntos de revisión por un conjunto de genes que son el blanco específico de alteraciones genéticas en el cáncer. Las proteínas en estos puntos de control que con frecuencia se encuentran mutadas o inactivadas en los cánceres, son llamadas genes supresores de tumores, entre ellos los genes que codifican para la proteína p53 y la proteína del retinoblastoma (Rb) (63).

3.5.1.1. Fase G1 o gap 1: es la etapa del ciclo celular que sigue a la mitosis. En ella las células mantienen un número de cromosomas diploide (2n) que equivale a dos copias de cada cromosoma. La cromatina se descondensa gradualmente hasta que adopta una conformación totalmente extendida (correspondiente a la doble hélice), necesaria para la separación de las dos hebras en la siguiente fase. En esta fase la célula sintetiza ciclinas de G1, en particular ciclina D (61).

Durante el punto de control G1 en la transición G1-S, la célula comprueba si las condiciones internas y externas son adecuadas para su división (p. ej., nutrientes, sales, temperaturas adecuadas, oxígeno, señales proliferativas y antiproliferativas, etc.)(60). La proteína retinoblastoma Rb es el principal freno del proceso. Cuando la célula está preparada para continuar, una activación secuencial de las CDK desactiva Rb mediante su fosforilación. La Rb fosforilada libera el factor de transcripción regulador de la fase S (E2F/DP1) y se expresan los genes necesarios para el progreso de la fase S. Cuando la célula determina que no es apta para replicar el DNA, varios inhibidores bloquean la acción de las CDK (p.ej., p21<sup>Cip2/Waf1</sup>, p16<sup>Ink4a</sup> y p27<sup>Kip1</sup>). Casi todo tipo de cáncer tiene una o más lesiones genéticas en el punto de control G1 que permite el paso a la fase S a pesar de que existan anomalías en los mecanismos de reparación del DNA y otras deficiencias capaces de afectar la síntesis normal de DNA (63).

3.5.1.2. Fase S o síntesis: Durante esta fase se lleva a cabo la replicación del DNA de los cromosomas individuales. Cada hebra de este DNA sirve de molde para sintetizar la nueva hebra, que se asocia por apareamiento de bases nitrogenadas. Las dos moléculas de DNA se encuentran unidas por el centrómero dando lugar a cromosomas con cuatro hebras de DNA donde cada doble hebra conforma una cromátida; de esta manera el número de cromosomas es diploide en el núcleo (2n) pero al terminar esta etapa el contenido de DNA es 4n. Las dos copias de cada cromosoma replicado se mantienen unidas como cromátidas hermanas idénticas gracias a las cohesinas; la cohesión de las cromátidas es esencial para que los cromosomas puedan segregarse correctamente (61).

3.5.1.3. Fase G2: Esta fase abarca el periodo comprendido entre la finalización de la replicación del DNA y el inicio de la división (60). Durante ella, la célula inicia la producción de proteínas necesarias para la división celular. Se inicia la condensación gradual de la cromatina dando lugar a cromosomas visibles al microscopio, con el aspecto típico de dos cromátidas y cuatro brazos. Esta etapa se completa durante las primeras etapas de la mitosis (61).

Al final de la fase G2 y antes de la fase M, existe un punto de control G2 donde la célula comprueba si los cromosomas se han duplicado por completo, si hubo

segmentos del DNA con más de una copia, si el DNA dañado se ha reparado o si existe el número correcto de cromosomas y la cantidad adecuada de DNA. De ser así, la célula continúa en la fase G2 donde se prepara para dividirse al sintetizar el huso mitótico y otras proteínas necesarias para producir dos células hijas (64).

Cuando se detecta algún daño en el DNA normalmente se activa la vía de p53. Este factor conocido como guardián del genoma y cuyas concentraciones se encuentran bajas en la célula (en condiciones normales), se encuentra unido con mdm2, una ubiquitina ligasa que inhibe la activación transcripcional de p53 y lo transporta para que este pueda degradarse en el proteasoma. Cuando un daño es percibido se activa la vía de Ataxia-Telangiectasia mutada o ATM; esta vía fosforila a mdm2 haciendo que disminuya su afinidad con p53 y que éste último detenga la progresión del ciclo celular, dirija la síntesis de enzimas de reparación o inicie la apoptosis celular cuando el daño es significativo para evitar que una célula dañada pueda propagarse.

La vía de p53 también puede activarse al inducir a p14<sup>ARF</sup> mediante señales hiperproliferativas de oncogenes. p14<sup>ARF</sup> compite con p53 por la unión con mdm2 haciendo que p53 se libere del efecto de mdm2, se acumule en la célula y logre detener el ciclo celular al activar los inhibidores de CDK y/o iniciar la apoptosis (63). En más del 50% de los cánceres, la capacidad de p53 para suprimir el cáncer se encuentra reducida. El gen que codifica para p53 está mutado habitualmente por una mutación puntual que causa el cambio de un aminoácido único en la proteína p53; en otros casos ocurre que p53 es normal pero su función es reducida debido a defectos en otras proteínas que son necesarias para su función.

La ausencia de p53 acarrea inestabilidad cromosómica y acumulación de daño en el DNA que dan ventaja de proliferación y supervivencia a las células anormales (65).

3.5.1.4. Fase M: En esta fase se generan nuevas células, idénticas a la célula madre que contienen el mismo material genético. La división celular ocurre en dos etapas: la mitosis en la que el material genético duplicado se distribuye equitativamente en los polos de la célula, y la citocinesis en la que se distribuye el citoplasma (66,67). La mitosis se divide en cinco fases:

Profase: los cromosomas se condensan para formar la estructura más compacta posible; las cromátides hermanas unidas cuentan con cinetocoros donde se unen los

extremos de los microtúbulos. En esta etapa se inicia la formación del huso mitótico donde los centrosomas se dirigen hacia los polos opuestos de la célula.

Prometáfase: la envoltura nuclear se desensambla y partir de ese momento los cinetocoros de cada cromosoma interactúan con los microtúbulos del huso mitótico.

Metáfase: los cinetocoros se unen a los microtúbulos provenientes de los polos opuestos del huso. Los cromosomas se desplazan alineándose en el ecuador de la célula.

Anafase: se lleva a cabo la segregación de las cromátides hermanas hacia los polos opuestos del huso mitótico mediante dos fuerzas mecánicas independientes:

- Anafase A, consiste en el acortamiento de los microtúbulos
- Anafase B, consiste en el alejamiento de los polos del huso.

Telofase: llegada de los cromosomas a los polos del huso, se da inicio al ensamblaje de la envoltura nuclear alrededor de cada juego diploide de cromosomas.

Finalmente, el citoplasma se distribuye equitativamente entre las dos células hijas en la citocinesis. Durante este proceso ocurre el estrechamiento del ecuador de la célula mediado por el anillo contráctil, una estructura formada por actina y miosina. Esta contracción se acompaña de la fusión de vesículas de membrana citoplasmática a cada anillo contráctil donde se logra completar la superficie necesaria para sellar ambas células hijas. De este modo, en la citocinesis se obtienen dos células con citoplasmas completamente independientes (66).

Existe un punto de control en la fase de división o fase M, que ocurre antes de la transición metafase-anafase conocido como punto de vigilancia mitótica(66). Su función consiste en asegurar que se haya dado una unión apropiada de los cromosomas con el huso mitótico antes de que el ciclo celular progrese (63).

### **3.6. OSTEOSARCOMA (OS)**

El osteosarcoma es el tumor óseo maligno primario más frecuente. Se caracteriza histológicamente por la presencia de células mesenquimatosas malignas y la producción de hueso u osteoide tumoral (trabéculas óseas inmaduras) por parte de las células neoplásicas (68).

3.6.1. Epidemiología. El OS es el tumor óseo maligno que se presenta con mayor frecuencia en el niño y el adolescente; representa aproximadamente el 2.5% de todos los cánceres en menores de 15 años y el 4.2% en jóvenes de entre 15 a 19 años. La tasa de incidencia anual oscila entre 3,5 y 8,8 casos/millón en menores de 15 y entre 15 a 19 años respectivamente (69).

Esta malignidad presenta una predilección por el género masculino (proporción de niños a niñas 1.4:1)(70) y una manifestación bimodal en la adolescencia (con un pico de mayor incidencia entre 10 y 14 años) y en adultos mayores de 65 años(vinculada con la enfermedad de Paget ósea)(71).

3.6.2. Factores de riesgo. Existen algunos factores de riesgo identificados: la radioterapia o quimioterapia previa, enfermedad de Paget y otras lesiones benignas como el osteocondroma, el encondroma, la osteomielitis crónica, la displasia fibrosa, los infartos óseos y las regiones con implantes metálicos(68). Las afecciones genéticas hereditarias como el Retinoblastoma hereditario, síndrome de Li-fraumeni, Síndrome de Bloom, Síndrome de Werner, entre otros, así como la radiación ionizante para el tratamiento de malignidades previas (72).

3.6.3. Etiología y patogenia. El OS surge de células madre mesenquimales y sus alteraciones genéticas se encuentran relacionadas con los genes putativos PTEN, Rb, ezrin, villin-2, BRCA2, BAP1, RET, MUTYH, ATM, WRN, RECQL4, ATRX, FANCA, NU, MA1, MDC1 c-met, ErbB-2, oncogen homolog Gustafson derivado de neuro/glioblastoma y p53 (73,74).

En la etiología del OS existe una relación entre la aparición del tumor y el crecimiento óseo acelerado debido a los siguientes parámetros:

- El pico de incidencia del OS está en la adolescencia, momento de mayor crecimiento óseo.

- Este tumor aparece usualmente en las zonas metafisarias, es decir en la región donde se produce el crecimiento óseo.
- El OS aparece en las mujeres a edades más tempranas, lo que puede corresponder a que su desarrollo se da más temprano que en los hombres (68).

3.6.4. Presentación clínica. Los huesos comúnmente afectados por el OS son los huesos largos superiores (húmero proximal), los huesos largos inferiores (fémur distal y tibia proximal) y la región pélvica (75). La mayoría de los pacientes presenta dolor e hinchazón localizados; de 15% a 20% de los pacientes puede presentar una fractura patológica (70) y aproximadamente del 10% a 20% presentan evidencia macroscópica de enfermedad metastásica comúnmente (90%) en los pulmones aunque también puede desarrollarse metástasis en los huesos (8 a 10%) y rara vez en los ganglios linfáticos (76,77).

La metástasis de células cancerosas implica una compleja cascada de reacciones: desprendimiento de las células de su ubicación original, invasión de la matriz circundante, extravasación y diseminación a través de la circulación y la extravasación a un sitio secundario para una colonización posterior. Las moléculas de adhesión celular o CAM son uno de los factores más importantes para el desarrollo de la metástasis; se dividen en cuatro grupos: cadherinas, integrinas, selectinas e inmunoglobulinas (78). En el desarrollo del OS, la molécula de adhesión celular 1 o VCAM-1 y el factor de crecimiento de tejido conectivo CTGF se encuentran relacionados con su progresión a la metástasis (79).

#### 3.6.5. Clasificación de los osteosarcomas

Existen diferentes tipos de osteosarcomas, los cuales tienen en común la formación de hueso o material osteoide (80).



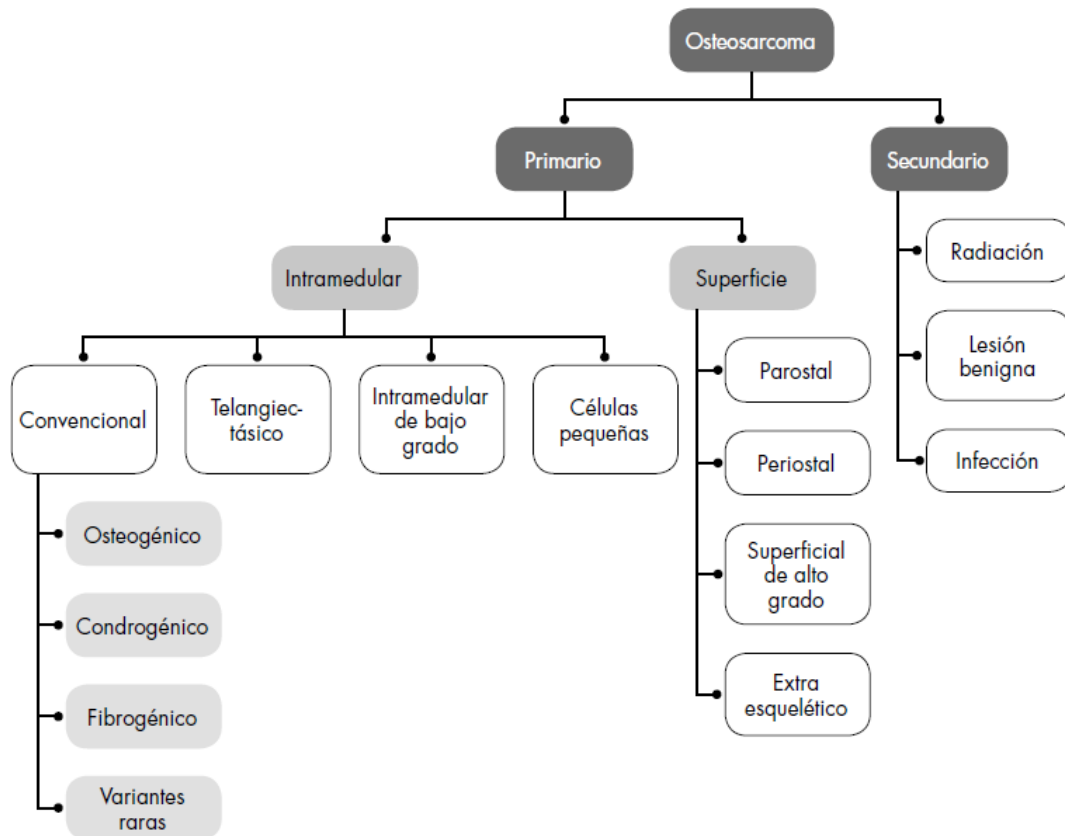


Figura 5. Clasificación de los osteosarcomas (80)

### 3.6.5.1. Osteosarcomas primarios.

- El OS convencional representa el 85% de todos los osteosarcomas. Produce osteoide y presenta abundantes células tumorales, afecta la metáfisis y muestra una reacción perióstica agresiva(80). Este tipo de osteosarcoma se divide en tres subtipos histológicos: osteoblástico, condroblástico y fibroblástico (81).
- El OS de células pequeñas representa el 1% de todos los osteosarcomas. Es radiotransparente, de márgenes permeables y reacción perióstica (82).
- El OS fibrohistiocítico se caracteriza por ser una lesión radiotransparente con reacción perióstica menor. Aparece en la tercera década de la vida (80).
- El OS telangiectásico de alto grado representa el 5% de todos los osteosarcomas, se caracteriza por ser una lesión en la diáfisis, es radiotransparente múltiple y exhibe una reacción perióstica agresiva.

- El OS con abundantes células gigantes representa el 3% de todos los osteosarcomas. Presenta osteoclastos abundantes (células gigantes), lesión osteolítica y una reacción perióstica menor.
- El OS central de bajo grado representa el 2% de todos los osteosarcomas. Es una lesión osteolítica de borde escleroso que aparenta benignidad, que es de crecimiento lento.
- El OS intracortical es una afección cortical rara, radiotransparente, y de borde esclerótico. Su principal diagnóstico diferencial es el osteoma osteoide.
- El OS mandibular es un tumor bien diferenciado con una tasa mitótica baja que aparece usualmente entre la cuarta y sexta décadas de la vida. A diferencia de los demás osteosarcomas, se origina en el maxilar inferior o mandíbula (82).
- El OS multicéntrico se caracteriza porque las lesiones se desarrollan de manera simultánea en múltiples huesos. Se distinguen dos variantes: sincrónico y metacrónico.
- Los OS yuxtacorticales representan el 5% de todos los osteosarcomas. Se originan en la superficie del hueso, en el hueco poplíteo fémur distal, y en el parostal.
- El OS extraesquelético de partes blandas tiene el aspecto de una masa con calcificaciones y osificaciones amorfas al observarse en rayos X(80).

#### 3.6.5.2. Osteosarcomas secundarios.

- El sarcoma de Paget se origina a partir de un hueso pagético. Los cambios radiográficos consisten en una lesión destructiva en el hueso afectado, la presencia de hueso tumoral en la lesión, una fractura patológica y una masa asociada en partes blandas.
- Los OS secundarios a radioterapia. Tienen un periodo de latencia que oscila entre los 4 y los 42 años. Sus criterios diagnósticos se basan en que la enfermedad inicial y el sarcoma secundario a radiaciones no deben ser del mismo tipo histológico, la localización del nuevo tumor debe encontrarse en el campo radiado y debe haber transcurrido un periodo de al menos tres años desde la última radioterapia.

- Los OS secundarios a lesiones benignas, presentan características similares al osteosarcoma convencional. Entre ellos se encuentran el infarto óseo y la displasia fibrosa (80).

3.6.6. Diagnóstico. Ante la sospecha de un tumor óseo el primer estudio a realizar debe ser la radiografía de la zona afectada. Ya que ninguna imagen radiológica es patognomónica, se hace necesaria la realización de biopsias para realizar un diagnóstico histológico correcto. Por último, la resonancia magnética debe ser solicitada como prueba diagnóstica ya que muestra lesiones que no son evidentes en la radiografía, permite evaluar la extensión del tumor y planificar posteriores intervenciones quirúrgicas (83).

Los diagnósticos diferenciales del OS incluyen otros tumores óseos malignos como el sarcoma de Ewing, linfoma y metástasis; tumores óseos benignos como el osteoblastoma, osteoma osteoide, condroblastoma, tumor de células gigantes y osteocondroma; y enfermedades no neoplásicas como la osteomielitis, granuloma eosinófilo, displasia fibrosa y quiste óseo aneurismático (68).

3.6.7. Tratamiento. El tratamiento para el OS consiste en la quimioterapia, la cirugía y la radioterapia (RT). La quimioterapia puede ser de tres tipos: neoadyuvante (antes de la cirugía), adyuvante (después de la cirugía) o paliativa (cuando el paciente presenta metástasis a distancias irresecables). El tratamiento quirúrgico puede realizarse de diferentes formas, como lo son las cirugías conservadoras de la extremidad (reemplazo protésico, artrodesis) o un tratamiento radical. La radioterapia es el tratamiento reservado para aquellos tumores no resecables o zonas de difícil acceso como la columna vertebral (80).

3.6.7.1. Quimioterapia. La quimioterapia se basa en esquemas combinados que han demostrado efectividad para este tipo de tumor: platinos, doxorubicina, metotrexato, ciclofosfamida, ifosfamida y etopósido (84). Sin embargo, en ensayos clínicos realizados durante las últimas décadas se ha encontrado que el cisplatino, la doxorubicina y el metotrexato (MAP) son el tratamiento más eficaz para el OS (85).

La quimioterapia destruye las células cancerosas, pero también elimina algunas células normales generando efectos secundarios a largo plazo; estos dependen del

tipo de medicamentos, las dosis y la duración del tiempo en que se administran (86). Los pacientes con OS que reciben terapia con MAP pueden experimentar náuseas, vómitos, mielosupresión, inmunosupresión y otros efectos secundarios más específicos como nefrotoxicidad, neurotoxicidad, hepatotoxicidad, ototoxicidad y cardiotoxicidad (87).

La ototoxicidad es un importante efecto secundario inducido por el cisplatino, esta ocurre entre el 40% y 60% de los pacientes tratados con este fármaco y se caracteriza por una pérdida auditiva neurosensorial permanente bilateral (87,88).

La cardiotoxicidad es un problema importante en el tratamiento con la doxorubicina. Esta puede presentarse como una insuficiencia cardíaca aguda o crónica que parece ser inducida por el estrés oxidativo en los cardiomiocitos. La susceptibilidad a la cardiotoxicidad inducida por este fármaco aumenta con la edad, la dosis acumulada más alta y se presenta predominantemente en el sexo femenino (10).

Los efectos adversos más comunes del tratamiento con metotrexato oral a bajas dosis abarcan complicaciones gastrointestinales, hematológicas, estomatitis, hepatotoxicidad, pérdida del cabello, toxicidad pulmonar y erupciones cutáneas. El efecto tóxico más conocido del metotrexato sobre el pulmón es la neumonitis, una complicación generalmente aguda y grave que requiere la suspensión del fármaco para su resolución. Otras formas de toxicidad pulmonar asociadas a metotrexato son la fibrosis intersticial, nodulosis pulmonar, linfoma y edema pulmonar no cardiogénico (89). La toxicidad hematológica por metotrexato incluye inhibición de la hematopoyesis, anemia aplásica, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia o pancitopenia (90). El grado de pancitopenia es un efecto adverso que puede ser grave e impredecible incluso si se administran dosis bajas de metotrexato. Esta es una complicación infrecuente que en la mayoría de los casos es transitoria y se recupera tras interrumpir el fármaco, sin embargo, en algunos pacientes puede ser grave e irreversible llegando incluso a producir la muerte (89,91).

3.6.7.2. Cirugía. Sin tratamiento quirúrgico no existe posibilidad de curar el OS. Aunque la quimioterapia ha conseguido un notable cambio en la supervivencia de los pacientes, se considera que este tipo de tratamiento aislado es incapaz de erradicar el tumor primario. Por lo tanto, el tratamiento quirúrgico del OS convencional queda intercalado entre la quimioterapia preoperatoria y la quimioterapia postoperatoria.

La cirugía se realiza sobre la semana 15 de inicio de la quimioterapia, lo que permite que el cirujano oncológico planifique adecuadamente el tipo de intervención y reconstrucción a realizar.

La situación clínica y los estudios por imagen en pacientes no diseminados son la base para decidir si se realiza una cirugía de salvamento de extremidad o una amputación. El salvamento de la extremidad es posible cuando puede realizarse la resección con un margen de 5 cm a nivel medular, si la resección del tumor extraoseo-partes blandas permite que la extremidad tenga una funcionalidad aceptable y cuando el paquete vasculonervioso de la extremidad después de haber resecado el tumor, asegura su viabilidad posterior.

Las reconstrucciones en la cirugía ortopédica oncológica son posibles con el empleo de homoinjertos estructurales masivos, megaprótesis a medida y megaprótesis tumorales modulares.

Las complicaciones postquirúrgicas del salvamento de extremidades en el OS abarcan infecciones, síndromes compartimentales, roturas y desinserciones del aparato extensor (92).

3.6.7.3. Radioterapia (RT). La radioterapia utiliza partículas u ondas de alta energía, tales como los rayos X, rayos gamma y rayos de electrones o de protones para eliminar células cancerosas (93).

El OS convencional es relativamente resistente a la radioterapia, por lo que no se encuentra indicada en este tipo de sarcoma. Sin embargo, este tipo de tratamiento puede considerarse como una alternativa cuando el paciente presenta un tumor primario no resecable o resecado de forma incompleta (94).

Se debe tener en cuenta que en pacientes tratados con quimioterapia y cirugía, la RT no mejora la supervivencia y aumenta el riesgo de aparición de sarcomas secundarios (68).

### 3.7. CULTIVO CELULAR

Los modelos celulares constituyen una herramienta para el desarrollo y producción de conocimiento en investigación. Un cultivo celular proporciona características idénticas del tejido de origen, lo que permite realizar estudios en diferentes áreas médicas y veterinarias (95). La técnica de cultivo celular corresponde al crecimiento en condiciones *in vitro*, en donde se proporcionan nutrientes esenciales para las células; el medio de cultivo es el encargado de suministrar los aminoácidos, las vitaminas, fuente de energía, factores de crecimiento y hormonas que en condiciones atmosféricas con oxígeno, dióxido de carbono, temperatura y un pH regulado permiten mantener una proliferación ideal en el cultivo celular (96).

El cultivo celular es originado a partir de una explantación primaria o cultivos primarios proveniente de tejidos humanos o animales, estos cultivos dan lugar a la formación de una línea celular, las líneas celulares son establecidas cuando es posible demostrar la potencialidad de las células para replicarse indefinidamente y de conservar sus características en pasajes sucesivos (97).

Las líneas celulares pueden ser adherentes (crecimiento en monocapa), es decir que son capaces de adherirse a la superficie del recipiente plástico donde están contenidas, y no adherentes que crecen en suspensión y por lo tanto no se adhieren a dicha superficie. Existen dos tipos de líneas celulares, la línea celular finita y la línea celular continua, en la primera las células suelen dividirse de manera limitada sin perder la capacidad de proliferar y en la segunda, aquellas líneas celulares que se immortalizan cuando sufren algún tipo de transformación. Cuando una línea celular finita se transforma y adquiere la capacidad de dividirse indefinidamente, se convierte en una línea celular continua (98).

## 4. DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de cultivo celular y proteínas de la Universidad Antonio Nariño, sede Circunvalar de Bogotá.

### 4.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Experimental.

### 4.3. UNIVERSO

Extractos vegetales.

### 4.4. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población está conformada por extractos vegetales obtenidos de las plantas *Malachra alceifolia Jacq*, *Cordia dentata Poir* y *Heliotropium indicum Linn*, los cuales fueron proporcionados por el Doctor Harold Gómez Estrada del grupo de investigación en Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena y las líneas celulares OSCA-8 (Osteosarcoma canino) y MDCK (fibroblastos renales de canino).

### 4.5. MUESTRA

La muestra corresponde a 9 extractos vegetales obtenidos de las plantas *Malachra alceifolia Jacq*, *Cordia dentata Poir* y *Heliotropium indicum Linn* evaluados en las líneas celulares OSCA-8 (Osteosarcoma canino) y MDCK (fibroblastos renales de canino).

## 4.6. HIPÓTESIS

4.6.1. Hipótesis alterna. Los extractos vegetales obtenidos de las plantas *Malachra alceifolia* Jacq, *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn presentan efecto citotóxico sobre la línea celular de osteosarcoma canino OSCA-8.

4.6.2. Hipótesis nula. Los extractos vegetales obtenidos de las plantas *Malachra alceifolia* Jacq, *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn no presentan efecto citotóxico sobre la línea celular de osteosarcoma canino OSCA-8.

## 4.7. VARIABLES E INDICADORES

Variables	Indicadores
Plantas	<i>Malachra alceifolia</i> Jacq, <i>Cordia dentata</i> Poir, <i>Heliotropium indicum</i> Linn.
Solventes	Cloroformo, Acetato de etilo, Metanol.
Concentraciones de los extractos	25, 50, 100, 200, 350 y 500 µg/mL
Tiempo de exposición a los extractos	48 y 72 Horas
Líneas celulares	OSCA-8 y MDCK

Tabla 1 Variables e indicadores de la investigación.

## 4.8. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS



4.8.1. Extractos. Los extractos fueron donados gentilmente por el Doctor Harold Gómez Estrada del grupo de investigación en Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena, como parte del trabajo colaborativo que tiene como fin promover y difundir la investigación incentivando el trabajo en equipo. Las muestras de las tres especies vegetales *Malachra alceifolia Jacq*, *Cordia dentata Poir* y *Heliotropium indicum Linn*, fueron obtenidas de las hojas de cada planta por el mismo método de extracción, la maceración con etanol se realizó para obtención del extracto total, las muestras fueron enviadas en diferentes solventes como se muestra en la siguiente tabla:

<b><i>Malachra alceifolia Jacq</i> (MA)</b>		<b><i>Cordia dentata Poir</i> (CD)</b>		<b><i>Heliotropium indicum Linn</i> (HI)</b>	
<b>Extracto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Extracto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Extracto</b>	<b>Solvente</b>
<b>1. MAC</b>	Cloroformo	<b>4. CDM</b>	Metanol	<b>7. HIC</b>	Cloroformo
<b>2. MAAe</b>	Acetato de etilo	<b>5. CDC</b>	Cloroformo	<b>8. HIAe</b>	Acetato de etilo
<b>3. MAM</b>	Metanol	<b>6. CDAe</b>	Acetato de etilo	<b>9. HIM</b>	Metanol

**Tabla 2** Extractos vegetales en estudio.

Para los ensayos de citotoxicidad, cada extracto fue disuelto en 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente filtrado con filtro de poro 0,22 µm, a partir de lo cual se analizaron seis concentraciones diferentes: 25, 50, 100, 200, 350 y 500 µg/mL partiendo de su concentración inicial, para MAC y MAAe la concentración fue de 200 mg/mL y para los extractos restantes fue de 500 mg/mL.

4.8.2. Cultivo celular. Se emplearon dos líneas celulares: Línea celular OSCA-8 (Kerafast Inc): Es una línea celular de osteosarcoma canino proveniente de un tumor del hombro izquierdo de un Rottweiler macho de un año. Posee morfología en huso y requiere adherencia para su crecimiento.

Línea celular MDCK (ATCC CCL-34): Es una línea celular normal, proveniente del riñón de una Cocker spaniel hembra adulta. Posee morfología epitelial y requiere adherencia para su crecimiento (99).

El cultivo se realizó en medio DMEM (Dulbecco modificado) suplementado con suero fetal bovino al 5%, L-glutamina al 1% y penicilina/estreptomicina al 1%. Las células fueron mantenidas en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en botellas de cultivo de 25cc hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 90% para la realización de pases según la necesidad.

Se realizó un stock celular para OSCA-8 y MDCK: Cuando las células alcanzaron una confluencia de 90 a 100%, se lavó la monocapa con PBS para retirar el remanente de medio suplementado, se adicionó 1 ml de tripsina y se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 minutos. Posteriormente la tripsina fue inactivada al resuspender las células con medio completo DMEM. Se realizó un lavado de las células por centrifugación, y finalmente se congelaron a una concentración final de  $1 \times 10^6$  cel/ml, según recuento en cámara de Neubauer, en medio de congelación (SFB al 80% y DMSO al 20%) por ser uno de los criopreservantes empleados con mayor frecuencia ya que además de disminuir la formación de hielo intracelular, permite un buen rendimiento en cuanto a la tasa de viabilidad post criopreservación (100). La congelación se realizó preservando las células a -20°C mínimo 1 hora, para luego ser almacenadas a -70°C y en nitrógeno líquido hasta su uso.

4.8.3. Curva de proliferación celular. Para determinar la tasa de proliferación celular las células OSCA- 8 y MDCK se cultivaron en placas de 96 pocillos con concentraciones celulares de 12.500, 25.000, 50.000 y 100.000 células/ml, teniendo seis réplicas por cada concentración de células. El ensayo de MTT se realizó según el protocolo Cell Proliferation Kit I MTT (Roche), en cuatro tiempos diferentes 24, 48, 72 y 96 horas, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.8.4. Ensayo de viabilidad celular. El ensayo de viabilidad celular se realizó mediante la determinación de la reducción del compuesto MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide)(Roche™), una sal de tetrazolio de color amarillo. Este método cuantifica mediante valores de absorbancia la viabilidad celular; la reacción es posible por acción de deshidrogenasas mitocondriales y otros reductores celulares(101). En condiciones normales, el MTT es reducido por las enzimas dando lugar a la formación de cristales de formazán (ver figura 6) los cuales son compuestos de color púrpura insolubles en agua. Por tal razón, es común el uso de disolventes orgánicos para solubilizar dichos cristales y realizar mediciones espectrofotométricas. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional a las células metabólicamente activas (102,103).

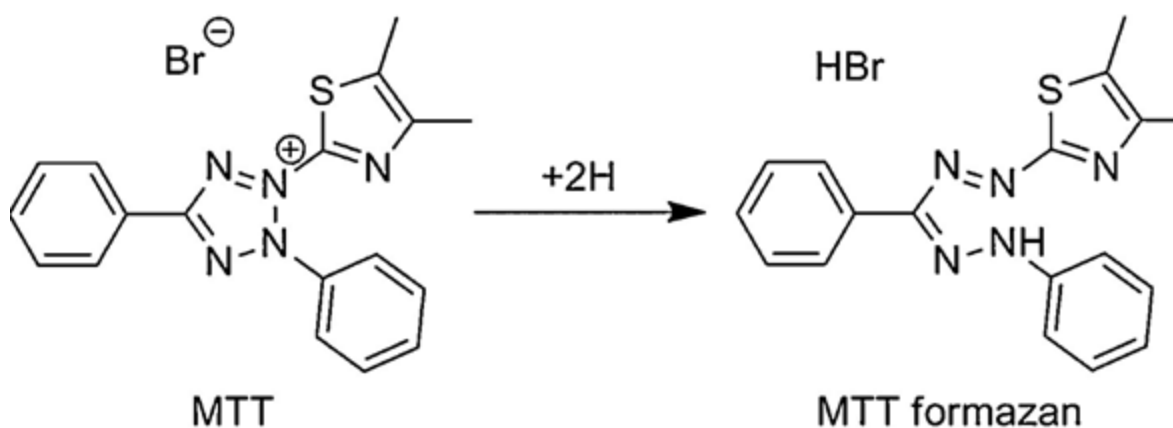


Figura 6. Estructura del MTT y su producto coloreado el formazán (114)

Las células se incubaron en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos empleando la concentración celular adecuada para cada línea celular, según los resultados obtenidos en la curva de proliferación. Una vez servidas las placas se dejaron 24 horas para lograr la adherencia celular, posteriormente las células se trataron con los nueve extractos vegetales en las concentraciones 25, 50, 100, 200, 350 y 500 µg/ml.

La viabilidad se evaluó a las 48 y 72 horas post tratamiento, para ello las células se incubaron con 10µl de solución MTT-1 durante 4 horas, después de esta incubación se formaron los cristales de formazán y fueron disueltos con 100µl de MTT-2 (solución solubilizante). Las placas se incubaron durante toda la noche en atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, según las indicaciones de la casa comercial

(Roche™). Luego se realizó la cuantificación del producto formazano solubilizado mediante espectrofotometría a una absorbancia de 570nm, usando un lector de ELISA (Multiskan Fc Thermo Scientific). Un aumento en el número de células vivas genera un aumento en la actividad metabólica total de la muestra, lo que se correlaciona directamente con la medida de la absorbancia correspondiente a la cantidad de cristales de formazan púrpura formados(104).

Como control positivo se empleó Doxorubicina, en diferentes concentraciones: 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16  $\mu$ M, con el fin de determinar la concentración del fármaco requerida para inhibir el crecimiento celular en un 100% y calcular la  $IC_{50}$  para los experimentos posteriores. La Doxorubicina es un fármaco quimioterapéutico capaz de interactuar con el ADN mitocondrial, alterar el ciclo celular, generar peroxidación lipídica, dar lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno e inducir la apoptosis (105). Como control del diluyente se usaron células con DMSO a una concentración < 1% en medio suplementado; y como control negativo se cultivaron células sin tratamiento, es decir, se cultivaron en medio DMEM completo solamente. El ensayo se realizó por triplicado en un único experimento.

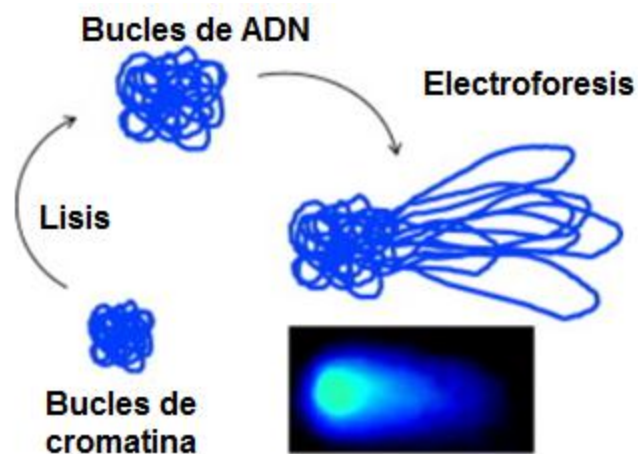
4.8.5. Cálculo de la Concentración inhibitoria 50 (  $IC_{50}$ ). La  $IC_{50}$  representa la concentración de cada extracto requerida para inhibir el 50% de la proliferación celular, se calculó empleando una curva de regresión no lineal mediante el software Excel.

4.8.6. Ensayo de cometa. Las células se cultivaron en botellas de cultivo de 25cc empleando la concentración de células adecuada para cada línea celular, según los resultados obtenidos en la curva de proliferación. Luego se incubaron durante 24 horas para lograr la adherencia y se trataron con los extractos que presentaron mejor comportamiento: CDAe y HIM (escogidos según la concentración inhibitoria 50 -  $IC_{50}$ ), las dos líneas celulares fueron tratadas con la concentración de cada extracto, determinada por los resultados de la  $IC_{50}$  correspondientes a la línea celular OSCA-8 obtenida a las 48 horas de tratamiento.

Pasadas las 48 horas se lavó la monocapa con PBS, se adiciono 1ml de tripsina y se incubó a 37°C con 5% de  $CO_2$  durante 5 minutos. Posteriormente la tripsina fue inactivada con DMEM completo, se realizó un lavado a las células por centrifugación

y se inició el protocolo para el ensayo de cometa como el realizado por McKelvey y colaboradores (106) con algunas modificaciones.

El ensayo de cometa también conocido como electroforesis de células individuales, permite evaluar el daño del ADN. Cuando la molécula compacta de ADN se fragmenta y sus hebras han sido afectadas por algún tipo de tratamiento, estas pueden estirarse mediante la realización de una electroforesis. La migración se facilita cuando hay daños predominantes en la cadena simple y doble, evidenciándose la genotoxicidad con la presencia de una zona compacta (cabeza) y los fragmentos dañados formando bucles o alargamiento que se asemeja a una cometa (cola)(107).



**Figura 7.** 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. Adaptado de: (107).

Para ello, portaobjetos desengrasados fueron cubiertos con 300µl de Agarosa de punto de fusión normal al 1% en PBS libre de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , posteriormente un cubreobjetos fue puesto para favorecer la uniformidad y solidificación de la agarosa, este montaje fue llevado a 4°C durante 3 minutos, después de los cuales se retiró el cubreobjetos, sobre la agarosa solidificada se puso una segunda capa de 200µl de Agarosa de bajo punto de fusión al 0,75% en PBS libre de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  con  $1 \times 10^5$  células, para favorecer la solidificación se incubó a 4°C durante 3 min cubierto con cubreobjetos.

Posteriormente, el cubreobjetos fue retirado y los portaobjetos con el montaje agarosa-células, fueron sumergidos en buffer de lisis recién preparado (NaCl 2,5M,

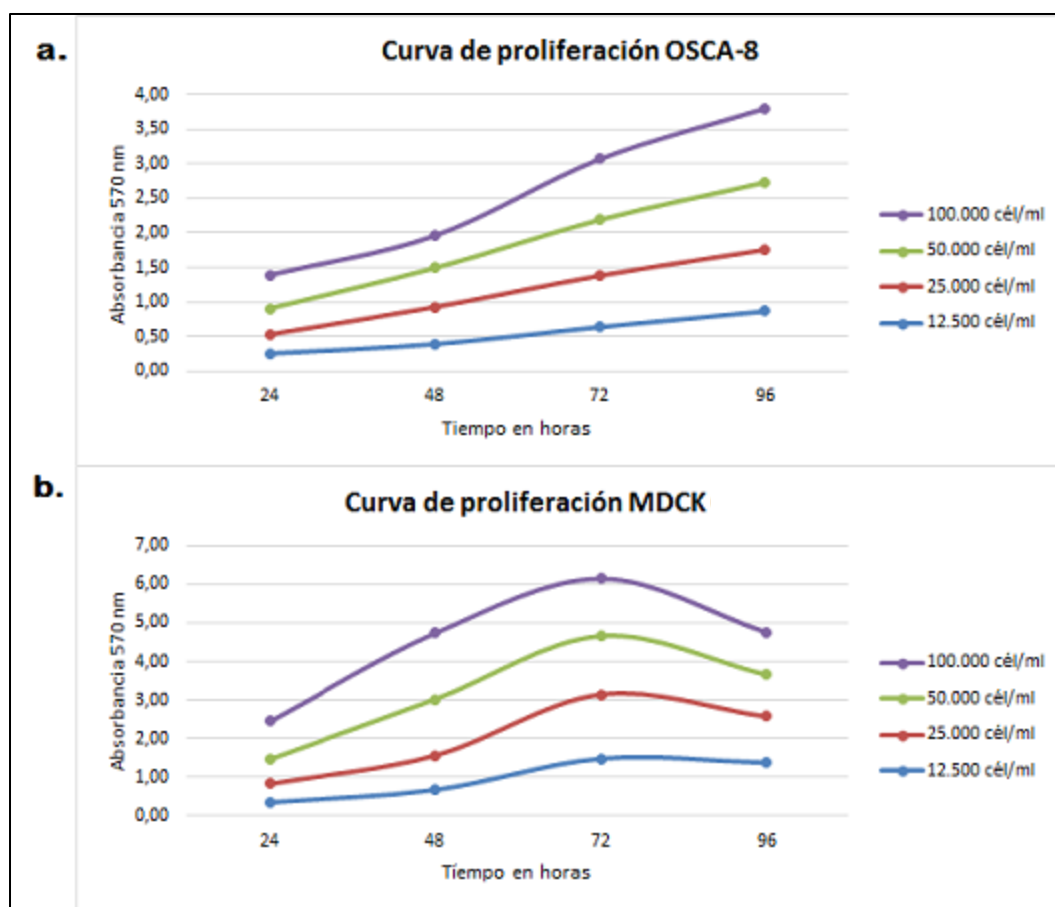
EDTA 100mM, Tris 10mM pH 10 y Triton X-100 al 1%) durante 1 hora a 4°C, luego los portaobjetos se lavaron cuidadosamente con un buffer de electroforesis alcalina (NaOH 300mM y EDTA 1mM, pH 13.5). Adicionalmente, para retirar el remanente de sales, los portaobjetos se sumergieron durante 30 minutos en la cámara de electroforesis horizontal llena con el buffer de electroforesis alcalina enfriado a 4°C, para permitir que el ADN se desenrollara completamente(108). La electroforesis se realizó durante 20 min a 25V y 300mA; terminada la electroforesis los portaobjetos se neutralizaron con Buffer (Tris 0,4 M, pH 7,5), con tres cambios cada uno durante 5 minutos, con el objetivo de eliminar los álcalis y los restos de detergentes. Finalmente, a cada montaje, se añadió 50uL de bromuro de etidio, para favorecer la visualización, y un cubreobjetos fue puesto para analizar directamente al microscopio de fluorescencia. Los cometas visibles se forman cuando los extremos rotos de la molécula de ADN cargada negativamente se liberan para migrar en el campo eléctrico hacia el ánodo (27).

Como control positivo de genotoxicidad se empleó Doxorrubicina a la dosis de IC<sub>50</sub> respectiva para cada línea celular, obtenida a partir del ensayo de citotoxicidad a las 48 horas post tratamiento, y como control negativo se emplearon células sin tratamiento es decir con DMEM suplementado únicamente.

4.8.7. Análisis estadístico. Los datos obtenidos en el experimento de proliferación celular se procesaron y graficaron en Excel; los datos del ensayo de citotoxicidad fueron procesados en Excel, graficados y analizados en el Software GraphPad Prism 7 al igual que el análisis de varianza ANOVA de dos vías considerando diferencias estadísticamente significativas con una P <0.05.

## 5. RESULTADOS

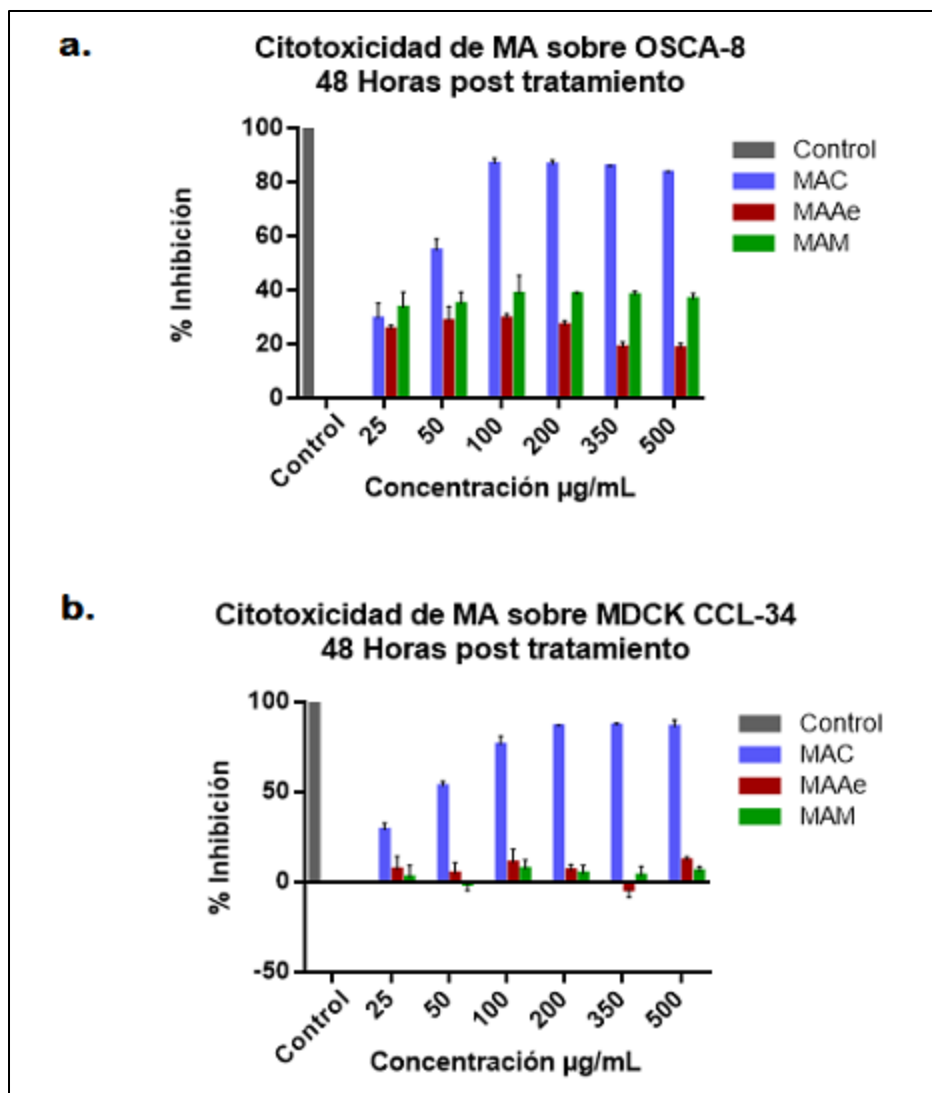
### 5.1. TASA DE PROLIFERACIÓN CELULAR



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

La concentración celular seleccionada fue de 25.000 células/ml para ambas líneas celulares, ya que se encuentran en fase exponencial a partir de las 48 horas y son viables al menos hasta las 72 horas.

## 5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

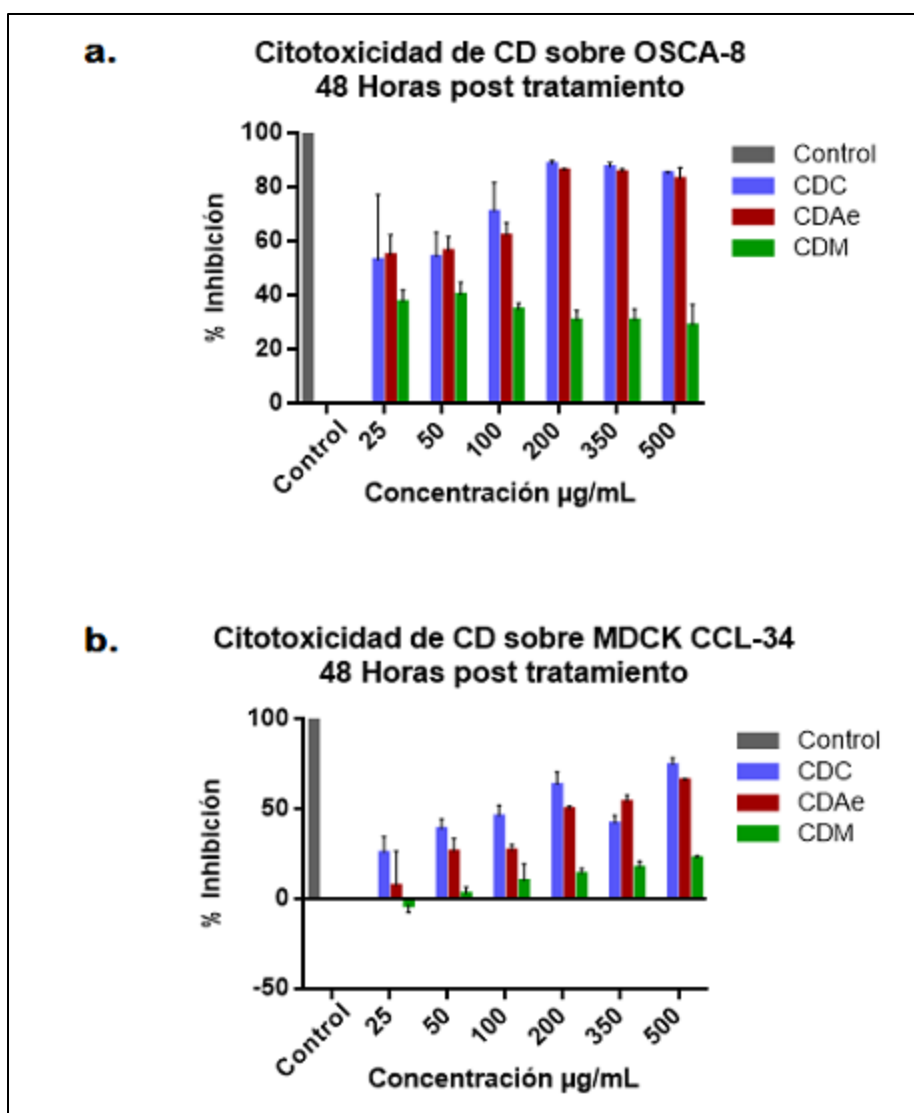


**Figura 9.** Evaluación de la actividad citotóxica de *Malachra alceifolia Jacq* (MA), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT. **a.** Citotoxicidad de los extractos de MA sobre OSCA-8 **b.** Citotoxicidad de los extractos de MA sobre MDCK. **MAC:** *Malachra alceifolia Jacq* cloroformo **MAAe:** *Malachra alceifolia Jacq* Acetato de etilo **MAM:** *Malachra alceifolia Jacq* Metanol. **Control:** Control positivo Doxorrubicina a una concentración 16 µM.

Al evaluar la actividad citotóxica de *Malachra alceifolia Jacq* en sus tres extractos a las 48 horas post tratamiento, se determinó que el extracto MAC ejerció inhibición de forma similar en ambas líneas celulares (hasta 87,22% en OSCA-8 y 87,46% en MDCK) mientras que los extractos MAAe y MAM inhibieron en un porcentaje más alto a las células OSCA-8 (hasta 29,71% y 38,89% respectivamente) en comparación con las células control MDCK (hasta 11,16% y 7,65% respectivamente).

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0.05$ .

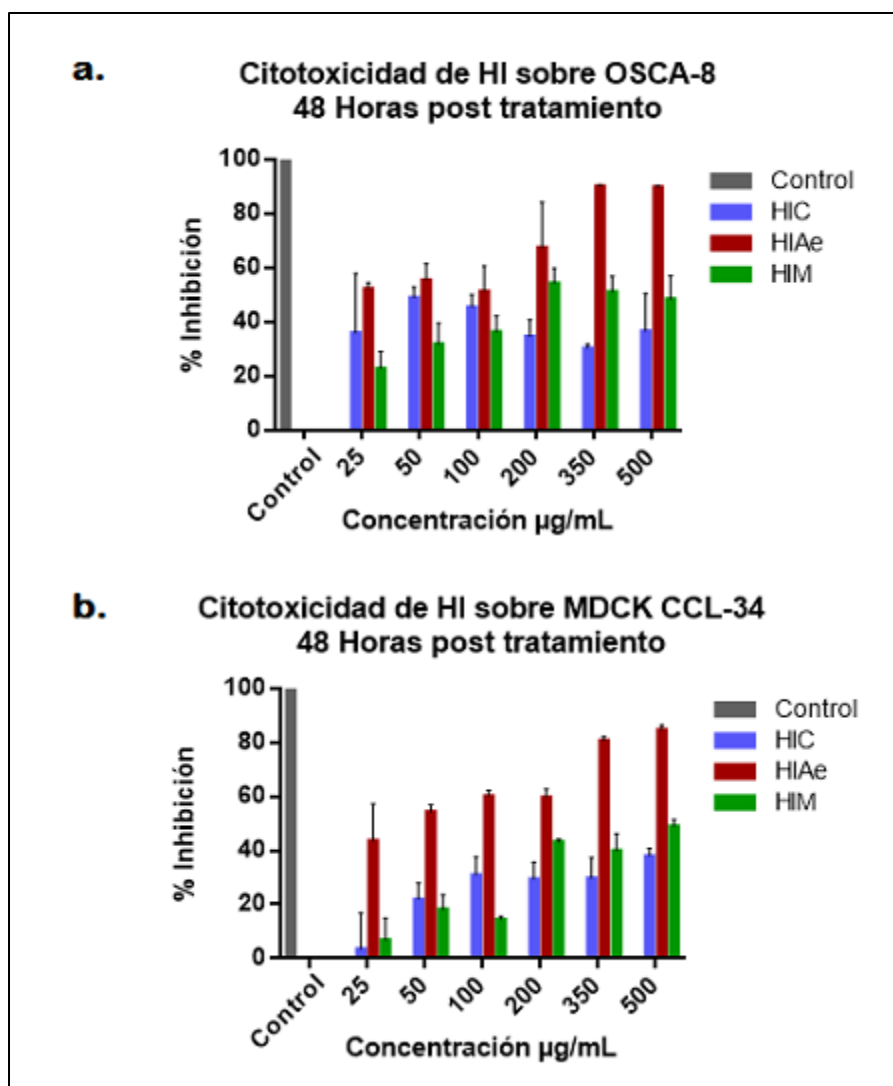




**Figura 10.** Evaluación de la actividad citotóxica de *Cordia dentata Poir* (CD), 48 horas post tratamiento empleando el método MTT. **a.** Citotoxicidad de los extractos de CD sobre OSCA-8 **b.** Citotoxicidad de los extractos de CD sobre MDCK. **CDC:** *Cordia dentata Poir* cloroformo **CDAe:** *Cordia dentata Poir* Acetato de etilo **CDM:** *Cordia dentata Poir* Metanol. **Control:** Control positivo Doxorubicina a una concentración 16 µM.

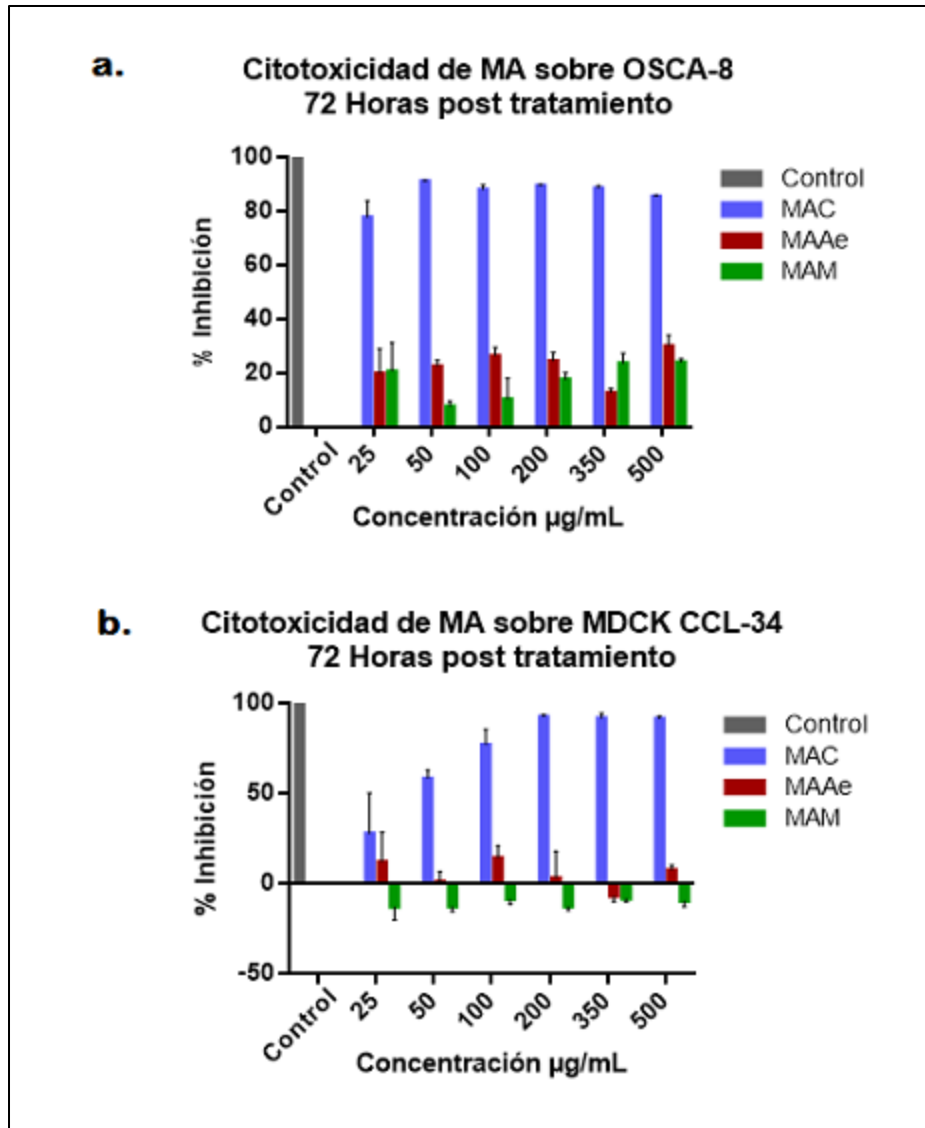
Con respecto a la actividad citotóxica de *Cordia dentata Poir* en sus tres extractos a las 48 horas post tratamiento, se determinó que los extractos CDC y CDAe inhibieron en un mayor porcentaje (hasta 88.55% y 86,28% respectivamente) a las células OSCA-8 en comparación con las células control MDCK (hasta 74,77% y 66,18% respectivamente). El extracto CDM inhibió las células OSCA-8 en todas las concentraciones (hasta 40,32%) mientras que las células control sólo fueron inhibidas a partir de la concentración 50 µg/mL y siempre en un menor porcentaje respecto a las células OSCA-8 (hasta 22,89%).

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0.05$ .



**Figura 11.** 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.

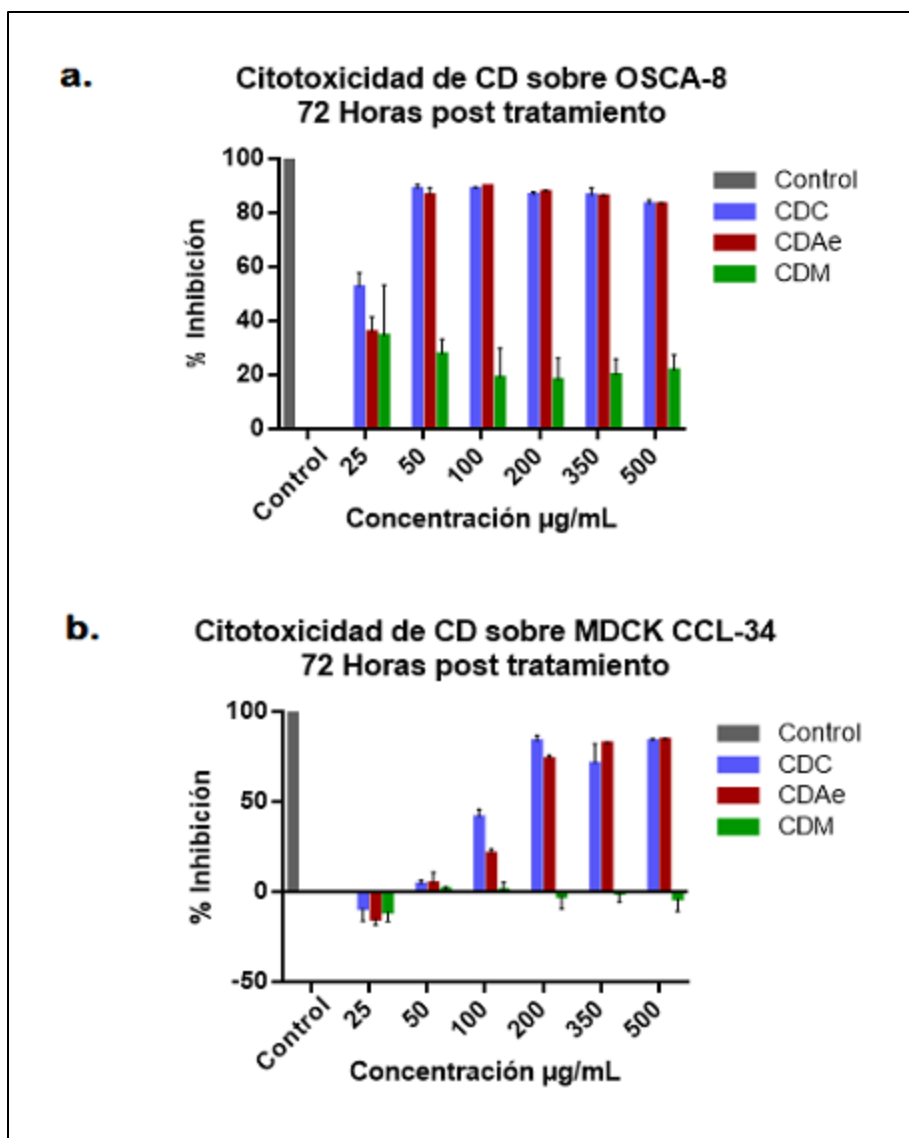
En cuanto a la actividad citotóxica de *Heliotropium indicum Linn* en sus tres extractos a las 48 horas post tratamiento, se determinó que los extractos HIC y HIM inhibieron en un mayor porcentaje las células OSCA-8 (hasta 48,95% y 54,26% respectivamente) en comparación con las células control MDCK (hasta 37,91% y 49,02% respectivamente) mientras que el extracto HIAe ejerció inhibición de forma similar en ambas líneas celulares (hasta 87,22% en OSCA-8 y 87,46% en MDCK). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0.05$ .



**Figura 12.** Evaluación de la actividad citotóxica de *Malachra alceifolia Jacq* (MA), 72 horas posttratamiento 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 **MAAe:** *Malachra alceifolia Jacq* Acetato de etilo **MAM:** *Malachra alceifolia Jacq* Metanol. **Control:** Control positivo Doxorubicina a una concentración 16 µM.

Al evaluar la actividad citotóxica de *Malachra alceifolia Jacq* en sus tres extractos a las 72 horas post tratamiento, se determinó que el extracto MAC ejerció inhibición de forma similar en ambas líneas celulares (hasta en 91,25% en OSCA-8 y 92,76% en MDCK). El extracto MAAe inhibió en un mayor porcentaje la línea celular OSCA-8 (hasta 30,12%) en comparación con las células control MDCK (hasta 14,41%) mientras que el extracto MAM inhibió únicamente la línea celular OSCA-8 (hasta 24,10%).

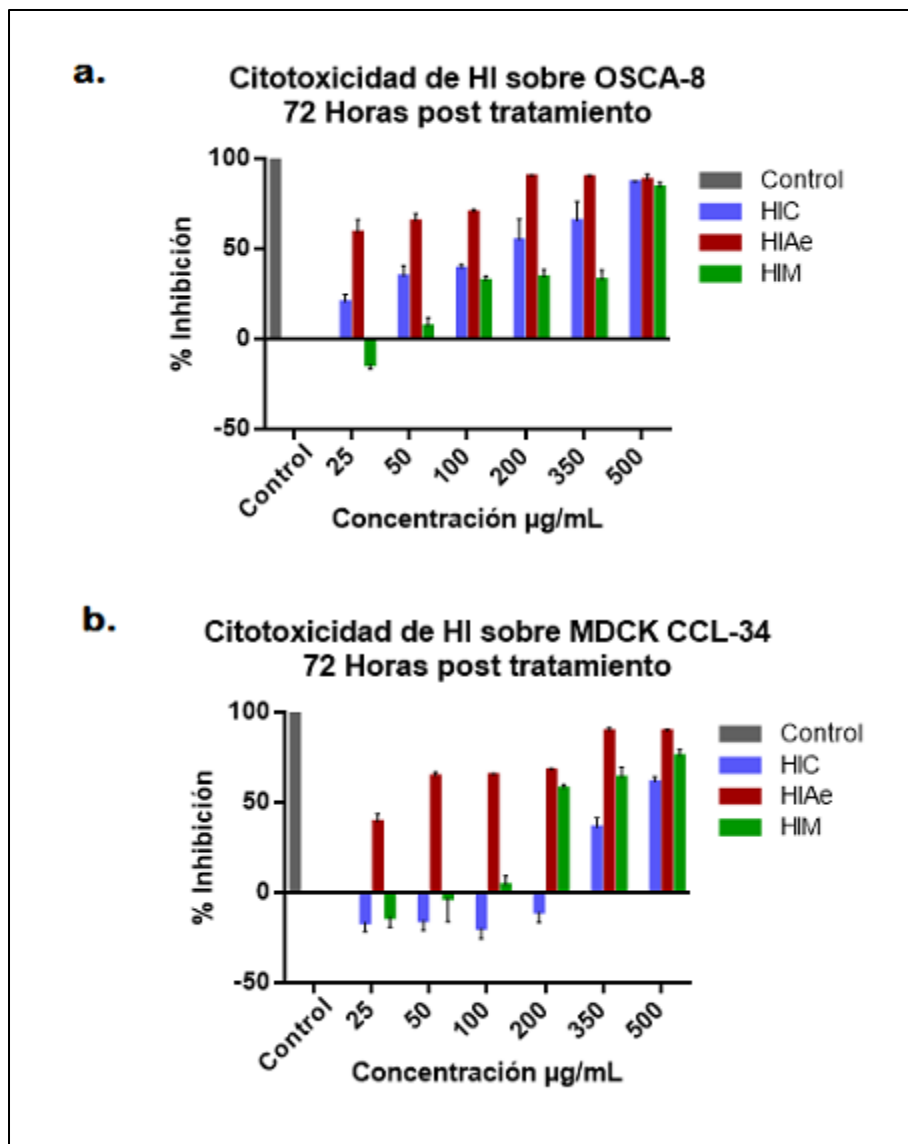
Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0.05$ .



**Figura 13.** 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  $\mu\text{M}$ .

Con respecto a la actividad citotóxica de *Cordia dentata Poir* en sus tres extractos a las 72 horas post tratamiento, se determinó que el extracto CDC inhibió las células OSCA-8 en todas las concentraciones (hasta 89,07%), mientras que las células control sólo fueron inhibidas a partir de la concentración 50  $\mu\text{g/mL}$  (hasta 84,08%). Del mismo modo, el extracto CDAe inhibió las células OSCA-8 en un mayor porcentaje (hasta 89,93%) y en todas las concentraciones, en comparación con las células control que solo fueron inhibidas a partir de la concentración 50  $\mu\text{g/mL}$  (hasta 84,79%). El extracto CDM inhibió únicamente las células OSCA-8 (hasta 34,64%).

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0.05$ .



**Figura 14.** Evaluación de la actividad citotóxica de *Heliotropium indicum* Linn (HI), 72 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.

En cuanto a la actividad citotóxica de *Heliotropium indicum* Linn en sus tres extractos a las 72 horas post tratamiento, se determinó que el extracto HIC inhibió las células OSCA-8 en todas sus concentraciones (hasta 87,30%) mientras que las células control MDCK sólo fueron inhibidas a partir de la concentración 350 µg/mL (hasta 61,60%). El extracto HIAe inhibió ambas líneas celulares de forma similar (hasta en 90,60% en OSCA-8 y 89,81%% en MDCK) mientras que el extracto HIM inhibió las

células OSCA-8 a partir de la concentración 50 µg/mL (hasta 84,24%) y las células control a partir de 100µg/mL (hasta 76,0%).

Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0.05$ .

### 5.3. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (IC<sub>50</sub>)

El cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) se determinó a partir de los porcentajes de inibición; estos resultados se resumen en la tabla 3:

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

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

**Tabla 3.** Citotoxicidad en términos de dosis IC<sub>50</sub> para cada extracto empleado a 48 y 72 horas de tratamiento sobre las líneas celulares OSCA-8 y MDCK. El guion (-) empleado en algunas casillas indica imposibilidad en la obtención de la IC<sub>50</sub>.

Los resultados obtenidos en la determinación de la IC<sub>50</sub> permitieron determinar los extractos con mejor comportamiento: aquellos cuya dosis IC<sub>50</sub> frente a las células cancerígenas OSCA-8 fuera menor a la requerida para inhibir el 50% de la población celular en las células MDCK empleadas como control de tratamiento.

Los extractos que presentaron el comportamiento esperado fueron CDAe y HIM. Para el extracto CDAe, la IC<sub>50</sub> frente las células OSCA-8 fue de 22,38±7.46 µg/ml y 29,24±7.46 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente mientras que

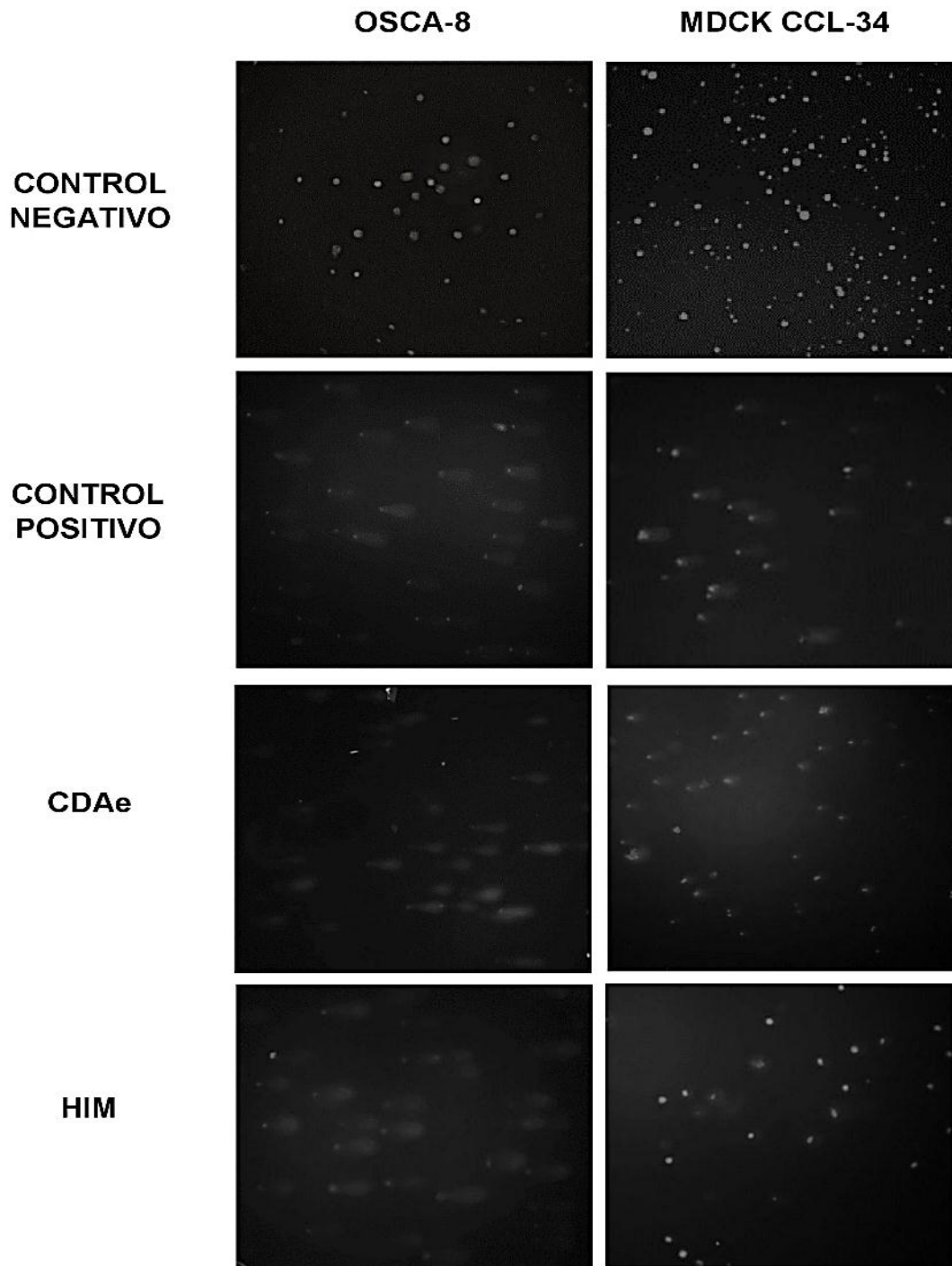
para el extracto HIM la  $IC_{50}$  frente las células OSCA-8 fue de  $173,38 \pm 7.54$   $\mu\text{g/ml}$  y  $222,08 \pm 6.59$   $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas post tratamiento.

En las células MDCK, el extracto CDAe obtuvo una  $IC_{50}$  de  $243,22 \pm 2.99$   $\mu\text{g/ml}$  y  $158,12 \pm 2.67$   $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente mientras que en el extracto HIM la  $IC_{50}$  frente las células control fue de  $524,81 \pm 10.11$   $\mu\text{g/ml}$  y  $247,68 \pm 3.57$   $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente.

Es importante resaltar que en algunos extractos fue imposible calcular dicha concentración ya que no se llegó a inhibir el 50% de las poblaciones celulares ni se empleó un rango amplio de concentraciones de los extractos que permitieran su obtención.

#### **5.4. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA. ENSAYO DE COMETA**

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad genotóxica sugieren que tanto el extracto CDAe como el extracto HIM ejercen daño en el ADN de la línea celular OSCA-8 y de mayor proporción en comparación con el efecto causado en la línea celular control MDCK, pues se observa la formación de cometas con colas bien definidas. En esta última línea celular se observó la formación de cometas mucho más cortos que sugieren el escaso daño en el ADN de las células MDCK ejercido por ambos extractos.



**Figura 15.** 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  $\mu$ M. **CDAe:** *Cordia dentata* Poir Acetato de etilo  $IC_{50}$  22,38  $\mu$ g/ml. **HIM:** *Heliotropium indicum* Linn Metanol  $IC_{50}$  173,38  $\mu$ g/ml



## 6. DISCUSIÓN

Al determinar que los extractos vegetales tienen efecto citotóxico sobre la línea celular cancerígena OSCA-8 y en menor proporción en la línea celular empleada como control del tratamiento MDCK, se acepta la hipótesis alterna que establece que los extractos vegetales obtenidos de las plantas *Malachra alceifolia* Jacq, *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn tienen efecto citotóxico sobre la línea celular de osteosarcoma canino OSCA-8.

En la obtención de extractos vegetales se realizan extracciones con solventes orgánicos donde se incluyen compuestos polares, como el agua, con el fin de extraer los compuestos fitoquímicos de las plantas (20). En esta investigación se emplearon solventes con polaridad creciente, como cloroformo, acetato de etilo y metanol, ya que tienen como ventaja fijar los compuestos fitoquímicos de los extractos, para cada una de las tres plantas obteniendo un total de nueve extractos.

Los extractos vegetales mostraron una 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). En cuanto a la línea celular OSCA-8 se demostró que el extracto CDAe ejerció inhibición con una  $IC_{50}$  de 22,38  $\mu\text{g/ml}$  y 29,24  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente mientras que el extracto HIM ejerció inhibición en esta línea celular con una  $IC_{50}$  de 173,38  $\mu\text{g/ml}$  y 222,08  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente. En las células empleadas como control de citotoxicidad MDCK se observó que la concentración de extractos vegetales requerida para inhibir su crecimiento fue mucho mayor en comparación a la requerida para inhibir las células cancerígenas: el extracto CDAe inhibió la línea celular control con una  $IC_{50}$  de 243,22  $\mu\text{g/ml}$  y 158,12  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente mientras que el extracto de HIM ejerció inhibición con una  $IC_{50}$  de 524,81  $\mu\text{g/ml}$  y 247,68  $\mu\text{g/ml}$  a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente. Los extractos con mejor comportamiento se determinaron teniendo en cuenta su selectividad, es decir que fueron seleccionados aquellos que presentaron actividad citotóxica (en términos de porcentaje de inhibición y teniendo en cuenta la  $IC_{50}$ ) sobre la línea celular

cancerígena a concentraciones que no resultaran citotóxicas para las células empleadas como control.

Los extractos que no fueron seleccionados ejercieron actividad citotóxica sobre ambas líneas celulares. Es importante resaltar que en los extractos donde se empleó el cloroformo como solvente, por ejemplo, los extractos MAC y CDC, se evidenció el efecto citotóxico más potente tanto en la línea celular cancerígena como en la línea celular empleada como control. Ambos extractos fueron capaces de inhibir las dos líneas celulares en las seis concentraciones empleadas tanto a las 48 como a las 72 horas de exposición al tratamiento, exceptuando a CDC en las células MDCK donde se evidenció el efecto citotóxico o inhibitorio a partir de la concentración 50µg/ml a las 72 horas post tratamiento.

Un extracto vegetal es considerado un extracto ideal cuando la concentración inhibitoria 50 - IC<sub>50</sub> no supera los 100 µg/ml (21,27). Sin embargo, aunque los resultados obtenidos en esta investigación arrojaron valores de IC<sub>50</sub> superiores en algunos casos, fue posible demostrar la actividad citotóxica de los extractos seleccionados como los mejores, obteniendo resultados prometedores evidenciados en el ensayo de cometa.

*Malachra alceifolia Jacq* en solvente cloroformo muestra un comportamiento agresivo en las dos líneas celulares siendo el solvente de menor polaridad. Sus extractos en solventes Acetato de etilo y metanol acidificado (MAAe, MAM) se comportaron de manera similar inhibiendo en mayor proporción las células cancerígenas OSCA-8 en comparación con las células control MDCK. Sin embargo, los porcentajes de inhibición no llegaron al 50% por lo que no fue posible calcular la IC<sub>50</sub> determinando así que los resultados no se consideran representativos. La citotoxicidad de *Malachra alceifolia Jacq* no ha sido descrita, a pesar de ello, algunos ejemplares de la familia Malvaceae se han estudiado por su efecto citotóxico. *Sida rhombifolia*, una especie de la familia mostró actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cáncer de estómago SNU-1 y de hepatocarcinoma humano Hep-G2 con resultados dependientes de la polaridad empleando como solventes hexano, acetato de etilo y metanol. La citotoxicidad mostró ser más fuerte empleando solventes menos polares, es decir, el extracto con solvente hexano exhibió el efecto más potente con un porcentaje inhibición de 68,52% y el 47,82% sobre las líneas celulares SNU-1 y Hep-

G2 respectivamente, tal como se observa en el presente trabajo, los compuestos fitoquímicos como los triterpenos podrían explicar el efecto citotóxico de la planta *S. rhombifolia* (109). *Alcea rosea* L, otro ejemplar de la familia, evidenció actividad citotóxica sobre la línea celular de hepatocarcinoma humano Hep-G2 al emplear extractos obtenidos de sus hojas. Se comprobó que los flavonoides obtenidos del extracto alcohólico son los responsables de causar la citotoxicidad (26).

En estas investigaciones se demuestra que el efecto citotóxico de las plantas de dicha familia se debe principalmente a sus componentes fitoquímicos. Estos resultados en conjunto sugieren que *Malachra alceifolia* Jacq puede poseer componentes similares a los de estas plantas responsables de su actividad citotóxica, convirtiéndola en una planta promisoría con posible actividad anticancerígena.

Al menos en nuestro conocimiento, no existen estudios donde se evalúe la actividad citotóxica de *Cordia dentata* Poir con los que se pudiera realizar una comparación de resultados. Sin embargo, existen investigaciones donde se evaluó la actividad citotóxica de plantas del género *Cordia* que permiten realizar una comparación entre extractos con solventes idénticos a los empleados en la presente investigación.

Los resultados encontrados para el extracto CDAe guardan relación con lo que afirman Usmani y colaboradores (110), quienes evaluaron el potencial de estrés oxidativo y la actividad citotóxica de extractos de las semillas de *Cordia dichotoma* sobre las líneas celulares de adenocarcinoma cervical humano - HeLa y cáncer de pulmón humano - A549 empleando como solventes cloroformo, acetato de etilo y agua para la obtención de los extractos. En esta investigación las concentraciones empleadas fueron 25, 50, 100 y 250 µg/ml y la actividad citotóxica de los extractos se determinó a las 24 horas post tratamiento empleando el método MTT. En esta investigación se determinó que el extracto con solvente Acetato de Etilo mostró una reducción significativa de la viabilidad celular de 80.45, 55.54 y 42.78 % a las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/ml respectivamente sobre la línea celular HeLa (Con una IC<sub>50</sub> de 63.10 µg/mL) mientras que en la línea celular A549 mostró una reducción significativa en la viabilidad celular de 83.94, 66.78 y 54.78 % a las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/ml respectivamente (Con una IC<sub>50</sub> de 128.82 µg/mL). En la presente investigación, el extracto CDAe exhibió un aumento en la inhibición celular (sobre la línea celular OSCA-8) de 54.90, 56.53 y 62.15 % a las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/ml respectivamente (Con una IC<sub>50</sub> de 22,38

µg/mL) a las 48 horas post tratamiento y de 36.0, 86.73 y 89.93 % a las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/ml respectivamente (Con una IC<sub>50</sub> de 29,24 µg/mL) a las 72 horas post tratamiento. Los resultados hallados en esta investigación guardan relación con la investigación citada pues tanto el extracto de *Cordia dentata Poir* como el extracto de *Cordia dichotoma*, ambos en solvente acetato de etilo, ejercieron actividad citotóxica de forma dosis dependiente, es decir, que a mayor concentración del extracto, mayor porcentaje de inhibición o menor porcentaje de viabilidad se presentaba a pesar de que el tiempo de exposición al tratamiento fue distinto entre investigaciones.

Las investigaciones difirieron en que los extractos fueron obtenidos de partes diferentes de las plantas (en la investigación citada el extracto fue obtenido a partir de las semillas de *Cordia dichotoma* mientras que en la presente investigación los extractos se obtuvieron a partir de las hojas de *Cordia dentata Poir*), en los tipos de líneas celulares empleadas, en el tiempo de exposición a los extractos y a las especies vegetales estudiadas cuyos resultados de actividad citotóxica permiten concebir a *Cordia dentata poir* como una planta promisoría cuyo extracto en solvente acetato de etilo podría usarse para el tratamiento no sólo del osteosarcoma sino de muchos otros tipos de cáncer.

Los resultados encontrados para el segundo extracto con mejor comportamiento guardan relación con lo que sostienen Sivajothi y colaboradores.(21), quienes demostraron el efecto citotóxico *in vitro* de los extractos metanólicos de tallos y hojas de *Heliotropium indicum Linn* sobre la línea celular HeLa a las 48 horas post tratamiento empleando el método MTT. De los dos extractos empleados, el obtenido a partir del tallo presentó actividad citotóxica más efectiva (porcentaje relativo de inhibición de 64.52% y 16.11% empleando dosis de 200 y 1000 µg/ml respectivamente) en comparación al extracto obtenido de las hojas (porcentaje relativo de inhibición de 49.67% y 14.82% empleando dosis de 200 y 400 µg/ml respectivamente). En la presente investigación, el extracto metanólico de *Heliotropium indicum Linn* fue obtenido a partir de las hojas de la planta, lo que permite determinar que la actividad citotóxica de este extracto fue más efectiva (porcentaje de inhibición de 54,26% sobre la línea celular OSCA-8 empleando una dosis de 200 µg/ml) en comparación con lo reportado para este mismo tipo de extracto en la investigación citada.

En lo que difiere la investigación de los autores referidos con la presente, es que se menciona que tanto el extracto obtenido del tallo como el obtenido de las hojas, presentaron una actividad citotóxica inversamente dependiente de la dosis. En la presente investigación, la actividad citotóxica del extracto HIM se presentó directamente dependiente de la dosis, es decir que, a mayor concentración del extracto, mayor actividad citotóxica. Esta situación puede deberse en a que el tipo de línea celular empleada es diferente entre investigaciones y esto implica que el comportamiento biológico y de respuesta al tratamiento sea distinto.

La actividad citotóxica de los extractos acuoso y etanólico de *Heliotropium indicum* Linn fue determinada sobre líneas celulares de cáncer de pulmón humano A549 y NCI-H226 empleando concentraciones de 1, 10, 50 y 100 µg/ml donde el extracto acuoso no mostró ningún efecto, mientras que el extracto etanólico evidenció actividad citotóxica únicamente sobre la línea celular NCI-H226 con una IC<sub>50</sub> 51,90µg/ml (21). En este caso resulta interesante que existan estudios en líneas celulares de cáncer de pulmón pues este es el órgano que más se ve afectado cuando el osteosarcoma produce metástasis.

Estos resultados fueron similares a los encontrados en la esta investigación para el extracto HIC, el cual inhibió las células OSCA-8 en todas sus concentraciones mientras que las células control MDCK sólo fueron inhibidas a partir de la concentración 350 µg/mL a las 72 horas post tratamiento.

Subhabrata y colaboradores (27), evaluaron el efecto citotóxico de los extractos en solvente acuoso, cloroformo y hexano de *Heliotropium indicum* Linn sobre líneas celulares de carcinoma de cérvix HeLa, SiHa, y C33A. El extracto cloroformo arrojó una IC<sub>50</sub> de 155, 125 y 375 µg/mL para cada línea celular respectivamente, sin embargo, dicho efecto se evaluó a las 24 horas post tratamiento. En el presente estudio, la citotoxicidad fue evaluada a las 48 y 72 horas post tratamiento, por lo tanto, se puede inferir que la citotoxicidad causada por los extractos es evidente a corto y largo tiempo de exposición.

Estos resultados evidencian la actividad citotóxica de las plantas aun cuando se usan extractos con solventes de polaridad menor. Se puede apreciar que el comportamiento de los extractos va sujeto al tipo de línea celular como se observó en los estudios ya mencionados y que los solventes utilizados pueden relacionarse con

el efecto citotóxico de los extractos al ser capaces de concentrar compuestos como los metabolitos secundarios según su polaridad (20).

La actividad anticancerígena causada por metabolitos secundarios presentes en las plantas ha sido recientemente estudiada. Compuestos fitoquímicos como los flavonoides han sido descritos como agentes quimioterapéuticos que muestran efectos puntuales en las células cancerígenas tales como: la regulación de p53 mutante, la detención del ciclo celular, la inhibición de la tirosina quinasa y de las proteínas de choque térmico (111). Los compuestos terpenoides también han mostrado capacidad para prevenir la tumorigénesis, inhibir la proliferación de células cancerosas, la metástasis y la angiogénesis así como inducir la apoptosis, la diferenciación y la detención del ciclo celular (112).

La actividad citotóxica de las plantas está directamente relacionada con los componentes bioactivos presentes en cada una de ellas; la caracterización fitoquímica de *Cordia dentata* Poir y *Heliotropium indicum* Linn realizada por Beltrán y colaboradores (113) mostró la presencia de los componentes mencionados anteriormente y su relación con la actividad anticancerígena. Sin embargo, se requieren más estudios que caractericen fitoquímicamente cada parte de las tres plantas estudiadas. *Malachra alceifolia* Jacq es la única planta que no presenta caracterización fitoquímica, por lo menos en lo revisado en la literatura.

Como prueba complementaria en la evaluación de la actividad citotóxica de las tres plantas estudiadas, se realizó el ensayo de cometa con el fin de evaluar el daño ejercido por los extractos vegetales empleados en el material genético de las líneas celulares OSCA-8 y MDCK. En esta prueba se evaluaron los extractos que presentaron mejor comportamiento: CDAE y HIM, obteniendo resultados que sugieren genotoxicidad ya que fue posible la observación de cometas en la fase final de la prueba. Los resultados obtenidos sugieren que tanto el extracto CDAe como el HIM ejercen un 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. En esta última se observó la formación de cometas mucho más cortos que sugieren el escaso daño en el ADN de las células MDCK ejercido por ambos extractos; un efecto genotóxico similar se observó en la investigación realizada por Subhabrata y colaboradores (27) donde se demostró que el extracto de *H. indicum* en

solvente cloroformo fue capaz de dañar el material genético de la línea celular HeLa.

Aunque los resultados obtenidos en la prueba sugieren genotoxicidad, demuestran la capacidad de *Heliotropium indicum* Linn y *Cordia dentata* Poir para inducir daño en el ADN de células tumorales.

A lo largo de este proceso investigativo se presentaron algunas limitaciones que impidieron la obtención de ciertos resultados, por ejemplo las concentraciones empleadas de los extractos para el tratamiento celular no permitieron determinar la concentración inhibitoria 50 de algunos extractos vegetales determinando que son resultados no representativos; el extracto CDC no se logró manipular adecuadamente, ya que su consistencia hacía difícil el pipeteo y no se garantiza la confiabilidad de los resultados tanto del porcentaje de inhibición como en la determinación de la IC<sub>50</sub>.

Por otro lado, no fue posible determinar cuantitativamente la genotoxicidad causada por los extractos vegetales pues no se contó con el software especializado para dicho análisis. Sin embargo, los resultados obtenidos son prometedores por su acción contra las células cancerígenas.

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten determinar que al menos dos de los extractos vegetales estudiados (CDAe y HIM) ejercen actividad citotóxica sobre la línea celular de Osteosarcoma canino OSCA-8, lo que permite valorar este comportamiento como un avance en la investigación o búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para el osteosarcoma, teniendo en cuenta que esta es una línea celular que actúa como modelo biológico del osteosarcoma humano. Sin embargo, se requiere la realización de otras investigaciones que determinen la utilidad real de estos extractos vegetales al evaluar su actividad citotóxica *in vivo*.

Es importante resaltar que este estudio es innovador ya que al menos en nuestro conocimiento no se han realizado estudios previos donde se evaluara el efecto citotóxico o genotóxico de las tres especies vegetales estudiadas sobre líneas celulares de Osteosarcoma.

## 7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se determinó la concentración óptima a cultivar de las líneas celulares OSCA-8 y MDCK para los experimentos subsiguientes que según la curva de proliferación celular correspondió a 25.000 células/mL para las dos líneas celulares estudiadas.

En general se evidenció que los extractos vegetales poseen actividad citotóxica dosis dependiente, es decir, que a mayor concentración del extracto mayor es la inhibición celular (en términos de porcentaje de inhibición), 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, según otros estudios el solvente actúa por polaridades y su efecto está directamente relacionado con la composición fitoquímica de la planta.

Los porcentajes de inhibición varían entre líneas celulares; el efecto citotóxico se evidencia más en las células cancerosas que en las células normales, lo cual abre paso a investigaciones futuras.

La concentración inhibitoria 50 - IC<sub>50</sub> se calculó para cada extracto a las 48 y 72 horas post tratamiento estableciéndose como uno de los factores que permitieron elegir los extractos con mejor comportamiento. En cuanto a la línea celular OSCA-8 se demostró que el extracto CDAe ejerció inhibición con una IC<sub>50</sub> de 22,38 µg/ml y 29,24 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente mientras que el extracto HIM ejerció inhibición en esta línea celular con una IC<sub>50</sub> de 173,38 µg/ml y 222,08 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente. En las células empleadas como control de citotoxicidad se observó que la concentración de extractos vegetales requerida para inhibir su crecimiento fue mucho mayor en comparación a la requerida para inhibir las células cancerígenas: el extracto CDAe inhibió la línea celular control con una IC<sub>50</sub> de 243,22 µg/ml y 158,12 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente mientras que el extracto de HIM ejerció inhibición con una IC<sub>50</sub> de 524,81 µg/ml y 247,68 µg/ml a las 48 y 72 horas post tratamiento respectivamente.



Sin embargo, en algunos extractos fue imposible calcular dicha concentración ya que no se obtuvo un porcentaje de inhibición del 50%, por esta razón se sugiere emplear dosis en un rango más amplio con el fin de obtener valores que permitan el cálculo de la IC<sub>50</sub>.

En el ensayo de cometa, los resultados obtenidos sugieren que tanto el extracto CDAe como el HIM ejercen un 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.

## 8. RECOMENDACIONES

Obtener los extractos de diferentes partes de las plantas a estudiar, debido a que los compuestos bioactivos suelen estar presentes en diferentes partes de las mismas y a distintas concentraciones, así como lo muestran diversos estudios donde obtuvieron resultados favorables empleando extractos obtenidos de partes diferentes de las plantas. Este es un factor que también puede variar según la especie vegetal.

Realizar la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos vegetales estudiados en distintos tipos de líneas celulares ya que la respuesta al tratamiento puede ser distinta según el mecanismo biológico. De esta manera se buscarían nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de otros tipos de cáncer.

Realizar la caracterización fitoquímica de las especies vegetales estudiadas ya que las investigaciones son escasas y dichas caracterizaciones no se ha establecido completamente; una caracterización fitoquímica completa podría permitir el estudio de metabolitos secundarios con posible actividad anticancerígena.

Emplear técnicas que puedan evaluar la actividad antitumoral de los extractos vegetales, ya sea por citotoxicidad, por 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

1. Winslow LC, Kroll DJ. Herbs as medicines. *Arch Intern Med.* 1998;158(20):2192–9.
2. Bardia A, Nisly NL, Zimmerman B, Gryzlak BM, Wallace RB. Use of Herbs Among Adults Based on Evidence-Based Indications: Findings From the National Health Interview Survey. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(5):561–6.
3. Merriam Webster. Herb [Internet]. Herb. 2019 [cited 2019 Feb 8]. Available from: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/herb>
4. Real Academia Española. Hierba [Internet]. Definición de hierba - Diccionario de la lengua española - Edición del Tricentenario. 2018 [cited 2019 Feb 8]. Available from: <https://dle.rae.es/?id=KMZGtT3>
5. De Smet P. Herbal remedies. *N Engl J Med.* 2002;347(25):2046–56.
6. Muñoz E, Hoyos Y, Calambás F. Hepatotoxicidad asociada al consumo de Árnica. Reporte de un caso. 2010.
7. Bade R, Chan HF, Reynisson J. Characteristics of known drug space. Natural products, their derivatives and synthetic drugs. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2010;45(12):5646–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.018>
8. Giraldo S, Bernal M, Morales A, Pardo A, Gamba L. Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá, D.C. *Nova* [Internet]. 2015;13(23):73–80. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n23/v13n23a07.pdf>
9. Patel SR. Capítulo 87: Sarcomas de los tejidos blandos y metástasis óseas. In: *Harrison Principios de Medicina Interna* [Internet]. 20th ed. McGraw-Hill; 2018 [cited 2019 Feb 8]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/content.aspx?sectionid=203645569&bookid=2461&jumpsectionID=203645614&Resultclick=2#1158790144>
10. Schimmel KJM, Richel DJ, van den Brink RBA, Guchelaar HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(2):181–91.
11. Leite ML, da Cunha NB, Costa FF. Antimicrobial peptides, nanotechnology, and natural metabolites as novel approaches for cancer treatment. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;183(October 2017):160–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.010>

12. Morello E, Martano M, Buracco P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: Similarities and differences with human osteosarcoma [Internet]. Vol. 189, Veterinary Journal. Elsevier Ltd; 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.08.014>
13. Remon Masip J, Lianes Barragán P. Medicinas complementarias en oncología. Aten Primaria [Internet]. 2007;39(1):5–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0212-6567\(07\)70825-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0212-6567(07)70825-9)
14. Ranieri G, Gadaleta CD, Patruno R, Zizzo N, Daidone MG, Hansson MG, et al. A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. Crit Rev Oncol Hematol [Internet]. 2013;88(1):187–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.03.005>
15. Al-Khan AA, Gunn HJ, Day MJ, Tayebi M, Ryan SD, Kuntz CA, et al. Immunohistochemical Validation of Spontaneously Arising Canine Osteosarcoma as a Model for Human Osteosarcoma. J Comp Pathol [Internet]. 2017;157(4):256–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.07.005>
16. Jaramillo-García V, Trindade C, Lima E, Guecheva TN, Villela I, Martinez-Lopez W, et al. Chemical characterization and cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of Baccharis trinervis (Lam, Persoon) from Colombia and Brazil. J Ethnopharmacol [Internet]. 2018;213(July 2017):210–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.027>
17. Popoca J, Aguilar A, Alonso D, Villarreal ML. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. J Ethnopharmacol. 1998;59(3):173–7.
18. Parisotto EB, Michielin EMZ, Biscaro F, Ferreira SRS, Filho DW, Pedrosa RC. The antitumor activity of extracts from Cordia verbenacea D.C. obtained by supercritical fluid extraction. J Supercrit Fluids [Internet]. 2012;61:101–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.08.016>
19. Sivajothi V, D SS, Sajini RJ. Cytotoxic effect of heliotropium indicum extracts on Hela cell lines. Int J Pharm Pharm Sci [Internet]. 2015 Apr 15 [cited 2018 Sep 15];7(6):412–4. Available from: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/4549/7177>
20. García R, Fajardo OR, Serna SO, Altamirano J, Cardineau GA. Cancer cell specific cytotoxic effect of Rhoeo discolor extracts and solvent fractions. J

- Ethnopharmacol [Internet]. 2016;190:46–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.051>
21. Chunthornng-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>
  22. Ogbole OO, Segun PA, Adeniji AJ. In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):1–10.
  23. Wang Y, Zhu Y, Xiao L, Ge L, Wu X, Wu W, et al. Meroterpenoids isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. and their cytotoxic activity in human hepatocellular carcinoma cells. *Fitoterapia* [Internet]. 2018;131(September):236–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.11.005>
  24. Notarbartolo M, Zito P, Bruno M, Sajeva M, Maggio A, Labbozzetta M, et al. Chemical composition, in vitro antitumor and pro-oxidant activities of *Glandora rosmarinifolia* (Boraginaceae) essential oil. *PLoS One*. 2018;13(5):e0196947.
  25. Mah SH, Teh SS, Ee GCL. Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of *Sida Rhombifolia*. *Pharm Biol*. 2017;55(1):920–8.
  26. Abdel-salam NA, Ghazy NM, Sallam SM, Radwan MM, Wanas AS, ElSohly MA, et al. Flavonoids of *Alcea rosea* L. and their immune stimulant, antioxidant and cytotoxic activities on hepatocellular carcinoma HepG-2 cell line. *Nat Prod Res* [Internet]. 2018;32(6):702–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332602>
  27. 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.
  28. Hernández Chávez A. Farmacología general. Una guía de estudio. In: *Farmacología general Una guía de desarrollo* [Internet]. Primera ed. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.; 2014 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/content.aspx?bookid=1489&sectionid=96949060>
  29. Jiménez Reyes MN. Ibugana Boletín del instituto de botánica. boletin ibug. 2004;17–42.

30. Fryxell, P.A. Bernal, R. SRG& MC. Universidad Nacional de Colombia: Resultados de la Búsqueda [Internet]. [cited 2019 Apr 4]. Available from: <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/es/resultados/genero/malachra/>
31. Universidad Nacional de Colombia: Colecciones. COL000260479 - *Malachra alceifolia* Jacq. - Malvaceae [Internet]. 2012 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/603420/>
32. TRAMIL. *Malachra alceifolia* [Internet]. TRAMIL Programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe. 2017 [cited 2019 Feb 12]. Available from: <http://www.tramil.net/es/plant/malachra-alceifolia>
33. Fryxell PA. Malvaceae. In: Flora de Veracruz. 1845. p. 103–54.
34. 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>
35. Universidad Nacional de Colombia. COL000139850 - *Malachra alceifolia* Jacq. - Malvaceae [Internet]. Universidad Nacional de Colombia: Colecciones. 2016 [cited 2019 Feb 12]. Available from: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/243695/>
36. Matias EFF, Alves EF, Silva MK do N, Carvalho VR de A, Coutinh HDM, da Costa JGM. The genus *Cordia*: Botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. *Brazilian J Pharmacogn* [Internet]. 2015;25(5):542–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.012>
37. Universidad Nacional de Colombia: Colecciones. COL000110709 - *Cordia dentata* Poir. - Boraginaceae [Internet]. 2007 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/6834/>
38. TRAMIL. *Cordia dentata* [Internet]. TRAMIL Programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe. 2017 [cited 2019 Feb 12]. Available from: <http://www.tramil.net/es/plant/cordia-dentata>
39. Cordero J (Jesús), Boshier D, Barrance A, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza., Oxford Forestry Institute., Great Britain. Forestry Research Programme. *Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza; 2003. 1079 p.

40. Núñez P, Mejía L, Yacamán L, Padilla L, Coello A, Ferrari J, et al. Identification of secondary metabolites present in fresh fruits of *Cordia dentata* Boraginaceae. Portal la Cienc [Internet]. 2015 Feb 22 [cited 2018 Sep 15];6(0):54–61. Available from: <http://www.lamjol.info/index.php/PC/article/view/1842>
41. Cuba. Comisión Nacional Asesora en Investigaciones de Plantas Medicinales. CE, Díaz Castillo F, Gómez Estrada H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. Rev Cuba Plantas Med [Internet]. 1996 [cited 2018 Sep 15];18(4):619–31. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000400013&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400013&lng=es)
42. Smithsonian Tropical Research Institute. *Cordia dentata* [Internet]. Árboles del Parque Nacional Sarigua y las Áreas Secas de los Alrededores. [cited 2019 Feb 12]. Available from: <https://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/sarigua/species/37>
43. Marini G, Graikou K, Zengin G, Karikas GA, Gupta MP, Chinou I. Phytochemical analysis and biological evaluation of three selected *Cordia* species from Panama. Ind Crops Prod [Internet]. 2018;120:84–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.037>
44. tian jie C shu. 6. HELIOTROPIUM Linnaeus, Sp. Pl. 1: 130. 1753. In: Flora of China. 1995. p. 338–41.
45. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. Herbario JBB en línea: *Heliotropium indicum* L. [Internet]. 2014 [cited 2018 Sep 16]. Available from: <http://colecciones.jbb.gov.co/herbario/especimen/358>
46. TRAMIL. *Heliotropium indicum* [Internet]. TRAMIL Programa de investigación aplicada a la medicina popular del Caribe. 2017 [cited 2019 Feb 12]. Available from: <http://www.tramil.net/es/plant/heliotropium-indicum>
47. Fuentes CL. Flora arvense asociada con el cultivo del arroz en el departamento del Tolima-Colombia. Primera ed. Bayer CropScience S.A., Universidad Nacional de Colombia, editors. Bogotá, D.C.; 2006. 294 p.
48. Melo JIM de, Sales MF de. *Heliotropium* L. (Boraginaceae - Heliotropioideae) de Pernambuco, Nordeste do Brasil,. Rodriguésia [Internet]. 2004 Jan [cited 2018 Sep 16];55(84):65–87. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2175-78602004000100065&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602004000100065&lng=pt&tlng=pt)

49. Souza JSN, Machado LL, Pessoa ODL, Braz-Filho R, Overk CR, Yao P, et al. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium indicum*. *J Braz Chem Soc* [Internet]. 2005 Nov [cited 2018 Sep 16];16(6b):1410–4. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532005000800019&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532005000800019&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
50. Wani PA, Tolu AM, Wahid S. Antioxidant, antimicrobial and antibiotic resistance modifying effect of *Heliotropium indicum*. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2018;15(May):113–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.018>
51. Kyei S, Asumeng G, Ramkissoon P, Ofori E, Akomanin E. Anti-inflammatory effect of *Heliotropium indicum* Linn on lipopolysaccharide-induced uveitis in New Zealand white rabbits. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(4).
52. Reddy JS, Rao PR, Reddy MS. Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(2):249–51.
53. Kyei S, Asumeng G, Ramkissoon P, Afari C, Akomanin E. The Claim of Anti-Cataract Potential of *Heliotropium indicum*: A Myth or Reality? *Ophthalmol Ther*. 2015;4(2):115–28.
54. Kyei S, Asumeng G, Ramkissoon P, Abokyi S, Owusu-Afriyie O, Wiredu EA. Possible Mechanism of Action of the Antiallergic Effect of an Aqueous Extract of *Heliotropium indicum* L. in Ovalbumin-Induced Allergic Conjunctivitis. *J Allergy*. 2015;1–7.
55. Chunthong-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(4):S102-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29919994>
56. Dash GK, Abdullah MS. A review on *heliotropium indicum* L. (Boraginaceae). *Int J Pharm Sci Res*. 2013;4(4):1253–8.
57. Jimenez García LF, Merchant Larios H. *Biología celular y molecular* [Internet]. Vol. 1. 2003. 912 p. Available from: <https://oncouasd.files.wordpress.com/2015/06/biologia-celular-y-molecular.pdf>
58. Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, Fernandez de Mattos S, Glassford J, Medema RH, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induces a Transient Multi-phase Cell Cycle Arrest in



- Mouse Fibroblasts through Modulating Cyclin D and p21 Cip1 Expression. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Apr 19 [cited 2019 Jan 11];277(16):13761–70. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111123200>
59. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis [Internet]. Vol. 4, *The Lancet Global Health*. 2016 [cited 2018 Sep 15]. p. e609–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X16301437>
  60. Muñoz A. Cáncer. *Genes y nuevas terapias* [Internet]. Primera ed. Feduchi E, Irurzun A, editors. Madrid: Hélice; 1997 [cited 2019 Jan 10]. 74-77 p. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/unalbogsp/reader.action?docID=315870&query=cancer+ciclo+celular>
  61. *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Capítulo 3: Ciclo celular.* In: Alcántar BE, Salazar AM, Hernández LD, editors. *Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* [Internet]. 02 ed. New York: McGraw-Hill; 2016 [cited 2019 Jan 10]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/content.aspx?sectionid=124154883&bookid=1803&Resultclick=2#1127409372>
  62. PERALTA-ZARAGOZA O, BAHENA-ROMÁN M, DÍAZ-BENÍTEZ CE, MADRID-MARINA V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Publica Mex* [Internet]. 1997 Sep [cited 2019 Jan 10];39(5):451–62. Available from: [http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36341997000500008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36341997000500008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
  63. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J. Capítulo 68. *Biología de la célula cancerosa.* In: Clark JW, Longo D, editors. *Harrison Principios de Medicina Interna* [Internet]. 20th ed. McGraw-Hill; 2018 [cited 2019 Jan 10]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/content.aspx?sectionid=203643807&bookid=2461&jumpsectionID=203643816&Resultclick=2>
  64. Rodríguez A de J, Frias S. La mitosis y su regulación. *Acta pediátrica México*. 2014;35(1):55–68.
  65. Fox S. Capítulo 3: Estructura y control genético celulares. In: Fox S, editor.

- Fisiología humana [Internet]. 14th ed. Madrid: McGraw-Hill; 2017 [cited 2019 Jan 10]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/book.aspx?bookid=2163>
66. Cáceres RE, Alonso L. Capítulo 5: El ciclo celular y la muerte celular regulada en el cáncer. In: Cáceres RE, Alonso L, editors. Manual de oncología [Internet]. 06 ed. Ciudad de México: McGraw-Hill; 2017 [cited 2019 Jan 11]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/book.aspx?bookid=2306>
  67. Rodríguez V, Fortoul T. Capítulo 4: La célula: su estructura y función. In: Rodríguez V, Fortoul T, editors. Histología y biología celular [Internet]. Tercera e. Ciudad de Méxco: McGraw-Hill; 2017 [cited 2019 Jan 11]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/content.aspx?sectionid=150299830&bookid=1995&jumpsectionID=150300003&Resultclick=2>
  68. Muscolo DL, Farfalli GL, Aponte Tinao L, Ayerza MA. Actualización en osteosarcoma. Rev la Asoc Argentina Ortop y Traumatol [Internet]. 2009 [cited 2019 Jan 15];74(1):86–101. Available from: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-74342009000100015](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-74342009000100015)
  69. Suárez A, Soto C, Gómez L, Gamboa Ó, Soto D, Escandón S, et al. Resultados del tratamiento de osteosarcoma convencional de alto grado en niños y adolescentes: análisis de supervivencia de una cohorte tratada sin metotrexato. Rev Colomb Cancerol [Internet]. 2017;21(2):86–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0123901517301075>
  70. Casali PG, Blay JY, Bertuzzi A, Bielack S, Bjerkehagen B, Bonvalot S, et al. Bone sarcomas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2014;25(Supplement 3):iii113-iii123.
  71. De los Reyes I. Osteosarcoma, la clave es la detección temprana [Internet]. Hospital Militar Central. 2017 [cited 2019 Jan 15]. Available from: <https://www.hospitalmilitar.gov.co/comunicaciones-publicas/noticias/osteosarcoma-la-clave-es-la-deteccion-temprana>
  72. DynaMed Plus. Osteosarcoma in children [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 15]. Available from: <http://www.dynamed.com/topics/dmp~AN~T920563/Osteosarcoma-in->

children#Etiology-and-Pathogenesis

73. Gustafson DL, Duval DL, Regan DP, Thamm DH. Canine sarcomas as a surrogate for the human disease. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;188:80–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.012>
74. Kovac M, Blattmann C, Ribí S, Smida J, Mueller NS, Engert F, et al. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat Commun*. 2015;6:1–9.
75. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival improvement. *Cancer*. 2009;115(7):1531–43.
76. Bielack BSS, Kempf-bielack B, Exner GU, Flege S, Helmke K, Kotz R, et al. Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):776–90.
77. Kager L, Zoubek A, Pötschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, et al. Primary metastatic osteosarcoma: Presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol*. 2003;21(10):2011–8.
78. Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, Syrigos K. Cell adhesion molecules: Role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest*. 2009;27(10):1023–37.
79. Hou CH, Yang R sen, Tsao YT. Connective tissue growth factor stimulates osteosarcoma cell migration and induces osteosarcoma metastasis by upregulating VCAM-1 expression. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2018;155(June):71–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.06.015>
80. Clara MÁ, Martínez JL. Osteosarcoma. In: Clara MÁ, Martínez JL, editors. *Manual de oncología* [Internet]. Ciudad de México: McGraw-Hill; 2017 [cited 2019 Jan 17]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/content.aspx?sectionid=180365917&bookid=2306&Resultclick=2>
81. Gorlick R. Current Concepts on the Molecular Biology of Osteosarcoma. In: *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma* [Internet]. Boston: Springer, Boston, MA; 2009 [cited 2019 Jan 17]. p. 467–78. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0284-9\\_27](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0284-9_27)
82. Raymond AK, Jaffe N. Osteosarcoma Multidisciplinary Approach to the

- Management from the Pathologist's Perspective. In: *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma* [Internet]. Boston: Springer, Boston, MA; 2009 [cited 2019 Jan 17]. p. 63–84. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0284-9\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0284-9_4)
83. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao LA, Ranalletta M. Partial Epiphyseal Preservation and Intercalary Allograft Reconstruction in Osteosarcoma of the Knee. *J Bone Jt Surg*. 2005;87–A:226–37.
  84. Cruz AE, Jaimes Y, Zapata M. Oncología. In: Cruz AE, Jaimes Y, Zapata M, editors. *Manual de Pediatría* [Internet]. New York: McGraw-Hill; 2016 [cited 2019 Jan 18]. Available from: <https://accessmedicina-mhmedical-com.ezproxy.unal.edu.co/content.aspx?sectionid=121673571&bookid=1745&jumpsectionID=121673768&Resultclick=2#1126609560>
  85. Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, Kroep JR, Taminiou AHM, Hogendoorn PCW, et al. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: Where do we stand? *Eur J Cancer* [Internet]. 2011;47(16):2431–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2011.05.030>
  86. American Cancer Society. Quimioterapia para el cáncer de hueso [Internet]. *Tratamiento del cáncer de hueso*. 2019 [cited 2019 Jan 22]. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-hueso/tratamiento/quimioterapia.html>
  87. Vos HI, Coenen MJH, Guchelaar HJ, te Loo DMWM. The role of pharmacogenetics in the treatment of osteosarcoma. *Drug Discov Today* [Internet]. 2016;21(11):1775–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.022>
  88. Gilmer KR, Kraemer DF, Neuwelt EA. Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: Underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8588–96.
  89. Igualada J, Romero G, Tejada F. Metotrexato: toxicidad pulmonar, hepática y hematológica. *Rev Clínica Med Fam* [Internet]. 2005;9(3):159–66. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1699-695X2016000300005](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2016000300005)
  90. Pfizer. Metotrexato- Documento Local de Producto [Internet]. Pfizer Inc.; 2014. Available from:

- [https://www.pfizerpro.com.co/sites/g/files/g10032936/f/201601/lld\\_metotrexato.pdf](https://www.pfizerpro.com.co/sites/g/files/g10032936/f/201601/lld_metotrexato.pdf)
91. Gutierrez S, Molina J, Garcia C, Cuellar M, Espinoza L. Pancytopenia secondary to methotrexate therapy in Rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1996;39(2):272–6. Available from: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L364222248%0Ahttp://phleb.rsmjournals.com/content/27/suppl\\_1/40.full.pdf+html%0Ahttp://dx.doi.org/10.1258/phleb.2012.012S18](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L364222248%0Ahttp://phleb.rsmjournals.com/content/27/suppl_1/40.full.pdf+html%0Ahttp://dx.doi.org/10.1258/phleb.2012.012S18)
  92. Majó J, Cubedo R, Pardo N. Tratamiento del osteosarcoma. Revisión. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2010;54(5):329–36.
  93. American Cancer Society. Conceptos básicos de la radioterapia [Internet]. Radioterapia. 2017 [cited 2019 Jan 31]. Available from: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/radioterapia/conceptos-basicos.html>
  94. DeLaney TF, Park L, Goldberg SI, Hug EB, Liebsch NJ, Munzenrider JE, et al. Radiotherapy for local control of osteosarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;61(2):492–8.
  95. Lynn DE. Cell Culture. *Encycl Insects* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 Feb 15];144–5. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/B9780123741448000485>
  96. Korke R, Rink A, Seow TK, Chung MCM, Beattie CW, Hu WS. Genomic and proteomic perspectives in cell culture engineering. *J Biotechnol*. 2002;94(1):73–92.
  97. Thermo Fisher Scientific. Introduction to Cell Culture [Internet]. Cell Culture Basics — Gibco. 2018 [cited 2019 Feb 15]. Available from: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
  98. Merck. Cell culture. Primary cell culture. Darmstadt: Merck KGaA; 2019.
  99. ATCC The Essentials of Life Science Research. MDCK (NBL-2) ATCC ® CCL-34™ *Canis familiaris* kidney normal [Internet]. 2016 [cited 2018 Sep 16]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-34.aspx>
  100. Pereira N, González E, Caviedes P. Criopreservación de células estromales derivadas del tejido adiposo: comparación de diferentes medios de criopreservación. *Rev Chil Cirugía* [Internet]. 2016 Jul [cited 2018 Sep

- 16];68(4):295–301. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379389316000107>
101. Stockert JC, Blázquez Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2018 Sep 16];114(8):785–96. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128112000190>
102. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* [Internet]. 2018;120(3):159–67. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
103. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* [Internet]. 2002 Apr 1 [cited 2018 Sep 16];47(4):236–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.10080>
104. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2018 Sep 16];114(8):785–96. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128112000190>
105. Haq M, Legha SS, Choksi J, Hortobagyi GN, Benjamin RS, Ewer M, et al. Doxorubicin-induced congestive heart failure in adults. *Cancer*. 1985;56(6):1361–5.
106. Rajab NF, McKelvey Martin VJ, Johnston SR, McCarthy PJ, McKeown SR, Ho ET, et al. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in i. *Mutagenesis*. 1998;13(1):1–8.
107. Afanasieva K, Sivolob A. Physical principles and new applications of comet assay. *Biophys Chem* [Internet]. 2018;238(March):1–7. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.003>
108. Elje E, Hesler M, Rundén-Pran E, Mann P, Mariussen E, Wagner S, et al. The comet assay applied to HepG2 liver spheroids. *Mutat Res Toxicol Environ*

- Mutagen [Internet]. 2019;(March):0–1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571818304248>
109. Mah SH, Teh SS, Ee GCL. Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of *Sida Rhombifolia*. *Pharm Biol* [Internet]. 2017;55(1):920–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1285322>
  110. Usmani S, Ahmad M, Sahabjada, Hussain A, Arshad M, Ali M. Cellular oxidative stress and antiproliferative effects of *Cordia dichotoma* (Linn.) seeds extract and their fractions on human cervix epitheloid (HeLa) and human lung (A549) carcinoma cells. *Eur J Integr Med* [Internet]. 2018;21(May):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.05.014>
  111. Kumar S, Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview Shashank. *Sci J*. 2013;2013:1–20.
  112. Salvador JAR, Leal AS, Valdeira AS, Gonçalves BMF, Alho DPS, Figueiredo SAC, et al. Oleanane-, ursane-, and quinone methide friedelane-type triterpenoid derivatives: Recent advances in cancer treatment. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2017;142:95–130. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.013>
  113. Beltrán C, Díaz F, Gómez H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. *Rev Cuba Plantas Med* [Internet]. 2013 [cited 2018 Sep 15];18(4):619–31. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000400013&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400013&lng=es)