

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

Evaluación de la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de
Salvia Keerlii Benth en líneas celulares de cáncer.

Proyecto genérico

Evaluación de productos relacionados con la salud.

Etapas

Evaluación fármaco toxicológica de compuestos activos.

Alumna: Verónica Ballesteros García

Matrícula: 2142042548

Asesora: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Asesor: Dr. Ernesto Sánchez Mendoza

Lugar de desarrollo del proyecto

Laboratorio de investigación química orgánica y productos naturales, edificio n. (UIDIS)
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

Fecha de inicio y terminación

01 de octubre de 2018 – 30 de noviembre de 2019

Contenido

Introducción	1
Antecedentes.....	3
Cáncer	3
Epidemiología	3
Etiología	4
La célula en estado normal	4
Fases del ciclo celular normal	5
Procesos biológicos alterados en las células del cáncer	7
Proliferación celular ilimitada	7
Evasión de los mecanismos de muerte.....	9
Mutación e inestabilidad genómica	11
Reprogramación del metabolismo energético	11
Inflamación tumoral	12
Inducción de angiogénesis	12
Metástasis	12
Tratamiento del cáncer.....	13
Cirugía.....	13
Radioterapia	14
Quimioterapia y Citotoxicidad	15
Medicina Tradicional	16
Género Salvia	17
Salvia Keerlii Benth	18
Ensayos de citotoxicidad en plantas del género Salvia	18
Justificación	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos	20
Metodología.....	20
Material vegetal.....	20
Obtención de extracto	20
Cultivos Celulares	20
Ensayo de citotoxicidad por el método de MTT	21
Tratamiento de datos experimentales	21
Análisis de resultados y discusión.....	22

Conclusiones	26
Referencias	27

Introducción

De acuerdo con la OMS, el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células, debido a la alteración en los mecanismos de división y muerte celular. El tumor o masa anormal formado suele invadir el tejido circundante, provocando metástasis e incluso diseminación a otros órganos del cuerpo (OMS, 2019). Factores externos como tabaco, productos químicos y radiación; y factores internos como hormonas, afecciones inmunitarias, mutaciones heredadas y mutaciones que ocurren a partir del metabolismo pueden actuar juntos o en secuencia para promover el desarrollo de células cancerígenas (Khazir, et al. 2014).

En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones a nivel mundial, siendo los tipos de cáncer de mayor mortalidad el de pulmón (1,69 millones de defunciones), hígado (788 000), colorrectal (774 000), gástrico (754 000) y mama (571 000). Más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos, y se prevé que el número siga aumentando hasta superar los 13,1 millones en 2030 (INEGI, 2018).

En México durante el 2018, los principales tipos de cáncer que se presentaron considerando todas las edades fueron el cáncer de mama (27 283), próstata (25 049), colorrectal (14 900), tiroides (12 122) y cervicouterino (7 869) de una población total de 130 759 070 (International Agency for Research on Cancer, 2019).

Las opciones de tratamiento para el cáncer dependen principalmente de la etapa en la que se encuentre la enfermedad. Los tres tipos principales de tratamiento contra el cáncer son la cirugía, radioterapia y quimioterapia, algunos pueden presentar resistencia o efectos secundarios no deseados, generándose así la necesidad de buscar o implementar nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad (Benedí y Gómez del Río, 2006).

Las plantas han mostrado ser una fuente importante de compuestos con actividad citotóxica, actualmente, algunos de ellos son usados efectivamente en

quimioterapia. Por ejemplo, *Taxus brevifolia* (paclitaxol); *Podophyllum peltatum*, (podofilotoxina); *Catharantus roseus* (vincristina), utilizados en el tratamiento de adenocarcinomas de próstata, colon, pulmón, mama, cervicouterino y leucemia (Rueda, et al. 2013; Uscanga, 2014).

En el caso particular de las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae, incluyen más de 700 especies del género *Salvia*, de las cuales 300 especies se encuentran en México (del 85-88% son endémicas) ricas en compuestos, como: terpenos y flavonoides, siendo frecuentemente las ramas y hojas las que contienen flavonoides, monoterpenos y triterpenos, y las raíces diterpenos. Algunos de los diversos efectos farmacológicos presentados por estas especies son: antiinflamatorio, antinociceptivo, antibacterial, hipoglucemiante, antihipertensivo y propiedades antihiperlipidémicas (Campos-Xolalpa, et al. 2018).

En el Estado de San Luis Potosí se encuentra *Salvia Keerlii* Benth se usa en medicina tradicional para el tratamiento de golpes y torceduras, y se ha reportado la actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico, sin embargo, no se han encontrado estudios que indiquen que presenta actividad citotóxica, por lo que en el presente trabajo se evaluara el mismo extracto clorofórmico en distintas líneas celulares de cáncer y en queratinocitos.

Antecedentes

Cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células en el organismo, causado por anomalías en el material genético (OMS, 2019), es decir, por alteraciones en los mecanismos de división y muerte celular, conduciendo a la formación de tumores (De la Garza y Juárez, 2014).

«Cáncer» es un término que designa un amplio grupo de enfermedades de más de 100 tipos diferentes que se identifican de acuerdo con el sitio de origen del tumor formado (Bland, et al. 2007). Los tumores malignos se forman rápidamente por células anormales, estos se rodean de vasos sanguíneos los cuales nutren a las células cancerígenas, proceso conocido como angiogénesis, así mismo, las células del tumor pueden diseminarse e invadir el tejido circundante a través del torrente sanguíneo, provocando metástasis. Además, recurren con frecuencia tras ser extirpados llegando a provocar la muerte en un periodo variable de tiempo, si no se realiza algún tratamiento (Hanahan y Weinberg, 2011).

Epidemiología

El cáncer es uno de los principales problemas de salud en todo el mundo, en el 2015 fue la principal causa de muerte a escala global con 8,8 millones de defunciones, siendo los tipos de cáncer de mayor mortalidad, el de pulmón (1,69 millones de defunciones), hígado (788 000 defunciones), estómago (754 000), colorrectal (774 000) y mama (571 000). Para el 2018 ascendió a 18 millones de casos nuevos y 9,6 millones de muertes, además se calcula que en términos de sobrevivencia a los 5 años después del diagnóstico hay 43,8 millones de personas (INEGI, 2018).

México no ha sido la excepción, desde 1960 el cáncer se ubicó entre las diez principales causas de muerte, siendo en 1960 y 1970 la sexta causa de mortalidad, entre 1990 y 2004 ocupó la segunda posición y en 2014 ocupó la tercera, donde representó el 12.2% de defunciones, únicamente por debajo de las enfermedades cardíacas (19.2%) y diabetes mellitus (14.8%) (Reynoso-Noverón y Torres-

Domínguez, 2017). La Sociedad Mexicana de Oncología además considera que las elevadas cifras de muertes por cáncer se deben a los estilos de vida, alimentación y a los diagnósticos tardíos (el 60% de los casos de cáncer en México es detectado en etapas avanzadas) (SMeO,2016).

De acuerdo con el centro internacional de investigaciones sobre el cáncer (IARC), los tipos de cáncer más recurrentes en las mujeres mexicanas son el cáncer de mama, tiroides, cervicouterino, cuerpo uterino y colorrectal, mientras que para los hombres son el cáncer de próstata, colorrectal, testicular, pulmonar y estómago (*Figura 1*) (International Agency for Research on Cancer, 2019).

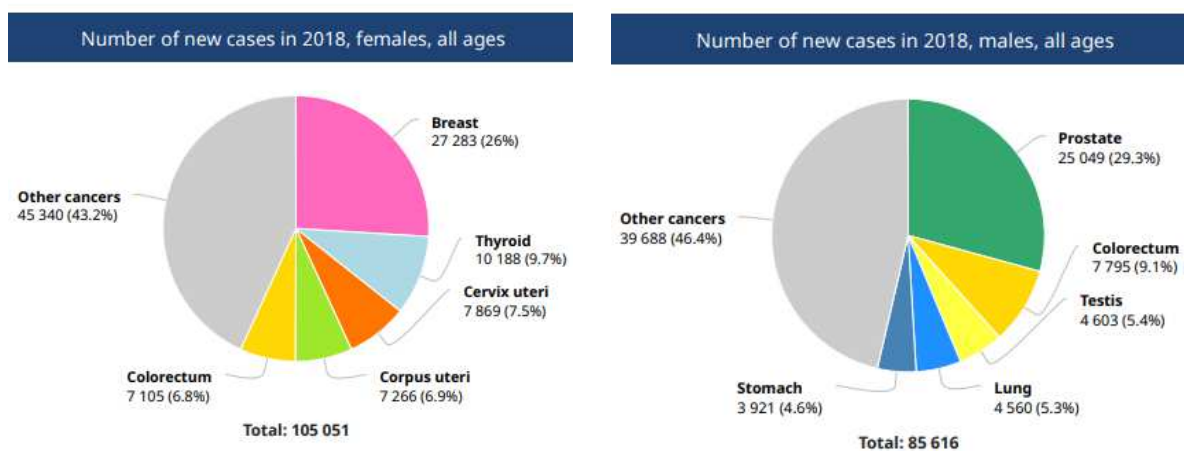


Figura 1. Cánceres más frecuentes en México. Fuente de IARC, 2019

Etiología

Los factores que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer pueden actuar juntos o en secuencia, así como ser heredadas o adquiridas, se clasifican como factores externos: tabaco, productos químicos y radiación; y factores internos: hormonas, afecciones inmunitarias, mutaciones heredadas y mutaciones que ocurren a partir del metabolismo (Khazir, et al. 2014).

La célula en estado normal

De acuerdo con la teoría celular, todos los seres vivos están formados por células y surgen sólo a partir de células preexistentes; la célula es la unidad viva anatómica, funcional de origen y de herencia más pequeña de los seres vivos. Están

constituidas por pequeños compartimentos separados del entorno externo, rodeadas de membrana y llenas de una solución acuosa concentrada de compuestos químicos (Alberts, et al. 2008). En su interior se producen numerosas reacciones químicas que en conjunto se les denomina metabolismo, estas reacciones les permiten crecer, reproducirse por división, producir energía para realizar actividades mecánicas, reaccionar a estímulos y eliminar residuos (Karp, 2011).

Fases del ciclo celular normal

El ciclo celular se divide en interfase y mitosis, y la interfase se subdivide en G₁, S y G₂ (Figura 2). La duración del ciclo celular varía de acuerdo con los tipos celulares y dura alrededor de 24 horas (interfase 23 horas y mitosis 1 hora). De modo que el 95% de las células se encuentran en interfase (Copper y Hausman, 2009).

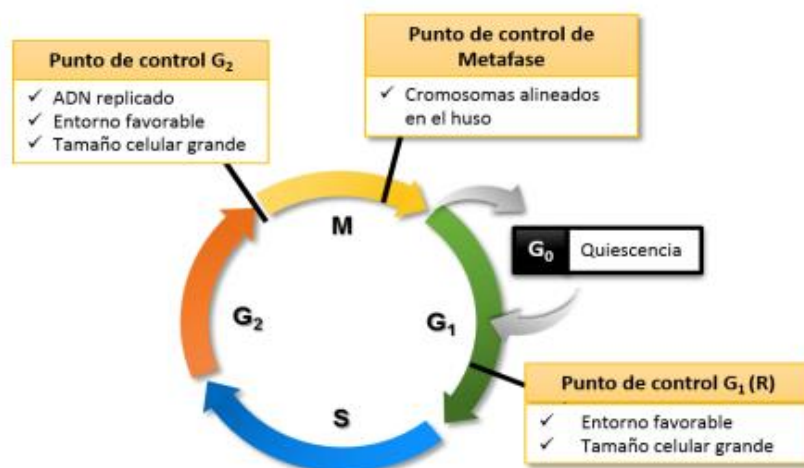


Figura 2. Ciclo celular y sus puntos de control. Fuente de Alberts B, 2008

Fase G₁

Es la etapa donde se lleva a cabo la mitosis y la fase de síntesis (S). En esta fase las células se preparan para la síntesis del ADN por lo que se encuentran

metabólicamente activas (sintetizan ARN y proteínas, y duplican su tamaño). Se divide en etapa temprana y tardía, en la primera se encuentran las células que provienen de la mitosis y en la fase tardía se encuentra el primer punto de control llamado punto de restricción (R) el cual es regulado por factores de crecimiento extracelulares, de manera que, si una célula no recibe los estímulos de crecimiento suficientes, la célula es dirigida a la fase de quiescencia (G_0).

Fase S (Síntesis)

Esta etapa funcional del ciclo celular es entre la mitosis y la fase S ya que se lleva a cabo la duplicación del ADN y proteínas.

Fase G_2

Esta fase es preparativa al igual que la fase G_1 . Aquí continúa la síntesis de ARN y proteínas, y la condensación de los cromosomas (hay cambios en la morfología celular). Al final de esta fase se encuentra el segundo punto de regulación G_2/M , este asegura que la célula haya replicado normal su ADN y continúe a la fase mitótica y no a la fase S. Además, si el ADN de la célula se encuentra dañado se activan moléculas que se encargan de la reparación celular, sino es reparada es dirigida a apoptosis.

Fase M (Mitosis)

Está subdividida en varias etapas: profase, metafase, anafase, telofase y telofase tardía o citocinesis. En esta fase se lleva a cabo la división celular y se encuentra un punto de regulación en la metafase que asegura que los cromosomas se encuentren alineados al huso mitótico (sino ocurre se lleva a cabo el proceso apoptótico) (Copper y Hausman, 2009). En el caso de las células cancerígenas, estas escapan de este punto de regulación, comenzando la división celular con una mala segregación cromosómica (Hanahan y Weinberg, 2011).

Procesos biológicos alterados en las células del cáncer

El cáncer surge por alteraciones genéticas que modifican numerosas funciones celulares (proliferación, muerte celular programada y envejecimiento) que permiten controlar el número de células de una población. El daño genético que ocurre en el desarrollo del cáncer tiene diversas causas, siendo una la pérdida de los mecanismos de reparación del ADN dando como resultado la acumulación de mutaciones (Bland, et al. 2007).

El conjunto de células que forman la masa tumoral recibe estímulos de células sanas. Por lo que este microambiente contribuye al desarrollo de características propias de las células cancerígenas (*Figura 3*) (Hanahan y Weinberg, 2011).

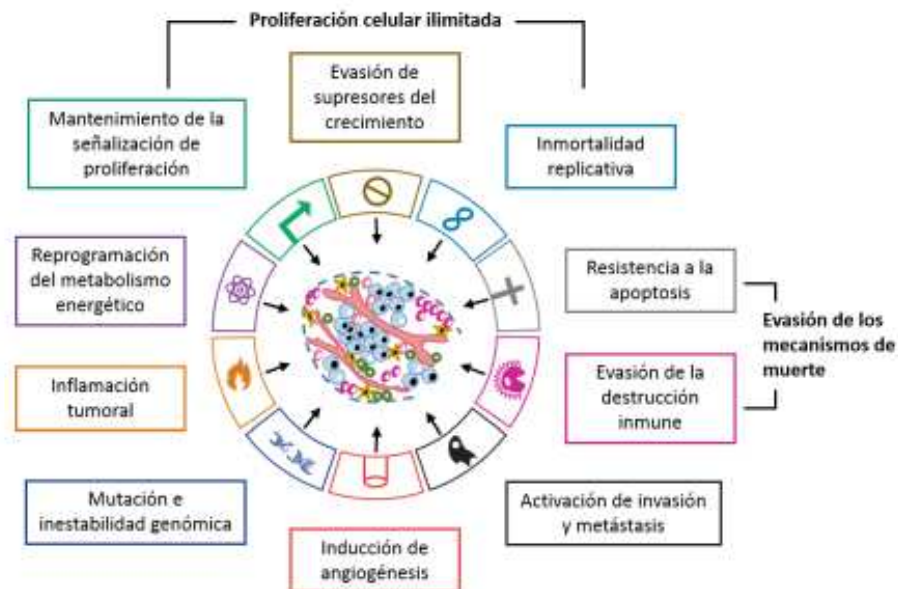


Figura 3. Características del cáncer. Fuente de Hanahan y Weinberg, 2011

Proliferación celular ilimitada

Por medio del ciclo celular se regula la proliferación de las células. Estas requieren de factores de crecimiento extracelulares para que se promueva su crecimiento, síntesis de ADN y división celular. Además, cada fase del ciclo está controlado por proteínas intracelulares que funcionan como puntos de regulación para que se

garantice la continuidad del ciclo sólo si se mantiene la integridad del ADN de las células replicadas (Shephard, et al. 2008).

- ***Mantenimiento de la señalización de proliferación***

Como se mencionó anteriormente una célula requiere de factores de crecimiento y nutrientes para que prolifere, estos son proporcionados por el ambiente y por células adyacentes sanas. En un proceso de carcinogénesis, las células cancerígenas tienen la capacidad de estimular sus propios factores de crecimiento, así como en células sanas, esto permite que se promueva la proliferación continua y desproporcionada aún en condiciones ambientales y moleculares desfavorables (Hanahan y Weinberg, 2011).

- ***Evasión de mecanismos supresores del crecimiento***

En las células cancerígenas el ciclo celular está alterado ya que ciertas moléculas que controlan el ciclo celular presentan modificaciones genéticas, se denominan genes supresores de tumores y tienen la función de limitar la proliferación y el crecimiento del tumor. En varios tipos de tumores malignos se han encontrado innumerables mutaciones en la expresión de estos genes. Los más estudiados son los genes de las proteínas Rb y p53. Ambas se encargan de regular puntos del ciclo celular. Rb sólo regula la transición de la célula de la fase G₁ a la fase S, mientras que p53 se encarga de asegurar la integridad del ADN y de restringir la transición tanto de la fase G₁ a la fase S como de G₂ a M cuando el ADN está dañado (Hanahan y Weinberg, 2011).

- ***Potencial replicativo ilimitado***

Las células normales tienen la capacidad replicativa limitada, la cual está determinada por el largo de los telómeros, cada vez que las células llevan a cabo una replicación el tamaño de los telómeros se va acortando hasta que ya no puede proliferar más. Posteriormente, la célula entra en una etapa donde se desencadena

la muerte por apoptosis. Por otro lado, la enzima telomerasa es la encargada del mantenimiento de las 13 terminales teloméricas en cada cromosoma y se expresa en la mayoría de los tumores malignos proporcionándoles estabilidad telomérica y evasión de la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

Evasión de los mecanismos de muerte

- ***Resistencia a la apoptosis***

La muerte celular programada o apoptosis es el mecanismo por el que una célula muere de manera controlada sin propiciar sucesos inflamatorios; es un proceso activo dependiente de energía que lleva a cabo la división de la célula por acción de endonucleasas, así como de proteasas. La apoptosis se caracteriza por la condensación de cromatina y el encogimiento celular. (Krebs, et al. 2012)

Es activado por señales intracelulares o extracelulares que desencadenan la acción de unas proteínas llamadas caspasas. Una vez que se activan, las caspasas fragmentan otras proteínas dentro de las células, lo que produce a la muerte eficiente y precisa de la célula en la que se activan (Jordan, 2003). La caspasa que se encuentra en la mayoría de las células es la caspasa 3, la cual es la responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos junto con la caspasa 6 y 7. (Ojeda, 2014) Este proceso apoptótico se clasifica en extrínseco o intrínseco, donde el primero es activado por señales extracelulares a través de receptores transmembranales conocidos como receptores de muerte (Fas/CD95, el receptor del factor de necrosis tumoral TNFR). Por el contrario, el mecanismo intrínseco es inducido intracelularmente y puede ser desencadenado por el estrés celular, por algunas citocinas, por el ADN dañado o la ausencia de factores de crecimiento (Jordan, 2003).

A diferencia de las células sanas, las células cancerígenas presentan mutaciones en la expresión de diferentes proteínas, ya sean reguladoras del ciclo celular que

activan directa o indirectamente los mecanismos apoptóticos (p53, Rb, p21, p57, etc.) o que proporcionan señales de supervivencia (familia Bcl-2, NF-κB, AP-1, etc.). La apoptosis es por lo tanto una función importante en la prevención de la transformación maligna de células sanas y en contrarrestar la proliferación al eliminar las células que sufrieron mutaciones (Wang, 2014).

- ***Necrosis***

A diferencia de la apoptosis, la necrosis se presenta generalmente en respuesta a un daño severo en una parte importante del tejido, por ejemplo, en el centro de un tejido infartado, en un área de isquemia o en la zona de una lesión por toxinas. Es desencadenada frecuentemente por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva, venenos o cualquier otra condición que genere disminución de ATP. Esto crea cambios que se representan por desorganización y lisis del citoplasma con dilatación del retículo endoplásmico y las mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática (proceso de oncosis) (Wang, 2014).

- ***Evasión de la destrucción inmune***

El sistema inmune es el encargado de mantener la homeostasis en el organismo; de vigilar, reconocer, eliminar agentes potencialmente peligrosos y células dañadas. Por lo que si un grupo de células altamente inmunogénicas comienza a proliferar el sistema inmune las destruirá o las mantendrá bajo control (de Visser, et al. 2006). Algunas de estas células son capaces de desarrollar mecanismos que les permitan evadir la destrucción inmune, proceso conocido como edición inmunológica (Prendergast, 2008).

Uno de los mecanismos propuestos que contribuyen a la evasión inmunológica, es la capacidad de las células cancerígenas de secretar factores inmunosupresores como el TGF-β (factor de crecimiento transformante beta) que inhibe la acción

citotóxica de las células NK y de los linfocitos T CD8+, dando como resultado la formación del tumor (Hanahan y Weinberg, 2011).

Mutación e inestabilidad genómica

La gran cantidad de mutaciones en las células cancerígenas indica que el establecimiento y desarrollo de un tumor con lleva cambios genéticos que les permite proliferar, sobrevivir y diseminarse (Negrini, et al. 2010). La mayoría de los tumores se caracterizan por la mutación de genes encargados del mantenimiento y reparación del ADN, por lo que si una célula pierde la capacidad de mantener la integridad de su genoma es más susceptible de presentar más mutaciones a través de diversos mecanismos y por consecuencia transmitirlos a la siguiente generación. Con base a lo anterior, estos genes reguladores podrían ser los iniciadores de procesos carcinogénicos de carácter no hereditario (Hoeijmakers, 2001).

Reprogramación del metabolismo energético

Las células utilizan la glucosa como principal fuente de energía y a través de la glicólisis es degradada en dos moléculas de piruvato y ATP (adenosín trifosfato). En condiciones aeróbicas las células transforman el piruvato a través del ciclo de Krebs en diferentes intermediarios metabólicos, además de la obtención de ATP mediante fosforilación oxidativa; en cambio, en condiciones anaeróbicas el piruvato es transformado en lactato sin la generación de ATP (Vander-Heiden, et al. 2009).

La mayoría de las células cancerígenas dirigen su metabolismo hacia la vía anaerobia aún con oxigenación normal, obteniendo como resultado ácido láctico y ATP. Este mecanismo restringe la cantidad de energía que una célula con alta tasa de crecimiento y proliferación necesita, por lo que en las células cancerígenas se encuentra sobreexpresado el transportador GLUT1 y distintas enzimas de la vía glicolítica (hexocinasa, fosfofructocinasa, etc.), lo que les permite obtener una gran cantidad de glucosa y por consiguiente ATP, incluso más que el obtenido por fosforilación oxidativa (Moreno, et al. 2007 ; Hanahan y Weinberg, 2011).

Inflamación tumoral

El riesgo de desarrollar cáncer aumenta cuando se padecen enfermedades inflamatorias como gastritis, colitis y prostatitis ya que los procesos inflamatorios están íntimamente relacionados con esta enfermedad una vez que se establece el tumor (Abbas, et al. 2015). Las células cancerígenas son capaces de secretar moléculas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 y quimiocinas, pues estimulan la proliferación celular y atraen células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos, que también secretan estas moléculas inflamatorias. Por lo tanto, este ambiente inflamatorio y la inestabilidad de su genoma promueven la proliferación de células cancerígenas (Colotta, et al. 2009; Hanahan y Weinberg, 2011).

Inducción de angiogénesis

Como el transportador GLUT1 y distintas enzimas de la vía glicolítica les permiten consumir una gran cantidad de glucosa y otros nutrientes a las células cancerígenas, se promueve el aumento de productos de desecho, haciendo el microambiente tumoral hipóxico. El ambiente hipóxico y varias vías de señalización sobreactivadas, aumentan la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que promueve la generación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor, estos vasos sanguíneos tienen la función de aportar nutrientes y oxígeno a las células cancerígenas. VEGF aparece desde etapas tempranas, inclusive en lesiones no malignas de aspecto anormal como vasos sanguíneos alargados, microhemorragias y flujo sanguíneo irregular. (Hanahan y Weinberg, 2011)

Metástasis

Las células cancerígenas migran hacia otros tejidos a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo una vez que disminuye la expresión de proteínas de anclaje, uniones célula-célula y el anclaje a la matriz extracelular. Esto permite que se facilite su desprendimiento y por consiguiente su migración, donde pueden establecerse, proliferar y generar nuevos tumores (Hanahan y Weinberg, 2011).

Tratamiento del cáncer

El tratamiento depende de lo avanzado que se encuentra la enfermedad, así como de las características de la persona afectada, edad, sexo, padecimiento de otras enfermedades, ubicación del tumor, momento de la detección y de su extensión. Los tres tipos principales de tratamiento contra el cáncer son la cirugía, quimioterapia y radioterapia. Otras posibilidades de tratamiento incluyen la terapia hormonal, biológica e inmunológica, blancos terapéuticos no citotóxicos y trasplante de médula ósea. Algunas veces el mejor tratamiento incluye dos métodos o más. (Instituto Nacional del Cáncer, 2018). La respuesta al tratamiento puede ser completa (RC) si han desaparecido todos los signos y síntomas, respuesta parcial (RP) si existe una disminución de más del 50% de las lesiones, enfermedad estable (EE) cuando no se encuentran datos de algún cambio y Respuesta patológica Completa (RpC) si el tumor desaparece por efecto de la quimioterapia y el diagnóstico del patólogo lo reporta sin tumor. Por otro lado, si no es posible que se logre una curación, el tumor debe ser extirpado o la mayor parte posible del cáncer debe ser destruido para evitar que crezca o se propague, lográndose una mayor sobrevivencia y muerte digna (De la Garza y Juárez, 2014)

Cirugía

La cirugía puede ser utilizada para el diagnóstico de cáncer, para determinar dónde está alojado, si se ha diseminado o si afecta las funciones de otros órganos, para extirpar el tumor parcial o totalmente y para restablecer el aspecto físico de una parte del cuerpo. La cirugía convencional requiere incisiones grandes que atraviesan la piel, músculo y en ocasiones hueso provocando que la recuperación sea lenta y dolorosa. En algunos casos la cirugía que es poco invasiva puede ser una opción ya que se realizan pequeñas incisiones y en general, tienen plazos de recuperación más corta y con menos dolor posoperatorio. Algunos tipos son:

Criocirugía: Es utilizado para tratar el cáncer pre-invasor, pero no para el cáncer invasor. Se utiliza nitrógeno líquido para congelar y destruir las células cancerígenas.

Cirugía por láser: Se usa sólo como tratamiento contra el cáncer pre-invasor. Se emplea un rayo láser para quemar las células cancerígenas o para extraer una muestra pequeña de tejido (biopsia quirúrgica).

Cirugía laparoscópica: Se realizan pequeñas incisiones en la piel para insertar un tubo iluminado con una cámara. El término, hace referencia a una cirugía abdominal mínima invasiva.

Cirugía robótica: La más utilizada es la del Sistema Robótico da Vinci que proporciona una imagen en 3D de la operación. El sistema electrónico permite que el cirujano realice movimientos de alta precisión para retirar el tejido maligno.

Radioterapia

Consiste en la utilización de radiaciones ionizantes (rayos X o rayos gamma) que disminuyen la capacidad de crecimiento, reproducción y tamaño de las células cancerígenas. Actualmente hay distintos tipos de radiación con los que se logra una penetración mucho mayor en el cuerpo y con un mejor control para que puedan ser tratadas áreas pequeñas (alrededor de 1 pulgada). Algunos tipos son:

Radioterapia profiláctica: Es utilizada para determinados tipos de cáncer, la radiación se puede administrar en áreas sin evidencia de cáncer por lo que se evita que crezcan células cancerígenas en el área irradiada.

Radioterapia externa: Se usa para tratar distintos tipos de cáncer, este tratamiento permite aliviar el dolor o minimizar otros problemas que se presentan cuando el cáncer se disemina. El haz se enfoca hacia la zona a tratar y casi siempre se administra a pacientes ambulatorios.

Radioterapia interna (braquiterapia): La fuente de radiación se encuentra sellada en un portador pequeño llamado implante y es colocado muy cerca del tumor o dentro del mismo. Estos pueden ser alambres, tubos de plástico, catéteres, cintas, cápsulas o semillas. El implante se inserta directamente en el cuerpo y solo se trata una parte específica del tumor (De la Garza y Juárez, 2014; Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

Quimioterapia y Citotoxicidad

La quimioterapia es considerada como primera opción para combatir distintos tipos de cáncer y casi siempre se usa como tratamiento sistémico. Los fármacos usados en quimioterapia pueden ser citostáticos o citotóxicos. Estos fármacos viajan a través del torrente sanguíneo para llegar hasta las células cancerígenas adondequiera que se hayan propagado (Instituto Nacional del Cáncer, 2018). Sin embargo, también ocasionan la muerte de células normales que crecen y se dividen rápidamente, generando procesos necróticos que originan efectos secundarios como fatiga, náuseas, vomito, caída de cabello y dolor (De la Garza y Juárez, 2014).

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño celular (Acevedo, et al. 2013). Por lo que, los fármacos citotóxicos se clasifican de acuerdo al lugar donde se dirigen (hacia el ciclo celular, sobre el ADN o ARN, en factores extracelulares de división celular y sobre el sistema inmunológico (Benedí y Gómez del Río, 2006).

La evaluación de la actividad citotóxica de extractos naturales y/o compuestos se puede predecir mediante pruebas *in vitro*, utilizando como modelo experimental cultivos primarios de células de cáncer. Además, existen diferentes métodos de tinción celular para evaluar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento, como la captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y la reducción del MTT (Escobar, 2010). Este último, se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-

2,5-difeniltetrazólico (MTT), el cual es captado por las células y reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a su forma insoluble formazán. El producto de la reacción (cristales de fomazán) queda retenido en las células por lo que debe ser solubilizado con DMSO (dimetilsulfóxido) para su cuantificación (Díaz, et al. 2011).

Medicina Tradicional

Según la OMS, la medicina tradicional es considerada como principal recurso de atención para la salud y es utilizada en un 80% por países en desarrollo; este tipo de medicina se ha empleado desde hace miles de años y abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que se fundamentan por creencias, teorías y experiencias que varían entre países y regiones (OMS, 2019). Los medicamentos naturales pueden ser infusiones, preparaciones y productos acabados, siendo los principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales (Ojeda, 2014).

Estudios realizados indican que alrededor de 3,000 plantas con propiedades anticancerígenas son conocidas en el mundo y que pacientes diagnosticados con cáncer, frecuentemente recurren a terapias alternativas o complementarias para encontrar la cura. Específicamente en áreas urbanas de México, cerca del 30% de los pacientes con cáncer emplean este tipo de terapia, debido a que es menos costosa y más accesible, contrario a un tratamiento médico como quimioterapia y radioterapia que además de ser muy costosos, suelen presentar resistencia y/o efectos secundarios que eventualmente desalientan a los pacientes (Jacobo-Herrera, et al. 2016).

Hoy en día, el 60% de los medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer se derivan de plantas, su actividad biológica puede provenir de cualquiera de sus partes (hojas, tallos, raíces, flores o semillas) (Ávalos, et al. 2014). Estudios etnofarmacológicos han permitido la construcción de bases de datos de plantas medicinales que se utilizan para el tratamiento de esta enfermedad. Por ejemplo, los alcaloides vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus* (descubiertos por serendipia), paclitaxol de *Taxus brevifolia* (descubierto por estudios sistematicos),

podofilotoxina de *Podophyllum peltatum* (también precursor del fármaco etopósido) y camptotecina de *Camptotheca acuminata* (descubierto al azar) (Rueda, et al. 2013; Uscanga, 2014). Los fármacos citotóxicos mencionados anteriormente son ejemplos claros de hallazgos en fuentes naturales, estos hechos permiten que se continúe con la búsqueda de nuevas moléculas o compuestos con actividad anticancerígena en la naturaleza.

Género *Salvia*

En climas tropicales y templados se hallan distribuidas aproximadamente 900 especies del género *Salvia*. En particular la familia Lamiaceae incluye más de 700 especies, de las cuales 300 están en la región mediterránea y Asia central, 500 en el continente americano y 100 en la parte oriental del continente asiático. En México se encuentran cerca de 300 especies siendo el 85-88% endémicas. Está documentado que las plantas pertenecientes a este género son ricas en compuestos, como: terpenos y flavonoides, la mayoría de las ramas y hojas son las que contienen flavonoides, monoterpenos y triterpenos, y las raíces diterpenos. Sin embargo, los principales compuestos encontrados son el ácido oleanólico, ácido linolénico y ácido linoléico. Algunos de los diversos efectos farmacológicos presentados por estas especies son: antiinflamatorio, antinociceptivo, antibacteriano, hipoglucemiante, antihipertensivo y antihiperlipidémico (Campos-Xolalpa, et al. 2018).

En específico, los Terpenos (están conformados por dos o más unidades de isopreno) son compuestos químicos con actividad citotóxica y han sido aislados alrededor de 111 de 24 plantas de este género. Estos corresponden a 82 diterpenos, 4 sesterpenoides, 16 sesquiterpenos y 9 triterpenos. Estos compuestos tienen la capacidad de disminuir el crecimiento celular en distintas líneas celulares de cáncer, lo que permite su posible uso en el tratamiento del cáncer (Campos-Xolalpa, et al. 2018).

***Salvia Keerlii* Benth**

Salvia Keerlii Benth es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae, originaria de México; se encuentra en forma de matorral en ladera de cerro, sus ramas llegan a medir de 1-3.50 m de alto, sus flores se caracterizan por estar en pequeños racimos de color morado y por sus estambres color blanco, se suele relacionar con *Salvia melissodora*, sin embargo, se distingue por su cáliz glandular, y se usa en la medicina tradicional para el tratamiento de golpes y torceduras (Esquivel, et al. 1985).

Ensayos de citotoxicidad en plantas del género *Salvia*

Los estudios realizados de *Salvia keerlii* Benth son escasos ya que solo se ha reportado la actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico, no obstante, se han encontrado estudios de la actividad citotóxica de extractos de distintas especies del género *Salvia*.

Campos-Xolalpa, et al (2017), evaluaron la actividad citotóxica del extracto clorofórmico lavado con hexano de *Salvia ballotiflora* (ESC) y de cuatro diterpenos aislados en 3 líneas celulares de cáncer, utilizando el método de MTT. Las CI_{50} obtenidas con ESC para A549, HeLa y MCF7 fueron de $2.29 \pm 3.8 \mu\text{g/mL}$, $23.79 \pm 4.6 \mu\text{g/mL}$ y $6.57 \pm 2.1 \mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Jiang, et al. (2017), evaluaron los extractos etanólicos y acetónicos de las hojas y raíces de *Salvia officinalis* y *S. miltiorrhiza* en la línea celular de cáncer HepG2 (hígado) y en WRL-68 (células hepáticas normales). Los valores de CI_{50} que obtuvieron varían de $14.3 \mu\text{g/mL}$ a más de $200 \mu\text{g/mL}$, indicando que el extracto etanólico de las raíces de *S. officinalis* tienen mayor actividad citotóxica sobre HepG2 (CI_{50} , $19.6 \mu\text{g/mL}$) en comparación con las células normales (CI_{50} , $45.6 \mu\text{g/mL}$).

Tundis, et al. (2017), evaluaron la actividad citotóxica de la fracción metanólica de *Salvia fruticosa* Mill subsp. *thomassi* en distintas líneas celulares de cáncer. Los valores de CI_{50} que obtuvieron de MCF7, MDA-MB-231 (glándula mamaria), y RKO y Caco-2 (colorrectal) son: 43.17 ± 1.2 , 41.27 ± 0.9 , 64.65 ± 1.1 , 43.46 ± 0.7

respectivamente, mientras que en células normales 3T3-L1 (fibroblastos de murino) obtuvieron una CI_{50} de 201.1 ± 1 .

Finalmente, en Fiore, et al. (2006), evaluaron la actividad de los extractos etanólicos de varias *Salvias*, *S. dominica*, *S. lanígera*, *S. menthaefolia*, *S. palestina*, *S. sclarea* y *S. spinose* en distintas líneas celulares de cáncer. Obtuvieron CI_{50} que van de 89.6 $\mu\text{g/mL}$ a 405 $\mu\text{g/mL}$. De acuerdo con los datos que obtuvieron, sugieren que existen diferencias entre las especies debido a que *S. lanígera* no mostró actividad conforme se aumentó la concentración, mientras que *S. menthaefolia* mostró una marcada actividad citotóxica al obtenerse las CI_{50} más bajas y *S. sclarea*, *S. spinose*, *S. dominica* y *S. palestina* solo mostraron actividad frente a tres líneas celulares (HEC-1A, JEG-3 y CIR).

Justificación

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo por lo que el número de personas diagnosticadas con esta enfermedad seguirá en aumento. Los fármacos citotóxicos empleados en quimioterapia son efectivos, sin embargo, son costosos y presentan varios efectos secundarios no deseados. Debido a estos hechos, el descubrimiento y búsqueda de nuevos compuestos contra el cáncer con más potencia y menos efectos secundarios ha guiado numerosas investigaciones para el desarrollo de nuevos medicamentos. Las plantas son consideradas una fuente importante para la obtención de compuestos citotóxicos, por lo tanto, debido a la continua necesidad de desarrollar alternativas para el tratamiento del cáncer, durante el servicio social se evaluará la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de *Salvia keerlii* Benth en distintas líneas celulares de cáncer y en queratinocitos como control normal.

Objetivo General

- Evaluar la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de *Salvia Keerlii* Benth sobre distintas líneas celulares: A549, SKLU-1, SW620, HeLa, MCF7 y queratinocitos como control.

Objetivos Específicos

- Preparar el extracto clorofórmico.
- Evaluar la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de *Salvia keerlii* Benth en distintas líneas celulares de cáncer y en queratinocitos.
- Determinar la CI_{50} de las distintas líneas celulares.

Metodología

Material vegetal

El material vegetal se colectó en el municipio de Guadalucazar, Estado de San Luis Potosí. De la colecta del material se tomó una muestra, la cual fue llevada al Herbario Isidro Fabela de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí para su identificación taxonómica y corroborar que se trata de *Salvia keerlii* Benth. El número de registro proporcionado por el Taxónomo José García Pérez fue SLPM43012.

Obtención de extracto

La planta se dejó secar a la sombra a temperatura ambiente y se trituró en un molino. En un matraz balón de 1 L con un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 50 g del material seco y molido y se le adicionaron 400 mL de cloroformo, la mezcla se calentó a temperatura de ebullición durante 4 h, al término de este periodo, se dejó enfriar y se filtró a vacío. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio. El residuo se llevó a sequedad en baño maría y se lavó con 100 mL de *n*-hexano, calentando la mezcla en baño maría por 5 minutos y se filtró.

Cultivos Celulares

Se utilizaron las líneas celulares A549 (pulmón), SKLU-1 (pulmón), SW620 (colon), HeLa (cervicouterino), MCF7 (glándula mamaria) y SiHa (cervicouterino) de origen tumoral humano, y HaCat (queratinocitos) de epidermis humano, las cuales fueron

donadas por el Dr. Ignacio González Sánchez de la Facultad de Química. Se mantuvieron en medio de Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina en cajas de cultivo celular a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂.

Ensayo de citotoxicidad por el método de MTT

De cultivos confluentes se despegaron células con tripsina 1x, posteriormente fueron resuspendidas en medio DMEM suplementado para determinar el número de células requeridas por pozo de 5×10^3 , el conteo se realizó con la cámara de Neubauer. Después de sembrar cada placa, se dejó incubar por 24 h a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂. Por otro lado, ECSAKE fue disuelto en PBS (buffer fosfato salino) y aplicado a cada uno de los pozos en concentraciones de 0.1 a 200 µg/mL. Una vez agregado el tratamiento, cada una de las placas de 96 pozos fueron incubadas durante 48 h. Al término del tratamiento, se agregaron 10 µL de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio) (5 µg/mL disueltos en PBS) por pozo y nuevamente se incubaron por 3 h para permitir la metabolización y formación de cristales de formazán. Pasado el tiempo, se desechó el sobrenadante de cada pozo y se agregaron 100 µL de DMSO para solubilizar los cristales. La placa se agitó por 10 segundos y finalmente se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de 540 nm.

Tratamiento de datos experimentales

Con los valores obtenidos de las lecturas del espectrofotómetro se calculó el porcentaje de viabilidad celular.

Ecuación 1.

$$\% \text{ Viabilidad} = \left(\frac{\text{Células tratadas}}{\text{Células control}} \right) \times 100$$

Se determinó la Concentración inhibitoria a la cual ECSAKE reduce la viabilidad celular en un 50% (CI₅₀), mediante el análisis de regresión lineal (ecuación de la

recta: $y = a + bx$). Posteriormente se determinó el Índice de Selectividad (IS, si el valor es >1 , indica que ECSAKE es más citotóxico en células de cáncer que en células normales, si el valor es <1 , lo contrario) (Borrego, et al. 2016).

Ecuación 2.

$$IS = CI_{50} \text{ Células normal} / CI_{50} \text{ Célula de cáncer}$$

Análisis de resultados y discusión

Rendimiento

Por cada 350 g de planta seca y molida, y mediante extracción directa a reflujo se obtuvo 13.49 g de extracto clorofórmico, su rendimiento fue de 3.85%.

Ensayo de citotoxicidad

Se determinó la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de *Salvia keerlii* Benth (ECSAKE) por el método de MTT. Se evaluaron varias concentraciones (0.1, 1, 10, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ECSAKE sobre distintas líneas celulares de cáncer (MCF7, A549, SW620, HeLa, SiHa y SKLU-1) y en queratinocitos (HaCaT) como control. Los resultados se muestran en la figura 4.

Se observa que ECSAKE disminuyó el crecimiento de las líneas celulares a partir de la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en varias de las líneas celulares. Sin embargo, para la línea celular A549 se mostró la disminución del crecimiento a partir de la concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para HaCaT a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, a concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ECSAKE todas las líneas celulares presentaron cambios morfológicos, así como baja densidad celular, esto se pudo observar al comparar con el control basal (células sin tratamiento).

En la tabla 1 se presentan las CI_{50} de cada línea celular, A549 y SKLU-1 presentaron la mejor actividad citotóxica, ya que mostraron las CI_{50} más bajas 55.82 ± 5.43

$\mu\text{g/mL}$ y $99.57 \pm 3.75 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, las líneas celulares SiHa, HeLa presentaron los valores $113.89 \pm 3.59 \mu\text{g/mL}$, $117.26 \pm 3.86 \mu\text{g/mL}$ $123.61 \pm 4.25 \mu\text{g/mL}$ y $174.98 \pm 3.97 \mu\text{g/mL}$ respectivamente

HaCaT presentó una CI_{50} de $56.78 \pm 1.48 \mu\text{g/mL}$, con base en este resultado y con los de las líneas celulares de cáncer, se calculó el índice de selectividad (IS) el cual indica la relación de citotoxicidad entre células normales y células de cáncer. Los resultados muestran que la citotoxicidad de ECSAKE en células normales es mayor que en la mayoría de las células de cáncer ($IS < 1$), es decir, que ECSAKE no es selectivo sobre células de cáncer, SKLU-1(0.570), SiHa (0.498), SW620 (0.459), HeLa (0.484) y MCF7 (0.324). A549 presentó una IS igual a 1.018, aunque este valor es mayor a 1, no presenta una selectividad significativa.

El grupo de trabajo realizó previamente la evaluación de la actividad citotóxica de cisplatino en varias de las líneas celulares de cáncer presentados en este trabajo, A549, HeLa, y MCF7, con una CI_{50} obtenida de $4.6 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$, $1.06 \pm 3.8 \mu\text{g/mL}$ y $2.14 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$ respectivamente (Campos-Xolalpa, et al. 2017). El cisplatino es un fármaco con actividad citotóxica conocida que se emplea comúnmente como referencia. La comparación entre estos resultados y lo obtenidos en el presente trabajo nos confirman que ECSAKE no presenta actividad sobre las líneas celulares estudiadas. Esta conclusión se confirma además con los parámetros establecidos por el NCI sobre compuestos o extractos con actividad citotóxica, el cual indica que un extracto de planta es citotóxico si presenta una CI_{50} menor o igual a $30 \mu\text{g/mL}$ y para compuestos puros menor o igual a $4 \mu\text{g/mL}$.

No obstante, estudios previos obtenidos en el laboratorio (Serrano, R., 2019 Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Salvia keerlijii*, resultados por publicar) demostraron que ECSAKE contiene ácido ursólico y ácido oleanólico en una proporción de 11.37% y 2.90% respectivamente. La actividad citotóxica de ambos triterpenos está bien documentada por Chiang, et al. (2019) y Yan, et al. (2010) en distintas líneas celulares de cáncer. Los resultados sugieren que ECSAKE

podría estar constituido por una mezcla de compuestos que inhiben la actividad citotóxica de ambos ácidos triterpénicos, sin embargo, se requieren de más estudios que sustenten esta observación, tal como estudiar la actividad de las fracciones de ECSAKE, aislar e identificar los compuestos de manera individual y corroborar también su actividad o en su caso si hay efecto inhibitorio.

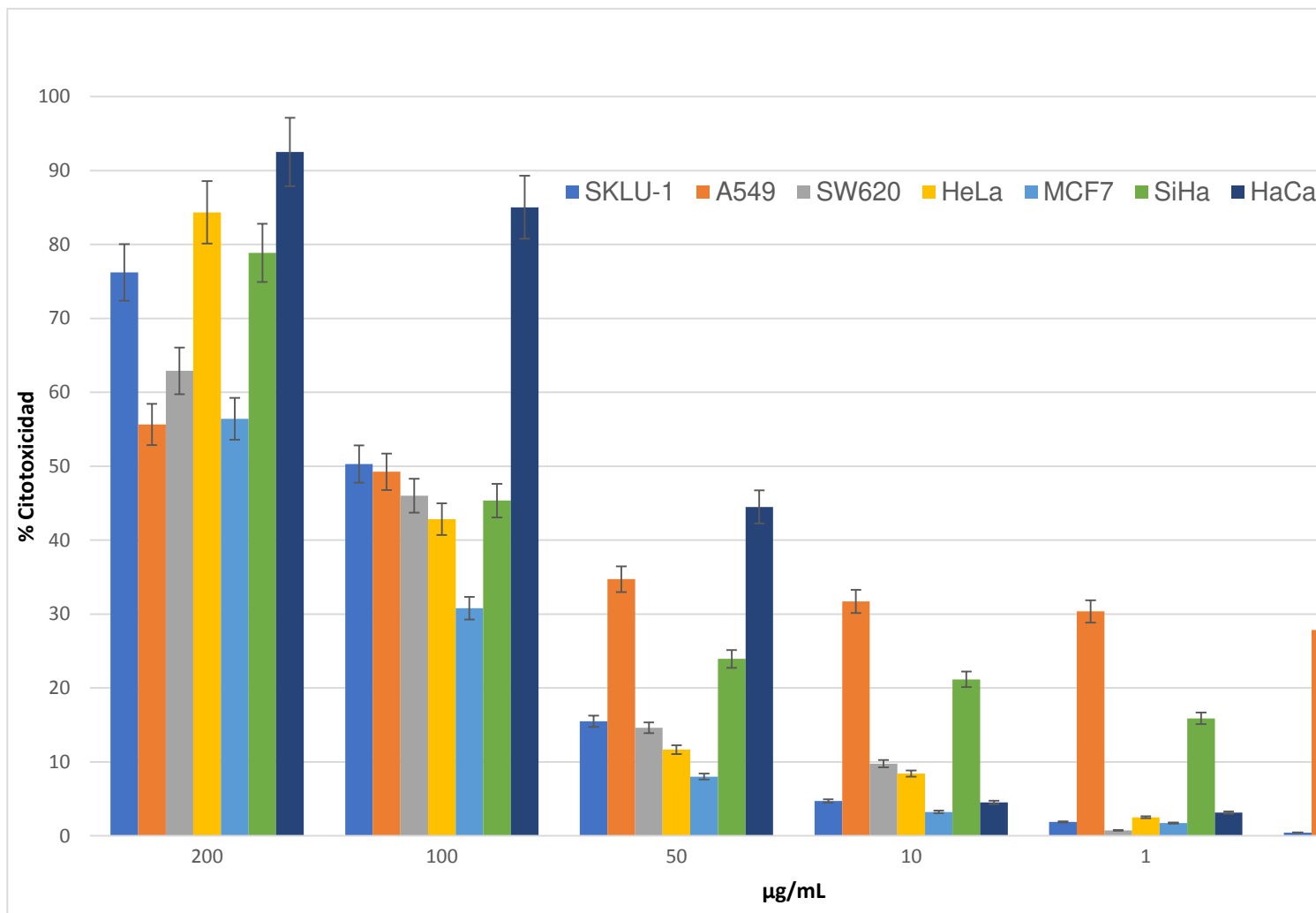


Figura 4. Actividad citotóxica de ECSAKE. Las líneas celulares de cáncer y queratinocitos fueron tratadas por 48h. Finalizado el tratamiento se determinó la citotoxicidad celular mediante el método de MTT.

Tabla 1. Valores calculados de IC_{50} y citotoxicidad en distintas líneas celulares.

Líneas celulares de cáncer	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
A549 (pulmón)	55.82 ± 5.43	1.018
SKLU-1 (pulmón)	99.57 ± 3.75	0.570
SiHa (cérvico-uterino)	113.89 ± 3.59	0.484
HeLa (cérvico-uterino)	117.26 ± 3.86	0.498
SW620 (colon)	123.61 ± 4.25	0.459
MCF7 (glándula mamaria)	174.98 ± 3.97	0.324
Línea celular normal		
	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
HaCaT (queratinocitos)	56.78 ± 1.48	

Conclusiones

- ECSAKE disminuyó el crecimiento celular conforme se aumentó la concentración de $0.1 \mu\text{g/mL}$ – $200 \mu\text{g/mL}$, sin embargo, se observó en general que a partir de la concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ todas las líneas celulares disminuyeron entre 30% y 85%.
- De acuerdo con los resultados presentados, así como la comparación con parámetros establecidos, ECSAKE no ejerce actividad citotóxica sobre células de cáncer.
- Es necesario aislar los componentes mayoritarios de ECSAKE para identificar los compuestos que posiblemente inhiben la actividad citotóxica de los ácidos triterpénicos.

Referencias

- Abbas, S., Bilsland, A., Alexandros, G., Amedeo, A., Amr, A., Anupam, B., Asfar, A. & Bal, L. (2015). A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. *Seminars in Cancer Biology*, 35, 151-184.
- Acevedo, J., Angeles, J., Rivera, M., López, V., Quintana, N., Magaña, Y. & Santa-Olalla, J. (2013). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización. Barcelona: OmniaScience.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Warter, P. (2008). *Molecular Biology of the cell. Components of the Cell-Cycle Control System*. España: Omega.
- Ávalos, S., Treviño, J., Verde, M., Rivas, C., Oranday, A., Moran, J., Serrano, B. & Morales, M. (2014). Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45 (3) 39-44.
- Benedí, J. & Gómez del Río, M. (2006). Fármacos antineoplásicos. *Farmacia Profesional*, 20 (2), 60-64.
- Borrego, P., Rojas, L., Robles, J., Florentino, S., Hernández, J., Orduz-Díaz, L. & Pombo, L. (2016). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de las especies *Conyza trihecatactis* y *Ageratina vacciniaefolia*. *Universidad Militar Nueva Granada*, 12 (2), 212-227.
- Bland, K., Edward, M. & Copeland III. (2007). *Comprehensive management of benign and malignant disorders*. (3ra., Ed.) New York, USA: Elsevier.
- Campos-Xolalpa, N., Alonso-Castro, A., Sánchez-Mendoza, E., Zavala-Sánchez, M. & Pérez-Gutiérrez, S. (2017). Cytotoxic activity of the chloroform extract and four diterpenes isolated from *Salvia ballotiflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 302-305.
- Campos-Xolalpa, N., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-González, C., Mendoza-Pérez, J. & Alonso-Castro, A. (2018). Terpenes of the Genus *Salvia*: Citotoxicity and Antitumoral Effects. En M. K. Sayeed, *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements* (Vol. 2, págs. 163-199). Singapore: Springer.
- Colotta, F., Avellana, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. (2009). Cancer related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30, 1073-1081.
- Copper, G. & Hausman, R. (2009). *The Eukaryotic Cell Cycle. The Cell: A Molecular Approach*. Estados Unidos: Sinauer Associates Inc. 650-724.
- Chiang, E., Yong, C., Lee, J., Kuin, S. & Who, Y. (2019). Ursolic acid: An overview on its cytotoxic activities against breast and colorectal cancer cell. *Journal of Integrative Medicine*, 17, 155-160.

- Cragg, G. & Newman, D. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 72-79.
- De la Garza, J. & Juárez, P. (2014). El Cáncer. En *¿Qué sabemos del Cáncer en el momento actual?* Monterrey: UANL. 33-46.
- De la Garza, J. & Juárez, P. (2014). El Cáncer. El tratamiento del cáncer. México: UANL. 95-130.
- de Visser, K., Eichten, A. & Coussens, L. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 6, 24-37.
- Díaz, A., Rodríguez, H. & Scull, R. (2011). Cytotoxicity of medicinal plant extracts on the human lung carcinoma cell line A549. *Revista Cubana de Farmacia*, 45 (1) 101-108.
- Escobar, L. R. (2010). Estudio comparativo de los Métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 17 (1), 67-74.
- Esquivel, B., Ortega, A., Soriano-García, A. & Rodríguez-Hahn, L. (1985). Neo-clerodane -type diterpenoids from *Salvia keerlii*. *Phytochemistry*, 24 (8), 1769-1772.
- Fiore, G., Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., Bader, A., Giorgi, G. & Micheli, L. In vitro Antiproliferative Effect of Six *Salvia* species on Human Tumor Cell Lines. (2006). Wiley InterScience. 20, 701-703.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hoeijmakers, J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-374.
- International Agency for Research on Cancer, México Source: Globocan 2018. (2019). Consultado en <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>
- INEGI. (2018). "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de Febrero). México.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2018 de abril de 03). Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamientos/tipos>
- Jacobo-Herrera, N., Jacobo-Herrera, F., Zentella-Dehesa, A., Andrade-Cetto, A., Heinrich, M. & Pérez-Plasencia, C. (2016). Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 391-402.
- Jiang, Y., Zhang, L. & Vasantha, R. (2017). Antiproliferative effects of extracts from *Salvia officinalis* L. and *Salvia miltiorrhiza* Bunge on hepatocellular carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 57-67.
- Jordan, J. (2003). Apoptosis: programmed cell death. *Pharmaceutical Field*, 22(6), 100-105.

- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. (6ta ed). México. MC Graw Hill Interamericana.
- Khazir, J., Ahmad, B., Pilcher, L. & Riley, D. Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters*, 7, 173-181.
- Krebs, J., Goldstein, E. & Kilpatrick, S. (2012). *Lewin. Genes. Fundamentos* (2da ed). México: Medica Panamericana. 192-231.
- Moreno, R., Rodríguez, S., Marín, A. & Emma, S. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal*, 274, 1393-1418.
- Negrini, S., Vassilis, G. & Thanos, D. (2010). Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nature*, 11, 220-226.
- Ojeda, P. (2014). Efecto antiproliferativo y citotóxico del extracto acuoso del agave pitzometl en células tumorales de cáncer cervicouterino HeLa. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- OMS. (14 de Agosto de 2019). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OMS. (29 de Septiembre de 2019). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
- Prendergast, C. (2008). Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene*, 27(28), 3889-3900.
- Reynoso-Noverón, N. & Torres-Domínguez, J. (2017). Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*, 8(1), 9-15.
- Rueda, E., Ramis, C., Fraile, G. & Triana, F. (2013). Citotoxicidad in vitro de extractos laticíferos de *Calotropis procera* (Aiton). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12 (5), 476-492.
- Shephard, E., White, A., Wiedemann G., Bolsover, R. & Hyams, S. (2008). *Biología celular*. España: Acribia. 342-389.
- Sociedad Mexicana de Oncología. Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer. 2016. Consultado en https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC_GUIA.pdf
- Tundis, R., D. Iacopetta., Sinicropi, M.S., Bonesi, M., Leporini, M., Passalacqua, N.G., Ceramella, J., Menichini, F. & Loizzo, M.R. (2017). Assessment of antioxidant, antitumor and pro-apoptotic effects of *Salvia fruticosa* Mill. subsp. *thomasii* (Lacaita) Brullo, Guglielmo, Pavone & Terrasi (Lamiaceae). 106, 155-164.
- Uscanga, A. (2014). Efecto citotóxico de los extractos acuoso y metanólico de *Cuphea aequipetala*, sobre líneas celulares de cáncer y un modelo murino. Nuevo León: Facultad de Ciencias Biológicas.
- Vander-Heiden, M., Lewis, C. & Thompson, C. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-1033.

Wang, K. (2014). Molecular mechanisms of liver injury: apoptosis or necrosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66 (2), 351-356.

Yan, S., Huang, C., Wu, S. & Yin, M. (2010). Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines, *Toxicology in Vitro*, 24, 842-848.

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

Evaluación de la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de
Salvia Keerlii Benth en líneas celulares de cáncer.

Proyecto genérico

Evaluación de productos relacionados con la salud.

Etapas

Evaluación fármaco toxicológica de compuestos activos.

Alumna: Verónica Ballesteros García

Matrícula: 2142042548

Asesora: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Asesor: Dr. Ernesto Sánchez Mendoza

Lugar de desarrollo del proyecto

Laboratorio de investigación química orgánica y productos naturales, edificio n. (UIDIS)
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

Fecha de inicio y terminación

01 de octubre de 2018 – 30 de noviembre de 2019

Introducción

De acuerdo con la OMS, el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células, debido a la alteración en los mecanismos de división y muerte celular. El tumor o masa anormal formado suele invadir el tejido circundante, provocando metástasis a otros órganos del cuerpo (OMS, 2019). (Khazir, et al. 2014).

En México durante el 2018, los principales tipos de cáncer que se presentaron fueron el cáncer de mama, próstata, colorrectal, tiroide y cervicouterino (International Agency for Research on Cancer, 2019). Los tres tipos principales de tratamiento son la cirugía, radioterapia y quimioterapia, sin embargo, algunos pueden presentar resistencia o efectos secundarios no deseados, por lo que es necesario nuevas alternativas terapéuticas contra esta enfermedad (Benedí y Gómez del Río, 2006).

Las plantas son una fuente importante de compuestos con actividad citotóxica, actualmente, algunos son usados efectivamente en quimioterapia. En el caso particular de las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae se encuentra el género *Salvia*, ricas en compuestos como: terpenos y flavonoides. En el Estado de San Luis Potosí se encuentra *Salvia Keerlii* Benth se usa en medicina tradicional para el tratamiento de golpes y torceduras, y se ha reportado la actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico, sin embargo, no se han encontrado estudios que indiquen que presenta actividad citotóxica, por lo que en el presente trabajo se evaluara el mismo extracto clorofórmico en distintas líneas celulares de cáncer y en queratinocitos.

Objetivo General

- Evaluar la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de *Salvia Keerlii* Benth sobre distintas líneas celulares: A549, SKLU-1, SW620, HeLa, MCF7 y queratinocitos como control.

Objetivos Específicos

- Preparar el extracto clorofórmico.

- Evaluar la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de *Salvia keerlii* Benth en distintas líneas celulares de cáncer y en queratinocitos.
- Determinar la CI_{50} de las distintas líneas celulares.

Metodología

Obtención de extracto

El material vegetal se colectó en el municipio de Guadalucazar, Estado de San Luis Potosí. El número de registro proporcionado por el Taxónomo José García Pérez fue SLPM43012. Se realizó una extracción directa a reflujo con 50 g del material seco y molido y 400 mL de cloroformo, la mezcla se calentó a temperatura de ebullición durante 4 h, posteriormente, se dejó enfriar y se filtró a vacío.

Cultivos Celulares

Se utilizaron las líneas celulares A549, SKLU-1, SW620, HeLa, MCF7 y SiHa de origen tumoral humano, y HaCaT de epidermis humano. Se mantuvieron en medio de Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina en cajas de cultivo celular a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂.

Ensayo de citotoxicidad por el método de MTT

De cultivos confluentes se despegaron células con tripsina 1x, posteriormente fueron resuspendidas en medio DMEM suplementado para determinar el número de células requeridas por pozo de 5×10^3 . Después de sembrar cada placa, se dejó incubar por 24 h. Por otro lado, ECSAKE fue disuelto en PBS (buffer fosfato salino) y aplicado a cada uno de los pozos en concentraciones de 0.1 a 200 μ g/mL. Una vez agregado el tratamiento, las placas fueron incubadas durante 48 h. Al término del tratamiento, se agregaron 10 μ L de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio) (5 μ g/mL disueltos en PBS) por pozo y nuevamente se incubaron por 3 h. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 100 μ L de DMSO para solubilizar los cristales. La placa se agitó por 10 segundos y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de 540 nm. Con los valores obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad celular, la concentración inhibitoria media (CI_{50}) y el Índice de Selectividad (Borrego, et al. 2016).

Análisis de resultados y discusión

Rendimiento

El rendimiento fue de 3.85%.

Ensayo de citotoxicidad

Se determinó la actividad citotóxica del extracto clorofórmico de *Salvia keerlii* Benth (ECSAKE) por el método de MTT. Se evaluaron varias concentraciones (0.1, 1, 10, 100 y 200 µg/mL de ECSAKE sobre distintas líneas celulares de cáncer y en queratinocitos como control.

Se observa que ECSAKE disminuyó el crecimiento de las líneas celulares a partir de la concentración de 100 µg/mL en varias de las líneas celulares. Sin embargo, para la línea celular A549 se mostró la disminución del crecimiento a partir de la concentración de 0.1 µg/mL y para HaCaT a partir de 50 µg/mL. Por otro lado, a concentración de 200 µg/mL de ECSAKE todas las líneas celulares presentaron cambios morfológicos, así como baja densidad celular. A549 y SKLU-1 presentaron la mejor actividad citotóxica, ya que mostraron las CI_{50} más bajas 55.82 ± 5.43 µg/mL y 99.57 ± 3.75 µg/mL, respectivamente. HaCaT presentó una CI_{50} de 56.78 ± 1.48 µg/mL, con base en este resultado y con los de las líneas celulares de cáncer, se calculó el índice de selectividad (IS). Los resultados muestran que la citotoxicidad de ECSAKE en células normales es mayor que en la mayoría de las células de cáncer ($IS < 1$), es decir, que ECSAKE no es selectivo sobre células de cáncer, SKLU-1 (0.570), SiHa (0.498), SW620 (0.459), HeLa (0.484) y MCF7 (0.324). A549 presentó una IS igual a 1.018, aunque este valor es mayor a 1, no presenta una selectividad significativa.

El grupo de trabajo realizó previamente la evaluación de la actividad citotóxica de cisplatino en varias de las líneas celulares de cáncer presentados en este trabajo, A549, HeLa, y MCF7, con una CI_{50} obtenida de 4.6 ± 2.6 µg/mL, 1.06 ± 3.8 µg/mL y 2.14 ± 2.7 µg/mL respectivamente (Campos-Xolalpa, et al. 2017). La comparación entre estos resultados y los obtenidos en el presente trabajo nos confirman que ECSAKE no presenta actividad sobre las líneas celulares estudiadas. Esta conclusión se confirma además con los parámetros establecidos por el NCI sobre compuestos o extractos con actividad citotóxica, el cual indica que un extracto de

planta es citotóxico si presenta una CI_{50} menor o igual a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para compuestos puros menor o igual a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Los resultados sugieren que ECSAKE podría estar constituido por una mezcla de compuestos que inhiben la actividad citotóxica de ambos ácidos triterpénicos, sin embargo, se requieren de más estudios que sustenten esta observación, tal como estudiar la actividad de las fracciones de ECSAKE, aislar e identificar los compuestos de manera individual y corroborar también su actividad o en su caso si hay efecto inhibitorio.

Conclusiones

ECSAKE disminuyó el crecimiento celular conforme se aumentó la concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, se observó en general que a partir de la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ todas las líneas celulares disminuyeron entre 30% y 85%.

De acuerdo con los resultados presentados, así como la comparación con parámetros establecidos, ECSAKE no ejerce actividad citotóxica sobre células de cáncer.

Es necesario aislar los componentes mayoritarios de ECSAKE para identificar los compuestos que posiblemente inhiben la actividad citotóxica de los ácidos triterpénicos.

Bibliografía

- Benedí, J. & Gómez del Río, M. (2006). Fármacos antineoplásicos. *Farmacia Profesional*, 20 (2), 60-64.
- Campos-Xolalpa, N., Alonso-Castro, A., Sánchez-Mendoza, E., Zavala-Sánchez, M. & Pérez-Gutiérrez, S. (2017). Cytotoxic activity of the chloroform extract and four diterpenes isolated from *Salvia ballotiflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 302-305.
- Chiang, E., Yong, C., Lee, J., Kuin, S. & Who, Y. (2019). Ursolic acid: An overview on its cytotoxic activities against breast and colorectal cancer cell. *Journal of Integrative Medicine*, 17, 155-160.
- International Agency for Research on Cancer, México Source: Globocan 2018. (2019). Consultado en <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- INEGI. (2018). "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de Febrero). México.
- Khazir, J., Ahmad, B., Pilcher, L. & Riley, D. Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters*, 7, 173-181.
- OMS. (14 de Agosto de 2019). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Yan, S., Huang, C., Wu, S. & Yin, M. (2010). Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines, *Toxicology in Vitro*, 24, 842-848.