

**Evaluación de la actividad antitumoral de muestras obtenidas de plantas colombianas con  
uso medicinal.**

**Diana Carolina Suárez Ángel**

**Trabajo de Grado para optar al título de Bióloga**

**Directora:**

**Raquel Elvira Ocazonez Jimenez**

**Ph.D. Immunología Básica e Aplicada**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Bucaramanga**

**2017**

### Agradecimientos

A la profesora Raquel E. Ocazonez por darme la oportunidad de hacer parte de este proyecto, por sus enseñanzas y por la confianza que depositó en mí.

A mi mamá Mercedes por ser mi ejemplo a seguir, por su inmenso amor y por enseñarme que no hay nada imposible, que los límites sólo están en nuestra mente.

A Elizabeth Quintero mi mejor amiga, gracias por guiarme y ayudarme en el transcurso de esta pasantía.

A Sindi Velandia, María Camila Flechas, María Fernanda Carreño, Cinthy Jiménez y a todo el grupo CINTROP gracias por sus correcciones.

A mis amigos Lucía, Mauricio, Diego, Mayo y Wilson gracias por su constante ayuda y apoyo.

A la Universidad Industrial de Santander y a los profesores por ser parte de mi formación académica.

**Contenido**

	<b>Pág.</b>
Lista de Tablas .....	9
Introducción .....	12
1. Objetivos.....	16
1.1 General.....	16
1.2 Específicos .....	16
2. Materiales y Métodos.....	17
2.1 Muestras.....	17
2.2 Células.....	17
2.3 Cultivo de las líneas celulares.....	18
2.4 Evaluación de la actividad antitumoral.....	18
2.4.1 Reducción de la viabilidad celular.....	18
2.4.2 Efecto sobre la proliferación celular.....	19
2.4.3 Inducción de apoptosis.....	20
2.5 Análisis de datos .....	20
2.5.1 Viabilidad celular – ensayos del MTT.....	20
2.5.2 Proliferación celular – ensayos en tubo de vidrio.....	21

---

2.5.3 Inducción de apoptosis.....	21
2.6 Consideraciones éticas .....	21
3. Resultados.....	22
3.1 Cultivo de las líneas celulares.....	22
3.2 Actividad de Zornia brasiliensis. ....	25
3.2.1 Efecto sobre la sobrevivencia celular .....	25
3.2.2 Efecto sobre la proliferación celular .....	28
3.2.3 Inducción de apoptosis.....	30
3.3 Actividad de Lippia origanoides.....	34
3.3.1 Efecto sobre la sobrevivencia celular: .....	34
3.3.2 Efecto sobre la proliferación celular .....	38
3.3.3 Inducción de apoptosis:.....	39
4. Discusión.....	40
5. Conclusiones .....	44
Referencias Bibliográficas .....	46

## Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Curvas de proliferación de células de carcinoma hepático humano, HepG-2 (A) y células de riñón humano, Hek-293 (B). Los datos representan el promedio de dos ensayos independientes $\pm$ DS. Los conteos se realizaron cada 24 h durante 5 días. ....	24
Figura 2 Efecto del AE de <i>Zornia brasiliensis</i> sobre la sobrevivencia de células cancerosas HepG-2 comparado con células normales HeK-293. Las células se trataron con concentraciones del AE y 72 h después la actividad enzimática se evaluó en el ensayo del MTT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado. ....	26
Figura 3 Efecto del EXT de <i>Zornia brasiliensis</i> sobre la sobrevivencia de células cancerosas HepG-2 comparado con células normales HeK-293. Las células se trataron con concentraciones del AE y 72 h después la actividad enzimática se evaluó en el ensayo del MTT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado. ....	27
Figura 4 Efecto de <i>Zornia brasiliensis</i> sobre la proliferación de la célula cancerosa (HepG-2) comparada con célula normal (Hek-293). Las células se trataron 72 h. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes $\pm$ DS. ....	29
Figura 5 Efecto el AE de <i>Zornia brasiliensis</i> sobre el crecimiento y morfología de células cancerosas (HepG-2) comparado con la célula normal (Hek-293). Fotografías de monocapas celulares captadas bajo observación con microscopio de luz corriente (objetivo 40X). Etoposide se usó como control positivo. Tratamiento por 24 h. ....	31

Figura 6 Inducción de apoptosis en células cancerosas HepG-2 y normales Hek-293 tratadas (24 h) con AE de <i>Zornia brasiliensis</i> . Fotografías de células teñidas con Hoechst captadas bajo observación con microscopio de fluorescencia (40X). Se observa condensación de cromatina y cuerpos apoptóticos (flechas).....	32
Figura 7 Número de células cancerosas y normales en apoptosis debido a tratamiento con el AE de <i>Z. brasiliensis</i> y etopósido (Eto: 80 $\mu$ M). * $p < 0.01$ (Test de Tukey).....	33
Figura 8 Efecto del AE de <i>Lippia origanoides</i> sobre la sobrevivencia de células cancerosas HepG-2 comparado con células normales HeK-293. Las células se trataron con concentraciones del AE y 72 h después la actividad enzimática se evaluó en el ensayo del MTT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado. ....	35
Figura 9 Efecto del EXT de <i>Lippia origanoides</i> sobre la sobrevivencia de células cancerosas HepG-2 comparado con células normales HeK-293. Las células se trataron con concentraciones del AE y 72 h después la actividad enzimática se evaluó en el ensayo del MTT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado. ....	37
Figura 10 Efecto de <i>Lippia origanoides</i> sobre la proliferación de la célula cancerosa (HepG-2) comparada con célula normal (Hek-293). Las células se trataron 72 h. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes $\pm$ DS. ....	38

## Lista de Tablas

## Pág.

Tabla 1 Datos usados para construir las curvas de proliferación de las líneas celulares. ....	25
Tabla 2 Valores de CE <sub>50</sub> e IS de muestras de <i>Zornia brasiliensis</i> . ....	28
Tabla 3 Datos obtenidos en experimentos de evaluación del efecto anti-proliferante de <i>Zornia brasiliensis</i> . ....	29
Tabla 4 Datos de experimentos para evaluar el efecto anti-proliferante de <i>Zornia brasiliensis</i> .	30
Tabla 5 Proporción de células HepG-2 y Hek-293 en apoptosis debido a tratamiento con AE de <i>Zornia brasiliensis</i> . ....	34
Tabla 6 Valores de CE <sub>50</sub> e IS de muestras de <i>Lippia origanoides</i> . ....	35
Tabla 7 Datos de experimentos para evaluar el efecto anti-proliferante de <i>Lippia origanoides</i> .	38
Tabla 8 Datos de experimentos para evaluar el efecto anti-proliferante de <i>Lippia origanoides</i> .	39

## Resumen

**Título:** Evaluación de la actividad antitumoral de muestras obtenidas de plantas colombianas con uso medicinal\*.

**Autor:** Diana Carolina Suárez Ángel\*\*

**Palabras clave:** Actividad antitumoral, *Lippia origanoides*, *Zornia brasiliensis*, apoptosis, cáncer, actividad antiproliferante.

### Descripción:

**Introducción-** El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, razón por la cual se siguen buscando nuevas opciones para su tratamiento. Los productos naturales EXT (extractos) y AE (aceites esenciales) constituyen una fuente de sustancias con gran actividad biológica y son útiles como tratamientos complementarios para el cáncer, aportando efectos beneficiosos y mejorando la calidad de vida de los pacientes cuando estas medicinas a base de plantas se utilizan en combinación con agentes terapéuticos convencionales.

**Objetivo-** Se evaluó la actividad antitumoral de las muestras de aceite esencial y extracto (fracción 1 y 2) obtenidas de *Lippia origanoides* y *Zornia brasiliensis*.

**Metodología-** Mediante el ensayo MTT se determinó la inhibición de la viabilidad sobre células de carcinoma hepático humano (HepG-2) y células de riñón normales (Hek-293). Para determinar el efecto de las muestras sobre la proliferación celular se usó el ensayo por exclusión de azul de tripán y se determinó la inducción de apoptosis de la muestra con potencial antitumoral.

**Resultados-** No se evidenció efecto inhibitorio sobre la proliferación in vitro de las células cancerosas evaluadas en el ensayo de MTT. En el ensayo de inhibición de la proliferación celular el AE de *Zornia brasiliensis* a concentración de 30 µg/mL evidenció efecto protector hacia la célula de riñón humano y mayor afectación en las células de carcinoma hepático humano, mientras que las muestras de *Lippia origanoides* mostraron toxicidad en ambas líneas celulares. El AE de *Zornia brasiliensis* indujo apoptosis en células cancerosas a las concentraciones evaluadas.

**Conclusiones-** Se evidenció efecto inhibitorio del AE de *Zornia brasiliensis* sobre la proliferación in vitro de células de carcinoma hepático humano. Además, indujo muerte celular por apoptosis, mostrando diferencias significativas entre la célula cancerosa con respecto a la célula de riñón humano.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ciencias Básicas, Escuela de Biología. Orientadora; Ph.D Raquel Ocazonez Jiménez

## Abstract

**Title:** Evaluation of antitumoral activity of samples obtained from colombian plants with medicinal use\*.

**Author:** Diana Carolina Suárez Ángel\*\*

**Key Words:** Antitumor activity, *Lippia organoides*, *Zornia brasiliensis*, apoptosis, cancer, antiproliferative activity.

### Description:

**Introduction-** Cancer is one of the main causes of death in the world, which is why new options for treatment are still being sought. Natural products EXT (extracts) and EO (essential oils) constitute a great source of positive biological activity and are useful as cancer treatments. When these herbal remedies are used in combination with conventional therapeutic agents they can have beneficial effects on patient's quality of life.

**Objective-** The antitumor activity of the essential oil and extract samples (Fraction 1 and 2) obtained from *Lippia organoides* and *Zornia brasiliensis* was evaluated.

**Methodology-** The inhibition of viability on human hepatic carcinoma cells (HepG-2) and normal kidney cells (Hek-293) were determined by the MTT assay. In order to determine the effect of the samples on cell proliferation, the trypan blue exclusion test was used and the induction of apoptosis of the antitumor potential sample was determined

**Results-** No inhibitory effect was demonstrated on in vitro proliferation of cancer cells evaluated in the MTT assay. In the cell proliferation inhibition assay the EO of *Zornia brasiliensis* at a concentration of 30 µg / mL showed protective effect towards the human kidney cells and greater involvement in the human hepatic carcinoma cells, while the *Lippia organoides* samples showed toxicity in both cell lines. *Zornia brasiliensis* EO induced apoptosis in cancer cells at the concentrations evaluated.

**Conclusions-** The inhibitory effect of *Zornia brasiliensis* EO on the in vitro proliferation of human hepatic carcinoma cells was evidenced. Moreover, it induced cell death by apoptosis, showing significant differences between the cancer cell and the human kidney cell.

---

\* Project of grade

\*\* Science Faculty, Department of Biology. Professor: Ph.D Raquel Ocazonez Jiménez.

## Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en la actualidad y el número de casos está aumentando gradualmente (Ospina, Huertas, Montaña, & Rivillas, 2015). Existen varios medicamentos disponibles para tratar los diversos tipos de cáncer, pero su eficacia y seguridad son limitadas (JG Marin, Briz, J Monte, G Blazquez, & IR Macias, 2012; Rebucci & Michiels, 2013). Las principales desventajas en la quimioterapia del cáncer son la toxicidad de los fármacos utilizados y los efectos secundarios asociados (Dunoyer, Marimón, & Zambrano, 2016; Jain, Jahagirdar, Nilendu, & Sharma, 2017). La medicina tradicional se considera una alternativa para aminorar los síntomas y es fuente para el descubrimiento de nuevos fármacos (Bahmani, Shirzad, Shahinfard, Sheivandi, & Rafieian-Kopaei, 2017). En los últimos años se ha incrementado el uso de productos naturales elaborados a base de extracto (EXT) o aceite esencial (AE) obtenido de las plantas.

Los AEs y EXTs son mezclas complejas biosintetizadas por las plantas, con una amplia variedad de compuestos bioactivos (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008). Estas mezclas han sido utilizadas para la fabricación de productos de uso humano como cosméticos, perfumes y medicamentos para aliviar síntomas de diferentes enfermedades (Amirghofran, 2012). Actualmente, han demostrado ser eficaces y seguros en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Componentes de los AEs como  $\beta$ -cariofileno y citral, pueden inhibir la proliferación celular y tener efecto citotóxico en células cancerosas en estudios *in vivo* (Gautam, Mantha, & Mittal, 2014; Lesgards, Baldovini, Vidal, & Pietri, 2014).

En Colombia existe una amplia diversidad de plantas medicinales, de las cuales 2.404 especies presentan estudios etnobotánicos en diferentes departamentos del país. De estas, 1.442 corresponden a especies consideradas nativas del neotrópico y 214 son exclusivas del país (Bernal, García, & Quevedo, 2011). Por otra parte, en el *Vademécum de Plantas Medicinales de Colombia* se registran 127 especies, pero solo algunas tienen uso documentado para el tratamiento del cáncer (INVIMA 2008). Estudios realizados en Colombia han evaluado el potencial anticancerígeno de productos de plantas con base en su uso terapéutico (Aguillón, Maldonado, Loango, Arango, & Landázury, 2013; Areiza, Maldonado, & Rojano, 2013). Sin embargo, estos estudios son escasos y limitados. La falta de conocimiento sobre el potencial anticáncer de estos productos naturales obliga al uso de medicamentos que son de alto costo para el paciente y para el sistema de salud del país; además, causan efectos adversos incrementando el costo de la atención médica (Alba & Moncada, 2012).

*Lippia origanoides* es una planta aromática de la familia Verbenaceae. En Colombia se conoce con los nombres de orégano cimarrón, orégano de cerro, orégano y orégano ancho (Bernal *et al.*, 2011). Es usada en la medicina tradicional como remedio para trastornos gastrointestinales, respiratorios y como un antiséptico general para las heridas (Pascual, Slowing, Carretero, Mata, & Villar, 2001). Su aceite esencial (AE) ha demostrado actividad antimicrobiana (Majolo, Rocha, Chagas, Chaves, & Bizzo, 2017; Sarrazin *et al.*, 2015), citotóxica (Zapata, Durán, Stashenko, Correa, & Betancur, 2009), anti-hipertensiva (Coelho *et al.*, 2015), antiespasmódica, anti-inflamatoria, analgésica (Oliveira, Leitão, Fernandes, & Leitão, 2014) y antioxidante (da Silva *et al.*, 2017; Damasceno, Silva, Andrade, Sousa, & Maia, 2011). Componentes del AE como timol, carvacrol y 1,8-cineol han mostrado actividad antioxidante (Amorati, Foti, & Valgimigli, 2013). (Stashenko, Martínez, Cala, Durán, & Caballero, 2013) demostraron que uno de los componentes

mayoritarios del AE es el  $\beta$ -cariofileno, el cual posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Legault & Pichette, 2007).

Otra planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional de varios países es *Zornia brasiliensis*, la cual pertenece a la familia Fabaceae. Se conoce con los nombres de urinana o carrapicho, es utilizada como diurético y para tratar enfermedades venéreas; además tiene propiedades espasmolíticas (Rojas, Bah, Rojas, Serrano, & Pacheco, 1999), antibacterianas (Obi, Ramalivhana, Samie, & Igumbor, 2007), citotóxicas (Arunkumar, Nair, & Subramoniam, 2012; David *et al.*, 2007), y antinociceptivas (da Silva *et al.*, 2013). Recientemente, se demostró que el AE de la hoja de esta planta inhibe la proliferación celular *in vitro* en células de carcinoma hepático humano (HepG-2) así como el crecimiento de tumores en ratones (Costa *et al.*, 2015).

En estudios realizados por el grupo de Arbovirus del CINTROP se encontró que los AEs de *Lippia origanoides* y *Zornia brasiliensis* inhiben la viabilidad de células de cáncer cervical (HELA) (Velandia, Flechas, Stashenko, & Ocazonez, 2016). Después de una amplia revisión en bases de datos, no se encontró información documentada de actividad anticancerígena de *Lippia origanoides* sobre célula hepática, mientras que *Zornia brasiliensis* cuenta con un reporte de este tipo (Costa *et al.*, 2015).

En el contexto antes descrito, el propósito fundamental del presente estudio fue evaluar la actividad antitumoral del AE y EXT obtenido de *Lippia origanoides* y *Zornia brasiliensis* crecidas en Colombia. Este estudio se llevó a cabo sobre células de cáncer de hígado HepG-2 y células normales de riñón humano como control. La selección de plantas mencionadas anteriormente se llevó a cabo tomando como base el listado de extractos y aceites analizados en el CINTROP. Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: muestras de planta con AE y dos fracciones del EXT,

muestras que presentaran el mayor índice de selectividad y el uso tradicional en el tratamiento de dolencias hepáticas.

## 1. Objetivos

### 1.1 General

Estudiar el potencial de *Lippia origanoides* y *Zornia brasiliensis* como fuente primaria para el descubrimiento de medicamentos para el tratamiento de carcinoma hepático humano.

### 1.2 Específicos

1. Evaluar la actividad citotóxica del extracto y el aceite esencial de *L. origanoides* y *Z. brasiliensis* sobre células de carcinoma hepático.
2. Determinar el efecto de las muestras de *L. origanoides* y *Z. brasiliensis* sobre la proliferación *in vitro* de la célula cancerosa.
3. Determinar la concentración efectiva de la muestra activa que induce apoptosis de la célula cancerosa.
4. Establecer la selectividad de las muestras para la célula cancerosa.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Muestras

Se incluyeron muestras de AE y EXT de *Lippia origanoides* Kunth H.B.K. (voucher COL582599) y *Zornia brasiliensis* Vogel (voucher COL582604). Las muestras se obtuvieron en el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL) de la UIS y fueron suministradas al CINTROP para el proyecto # 4 del programa de la red de bioprospección. El AE se obtuvo por hidrodestilación asistida por microondas –MWHD. El EXT se obtuvo por el procedimiento con fluido supercrítico -SFE- (Stashenko *et al.*, 2013), a 80 bar (fracción 1) y 40 bar (fracción 2). Para este trabajo, se usaron alícuotas de una preparación inicial (100 mg/mL en DMSO) que permanecen almacenadas a -20 °C. Del EXT se incluyeron dos fracciones y del AE la mezcla completa. Para cada experimento se usó una alícuota de la preparación de la muestra y diluciones de la misma en medio de cultivo DMEM/F12.

### 2.2 Células

Se usaron líneas celulares de origen humano: cancerosas de hígado (HepG-2, ATCC® HB-8065™) y normales de riñón embrionario (Hek-293 ATCC® CRL-1573™). Las células se cultivaron en medio DMEM/F12 [GIBCO Co.] suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF [GIBCO, Co.]) y antibiótico (P/E: Penicilina/Estreptomicina [Invitrogen Carlsbad, CA.]). Las

células se mantuvieron a 37°C, en atmósfera CO<sub>2</sub> 5% y su seguimiento se realizó con microscopio invertido (Olympus CKX41/31).

### 2.3 Cultivo de las líneas celulares.

Antes de realizar la evaluación de la actividad antitumoral se determinó el comportamiento en el tiempo de cada línea celular. Se sembró una concentración inicial de 100.000 cel/mL en cajas de cultivo de 12.5 cm<sup>2</sup> y se realizó el recuento de cada caja durante cinco días. Para determinar la viabilidad celular se usó el método de exclusión por azul de tripán. El recuento de células se realizó a partir de una mezcla de 10 µL de suspensión celular y 10 µL de azul de tripán (0,4%) bajo microscopio haciendo uso de un hemocitómetro de Neubauer. El porcentaje de células viables se estimó a partir del conteo de células vivas totales (no teñidas) sobre el número de células totales (teñidas y no teñidas). Por cada línea celular se llevaron a cabo dos ensayos independientes.

### 2.4 Evaluación de la actividad antitumoral

**2.4.1 Reducción de la viabilidad celular.** Para determinar la concentración efectiva de la muestra que redujo el 50% (CE<sub>50</sub>), la viabilidad de la célula tumoral y normal se hicieron los experimentos de la siguiente manera: las células se sembraron en placas de 96 pozos (8.000 cel/pozo) en medio que contenía o no concentraciones (50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL), de AE o EXT. La placa se incubó 72 h a 37°C. La viabilidad del cultivo se determinó con el ensayo del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) siguiendo el protocolo del laboratorio (Gómez *et al.*, 2013). Al término de la incubación, se retiró el medio de cultivo que

contenía la muestra, se adicionó una solución de MTT (20  $\mu$ L a concentración de 5 mg/mL. Sigma Co.) a cada pozo y la placa se incubó nuevamente 4 h a 37°C. Posteriormente, el precipitado formado que contenía cristales de formazán fue solubilizado en 100  $\mu$ L de DMSO. El grado de reducción de MTT a formazán se cuantificó midiendo la intensidad de color (densidad óptica: DO) en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific) a 580 nm. Cada muestra se evaluó por duplicado en tres ensayos independientes.

**2.4.2 Efecto sobre la proliferación celular.** Para determinar si la muestra reducía o no la proliferación celular, se usaron concentraciones de 30  $\mu$ g/mL y 100  $\mu$ g/mL. Estas corresponden a la mínima y máxima concentración de una muestra vegetal que debe reducir en 50% o más la proliferación celular para considerar que tiene actividad antitumoral (Cos, Vlietinck, Berghe, & Maes, 2006). El ensayo consistió en: las células (160.000 cel/pozo) se sembraron en tubos de vidrio pequeños con tapa de rosca en medio de cultivo que contenía o no la muestra a las concentraciones mencionadas anteriormente. Los tubos se incubaron durante 72 h y al término, las monocapas celulares se lavaron con 1 mL de PBS; Luego, las células se desprendieron de la superficie del vidrio con 500  $\mu$ L de tripsina y se resuspendieron en 500  $\mu$ L de medio DMEM/F12. A partir de esta preparación se realizó el recuento de células para determinar la viabilidad (Cotter & Martin, 1996).

El número de células en el recuento a las 72 h se usó para determinar la tasa de crecimiento con respecto al número de células en la siembra inicial. Para evitar el sesgo del experimentador, el recuento se realizó, al menos una vez por una persona distinta. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

**2.4.3 Inducción de apoptosis.** Con el fin de determinar si el mecanismo de muerte celular era por inducción de apoptosis, se realizó un ensayo para observación de condensación de cromatina como un indicador de esta (Brady, 2004). Brevemente, 15.000 células en medio de cultivo que contenía AE (CE<sub>50</sub>, 30 y 100 µg/mL) se sembraron en micropocillos de placas de vidrio para ensayos de inmunofluorescencia y se incubaron 24 h a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación, las células se fijaron con *p*-formaldehído (2% en tampón fosfato salino [PBS]) por 10 min a temperatura ambiente y después de un lavado con PBS se adicionó colorante Hoechst-33342 (Sigma Co.) 5 µg/mL. Las placas se incubaron en la oscuridad por 15 min a 37°C y luego se observaron con un microscopio de fluorescencia (Ex 450 – 490; cámara Canon EOS 70D). El recuento de células se llevó a cabo en tres campos diferentes para cada pozo donde se contaron al menos 200 células totales. Se estimó el número de células con cromatina condensada sobre el número total de células teñidas con Hoechst-33342. En cada experimento se incluyeron células no-tratadas y células tratadas con la muestra y con el inductor de apoptosis (etopósido [Sigma Co.] a concentración de 80 µM). Cada muestra se evaluó por duplicado en tres experimentos independientes.

## 2.5 Análisis de datos

**2.5.1 Viabilidad celular – ensayos del MTT.** Los datos de D.O. obtenidos en ensayos del MTT se usaron para determinar la concentración que inhibió 50% la viabilidad celular. La citotoxicidad del AE y del EXT se expresó como concentración citotóxica 50 o CC<sub>50</sub> para célula renal normal (Hek-293). La actividad sobre la célula cancerosa (HepG-2) se expresó como concentración efectiva 50 o CE<sub>50</sub> + índice de selectividad (IS); el IS es la proporción entre la CC<sub>50</sub> para la célula

renal normal (Hek-293) y la  $CE_{50}$  para la célula cancerosa. El cálculo de la  $CC_{50}$  se realizó por medio del ajuste de los valores de sobrevivencia obtenidos en un modelo de regresión logística usando el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2013; <https://www.rstudio.com/>).

**2.5.2 Proliferación celular – ensayos en tubo de vidrio.** Los datos del recuento que se realizaron en cámara de Neubauer se registraron en Excel, en donde se sacó un promedio y desviación estándar de tres ensayos independientes en cada línea celular. Para cada muestra (AE y EXT) se estimó un porcentaje de viabilidad y tasa de proliferación. Para establecer si existen diferencias significativas se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) aplicando una prueba de Tukey. Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados significativos.

**2.5.3 Inducción de apoptosis.** Para calcular el porcentaje de células en apoptosis, se determinó la proporción de células que experimentaron condensación de cromatina con respecto al número de células totales. Para establecer las diferencias significativas entre células tratadas o no, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) aplicando una prueba de Tukey con el paquete estadístico del software libre R (R Development Core Team, 2013; <https://www.rstudio.com/>). Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados significativos.

## 2.6 Consideraciones éticas

El presente trabajo está anidado al Proyecto No. 4 “*Evaluación de actividades citotóxicas, alergénica, antimicrobiana, inmunomoduladora y antitumoral de aceites esenciales y extractos SFE de plantas tropicales Colombianas, ingredientes potenciales para la industria cosmética,*

*farmacéutica y de aseo*", el cual está siendo ejecutado por el grupo de Arbovirus del CINTROP, UIS y es uno de los que conforman el programa de la Unión Temporal BioRed, Colciencias y el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (UT-BioRed-CO-CENIVAM). El programa de la UT-BioRed-CO-CENIVAM se financia con recursos del Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Contrato RC-0572-2012.

El material vegetal utilizado en este trabajo es suministrado por el Estado Colombiano a través del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. El material fue recolectado bajo el Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados No. 101 del 3 de junio de 2014, suscrito entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la UT-BioRed-CO-CENIVAM.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la UT-BioRed-CO-CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander.

### **3. Resultados**

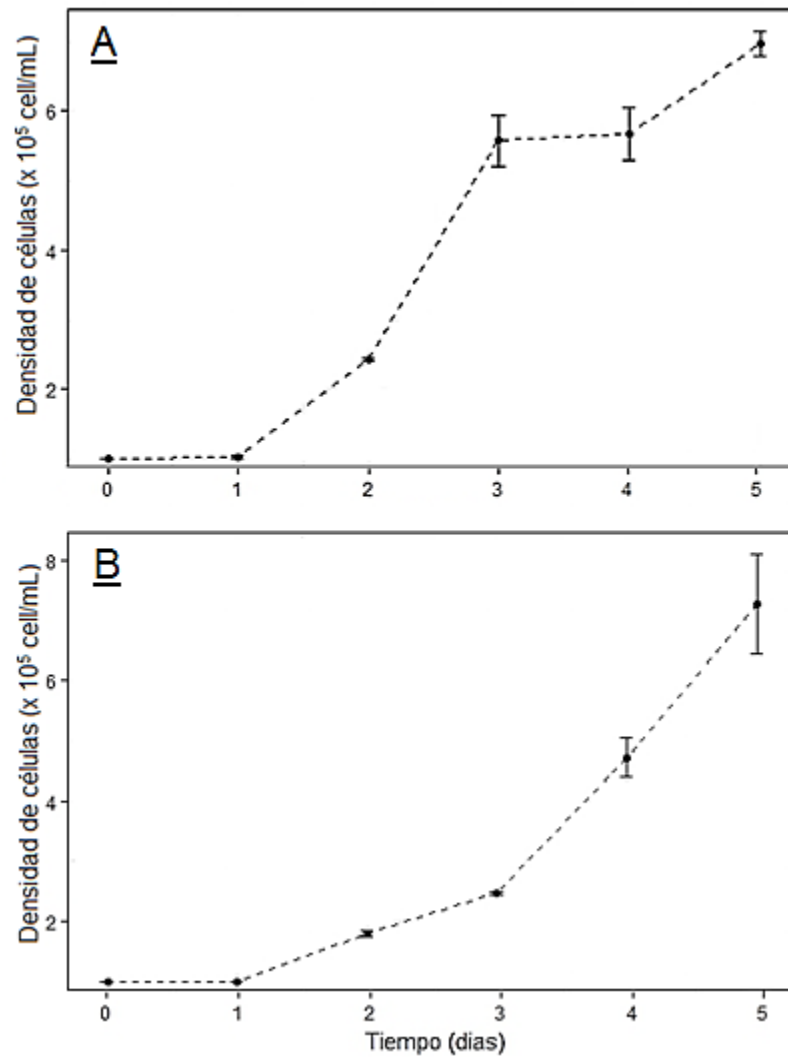
#### **3.1 Cultivo de las líneas celulares.**

Previo a la evaluación de la actividad antitumoral, se estableció la curva de crecimiento de la línea celular HepG-2 y Hek-293. Las células ( $5 \times 10^5$  cel/mL) se sembraron en cajas de cultivo de 12.5

cm<sup>2</sup> y se incubaron a 37°C en, atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Se monitoreó su crecimiento durante 5 días.

La figura 1 presenta las fases de proliferación de cada una de las líneas celulares. En el día 1 se observó la fase LAG o fase de adaptación ya que no se duplicó el número de células. En los días 2 y 3 se observó la fase LOG o de crecimiento exponencial y del día 3-5 la fase plateau o cese de proliferación e inicio de diferenciación celular. En la tabla 1 se detallan los datos de cada una de las curvas de crecimiento. Para cada día se determinó el número total y proporción de células viables por medio del colorante de exclusión azul de tripán. Cada punto que se observa en la figura 1 corresponde a dos experimentos independientes que reflejan la densidad celular de cada uno de los cultivos.

Los resultados de las curvas de proliferación celular permiten concluir que, al tercer día de haber sembrado las células en las cajas de cultivo, la densidad celular de cada línea fue óptima para realizar el tratamiento con las muestras seleccionadas.



*Figura 1* Curvas de proliferación de células de carcinoma hepático humano, HepG-2 (A) y células de riñón humano, Hek-293 (B). Los datos representan el promedio de dos ensayos independientes  $\pm$  DS. Los conteos se realizaron cada 24 h durante 5 días.

Tabla 1

Datos usados para construir las curvas de proliferación de las líneas celulares.

Día	HepG-2		Hek-293	
	Número	Viabilidad	Número	Viabilidad
0	100,000	1,0	100,000	1,0
1	100,000	1,0	100,000	0,85
2	240,000	1,0	145,700	0,94
3	520,000	1,0	295,000	0,95
4	530,000	0,9	335,000	0,89
5	680,000	0,8	330,000	0,97
0	100,000	1,0	100,000	0,99
1	105,000	1,0	130,000	0,93
2	245,000	1,0	275,000	0,96
3	595,000	1,0	392,500	0,96
4	605,000	0,9	200,000	0,89
5	715,000	0,8	157,500	0,9

Las células ( $5 \times 10^5$  cel/mL) se sembraron en cajas de cultivo de 12.5 cm<sup>2</sup>.

La viabilidad se determinó por coloración con azul de tripan. 1=100%.

### 3.2 Actividad de *Zornia brasiliensis*.

**3.2.1 Efecto sobre la sobrevivencia celular:** Las líneas celulares se trataron 72 h con diluciones seriadas de las muestras de la planta y al término se determinó el porcentaje de sobrevivencia midiendo actividad enzimática mediante el ensayo de MTT. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron a un modelo de regresión logística simple.

Con el AE se observó reducción del 25% la sobrevivencia celular de la línea cancerosa y 70% sobre la línea normal a concentración de 50 µg/mL (Figura 2). La CE<sub>50</sub> para la célula cancerosa fue notoriamente mayor que para la célula normal (250 vs 29 µg/mL) y en consecuencia el IS fue < 0.5 (Tabla 2). Los resultados permiten concluir que el AE a las concentraciones evaluadas no presentó efecto inhibitorio sobre la proliferación *in vitro* de las células cancerosas.

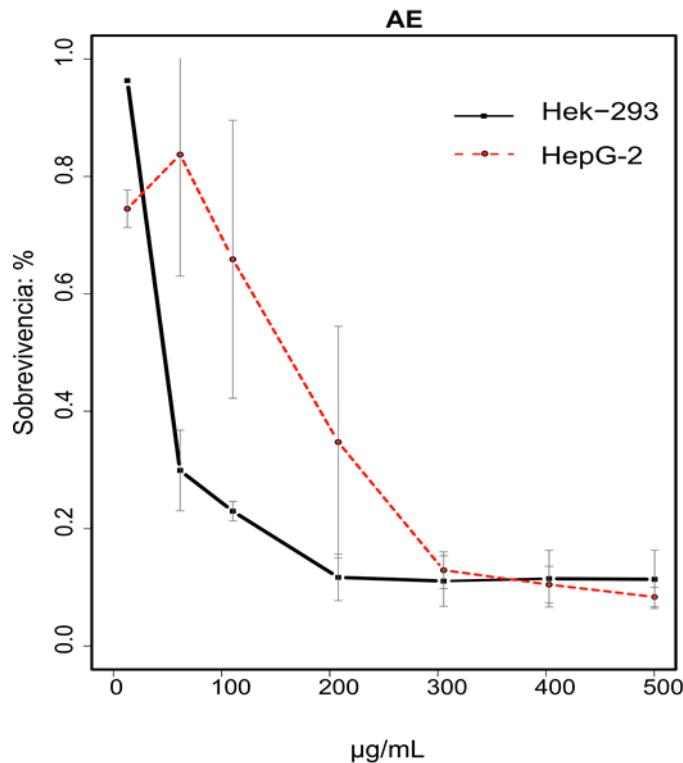


Figura 2 Efecto del AE de *Zornia brasiliensis* sobre la supervivencia de células cancerosas HepG-2 comparado con células normales HeK-293. Las células se trataron con concentraciones del AE y 72 h después la actividad enzimática se evaluó en el ensayo del MTT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado.

Con el EXT las curvas dosis-respuesta se presentan en la Figura 3. La fracción 1 (F1): redujo 100% la supervivencia celular de ambas líneas celulares a las concentraciones evaluadas (50 – 500 µg/mL); en consecuencia, no se pudo estimar la  $CE_{50}$  y para ambas líneas se consideró  $< 50$  µg/mL. El EXT fracción 2 (F2) redujo 60% la supervivencia celular de la línea cancerosa a concentración 100 µg/mL, mientras que sobre la línea normal mostró reducción de 90% a tan solo 50 µg/mL. La  $CE_{50}$  para la célula cancerosa fue notoriamente mayor que para la normal (114 vs  $< 50$  µg/mL) y en consecuencia el IS fue = 1 (Tabla 2). Los resultados permiten concluir que las fracciones del EXT no presentaron efecto inhibitorio sobre la proliferación *in vitro* de las células cancerosas.

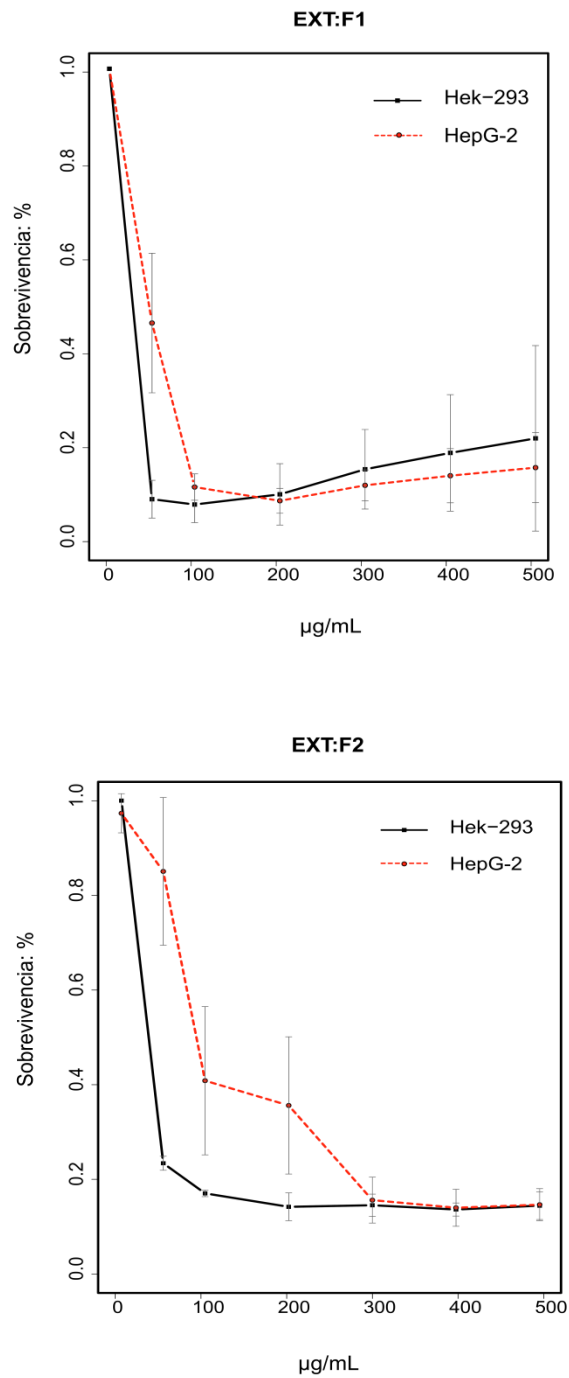


Figura 3 Efecto del EXT de *Zornia brasiliensis* sobre la sobrevivencia de células cancerosas HepG-2 comparado con células normales HeK-293. Las células se trataron con concentraciones del AE y 72 h después la actividad enzimática se evaluó en el ensayo del MTT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado.

Tabla 2

Valores de  $CE_{50}$  e IS de muestras de *Zornia brasiliensis*.

Muestra	$CE_{50}$ : $\mu\text{g/mL}$		Índice de selectividad
	HepG-2	Hek-293	
Aceite esencial	$250 \pm 0.12$	< 50	0,2
Extracto F1	< 50	< 50	1
Extracto F2	$114 \pm 29.3$	< 50	0,4

$CE_{50}$ : Concentración que disminuye la viabilidad celular en 50% con respecto al control. El índice de selectividad, (IS:  $CE_{50}$  Hek-293 /  $CE_{50}$ - HepG-2). Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado  $\pm$  DS.

**3.2.2 Efecto sobre la proliferación celular:** Para evaluar el efecto de las muestras de *Z. brasiliensis* sobre la proliferación de la célula cancerosa (HepG-2) comparada con la normal (Hek-293), se seleccionó el AE y el EXT (F1) con mayor IS. Las células fueron tratadas con AE o EXT a mínima (30  $\mu\text{g/mL}$ ) y máxima (100  $\mu\text{g/mL}$ ) concentración de una muestra vegetal que debería reducir en 50% o más la proliferación celular para considerarse activa según criterios de Cos *et al.*, (2006). El número y viabilidad de las células se determinó 72 h después del tratamiento (Figura 4 y Tabla 3).

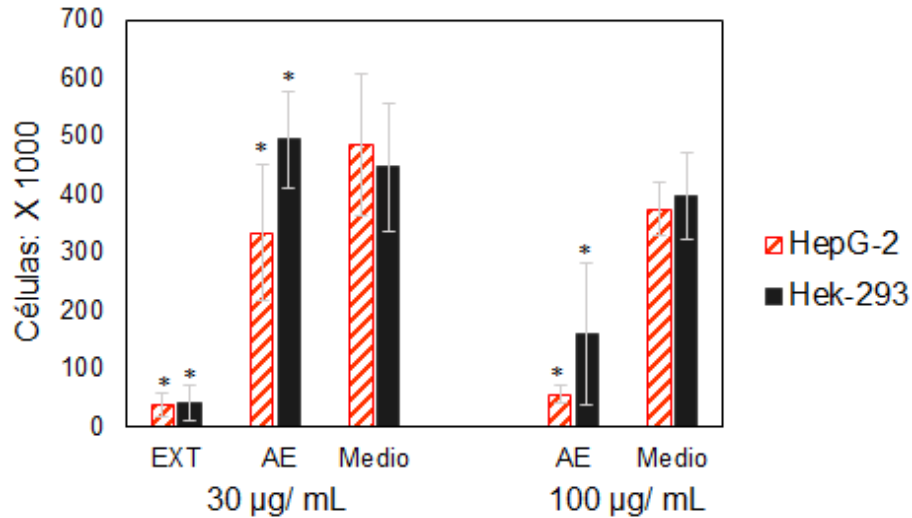


Figura 4 Efecto de *Zornia brasiliensis* sobre la proliferación de la célula cancerosa (HepG-2) comparada con célula normal (Hek-293). Las células se trataron 72 h. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes ± DS.

Tabla 3

Datos obtenidos en experimentos de evaluación del efecto anti-proliferante de *Zornia brasiliensis*.

Muestra	Células HepG-2		Células Hek-293	
	No. (tasa)	Viables: %	No. (tasa)	Viables: %
Ninguna	486.000 (3.0)	100	447.714 (2.8)	100
AE	333.833 (2.1)	68.7	494.357 (3.1)	100
EXT- F1	39.417 (0.2) *	8.1	41.357 (0.3) *	9.2

Se sembraron  $16 \times 10^4$  cel/mL en cada tubo de vidrio y se permitió replicación durante 72h en presencia de la muestra. Los datos presentan el número de células y la tasa de proliferación con respecto al número de siembra inicial. \*  $p < 0.01$  (Test de Tukey). Las muestras se usaron a 30 µg/mL.

El EXT – F1: a concentración de 30 µg/mL afectó la proliferación de ambas líneas celulares aumentando la mortalidad hasta 92%. Esta citotoxicidad sobre las dos líneas celulares refleja baja selectividad de la muestra hacia la línea tumoral y por lo tanto no se consideró para evaluación a 100 µg/mL.

El AE a concentración 30  $\mu\text{g/mL}$  bloqueó la proliferación celular de la línea cancerosa y mostró mortalidad de 31%. Sobre la línea normal no causó reducción en la tasa de proliferación. Este resultado indica que esta muestra presentó mayor selectividad hacia la línea celular tumoral y por lo tanto se evaluó a 100  $\mu\text{g/mL}$  para determinar si su actividad aumentaba en proporción con la dosis.

Al aumentar la dosis del AE a 100  $\mu\text{g/mL}$ , la citotoxicidad aumentó en la línea cancerosa en comparación con la línea normal a una tasa de proliferación (0 vs 1.0) (Tabla 4). Este resultado indica que la concentración evaluada presentó alta citotoxicidad para las dos líneas celulares.

Tabla 4

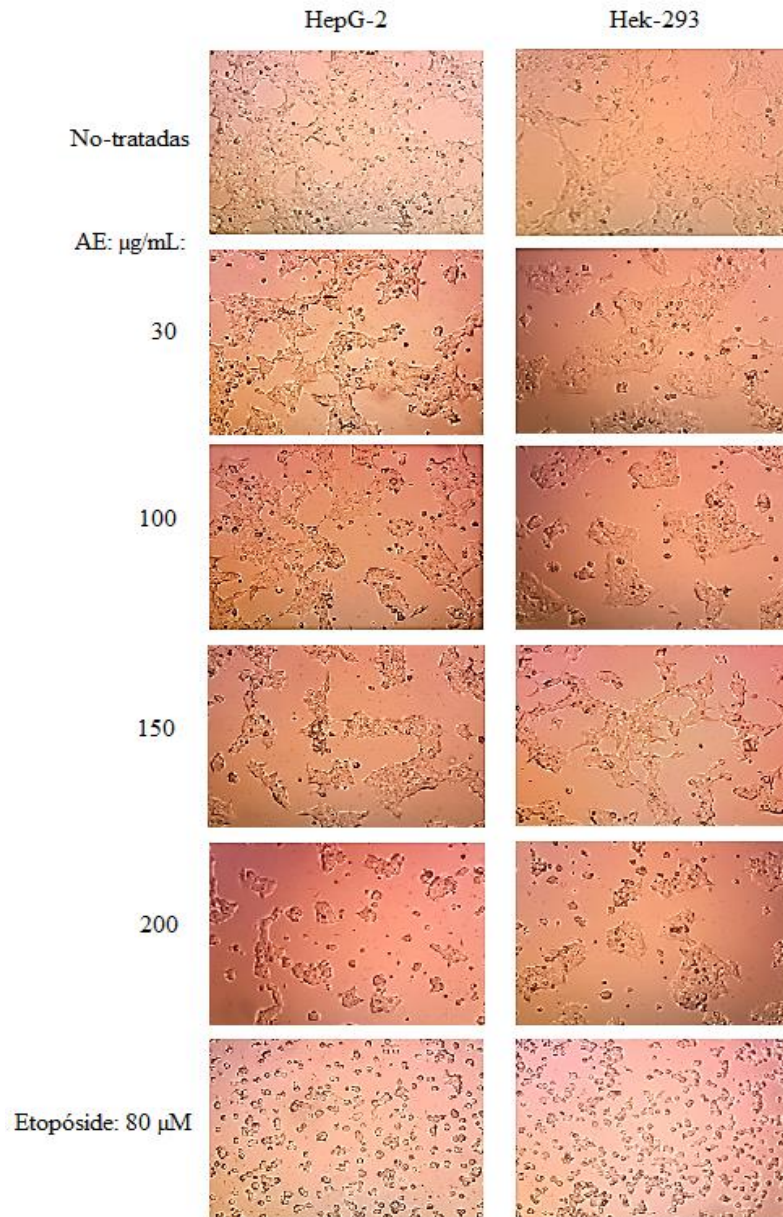
*Datos de experimentos para evaluar el efecto anti-proliferante de Zornia brasiliensis.*

Muestra	Células HepG-2		Células Hek-293	
	No. (tasa)	Viables:%	No. (%)	Viables: %
Ninguna	375.000 (2.0)	100	397.500 (2.0)	100
AE	56.887 (0) *	15	160.833 (1) *	40

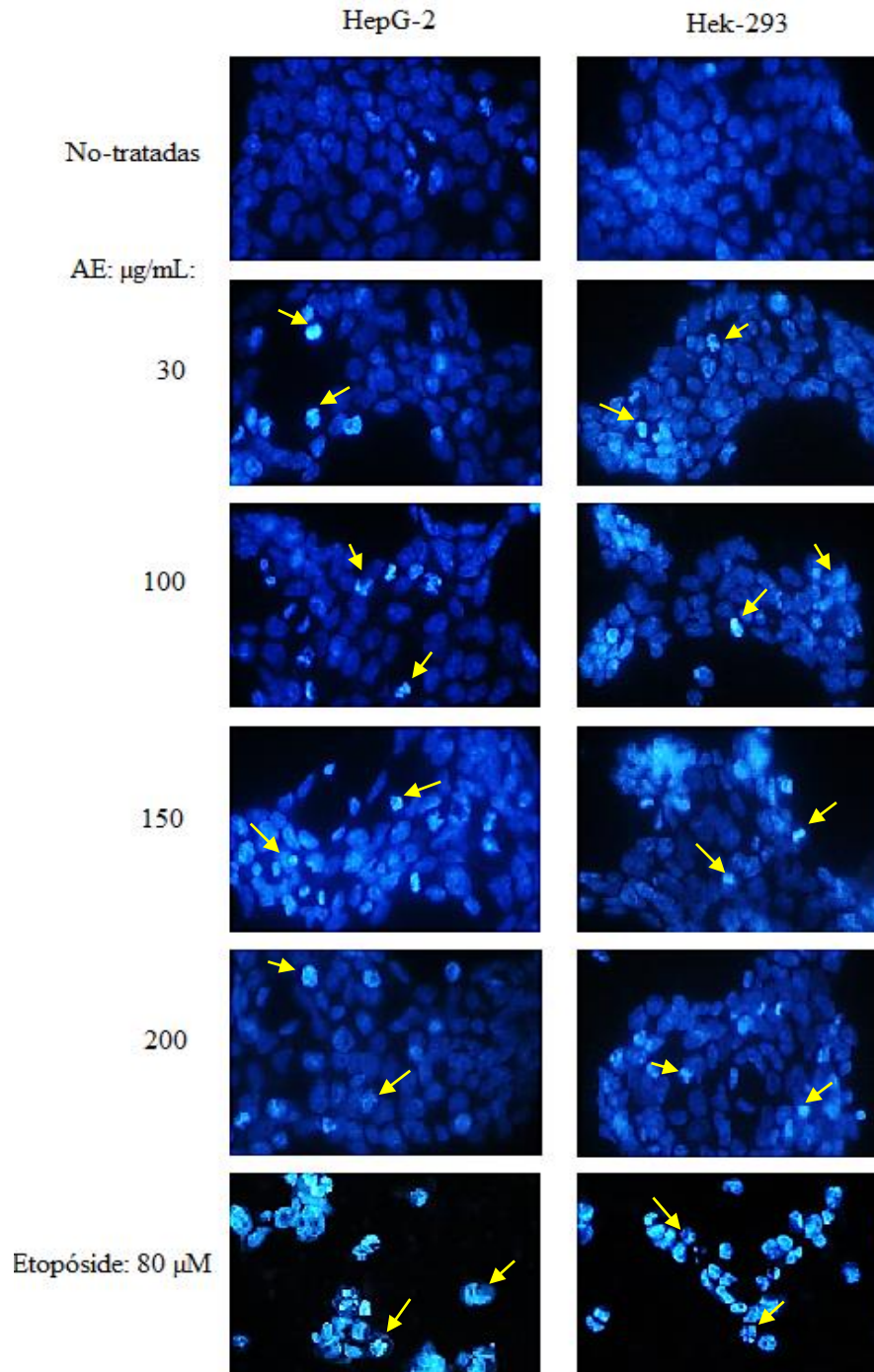
Se sembraron  $16 \times 10^4$  cel/mL en cada tubo de vidrio. Tasa de proliferación. \*  $p < 0.01$  (Test de Tukey). Las muestras se usaron a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

**3.2.3 Inducción de apoptosis:** Para evaluar la apoptosis inducida por tratamiento con AE de *Z. brasiliensis*, las células se trataron 24 h con diferentes concentraciones de muestra y al término se determinó el porcentaje de células con cromatina condensada (indicador de apoptosis). La exposición de las células cancerosas y normales al AE causó cambios en la morfología celular y pérdida de la monocapa a medida que se aumentó la dosis. A la máxima concentración evaluada (200  $\mu\text{g/mL}$ ), se observó reducción de la confluencia celular en las dos líneas (Figura 5). Ambas líneas celulares presentaron características propias de apoptosis, tales como encogimiento celular, formación de cuerpos apoptóticos y condensación nuclear de una manera dependiente de la dosis (Figura 6). Los cambios morfológicos, restos celulares y reducción de la densidad fueron visibles

en las diferentes concentraciones evaluadas. Estos cambios también se observaron con etopósido utilizado como control positivo.



*Figura 5* Efecto el AE de *Zornia brasiliensis* sobre el crecimiento y morfología de células cancerosas (HepG-2) comparado con la célula normal (Hek-293). Fotografías de monocapas celulares captadas bajo observación con microscopio de luz corriente (objetivo 40X). Etoposide se usó como control positivo. Tratamiento por 24 h.



*Figura 6* Inducción de apoptosis en células cancerosas HepG-2 y normales Hek-293 tratadas (24 h) con AE de *Zornia brasiliensis*. Fotografías de células teñidas con Hoechst captadas bajo observación con microscopio de fluorescencia (40X). Se observa condensación de cromatina y cuerpos apoptóticos (flechas).

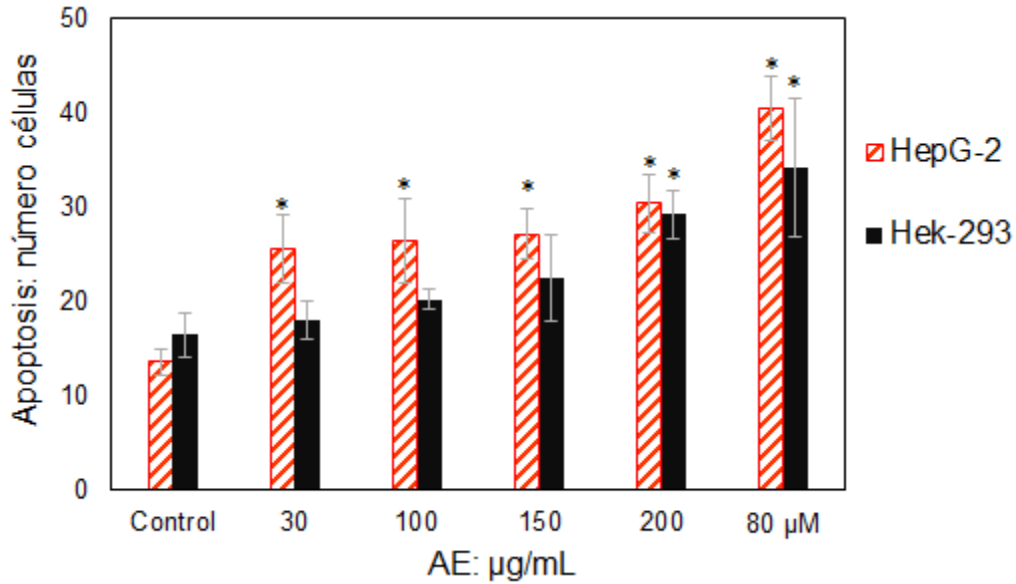


Figura 7 Número de células cancerosas y normales en apoptosis debido a tratamiento con el AE de *Z. brasiliensis* y etopósido: 80 µM. \*  $p < 0.01$  (Test de Tukey).

En células cancerosas tratadas con AE se evidenció casi el doble de células en apoptosis con respecto al control a cualquier concentración evaluada y para todos los casos la diferencia fue significativa ( $p = 0.0001 - 0.0070$ ). En células normales, aunque se observó mayor proporción de células en apoptosis de manera dependiente a la dosis, los valores fueron menores que en la célula tumoral y sólo a 200 µg/mL mostró diferencia significativa con respecto al control ( $p = 0.0215$ ). Estos resultados sugieren actividad antitumoral del AE de *Z. brasiliensis* (Figura 7; Tabla 5.).

Tabla 5

Proporción de células HepG-2 y Hek-293 en apoptosis debido a tratamiento con AE de *Zornia brasiliensis*.

Muestra	HepG-2		Hek-293	
	Nº	P	Nº	P
Ninguna (control)	14 ± 1.3	-	16 ± 2.3	-
AE: 30 µg/mL	26 ± 3.7	0.0070	18 ± 2.0	0.9979
AE: 100 µg/mL	26 ± 4.5	0.0038	20 ± 1.0	0.8943
AE: 150 µg/mL	27 ± 2.8	0.0026	22 ± 4.6	0.4586
AE: 200 µg/mL	30 ± 3.0	0.0004	29 ± 2.6	0.0215
Etopósido: 80 µM	40 ± 3.4	0.0001	34 ± 7.3	0.0014

P: significancia de la diferencia con respecto al control (Anova, Test de Tukey).

Los datos son el promedio de tres experimentos independientes ± DS.

### 3.3 Actividad de *Lippia organoides*.

**3.3.1 Efecto sobre la sobrevivencia celular:** La sobrevivencia celular fue determinada como se describió previamente para las muestras de *Zornia brasiliensis*. Con el AE de *L. organoides* se observó reducción del 10% de sobrevivencia celular en la línea cancerosa y 90% en la línea normal a concentración de 50 µg/mL (Figura 8). La CE<sub>50</sub> para la célula cancerosa fue notoriamente mayor que para la normal (107 vs < 50 µg/mL) y en consecuencia el IS fue < 0,6 (Tabla 6). Los resultados permiten concluir que, bajo este parámetro, el AE a las concentraciones evaluadas no presentó efecto inhibitorio sobre la proliferación *in vitro* de las células cancerosas.

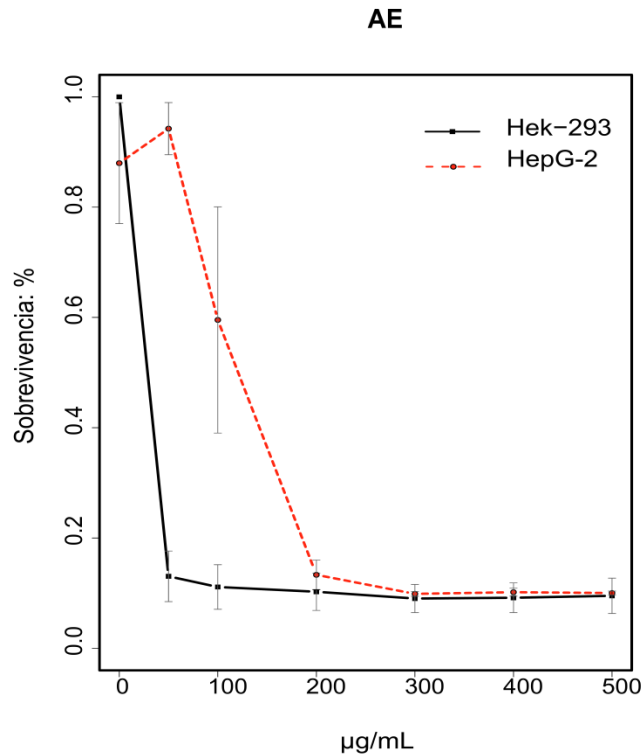


Figura 8 Efecto del AE de *Lippia organoides* sobre la sobrevivencia de células cancerosas HepG-2 comparado con células normales HeK-293. Las células se trataron con concentraciones del AE y 72 h después la actividad enzimática se evaluó en el ensayo del MTT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado.

Tabla 6

Valores de  $CE_{50}$  e IS de muestras de *Lippia organoides*.

Muestra	$CE_{50}$ : µg/mL		Índice de selectividad
	HepG-2	HeK-293	
Aceite esencial	107 ± 7.9	< 50	0,5
Extracto F1	110 ± 5.8	< 50	0,5
Extracto F2	116 ± 86.2	< 50	0,4

$CE_{50}$ : Concentración que disminuye la viabilidad celular en 50% con respecto al control. El índice de selectividad, (IS:  $CE_{50}$  HeK-293 /  $CE_{50}$ - HepG-2). Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado ± DS.

Con el EXT las curvas dosis-respuesta se muestran en la Figura 9. La fracción 1 (F1): Redujo 30% la sobrevivencia celular de la línea cancerosa y 80% la línea normal a concentración 50

$\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, el EXT- fracción 2 (F2): redujo 40% la sobrevivencia celular de la línea cancerosa y 70% la línea normal a concentración 100  $\mu\text{g/mL}$ . En las dos fracciones no se pudo estimar la  $\text{CE}_{50}$  para la línea normal por lo tanto se consideró  $< 50 \mu\text{g/mL}$  (Tabla 6).

La  $\text{CE}_{50}$  para la célula cancerosa fue notoriamente mayor que para la célula normal (116 vs  $<50 \mu\text{g/mL}$ ) y en consecuencia el IS fue  $< 0.6$  (Tabla 6). Los resultados permiten concluir que las fracciones del EXT no presentan efecto inhibitorio sobre la proliferación *in vitro* de las células cancerosas.

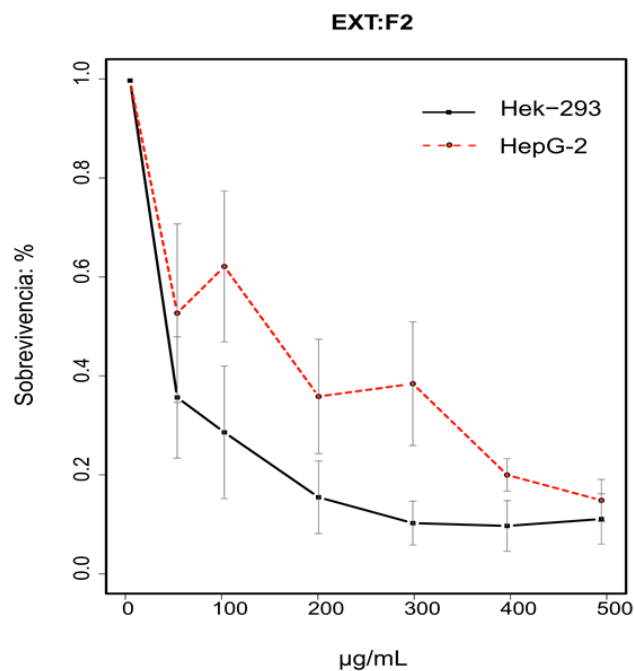
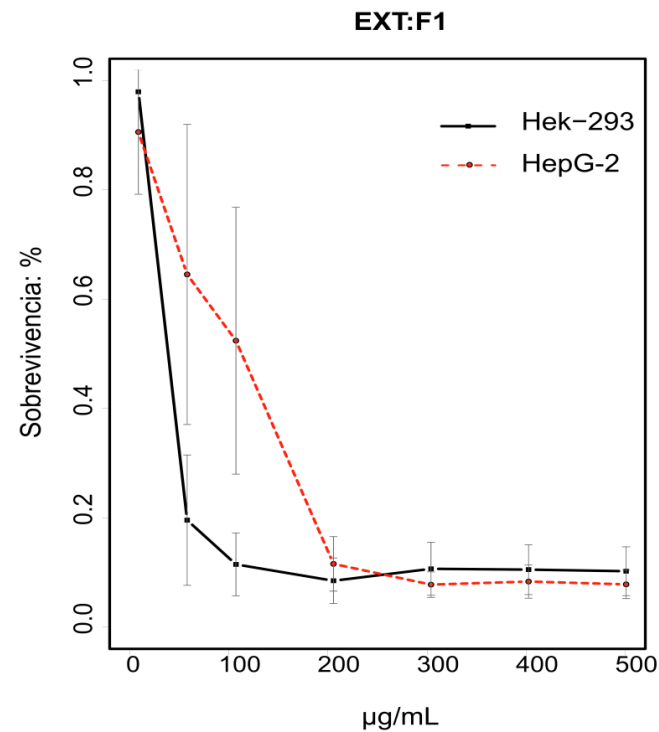


Figura 9 Efecto del EXT de *Lippia origanoides* sobre la sobrevivencia de células cancerosas HepG-2 comparado con células normales HeK-293. Las células se trataron con concentraciones del AE y 72 h después la actividad enzimática se evaluó en el ensayo del MTT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado.

**3.3.2 Efecto sobre la proliferación celular:** Para determinar el efecto de las muestras de *Lippia origanoides* sobre la proliferación de la célula cancerosa (HepG-2) comparada con la normal (Hek-293) se empleó el procedimiento antes descrito para las muestras de *Zornia brasiliensis*. El número y viabilidad de las células se determinó 72 h después del tratamiento (Figura 10 y Tabla 7)

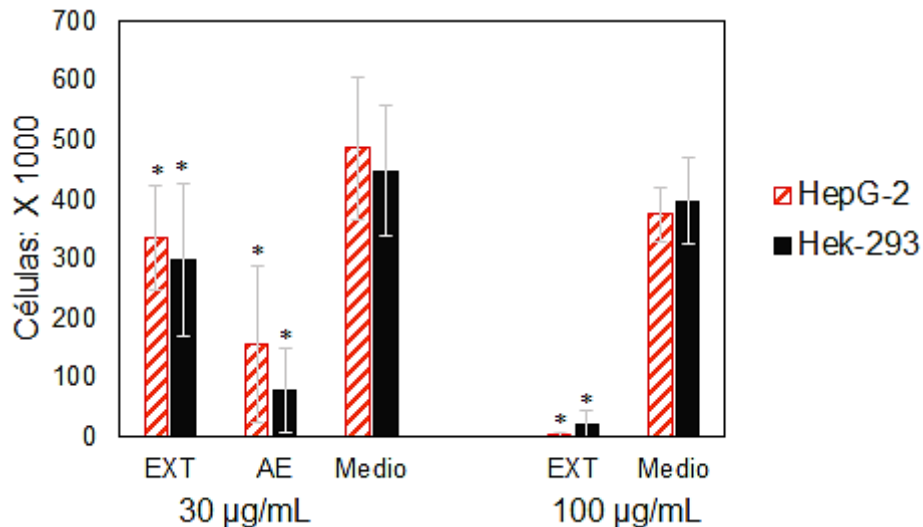


Figura 10 Efecto de *Lippia origanoides* sobre la proliferación de la célula cancerosa (HepG-2) comparada con célula normal (Hek-293). Las células se trataron 72 h. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DS.

Tabla 7

Datos de experimentos para evaluar el efecto anti-proliferante de *Lippia origanoides*.

Muestra	Células HepG-2		Células Hek-293	
	No. (tasa)	Viables: %	No. (%)	Viables: %
Ninguna	486.000 (3.0)	100	447.714 (2.8)	100
AE	156.083 (1.0)	32.1*	78.571 (0.5)	17.5*
EXT- F1	335.250 (2.1)	69 *	298.286 (1.9)	66.6 *

Se sembraron  $16 \times 10^4$  cel/mL en cada tubo de vidrio. Tasa de proliferación. \*  $p < 0.01$  (Test de Tukey). Las muestras se usaron a 30 µg/mL.

El EXT – F1: a concentración de 30 µg/mL afectó la proliferación de ambas líneas celulares aumentando la mortalidad hasta 31%. La citotoxicidad de esta muestra fue cercana en las dos líneas

celulares y la diferencia entre las tasas de proliferación de la línea cancerosa y la normal fue mínima (2.1 vs 1.9). Este resultado indicó que el EXT no presentó actividad a concentración de 30  $\mu\text{g/mL}$  y por lo tanto se evaluó a 100  $\mu\text{g/mL}$  para confirmar si presentaba o no actividad.

Al aumentar la dosis de la muestra (EXT-F1), la citotoxicidad incrementó en las dos líneas celulares (Tabla 8). Aunque fue mayor para la línea tumoral, redujo más del 90% la viabilidad para la línea normal (viabilidad 1.3 vs 5.0). Por lo tanto, esta muestra se consideró no activa en este trabajo.

Tabla 8

*Datos de experimentos para evaluar el efecto anti-proliferante de Lippia origanoides.*

Muestra	Células HepG-2		Células Hek-293	
	No. (tasa)	Viables: %	No. (%)	Viables: %
Ninguna	375.000 (2.0)	100	397.500 (2.0)	100
EXT- F1	5.000 (0)	1.3 *	20.000 (0)	5.0 *

Se sembraron  $16 \times 10^4$  cell/mL en cada tubo de vidrio. Tasa de proliferación. \*  $p < 0.01$  (Test de Tukey). Las muestras se usaron a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

El AE - a concentración 30  $\mu\text{g/mL}$  afectó la proliferación celular de la línea cancerosa en menor proporción que la línea normal, siendo la mortalidad de 68 % y en la línea normal 83%. Este resultado indicó que el AE de *L. origanoides* fue tóxico y por esta razón se descartó y no se evaluó a 100  $\mu\text{g/mL}$ .

**3.3.3 Inducción de apoptosis:** La muerte celular por apoptosis no se evaluó para las muestras de *L. origanoides* dado que el EXT evaluado a concentración de 30 y 100  $\mu\text{g/mL}$  y el AE a 30  $\mu\text{g/mL}$  presentaron citotoxicidad de forma similar sobre la línea tumoral y normal.

#### 4. Discusión

Los resultados obtenidos en las muestras de las dos plantas evaluadas en el ensayo de citotoxicidad evidenciaron una disminución en la viabilidad celular en la medida en que aumentaba la concentración de cada aceite esencial y extracto (F1 y F2).

Dentro de las muestras de *Z. brasiliensis* el AE mostró una menor toxicidad en las células de carcinoma hepático humano seguido de EXT-F2 y el EXT-F1, que tuvo mayor toxicidad. Los resultados obtenidos en este estudio, coinciden con lo reportado por Arunkumar *et al.*, (2012), donde se evaluó el potencial citotóxico del extracto en una especie del mismo género (*Z. diphylla*) que mostró ser activo en células de linfoma de Dalton. Por otra parte, David *et al.*, (2007), reportaron que el extracto metanólico de las partes aéreas de *Z. brasiliensis* tenía actividad citotóxica promisoría.

No se encontraron trabajos similares evaluando la actividad citotóxica del extracto y aceite de *L. origanoides*. De las muestras evaluadas, el EXT-F2 presentó menor toxicidad, seguido de EXT-F1 y por último el AE que tuvo una toxicidad mayor. Según (Costa *et al.*, 2001) dos de los componentes evaluados presentes en el extracto metanólico de *L. sidoides* presentan actividad *in vitro* contra leucemia promielocítica humana (HL60) y células de leucemia linfoblástica aguda humana (CEM). Por otra parte, (González, Soto, & Martínez, 2010) reportó un flavonoide presente en el extracto metanólico de tallos de *L. graveolens* y este mostró inhibición del crecimiento de la línea tumoral (k562).

No fue posible realizar la selección de muestras en este apartado tomando como base el criterio establecido en el que los valores de  $IS \geq 4$  denotan alta selectividad hacia célula tumoral (Britto *et al.*, 2012; Fontes *et al.*, 2013). Por lo que se eligieron las muestras que tuvieron mayor IS. Los resultados de esta selección pueden atribuirse a ciertas limitantes, entre estas, las que presenta el ensayo por MTT (Van Tonder, Joubert, & Cromarty, 2015).

Este ensayo es ampliamente utilizado para evaluar citotoxicidad de muestras de plantas y moléculas sintéticas (Mosmann, 1983; Weyermann, Lochmann, & Zimmer, 2005) entre las limitantes que posee se encuentra que refleja el metabolismo celular y no el número de células (van Meerloo, Kaspers, & Cloos, 2011). Aunque los resultados de este ensayo generalmente se correlacionan con el número de células viables que crecen en condiciones de cultivo estándar, la velocidad de reducción del tetrazolio refleja la actividad metabólica general o la tasa de producción de NADH glicolítico (Berridge, Herst, & Tan, 2005). La velocidad de reducción del MTT puede cambiar con las condiciones de cultivo (pH y contenido de glucosa del medio) y el estado fisiológico de las células.

Otra de las limitantes es la interferencia química dado que hay componentes que en su mayoría son compuestos reductores que conducen a la reducción no enzimática del MTT a formazán. Entre estos se ha reportado que los extractos de plantas y compuestos polifenólicos interfieren con este ensayo (Bruggisser, von Daeniken, Jundt, Schaffner, & Tullberg-Reinert, 2002; Han, Li, Tan, Sun, & Wang, 2010). También se ha informado que el MTT es tóxico para las células eucariotas y la adición de este para estimar la viabilidad celular puede dañar o incluso matar células durante el curso de un experimento (Riss *et al.*, 2016). Por otra parte, las mitocondrias no son la única fuente de reducción de MTT. Los estudios indican que el NADH es responsable de la mayor parte de la reducción del MTT y está asociado no sólo con las mitocondrias, sino también con el citoplasma

y con membranas en el compartimento endosoma/lisosoma, así como la membrana plasmática (Riss, 2014). Estas desventajas del método podrían explicar el bajo IS y la variación de la densidad óptica entre ensayos independientes.

Para determinar el efecto de la proliferación celular, se realizó el ensayo de viabilidad con el colorante de exclusión con azul de tripán. Este es un ensayo de permeabilidad donde la integridad de la membrana representa la viabilidad celular (Jurisic & Bumbasiveric, 2008).

El AE de *Z. brasiliensis* evaluado a 30 µg/ mL mantuvo la viabilidad de las células de riñón humano e indujo la proliferación de estas, además causó reducción de la sobrevivencia celular de sólo (30%) en células de carcinoma hepático humano. Esto puede explicarse debido a una de las propiedades que presentan los aceites esenciales es que, aunque son citotóxicos para las células tumorales, éstos inducen la proliferación de las células normales (Jaafari *et al.*, 2007). Son escasos los trabajos que reportan la composición química del aceite esencial de las especies de *Zornia*. Sin embargo, es posible que el AE de esta planta presente un mecanismo protector por un componente o por la acción sinérgica de 2 componentes presentes en este (Karna *et al.*, 2012; Liu, 2003). Al evaluar el AE a 100 µg/ mL éste resultó tóxico para ambas líneas celulares, cuando se evaluó a 30 µg/mL mostró alta selectividad hacia la célula tumoral manteniendo la integridad de la célula normal, por lo que para este ensayo el AE de *Z. brasiliensis* presenta posible actividad antitumoral. Lo anterior coincide con lo reportado con (Costa *et al.*, 2015) donde el aceite esencial de la hoja de *Z. brasiliensis* inhibe la proliferación celular *in vitro* en células HepG-2 así como el crecimiento de tumores en ratones.

En este estudio se esperaba que alguna de las muestras de *L. origanoides* tuviera actividad contra células de carcinoma hepático humano debido a uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial de esta planta que es el β-cariofileno (Stashenko *et al.*, 2013) el cual es un

compuesto que muestra propiedades anticancerígenas (Legault & Pichette, 2007). Adicionalmente estudios pertenecientes a especies de este género han reportado que compuestos aislados de *L. microphylla* poseen actividad antitumoral *in vitro* sobre líneas celulares de leucemia (K-562, HL-60, CEM), colon (HCT-116), mama (MCF-7), glioblastoma (U-251) y próstata (PC-3) (Simões *et al.*, 2015).

(Fouché *et al.*, 2008) reportaron actividad anticancerígena del extracto de raíz de *L. javanica* contra la línea de cáncer de mama (MCF-7) y melanoma. También se sabe que compuestos aislados de esta planta como el linalol tiene actividad antitumoral y desempeña un papel protector contra la hepatotoxicidad presentando también actividades antiinflamatorias (Nyamai, Arika, Ogola, Njagi, & Ngugi, 2016). En este estudio las muestras de *L. origanoides* (AE y EXT-F1) a concentración 30 µg/ mL y EXT-F1 a 100 µg/ mL no mostraron actividad antitumoral. EXT-F1 a 100 µg/ mL mostró actividad citotóxica de 100% en ambas líneas celulares. Con base en estos resultados, las muestras de *L. origanoides* fueron descartadas para el ensayo de apoptosis.

La inducción de apoptosis es un modo de acción común de agentes quimioterapéuticos incluyendo productos naturales derivados de plantas, su inducción es la clave del éxito como productos anticancerígenos (Sreelatha, Jeyachitra, & Padma, 2011). Para evidenciar la muerte celular por inducción de apoptosis, se evaluó el tratamiento con el AE de *Z. brasiliensis*, después de realizar la tinción con el colorante fluorescente Hoechst 33342, se observó el aumento de células apoptóticas con condensación de cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, que son las características principales de la apoptosis (Hu *et al.*, 2010). Considerando que el número de células apoptóticas fue inferior en las células no tratadas comparadas con las células tratadas se sugiere que el AE de esta planta puede inducir la apoptosis en células de carcinoma hepático humano.

Según los resultados de este estudio el AE de *Z.brasiliensis* mostró una posible actividad antitumoral ya que se evidenció mayor afectación hacia la línea de carcinoma hepático humano de manera dependiente de la dosis sin afectar la línea renal humana en todas las concentraciones evaluadas. El AE de esta planta sólo presentó citotoxicidad hacia la célula renal humana a la concentración máxima evaluada (200 µg/mL). Sin embargo, se sugieren futuros análisis y métodos más robustos para confirmar o no la actividad del AE de *Z.brasiliensis*.

Adicionalmente, es importante resaltar que la producción de componentes químicos en especies de plantas está influenciada por factores externos tales como la calidad del suelo y las condiciones climáticas. (Andrade, Alves, Guimaraes, Carreira, & Maia, 2011; Viljoen *et al.*, 2003). El rendimiento de un aceite esencial y su composición son susceptibles a variaciones cuantitativas y cualitativas y por lo tanto la actividad biológica de este aceite depende de su composición y de manera similar estará sujeta a variaciones en su potencial (Hussain, Anwar, Nigam, Ashraf, & Gilani, 2010).

## 5. Conclusiones

- El diseño experimental utilizado, permitió evidenciar el efecto inhibitorio de muestras de *Zornia brasiliensis* sobre la proliferación *in vitro* de células de carcinoma hepático humano (HepG-2). El AE y el EXT afectaron la viabilidad y proliferación. El AE indujo apoptosis en estas células, mostrando diferencias significativas de estos parámetros con respecto a la célula humana renal Hek-293.

- En ambas plantas, el EXT afectó en mayor grado ambas líneas celulares comparadas con el AE. Se evidenció que la fracción 1 del EXT presentó mayor citotoxicidad.
  
- Se requiere estudios para concluir precisamente sobre el potencial antitumoral del AE y EXT de las dos plantas. El análisis de las muestras con métodos más robustos como citometría de flujo, detección de caspasas, fragmentación de ADN entre otros, puede contribuir a clarificar sobre la actividad antitumoral.

### Referencias Bibliográficas

- Aguillón Osma, J., Maldonado, M. E., Loango Chamorro, N., Arango Varela, S. S., & Landázury, P. (2013). Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice *Passiflora edulis*. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(1), 13-25.
- Alba Machado, J. E., & Moncada Escobar, J. C. (2012). Evolución del consumo de medicamentos de alto costo en Colombia. *Pan American Journal of Public Health.*, 31(4).
- Amirghofran, Z. (2012). Herbal medicines for immunosuppression. *Iranian Journal of allergy, asthma and immunology.*, 11(2), 111.
- Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 61(46), 10835-10847.
- Andrade, E. H. A., Alves, C. N., Guimaraes, E. F., Carreira, L. M. M., & Maia, J. G. S. (2011). Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* LC Rich. *Biochemical systematics and ecology.*, 39(4), 669-675.
- Areiza Mazo, N., Maldonado, M. E., & Rojano, B. (2013). Extracto acuoso de uchuva (*Physalis peruviana*): actividades antiproliferativa, apoptótica y antioxidante. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(1), 41-55.
- Arunkumar, R., Nair, S. A., & Subramoniam, A. (2012). Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 3(3), 233.
- Bahmani, M., Shirzad, H., Shahinfard, N., Sheivandi, L., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). Cancer phytotherapy: Recent views on the role of antioxidant and angiogenesis activities. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(2), 299-309.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

Bernal, H. Y., García, M. ., & Quevedo, S. . (2011). Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia: Estrategia nacional para la conservación de `plantas. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review.*, 11, 127-152.

Brady, H. J. (2004). *Apoptosis methods and protocols*. (Springer, Vol. 282).

Britto, A. C., de Oliveira, A. C., Henriques, R. M., Cardoso, G. M., Bomfim, D. S., Carvalho, A. A., ... Costa, E. V. (2012). *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. *Planta medica*, 78(5), 409-414.

Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., & Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta medica.*, 68(05), 445-448.

Coelho, A. G., Neto, J. S. L., Moura, A. K., de Sousa, T. O., Morais, I. C., Carvalho, G. D., ... Oliveira, A. P. (2015). Optimization and standardization of extraction method from *Lippia origanoides* HBK: Focus on potential anti-hypertensive applications. *Industrial Crops and Products*, 78, 124-130.

Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.

Costa, E. V., Menezes, L. R., Rocha, S. L., Baliza, I. R., Dias, R. B., Rocha, C. A. G., ... Bezerra, D. P. (2015). Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. *Planta medica*, 81(07), 563-567.

- Costa, S. M. O., Lemos, T. L. G., Pessoa, O. D. L., Pessoa, C., Montenegro, R. C., & Braz-Filho, R. (2001). Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. *Journal of natural products*, 64(6), 792-795.
- Cotter, T., & Martin, S. (1996). Techniques in Apoptosis: A User's Guide. *Trends in Biochemical Sciences.*, 21(12), 499-499.
- da Silva, A. D. S., Cavalcante-Silva, L. H. A., da Matta, C. B. B., Silva, D. de F., Araujo, M. V. de, Tavares, J. F., ... Alexandre-Moreira, M. S. (2013). Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. *Natural product research*, 27(18), 1695-1699.
- da Silva, A. P., Silva, N. de F., Andrade, E. H. A., Gratieri, T., Setzer, W. N., Maia, J. G. S., & da Silva, J. K. R. (2017). Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. *PloS one*, 12(5).
- Damasceno, E. I. T., Silva, J. K. R., Andrade, E. H. A., Sousa, P. J. C., & Maia, J. G. S. (2011). Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1).
- David, J. P., Meira, M., David, J. M., Brandão, H. N., Branco, A., de Fátima Agra, M., ... Giulletti, A. M. (2007). Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. *Fitoterapia*, 78(3), 215-218.
- Dunoyer, A. T., Marimón, R. C., & Zambrano, J. J. M. (2016). Uso de una aplicación informática para evaluar la dosificación de cisplatino en quimioterapia antineoplásica. *Biociencias*, 10(1), 11-16.
- Fontes, J., Ferraz, R. P. C., Britto, A. C. S., Carvalho, A. A., Moraes, M. O., Pessoa, C., ... Bezerra, D. P. (2013). Antitumor effect of the essential oil from leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). *Chemistry & biodiversity*, 10(4), 722-729.
- Fouché, G., Cragg, G., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V., & Senabe, J. (2008). In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of ethnopharmacology.*, 119(3), 455-461.

- Gautam, N., Mantha, A. K., & Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed research international*.
- González-Guereca, M., Soto-Hernandez, M., & Martínez Vázquez, M. (2010). Isolation of (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahydroxyflavanone-7-O-β-D-glucopyranoside, from *Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandieri* Schauer, a new anti-inflammatory and cytotoxic flavanone. *Natural product research*, 24(16), 1528-1536.
- Han, M., Li, J., Tan, Q., Sun, Y., & Wang, Y. (2010). Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery. *J Chin Pharmaceu Sci*, 19, 195-200.
- Hu, W., Lee, S. K., Jung, M. J., Heo, S.-I., Hur, J. H., & Wang, M.-H. (2010). Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the ethyl acetate fraction of *Kalopanax pictus* leaves in human colon cancer cells. *Bioresource technology*, 101(23), 9366-9372.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827-1836.
- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Web site [Revisada en 12 Jun 2017].
- Jaafari, A., Mouse, H. A., Rakib, E. M., Tilaoui, M., Benbakhta, C., Boulli, A., & Ziad, A. (2007). Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(4), 477-491.
- Jain, A., Jahagirdar, D., Nilendu, P., & Sharma, N. K. (2017). Molecular approaches to potentiate cisplatin responsiveness in carcinoma therapeutics. *Expert Review of Anticancer Therapy*, (just-accepted).
- JG Marin, J., Briz, O., J Monte, M., G Blazquez, A., & IR Macias, R. (2012). Genetic variants in genes involved in mechanisms of chemoresistance to anticancer drugs. *Current cancer drug targets*, 12(4), 402-438.
- Juriscic, V., & Bumbasiveric, V. (2008). In vitro assays for cell death determination. *Archive of Oncology*, 16(3-4), 49-54.

- Karna, P., Chagani, S., Gundala, S. R., Rida, P. C., Asif, G., Sharma, V., ... Aneja, R. (2012). Benefits of whole ginger extract in prostate cancer. *British journal of nutrition*, 107(4), 473-484.
- Legault, J., & Pichette, A. (2007). Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12), 1643-1647.
- Lesgards, J. F., Baldovini, N., Vidal, N., & Pietri, S. (2014). Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytotherapy research*, 28(10), 1423-1446.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition.*, 78(3), 517s-520s.
- Majolo, C., Rocha, S. I. B., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Bizzo, H. R. (2017). Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research.*, 48(5), 2380-2387.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods.*, 65(1-2), 55-63.
- Nyamai, D., Arika, W., Ogola, P., Njagi, E., & Ngugi, M. (2016). Medicinally important phytochemicals: an untapped research venue. *Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.*, 4(1), 35-49.
- Obi, C., Ramalivhana, J., Samie, A., & Igumbor, E. (2007). Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolates from stool samples of patients in the Venda region of South Africa. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 428-435.
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Fernandes, P., & Leitão, S. G. (2014). Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 206-214.
- Ospina, M. L., Huertas, J. A., Montaña, J. I., & Rivillas, J. C. (2015). Observatorio Nacional de Cáncer Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública.*, 33(2), 262-276.

- Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., & Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 76(3), 201-214.
- Rebucci, M., & Michiels, C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical pharmacology*, 85(9), 1219-1226.
- Riss, T. L. (2014). Is Your MTT Assay Really the Best Choice. *Promega Corp*, 1983(1), 1-7.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rojas, A., Bah, M., Rojas, J., Serrano, V., & Pacheco, S. (1999). Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Queretaro (Mexico) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, 6(5), 367-371.
- Sarrazin, S. L. F., da Silva, L. A., de Assunção, A. P. F., Oliveira, R. B., Calao, V. Y., da Silva, R., ... Mourão, R. H. V. (2015). Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. *Molecules*, 20(2), 1860-1871.
- Simões, E. R. B., Santos, E. A., de Abreu, M. C., do Nascimento Silva, J., Nunes, N. M. F., da Costa, M. P., ... Ferreira, M. P. (2015). Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 4(3), 256.
- Sreelatha, s, Jeyachitra, A., & Padma, P. (2011). Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1270-1275.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cala, M. P., Durán, D. C., & Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of separation science*, 36(1), 192-202.
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*, 237-245.

- Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes.*, 8(1), 47.
- Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E. E., & Ocazonez, R. E. (2016). PROPUESTA PARA SELECCIONAR ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS DE COLOMBIA PARA INVESTIGACIÓN CON BASE EN SU CITOTOXICIDAD. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS*, 23(1), 18-29.
- Viljoen, A., Van Vuuren, S., Ernst, E., Klepser, M., Demirci, B., Bacser, H., & Van Wyk, B.-E. (2003). *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of ethnopharmacology.*, 88(2), 137-143.
- Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International journal of pharmaceutics.*, 288(2), 369-376.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Correa-Royero, J., & Betancur Galvis, L. (2009). Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y componentes mayoritarios. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 215-222.