



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA EN EL TRATAMIENTO
DE NEOPLÁSIAS DE UN PRODUCTO HERBARIO”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD
PRESENTA:**

FLOR YOHANA FLORES HERNÁNDEZ

DIRECTORES DE TESIS

**Dr. José Leopoldo Aguilar Faisal
Dr. José Correa Basurto**

Reconocimientos y créditos de autoría.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Medicina de Conservación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de los Doctores. José Leopoldo Aguilar Faisal y del Dr. José Correa Basurto, como parte de los proyectos **SIP 2009109 y CONACYT 62488.**

La autora fue becaria del IPN de Agosto de 2008 a Diciembre del 2009 y del Programa Institucional de Formación de Investigadores de Agosto del 2008 a Diciembre del 2009.

Dedicada:

A mi Ángel Naim Celic, por regalarme cada noche y mañana un besito y un abracito. Te adoro mi bebe, mi cocoi, todo es para ti.

A mi esposo Miguel Ángel, mi flaco, compañero amoroso y tierno, gracias por ser el roble en el que descanso, te amo, por sobre muchas cosas, gracias por siempre impulsarme y creer tanto en mí.

A mi mami por todo el apoyo incondicional que siempre me has dado, toda mi admiración, respeto y amor por ser una mama fuerte y luchona, tú eres mi ejemplo.

Agradecimientos especiales

Agradezco a mi bebe Ángel Naim Célic por existir, sonreír, bailar, aprender, crecer e inspirarme a seguir trabajando y cantando día a día.

Agradezco a mi esposo por estar siempre cuando lo necesito e impulsarme a no tener miedos.

A mi mami y su señor, por apoyarme por sobre todas las cosas.

A mis hermanos Paco y Toñito por crecer y jugar juntos.

Al Dr. Polito y Doc. Zepeda por darme la oportunidad, el espacio y la ayuda.

Al Dr. Correa por su siempre cordial ayuda y asesoría.

A la Dra. Gisela por enseñarme sobre regulación y expresión de genes, cultivos celulares y cáncer.

Al LMC por dejarse encontrar.

A mis profesores la M.C. Evangelina Muñoz y el Dr. Asbun.

Agradezco la colaboración de Jazmín García Machorro del departamento de Biomedicina del CINVESTAV.

Agradezco la colaboración del Dr. Héctor Herrera Gutiérrez y del T.A. Saúl Cortés Suárez del Laboratorio de Histopatología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Agradezco también la colaboración del Medico Fernando García Dolores y del Histotécnico César Sánchez Bautista del Servicio Médico Forense.

A mis amigos por pasar muchos momentos juntos Arturo, Antonio, Yukie, Graciela.

A Barbachano por ser un gran jefe y tutor.

A mis compadres Toñito y Arturito por ser igual de locos que yo.

A mis grandes amigos que siempre están; Nan y Oscaroso por escuchas mis traumas.

Ala UAM unidad Xochimilco, por enseñarme el auto aprendizaje.

EN MEMORIA



Índice

Titulo	Página
Acta de revisión de tesis.	
Carta de cesión de derechos.	
Reconocimientos y créditos de autoría.	
Resumen.	
Summary.	
Relación de tablas y gráficas.	
Índice de figuras.	
1. Introducción.	1
2. Antecedentes de la investigación	3
2.1 Epidemiología del cáncer en México.	3
2.1.2 Principales neoplasias en México.	4
2.2. Características generales de las neoplasias.	4
2.2.1. Proliferación celular.	5
2.2.2. Apoptosis.	8
2.2.3. Características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis.	10
2.1. Quimioterapia.	12
2.2. Fitoterapia con el producto herbario "ARCOMIG".	16
2.4.1. <i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla).	19
2.4.2. <i>Allum sativum</i> (ajo).	20
2.4.3. <i>Angélica archangelica</i> (angélica).	21
2.4.4. <i>Equisetum arvanse</i> (cola de caballo).	23
2.4.5. <i>Medicago sativa</i> (alfalfa).	24
2.4.6. Principales compuestos encontrados en el producto herbario ARCOMIG.	25
2.5. Técnicas para evaluar el efecto antineoplásico del producto herbario ARCOMIG.	33
2.5.1. Cultivos celulares.	33
2.5.1.2. Células HeLa.	34
2.5.2.3. Valoración de citotoxicidad <i>in vitro</i> .	35

2.5.2.	Apoptosis por epifluorecencia en una cinética celular.	36
2.5.3.	Modelo murino.	37
2.5.4.	Histopatología por inclusión en parafina.	38
3.	Propuesta.	39
4.	Justificación.	39
5.	Hipótesis de trabajo.	39
6.	Objetivo general.	40
6.1	Objetivos específicos.	40
7.	Materiales y métodos.	41
7.1	Mantenimiento y producción celular.	41
7.2	Curva concentración-respuesta (IC50).	41
7.3	Efecto citotóxico de cultivos celulares HeLa.	42
7.4	Efecto apoptótico de células HeLa en una cinética celular empleando la técnica de epifluorecencia con yoduro de propidio.	43
7.5	Modelo Murino.	43
7.5.1	Análisis Histológico de los tumores del modelo murino.	45
8.	Resultados.	47
8.1.	Curva concentración-respuesta (IC50).	47
8.2.	Efecto citotóxico de las células tratadas a diferentes diluciones.	49
8.3.	Cinética celular con epifluorecencia	51
8.4.	Modelo murino de cepa BALB/c con tumor de Ehrlich.	55
8.5.	Análisis Histopatológico de los tumores obtenidos del modelo murino.	58
9.	Discusión.	65
10.	Conclusión.	76
11.	Bibliografía.	77

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Algunos aspectos epidemiológicos del cáncer en México.	3
Figura 2. Producto herbario "ARCOMIG".	17
Figura 3. Angélica (<i>Angelica archangelica</i>).	23
Figura 4. Cola de caballo (<i>Equisetum arvanse</i>).	24
Figura 5. Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>).	25
Figura 6. Principios activos de ARCOMIG.	26
Figura 7. Estructura química de la cumarina.	28
Figura 8. Clasificación de las cumarinas.	29
Figura 9. Ciclo biosintético de los metabolitos secundarios de las cumarinas.	30
Figura 10. Origen biosintético de cumarinas y derivados.	32
Figura 11. Células HeLa.	35
Figura 12. Cultivos de células HeLa.	41
Figura 13. Microplaca de 96 pozos con células HeLa.	42
Figura 14. Administración de ARCOMIG en el modelo murino.	44
Figura 15. Modo de inoculación, toma de peso, longitud y desarrollo del tumor.	45
Figura 16. Tumores en parafina y micrótopo.	46
Figura 17. Células HeLa control y sometidas a tratamiento con ARCOMIG con pH 3.5.	50
Figura 18. Células HeLa control y sometidas a tratamiento con ARCOMIG con pH 7.5.	50
Figura 19. Células control con epifluorescencia con yoduro de propidio.	51
Figura 20. Células fijadas a las 12 hrs. con epifluorescencia con yoduro de propidio.	52
Figura 21. Células fijadas a las 24 hrs. con epifluorescencia con yoduro de propidio.	52
Figura 22. Células fijadas a las 36 hrs. con epifluorescencia	

con yoduro de propidio.	53
Figura 23. Células fijadas a las 48 hrs. con epifluorecencia con yoduro de propidio.	53
Figura 24. Células fijadas a las 60 hrs. con epifluorecencia con yoduro de propidio.	54
Figura 25. Células fijadas a las 72 hrs. con epifluorecencia con yoduro de propidio.	55
Figura 26. Células control fijadas a las 72 hrs. con epifluorecencia con yoduro de propidio.	55
Figura 27. Inoculación de células tumorales.	56
Figura 28. Ratón con sarcoma.	56
Figura 29. Tumores fijados en formol.	59
Figura 30. Laminillas de los cortes histológicos del grupo I.	60
Figura 31. Laminilla mostrando mestastasis en riñón e intestino.	61
Figura 32. Laminillas de los grupos II y V.	62
Figura 33. Laminillas de los grupos IV.	62
Figura 34. Laminillas de los grupos III.	63

Relación de tablas y graficas

	Página
Tabla 1. Grupos del modelo murino.	44
Tabla 2. Viabilidad celular después del tratamiento con ARCOMIG.	47
Grafico 1. Curva concentración- respuesta (pH 3.5).	47
Tabla 3. Análisis de varianza realizado a las células viables tratadas a diversas diluciones a un pH de 3.5.	48
Tabla 4. Viabilidad celular después del tratamiento con ARCOMIG a pH 7.5.	48
Grafico 2. Curva concentración respuesta (pH 7.5).	49
Tabla 5. ANOVA viabilidad celular pH 7.5.	49
Tabla 6. Longitud del tumor en cm.	57

Grafico 3. Longitud del muslo en cm.	57
Tabla 7. Peso del muslo en mg.	58
Grafica 4. Peso del muslo en mg.	58
Tabla 8. Resultados del diagnostico hitopatológico.	64

Resumen

El cáncer es también conocido como neoplasia, es una de las enfermedades de mayor impacto a nivel mundial, ya que la morbilidad y mortalidad por esta enfermedad ha ido en aumento desde finales del siglo XX, en México esta problemática es clara, por ello la Secretaria de Salud busca más y mejores tratamientos antineoplásicos, lo que está impulsando a la investigación científica a nivel celular, genético, farmacológico e inmunológico.

El producto herbario ARCOMIG, es empleado como fitoterapia alternativa en la medicina popular, esta manufacturado a base de *Matricaria chamomilla*, *Angélica archangelica*, *Equisetum arvense*, *Medicago sativa* y *Allium sativum*. Es por ello que el presente trabajo forma parte de un estudio integral que busca analizar el efecto antineoplásico del producto herbario "ARCOMIG" para ayudar a incorporarlo como un tratamiento alternativo, integral, curativo y/o preventivo, viable y eficaz.

Los resultados obtenidos en los ensayos *In Vitro* de células HeLa muestran que la IC50 más efectiva es la dilución 1:4. mostrando un mayor efecto citotóxico del producto ARCOMIG a un pH de 7.5, con la técnica de epifluorecencia se observaron cambios morfológicos característicos de la apoptosis como la condensación celular, fragmentación del núcleo, contracción de la célula. Por otro lado, el ensayo *In Vivo* muestro que a través del análisis histopatológico que los grupos sometidos a tratamiento con ARCOMIG no presentan un proceso necrótico ni angiogénesis y la masa tumoral es de menor tamaño, mientras que los grupos sin tratamiento tienen un proceso de metástasis y se observan vascularizaciones propias de la masa tumoral indicando un proceso angiogénico.

La evaluación del efecto antineoplásico de ARCOMIG contribuye a corroborar las propiedades antineoplásicas que le son popularmente atribuidas y destaca la posibilidad de proponerlo como un candidato a tratamiento mayormente preventivo del padecimiento cáncer ante la Secretaria de Salud si se contribuye con posteriores estudios que reafirmen y consoliden sus propiedades.

Summary

The cancer is known neoplasia, it is one of the diseases which have more impact around the world due to its incidence and mortality is high. Thus has been increasing since the late twentieth century in Mexico this issue is clear, therefore the Health Secretary is searching for more and better health for antineoplastic treatment as promoting scientific research at cellular level, genetic, pharmacological and immunological.

The herbal product ARCOMIG is used as an alternative herbal folk medicine is manufactured on the basis of *Matricaria chamomilla*, *Angelica archangelica*, *Equisetum arvense*, *Medicago sativa* and *Allium sativum*. That is why this work is part of a comprehensive study that analyzes the antineoplastic effect of herbal product "ARCOMIG" to help incorporate it as an alternative treatment, holistic, preventive self healing, viable, effective.

The results obtained in vitro assays of HeLa cells show that the IC50 is the 1:4 dilution. With the technique epifluorecencia observed morphologic changes of apoptosis and cellular condensation, fragmentation of the nucleus, cell contraction. The in vivo test shows that through histopathological analysis that groups treated with ARCOMIG not have a necrotic process or angiogenesis and tumor mass is less length and weight, level, and the groups are untreated metastatic process and observed characteristic of the vascularized tumor mass indicating an angiogenic process.

Evaluation of antineoplastic effect of ARCOMIG helps to corroborate anti-neoplastic properties which are popularly attributed and highlights the possibility of proposing a candidate for preventive treatment of the disease mainly cancer before the Secretary of Health if further study contributes to reaffirm and strengthen their properties.

I. Introducción.

El termino neoplasia, cáncer o más comúnmente conocida como tumor maligno hace referencia a mas de 200 tipos de enfermedades, que poseen como característica principal una división celular descontrolada debido a alteraciones genéticas o epigenéticas que modifican la regulación de la proliferación celular, que en algunos casos son completamente diferentes entre si, pudiendo considerarse como enfermedades con diferente comportamiento respecto a sus causas, su evolución y su tratamiento (Domínguez, 2008).

El cáncer es una de las enfermedades de mayor impacto a nivel mundial, incluido México. En el panorama epidemiológico de México desde finales del siglo XX, el incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad es evidente por lo que este padecimiento se convierte en un problema de salud pública no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgos individuales y ambientales con los que se asocia (Compendio de Cáncer, 2001).

La multiplicidad de factores que se asocian a este padecimiento hace que sea una enfermedad difícil de prevenir y tratar. Existen múltiples opciones de tratamiento, sin embargo, muchos de ellos no ofrecen una buena calidad de vida a las personas que los utilizan ya que tienen severos efectos adversos (Allevato, 2008).

Existen productos que se ofrecen como terapias alternativas utilizados en la medicina popular, pero en su mayoría no cumplen con la normatividad oficial Mexicana, ni son resultado de estudios con bases científicas que corroboren sus propiedades. Este problema es contemplado en el Plan de Desarrollo 2007-2012 de la Secretaria de Salud teniendo como meta realizar estudios con bases científicas como requisito indispensable para la incorporación de nuevos fármacos al mercado para el tratamiento del cáncer (Programa de acción específico 2007-2012).

Es por ello que el presente trabajo es parte de un estudio global que busca analizar el efecto antineoplásico del producto herbario "ARCOMIG" para ayudar a incorporarlo como un tratamiento alternativo, integral, curativo y o preventivo, viable, eficaz y seguro o en su caso descartar las propiedades antineoplásicas atribuidas a este. La evaluación antineoplásica del producto herbario ARCOMIG, conlleva un estudio integral, efectuando la evaluación en un modelo *in vivo* en el cual se estudien las cualidades antiangiogénicas y la inhibición de metástasis del tratamiento así como la estimulación al sistema inmunitario; así mismo se pretende una evaluación *in vitro* analizando la citotoxicidad del producto herbario, la inducción de apoptosis, la influencia del producto herbario en el ciclo celular a través de un análisis con citometría de flujo y el nivel de expresión génica en cultivos de líneas celulares tumorales sometidas a un tratamiento con ARCOMIG. Asimismo el estudio contempla la evaluación de la 7-metoxi-cumarina, como fármaco antineoplásico, citado como uno de los tres principales compuestos encontrados en ARCOMIG.

II. Antecedentes.

2.1 Epidemiología del cáncer en México.

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó que durante el periodo que comprende de 1998 a 2007, se observó que las defunciones por tumores malignos han incrementado considerablemente, siendo las mujeres las que presentan los porcentajes más altos en el periodo. En el 2001 en la República Mexicana se registraron 102,657 tumores malignos que corresponden a 101.6 casos por 100,000 habitantes, se observó que el grupo de 0 a 4 años presentó mayor número de casos que los de 5 a 14 años, posteriormente se aprecia un aumento progresivo hasta alcanzar el máximo en el grupo de 70 años y más. Según género, 34.8% fueron en hombres y 65.2% en mujeres, en ambos fue mayor el número de casos registrados en el grupo de 0 a 4 años y posteriormente se observó un aumento progresivo, en este aspecto, es importante destacar en las mujeres el aumento más intenso se presentó a partir de los 20 y hasta los 28 años mientras que en los hombres se apreció hasta los 50 años (Figura 1). Por otra parte, en más del 5% de casos en ambos sexos se desconoce la edad (Compendio de cáncer, 2001 RHNM).

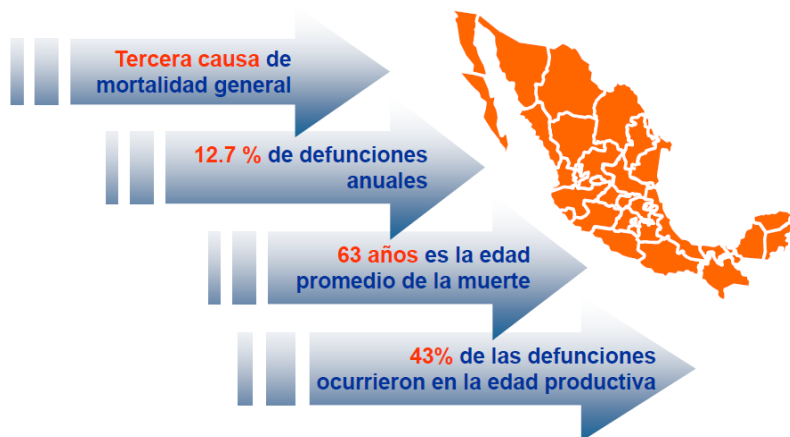


Figura 1. Algunos aspectos epidemiológicos del cáncer en México. En la figura se observa cuatro aspectos que hacen que las neoplasias en México tomen el carácter de epidemia (Secretaría de Salud / Dir. Gral. de Epidemiología / Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas / 2001).

Del total de neoplasias malignas registradas en el 2001, el 36.3% fueron reportadas por el IMSS, el 26.7% por el sector privado y en tercer lugar la SSA con el 22.8%.

De acuerdo a la entidad federativa de residencia, los estados en donde se presentó un mayor número de casos registrados por 100,000 habitantes fueron: Distrito Federal (273.9), Nuevo León (237.6) y Nayarit (140.8), los de menor tasa el Estado de México con 31.7 y Quintana Roo con 28.9 (Secretaría de Salud / Dir. Gral. de Epidemiología / Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas / 2001).

2.1.2 Principales neoplasias en México.

Los tumores malignos que se presentaron con mayor frecuencia son, en el género masculino; cáncer de piel (20%), próstata (17%) y estómago (6%) y para el género femenino, el cáncer cérvico uterino (36%), mama (17%) y piel (11%) (CENAVECE, 2009; Serman, 2002).

2.2 Características generales de las neoplasias.

El cáncer se origina cuando las células adquieren la capacidad de multiplicarse descontroladamente, invadir tejidos y hacer metástasis. Este proceso se denomina carcinogénesis. Así, el cáncer se caracteriza por un descontrol entre la proliferación y la muerte celular. Frecuentemente este descontrol es el resultado de mutaciones en su material genético o alteraciones epigenética (Hanssens 2006).

Las características de las células de un tumor maligno son: 1) displasia: en donde los mecanismos reguladores que mantienen la homeostasis de las células son incapaces de controlar su división, produciendo un cúmulo de células. Normalmente da lugar a un tumor. 2) neoplasia: las células presentan variaciones en su forma, tamaño y función. Estas células tienen un metabolismo incontrolado, por lo que adquieren propiedades que confieren un carácter maligno. 3). Capacidad de invasión: el cáncer puede extenderse por el organismo, utilizando para ello diferentes vías; las más comunes son: la propagación local, en

la cual las células tumorales invaden los tejidos vecinos, infiltrándose en ellos, la propagación a distancia (metástasis) que ocurre cuando algún grupo de células malignas se desprende del tumor original donde se generó para trasladarse a otros lugares del organismo. Fundamentalmente, se propagan por los vasos sanguíneos y linfáticos, para después desarrollar tumores malignos secundarios (Lara y Cols. 2004).

2.2.1 Proliferación celular.

La proliferación es un fenómeno fisiológico dependiente de los factores externos a los que se ven sometidas las células, estos pueden ser factores de crecimiento, interacciones con otras células y nutrientes, entre otros. Los factores de crecimiento son generalmente proteínas que actúan mediante uniones de alta afinidad a receptores, cuya función principal es la del control externo del ciclo celular mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada en la fase G1 (crecimiento de la célula) dando lugar a los procesos que conforman el ciclo celular y sus fases S y M que corresponden a la síntesis de DNA, la mitosis y G2 (preparación para la división celular), pudiendo realizar su función como inductores o supresores de la proliferación celular, promoviendo la diferenciación celular, la movilidad y la adhesión celular entre otros. Estos factores actúan sobre otros elementos celulares por mecanismo endocrino, paracrino o autocrino (Jiménez, 2006).

Una vez unido el factor de crecimiento a su receptor, se inicia una cascada de procesos bioquímicos denominados sistemas de transducción de señales que permiten, gracias a la actividad quinasa del receptor, la llegada de esta señal proliferativa hasta el núcleo, donde provoca inducción de la expresión de diversos mediadores que favorecen la proliferación celular; sin embargo, cuando la señal proliferativa llega al núcleo, la división celular queda regulada por puntos de control o “restricción checkpoint” del ciclo celular que impiden la progresión de células dañadas y mantienen la homeostasis celular (Bordon y Cols. 2007).

Existe una gran variedad de proteínas que controlan y coordinan el ciclo celular, las principales son las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), que consisten en dos subunidades: subunidad catalítica con actividad quinasa, que permite fosforilar proteínas produciéndose cambios en su actividad o estructura y subunidad de unión al sustrato (Ciclinas). Este proceso de regulación se da en la fosforilación o desfosforilación de la proteína codificada por el gen retinoblastoma (Rb). Cuando el Rb está hipofosforilada inhibe a E2F, evitando que éste induzca la expresión de genes que regulan la síntesis de DNA. La fosforilación de Rb conlleva alteraciones que impiden su unión y por tanto la inhibición de E2F, quedando libre para promover la síntesis de DNA (Bordon y Cols. 2007).

La regulación está basada en el proceso de regeneración y muerte celular, está se encuentra en homeostasis, en forma de un estado estacionario como por ejemplo; algunos tipos de células, como los eritrocitos humanos, viven aproximadamente 120 días mientras que las células intestinales tienen pocos días de vida media, por lo que las células intestinales deben ser sustituidas casi inmediatamente, lo que no ocurre con los eritrocitos. Los mecanismos que regulan la multiplicación celular fallan y entonces las células comienzan a crecer y dividirse incontrolablemente, el resultado es un clon de células que termina formando una masa celular denominada tumor (Ganen y Aguilar, 1996).

La formación de este tumor obedece a cambios en el material genético (DNA) de las células somáticas. El cambio más importante es la alteración de genes preexistentes a oncogenes. Los productos de los oncogenes son los causantes del crecimiento celular inapropiado, por lo que queda claro que la alteración del DNA es la clave de la génesis del cáncer (Ganen y Aguilar 1996).

Las células llevan a cabo la división celular mediante duplicación de sus cromosomas para segregar una copia del material genético, así como de los organelos esenciales a cada célula hija (ciclo celular). La regulación de la división celular es un evento crítico para el desarrollo normal de los organismos

multicelulares y se ha demostrado que su alteración se asocia al desarrollo del cáncer. Los tumores malignos pueden llevar a cabo la invasión del estroma circundante, degradar membranas basales y establecerse en sitios distantes, aún antes de que el tumor primario alcance un tamaño clínicamente detectable (Jiménez, 2006).

En un organismo pluricelular no solo está controlada la velocidad de la división celular, sino también, el ritmo de la muerte celular, particularmente por apoptosis (muerte celular programada). Las células que mueren por una lesión suelen inducir inflamación y al romper la membrana plasmática liberan todo su contenido sobre las células adyacentes, este proceso es denominado necrosis celular que es potencialmente perjudicial. Por el contrario, cuando una célula que sufre de apoptosis muere sin dañar las células adyacentes, la célula suele contraerse y condensarse. El citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desambla y el DNA nuclear se fragmenta, la superficie celular se altera para que la célula sea fácilmente fagocitada por una célula adyacente o un macrófago antes de que su contenido se libere, así evitan consecuencias perjudiciales y posibilitan que los componentes de la célula muerta se reciclen por la célula que los ingiere. Todo este mecanismo depende de una familia de proteasas que contiene una cisteína en su sitio activo y se escinden sus proteínas diana sobre residuos específicos de ácido aspártico. Estas proteasas son llamadas caspasas, las cuales son sintetizadas en la célula como precursores inactivos (Ganen y Aguilar, 1996).

Una vez activadas las caspasas generan una cascada proteolítica amplificadora, generando actividades de proteínas, unas degradarán el DNA, otras fragmentarán el núcleo y así hasta dismantelar la célula, esta cascada de proteasas no solo es destructiva y auto amplificadora sino que actúan dejando un daño irreversible.

2.2.2 Apoptosis.

En la última década, en la gran cantidad de trabajos de investigación relacionados con los procesos que rodean la muerte celular, se ha llegado a consolidar dos grupos generales; los que trabajan con necrosis y los que evalúan la muerte celular programada.

El termino necrosis considera los procesos repentinos y catastróficos, en los que la degeneración celular es pasiva sin requerimientos de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxina. En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno también conduce a las células vecinas hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan ese tipo de muerte celular, además de originar una reacción inflamatoria y una cicatriza fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado. El segundo tipo de muerte celular se conoce como apoptosis o muerte celular programada, en este proceso las células programan su autodestrucción sin desencadenar reacciones secundarias de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis por tanto se considera un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o reconocidas como ajenas, que desempeñan un papel protector frente a posibles enfermedades (Domínguez, 2008).

La apoptosis es un mecanismo que mantiene el balance entre la proliferación y la pérdida celular, lo cual permite una regulación fisiológica fundamentada en un estricto control genético el número de células a nivel tisular, este proceso es de suma importancia en la embriogénesis y la regulación del sistema inmune y el mantenimiento de la homeostasis tisular. En este proceso la célula presenta cambios morfológicos y fisiológicos como lo es la condensación celular, fragmentación del núcleo y del DNA nuclear, disrupción del citoesqueleto y

alteración de la superficie celular lo cual despliega una serie de señales para que la célula sea fagocitada por un macrófago o célula vecina y finalizar con la muerte celular sin afectar las células vecinas (García y Cols. 2009; Domínguez, 2008; Jiménez, 2006).

La maquinaria intracelular responsable de este proceso depende de una familia de caspasas, las cuales son producidas en la célula como precursores inactivos o procaspasas. Una vez activadas las caspasas iniciadoras, estas activan a otras procaspasas y producen una cascada proteolítica. Finalmente las caspasas efectoras activan proteínas indispensables para la célula como por ejemplo la laminina, lo que produce una degradación de la membrana nuclear o una influencia sobre la enzima degradante del DNA (DNAasas), las cuales fragmentan el DNA nuclear. Esta cascada no solo es destructiva sino también auto-amplificada e irreversible; por lo tanto el proceso de apoptosis al alcanzar un punto crítico es irreversible. La activación de la apoptosis puede darse por un estímulo interno o externo de la célula, lo que determina dos vías de inducción de este proceso; la intrínseca y la extrínseca (García y Cols. 2009; Jiménez, 2006; Domínguez, 2008).

Una masa tisular constante es mantenida por la tasa de producción de células nuevas y la tasa de células perdidas por apoptosis, si se da una alteración en estos estados se produce una patología, por ejemplo, se expresa una atrofia si hay una pérdida excesiva y una neoplasia cuando es una producción excesiva. El daño genético activa programas apoptóticos, lo que convierte a la apoptosis en la mayor fuente de disminución de la celularidad en un tumor. Por eso, la apoptosis debe ser superada para asegurar la expansión celular continua y la supervivencia de una masa tumoral, lo que genera un desbalance entre la proliferación y la muerte celular. En consecuencia, evitar la apoptosis debe ser un evento relativamente temprano en la transformación que asegure la acumulación de las mutaciones, necesaria para el crecimiento maligno exitoso. La falla de la apoptosis podría permitir a las células transformadas, susceptibles de sufrir

posterior daño genético, jugar un papel importante en la patogénesis tumoral. Durante el desarrollo tumoral, la resistencia de la apoptosis puede ser adquirida por las células tumorales a través de diferentes estrategias; de acuerdo al tipo histológico hay un mecanismo predominante. Cualquier activación de las vías antiapoptóticas o inactivación de las vías proapoptóticas ya sea por mutaciones somáticas o alteración en la expresión genética genera falla de la apoptosis, y por tanto, promueve la supervivencia de las células tumorales (García y Cols. 2009; Domínguez, 2008; Jiménez, 2006).

La muerte celular vía apoptosis es una variable cada vez más estudiada para la mejor comprensión del desarrollo del cáncer y el establecimiento de nuevas y mejores estrategias para la prevención y tratamiento de la enfermedad (García y Cols. 2009; Jiménez, 2006; Domínguez, 2008).

2.2.3. Características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis.

1. Aumento brusco de la densidad celular. El retículo endoplasmático se dilata, formando vesículas y fusionándose con la membrana plasmática, eliminando así su contenido al medio extracelular. Esta rápida, pero selectiva salida de fluidos e iones intracelulares se encuentra mediada por transportadores iónicos (cotransportador cloro-potasio-sodio, que inhibe la pérdida de agua y sodio de las células afectadas).
2. Las células se retraen y pierden el contacto con células vecinas. Se han descrito reducciones en el volumen celular de incluso el 30%.
3. Incremento moderado pero sostenido de la concentración citoplasmática de calcio libre, diferencia clara de necrosis donde su aumento es importante y drástico.
4. Cambios en la composición de la membrana celular, observándose translocación de glicolípidos de la cara interna de la membrana como la fosfatidil serina a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos que procesan a los

cuerpos apoptoticos resultantes y de esta manera, evitan la liberación del contenido celular y la posible reacción inflamatoria.

5. Alteración de la conformación de los elementos del citoesqueleto. Como consecuencia aparece una deformación celular, resultado de la actividad de las proteasas, modificando la transcripción y el transporte intracelular retrogrado de factores de crecimiento de proteínas.
6. Activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular.
7. Fragmentación nuclear por las endonucleasas endógenas que procesan el ADN en fragmentos oligonucleosomales de entre 180-200 pb. Eso produce el característico patrón del DNA en escalera cuando se analiza en electroforesis y se utiliza como una marca bioquímica en el reconocimiento de la apoptosis.
8. La membrana Plasmática comienza a tener circunvoluciones y adquiere una apariencia vesicular característica. Como resultado de las grandes invaginaciones aparecen los cuerpos apoptoticos. Estos son cuerpos membranosos impermeables a los colorantes vitales, mantiene sus mitocondrias intactas y contiene cuerpos densos granulares que corresponden a fragmentos nucleares, los cuales también se producen por las grandes invaginaciones de la membrana nuclear (Domínguez 2008; Gutiérrez y Cols. 2006; Fan y Cols. 2005; Aigner y Col. 2002; López y Cols. 2002).

La apoptosis puede ser inducida por diversos factores presentes en las neoplasias, como la isquemia leve, el estrés oxidativo, la citotoxicidad linfocitaria, los factores de necrosis tumoral, las interacciones o pérdidas de las relaciones entre las células epiteliales y la matriz extracelular, la radioterapia, las drogas citotóxicas o por la expresión de nuevos oncogenes. La resistencia a la apoptosis en los tumores, puede explicar en parte, la baja respuesta de esos tumores a la quimioterapia. La importancia de la apoptosis en las neoplasias se basa en su papel en la eliminación de células pre-neoplásicas, es necesaria y funcional en

los tumores ya establecidos, por ello es necesaria la respuesta terapéutica adecuada a las diferentes armas farmacológicas antitumorales.

2.1 Quimioterapia.

Son sustancias capaces de detener inhibir o impedir la evolución de una neoplasia, restringiendo la maduración o proliferación de células maduras actuando sobre fases específicas del ciclo celular y por ello son activas en células que se encuentran en proceso de división. La medicina contemporánea ofrece todo un abanico de posibilidades terapéuticas para los distintos tipos de cáncer, siendo la cirugía temprana el método con mayor índice de curaciones, además la combinación de cirugía con tratamientos coadyuvantes como radioterapia y quimioterapia, facilitan y mejoran el pronóstico tras la intervención quirúrgica del paciente (Jiménez 2006). En la actualidad solo del 2% al 4% de los tumores malignos responden a la quimioterapia. Por otra parte, estos agentes farmacológicos producen graves efectos secundarios, además de tener una efectividad limitada. Por ejemplo, los derivados del platino (cisplatino, carboplatino, oxalipaltino) entre otros, que se utilizan en una amplia variedad de tumores malignos de ovario, mama, pulmón, cuello de útero, testículo, vejiga, próstata, piel, páncreas etc. forman complejos con el ADN a fin de inducir la muerte celular programada, no obstante son responsables de efectos colaterales severos irreversibles del tipo nefrotóxico y ototóxico, lo que representa un obstáculo para extender su uso. Es por ello que la introducción de nuevas estrategias para mejorar la eficacia y especificidad en el tratamiento de cáncer es necesaria (Santos y Cols. 2006).

La investigación para la obtención de nuevos compuestos con potencial para el tratamiento del cáncer mediante la regulación de la muerte celular, es un campo de investigación de gran impacto, particularmente para las empresas farmacéuticas. Aunque la quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas más empleada en el tratamiento del cáncer, la resistencia a los fármacos utilizados representa un obstáculo importante es por ello que se han explorado muchas

posibilidades con el fin de encontrar mejores opciones terapéuticas (Sullivan, 2000).

Dependiendo del tipo de cáncer y de los fármacos que se vayan a emplear, la quimioterapia puede administrarse por vía oral o intravenosa. La duración total del tratamiento y sus efectos secundarios dependen de una serie de factores como son el tipo de tumor, la respuesta del tumor al tratamiento y el tipo de quimioterapia empleada.

En este tipo de tratamiento, deben considerarse los efectos terapéuticos y tóxicos de los distintos agentes empleados, así como la resistencia a estos y su especificidad a algunos tipos de células cancerosas (Sullivan y Cols. 2000).

El objetivo de la quimioterapia es incrementar la supervivencia mientras se mejora la calidad de vida de un individuo con esta patología. Los quimioterapéuticos han ido en aumento con cada nueva licencia de un agente quimioterapéutico, sin embargo se han introducido terapias más dirigidas ya que hay diversas entidades cancerígenas que escapan a las actuales terapias que aun continúan optimizándose, tanto en su función terapéutica como en los costos para los pacientes y al mismo tiempo evoluciona el conocimiento de los agentes terapéuticos y de la biología del tumor (Seufferlein y Cols. 2009).

Los diferentes quimioterápicos son neoadyuvantes, que se utilizan antes de la cirugía de extirpación de tumor. Complementariamente, elimina la metástasis subclínica en el momento del primer tratamiento. Se debe realizar inmediatamente después del tratamiento local de erradicación. Alternante, se realiza cuando el cáncer presenta dos o más subpoblaciones celulares con distinta sensibilidad a los citostáticos. Local o dirigida, se refiere al uso de fármacos dirigidos contra las moléculas de señalización (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos etc.) los cuales intervienen en la proliferación de las células malignas, con el fin de aumentar la eficacia y disminuir la citotoxicidad. Diferentes estrategias están disponibles con el

fin de interferir con las señales de transducción específicas de las vías del tumor (Allevato y Cols, 2008).

Existen varias formas de obtener sustancias con acción dirigida a blancos farmacológicos, estos pueden ser anticuerpos o sustancias químicas con ciertas características químico-estructurales que les permite acoplarse sobre el receptor involucrado en cáncer. Uno de estos blancos pueden ser enzimas como las cinasas (caspasas), cuyo inhibidor puede interferir con el sustrato ATP (por ejemplo, PTK / ZK, erlotinib, gefitinib). Por otra parte, a nivel de los ácidos nucleicos se puede interferir la expresión del ADN o ARN inhibiendo la expresión de un gen determinado.

Actualmente se están diseñando y o evaluando nuevas propuestas terapéuticas con mejores características farmacológicas para el tratamiento de cáncer, lo que implica el desarrollo una nueva generación de fármacos que evade la resistencia a los medicamentos contra los cáncer establecidos. Ejemplo de estos se tiene a los agentes alquilantes, dentro de ellos se encuentran compuestos de plantas medicinales. Estudios dentro de este campo llamado fitoterapia indica que la medicina tradicional derivada de productos naturales vale la pena ser investigada ya que se han obtenido resultados favorables además de innovadores (Konkimalla y Cols. 2008).

El principio básico en el que se sustenta la quimioterapia intensiva es la presunción de la existencia de una curva de dosis-respuesta, de agentes citotóxicos de corta semivida con fundamental toxicidad medular y de la posibilidad de rescate hematológico posterior. Cada fármaco funciona con mecanismos diferentes, de manera que unos son capaces de causar dano directamente a las células malignas causando efectos en su ADN, mientras que otros desencadenan una reacción del sistema inmune para que éste sea capaz de reconocerlas como 'elementos extraños' y ordene su ejecución. En otros casos, la actividad o reposo de las células enfermas depende de su reacción a las hormonas que produce el

organismo humano naturalmente. Conociendo en qué momento del ciclo celular actúan y qué actividad concreta bloquean para frenar la multiplicación de la enfermedad; los científicos pueden decidir que el fármaco actuará mejor sobre cada tipo de tumor, si deben combinarse varios de ellos para lograr una mayor eficacia, si se puede emplear conjuntamente con algún otro tipo de medicamento e incluso cuándo debe administrarse para lograr el efecto deseado. En la actualidad, los agentes quimioterapéuticos pueden agruparse de acuerdo a su estructura química y mecanismos de acción (García y Col. 2006; Allevatos y Col. 2008) en:

- *Agentes alquilantes.* todos comparten un mecanismo de acción común pero se diferencian en su acción clínica. Atacan los sitios negativamente cargados en el DNA, (átomos del oxígeno, nitrógeno, fósforo y sulfuro), bloqueando la replicación y/o la transcripción del DNA. La alquilación del DNA también conduce a roturas del filamento del DNA y ligadura cruzada del filamento del mismo. Alterando el DNA de este modo, la actividad celular es parada con eficacia y la célula morirá. Los fármacos de este grupo son activos en cada etapa del ciclo de la celular como los platinos, ciclofosfamida y busulfán.
- *Antimetabolitos.* Generalmente todos los antimetabolitos interfieren con los caminos metabólicos normales, incluyendo los necesarios para hacer el DNA nuevo como el 5-Fluorouracilo y 6-mercaptopurina.
- *Camptotecinas.* Las drogas de esta clase de quimioterapéuticos actúan formando un complejo con topoisomerasas y DNA dando por resultado la inhibición de la función de esta enzima. La presencia de topoisomerasa se requiere para la síntesis en curso del DNA. Ej.: Etopósido, Vinblastina y Vincristina.
- *Taxanos.* Otra clase de quimioterapéuticos específicos para la fase de Mitosis del ciclo celular son los taxanos. Los taxanos incluyen el paclitaxel y el docetaxel, los cuales atan con alta afinidad los microtúbulos e inhiben su función normal (Allevatos y Col. 2008; García y Col. 2006).

2.2 Fitoterapia con el producto herbario “ARCOMIG”.

Debido a la alta toxicidad y la multiresistencia a las drogas citostáticas utilizadas más comúnmente, además de los programas de desarrollo de fármacos estándares, cada vez se da más énfasis al desarrollo de nuevos agentes naturales antitumorales derivados de plantas. En la actualidad existe un gran número de estudios de productos antitumorales derivados de plantas con evidencias clínicas (Jiménez, 2006).

Hacia finales de 1950 comenzó una intensiva revisión de plantas, microorganismos y animales como corales y estrellas de mar, respecto a su actividad antineoplásica, esto lo inició el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (INC), que promovió y difundió un programa de detección selectiva.

Las moléculas antitumorales aisladas suelen ser productos naturales nuevos que se extienden en un amplio margen de tipos estructurales. No obstante varios de ellos, de hecho son principios naturales ya conocidos anteriormente, pero probablemente, no habían sido sometidos a ensayos rigurosos respecto a su actividad biológica, especialmente a su potencial antitumoral.

ARCOMIG es un producto herbario utilizado como suplemento alimenticio (Figura 2), es recomendado para el tratamiento de una serie de padecimientos tales como cáncer, diabetes, hipercolesterolemia y artritis reumatoide, es manufacturado a partir de una serie de plantas medicinales que se han utilizado en la medicina tradicional de varios países latinoamericanos desde tiempos pre-colombinos con aparentes buenos resultados (Aregullin y Cols. 2006). Entre los ingredientes naturales de este producto herbario se encuentra la manzanilla (*Matricaria chamomilla*), angélica (*Angelica archangelica*), cola de caballo (*Equisetum arvense*), alfalfa (*Medicago sativa*) y ajo (*Allium sativum*), dichas plantas contienen principios químicos activos que son responsables de las propiedades del producto.



Figura 2. Producto herbario ARCOMIG. En la figura la presentación comercial del producto herbario.

Se han realizado pocos estudios acerca de este producto que ha sido utilizado con resultados favorables. Dentro de estos se encuentra una evaluación en la inhibición de diversas variedades de células cancerígenas humanas, obteniendo como resultado una inhibición moderada en todas las líneas celulares en las que fue inoculado el producto, siendo particularmente efectivo en la línea celular de leucemia linfocítica y en células cancerígenas de mama, próstata y cerebro. Además, fue evaluado por técnicas espectrofotométricas para analizar la actividad antioxidante *In Vitro* usando el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DDPH) observando un rápida y potente reducción del radical libre e inhibiendo la producción intracelular de ROSs (especies reactivas del oxígeno intracelular) utilizando como indicador fluorescente, 2,7-diclorofluoreceina (DCFH), en células humanas de colon (Aregullin y Cols. 2006).

Se estudio la actividad citotóxica sobre diversas líneas celulares de leucemia humana (CEM) y cáncer de pulmón (LuCa1); así como en neuroblastoma de ratón

(B50) y osteosarcoma canino (K9), encontrando una aparente inhibición de células CEM a una concentración baja del producto de (16x), la viabilidad fue evaluada con la reducción del color del indicador, alamarBlue y confirmado por observaciones al microscopio (Berry J. College of Arts and Sciences Department of chemistry, University of Miami, sin año).

Las propiedades del producto herbario son atribuidas a los principios activos encontrados en el, estos componentes provienen de las diversas hierbas con las que esta elaborado, dichas plantas han sido ya blanco de diversos estudios; estas plantas medicinales se conceptualizan como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias conocidas como principio activo que pueden ser utilizadas con finalidades terapéuticas o que son precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica. Los principios activos se definen como cualquier sustancia que ejerce actividad farmacológica, que para la planta, suelen ser metabolitos de ella. La mayoría de principios activos se encuentran en las raíces y en la corteza (Tlacuilo y Cols. 2007).

ARCOMIG está compuesto de las siguientes plantas:

2.4.1 *Matricaria chamomilla* (manzanilla).

Los principios activos que se encuentran en los aceites esenciales de manzanilla son los responsables de conferirle las propiedades farmacéuticas, entre ellos se encuentra el óxido de bisabolol, óxido de bisabolona, flavonoides (luteolol, apigenol, quercetol), cumarinas (umbeliferona y herniaria), mucílagos urónicos, lactonas sesquiterpénicas o principios amargos (matricina, matricarina, precursoras del camazuleno), sales minerales de un 8% a un 11% y el aceite esencial que está compuesto por camazuleno, alfa-bisabolol (Tlacuilo y Cols. 2007; Jiménez 2006; Marinhho y Cols. 2006; Raal y Cols. 2003; Gardiner 1999).

El contenido que forma el aceite esencial produce un efecto analgésico, cicatrizante, antiinflamatorio fuerte, antiséptico, espasmolítico y ligeramente

sedante, acciones a las que contribuyen las cumarinas y flavonoides. El camazuleno, se utiliza para combatir el asma bronquial de los niños en inyección intramuscular. Está perfectamente indicada con buenos resultados en: gastritis, úlcera gastroduodenal, espasmos gastrointestinales, diarrea, náuseas, vómitos, digestiones lentas, inapetencia, síndrome de colon irritable, trastornos nerviosos, irritaciones cutáneas, picaduras, hinchazones, molestias oculares, conjuntivitis e insomnio infantil. (Marinhho y Cols. 2006; Hall y Cols. 2002; Gardiner, 1999).

En cuanto a la actividad antineoplásica, *Matricaria chamomilla* fue evaluada en diversas líneas celulares, encontrando que causa mínima inhibición del crecimiento en células normales, mientras que en diversas líneas celulares de cáncer humano causa una disminución significativa en la viabilidad debido a que induce apoptosis en las células cancerosas pero no en las células normales; confirmándose en análisis *In Vivo* que la apigenina 7-O-glucósido que es uno de los principales constituyentes de los extractos de manzanilla, inhiben el crecimiento celular de cáncer (Janmejai y Cols. 2007); la apigenina inhibe significativamente los tumores inducidos a ratones con rayos UV, provocando la reversión en la fase G2/M disminuyendo la keratinocitosis y contribuye a inhibir o disminuir la conversión de papilomas a carcinomas (Gardiner 1999).

2.4.2 *Allium sativum* (ajo).

Usado en la preparación del producto herbario, sus propiedades son conocidas desde hace mucho tiempo (Hall y Cols. 2002). El ajo es una especie herbácea originaria de Asia. Tradicionalmente ha sido empleado como antiséptico, expectorante o incluso diurético. No obstante, las investigaciones científicas indican que el ajo es capaz de eliminar numerosas bacterias, virus, infecciones fúngicas y parásitos intestinales. Asimismo, ha demostrado efectos beneficiosos en el tratamiento de la hipercolesterolemia y los niveles altos de triglicéridos, ya que permite la reducción del nivel de lípidos en sangre y, en consecuencia, interviene en la prevención de los procesos arterioscleróticos (Wagner 2005). También es recomendable en el tratamiento de la hipertensión leve y resulta eficaz

en las infecciones respiratorias como los catarros o resfriados (Tlacuilo y Cols. 2007; Hall y Cols. 2002).

El principal componente activo en el ajo es la *alliína* (sulfóxido de S-alil-cisteína), una sustancia química inodora. Cuando se tritura el ajo, la *alliína* se transforma en *allicina*, que proporciona al bulbo su característico sabor y tiene propiedades antibióticas. La *allicina* también ayuda a reducir el nivel de colesterol. Otro componente activo es el *ajoeno*, sustancia que se forma por la condensación de la *allicina* y previene el endurecimiento de las arterias y, en consecuencia, el riesgo de infarto, también contiene sales minerales, azúcares, lípidos, proteínas, saponósidos, terpenos, vitaminas, enzimas y compuestos azufrados (Tlacuilo y Cols. 2007).

Algunos trabajos científicos relacionan las propiedades del ajo con la prevención de procesos tumorales, esto es debido a que la solución acuosa de ajo morado inhibe el 'Helicobacter pylori', bacteria asociada a una mayor incidencia de úlcera gastroduodenal y cáncer gástrico, por otra parte, un trabajo de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, en Estados Unidos, muestra que las personas que consumen ajo crudo o cocinado con regularidad reducen a la mitad el riesgo de presentar dichos padecimientos (Yang y Cols. 2007).

El dialil sulfuro (DAS), componente del ajo, tiene propiedades quimioprotectoras contra diversos tipos de cáncer; el azufre que contienen estos compuestos son capaces de inducir apoptosis en varias líneas celulares como las de colon DM 320; también se demostró que aumenta la producción de ROSs, causando la detención del ciclo celular en la etapa G2/M, ya que la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y lactato deshidrogenasa (LDH) se redujeron con el tratamiento de DAS, lo que demostró la antiproliferatividad y los efectos citotóxicos, respectivamente (Sriram y Cols. 2008).

El S-allylmercaptocysteine (SAMC) extraído del ajo puede aumentar la sensibilidad del cáncer de próstata ya que se encontró que aumenta la eficacia inhibitoria del docetaxel en comparación con el efecto que causa el fármaco sólo. Así mismo en un modelo experimental de ratones, se encontró que la combinación de docetaxel y SAMC fue 53% más potente que docetaxel solo y que no hubo toxicidad en el hígado, riñón y médula ósea de los ratones tratados con la terapia combinada. Estos resultados sugirieron que la SAMC es capaz de aumentar el efecto contra el cáncer del docetaxel sin causar efectos tóxicos adicionales en estudios *InVivo*. El análisis por citometría de flujo y el análisis de Western Blot CPRH sobre las líneas celulares, demostrarón que la mezcla de SAMC y docetaxel indujo la detención del ciclo celular en la fase G2/M y la inducción de apoptosis (Engdal y Cols. 2008; Stan y Cols. 2007).

2.4.3 *Angélica archangelica* (angélica).

Tiene aplicaciones farmacéuticas ya que contiene cumarinas sencillas y numerosas furanocumarinas como la arcangelicina, el bergapteno o la imperatorina; tiene también, aceite esencial constituido principalmente por hidrocarburos monoterpénicos α (y β -felandreno, careno, α -pineno) y sesquiterpénicos; contiene además cromonas, ácidos fenólicos, β -sitosterol y flavonoides. Angélica posee propiedades antiespasmódicas, digestivas, carminativas, diuréticas, antiinflamatorias tópicas, antibacterianas y antifúngicas, tonificante y equilibradora del sistema nervioso; el aceite esencial ha mostrado efectos espasmolíticos. La planta (Figura 3) puede causar fotodermatitis y fototoxicidad debido a la presencia de las furanocumarinas, compuestos conocidos como fotosensibilizadores (HMPC, 2007; Nivinskiene y Cols. 2003; Carretero 2000).

Estudios realizados a esta planta muestran que tiene aplicaciones anticancerígenas. Al realizar ensayos en ratones expuestos a radiaciones ultravioleta, que se asemejan a las exposiciones humanas de rayos UV que dan como resultado carcinogénesis, se encontró que la angelicina que es uno de los

compuestos principales de angélica evita a partir de sus metil derivados, que se lleven a cabo mutaciones en el DNA causado por exposiciones a rayos ultravioleta emitidos por el sol (Committee on herbal medicinal products, 2007). También se ha estudiado el efecto antiproliferativo de una tintura de los frutos de *Angelica archangelica* y los componentes activos utilizando el cáncer de páncreas humano como línea celular (PANC-1) modelo. Se observó una importante actividad antiproliferativa al inocular la tintura del fruto, resultado de las dos más abundantes furanocoumarinas en la tintura: imperatorin y xanthotoxin (Sigurdsson y Cols. 2004). Además de la tintura del fruto también la hoja de *Angelica archangelica* ha sido estudiada, examinando el efecto del extracto de su hoja en el crecimiento de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* en ratones. Los resultados muestran que el extracto de la hoja tiene actividad antitumoral expresándose en los ratones con una marcada reducción en el crecimiento del tumor (Sigurdsson y Cols. 2005).

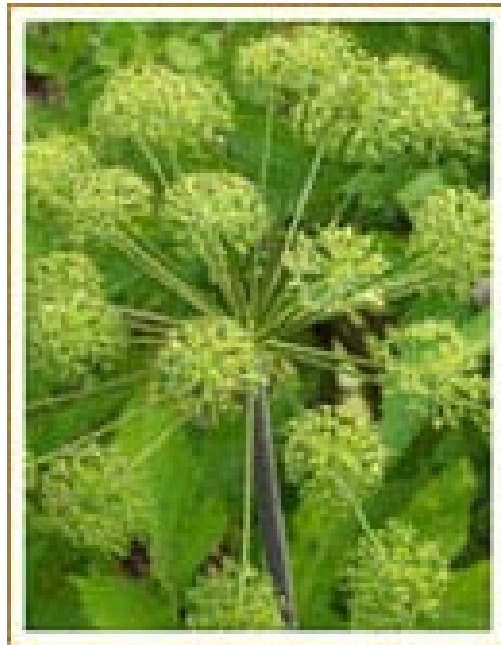


Figura 3. Angélica (*Angélica archangelica*). En la figura se muestra la plántula de angelica (Oxford Scientific Films/D. Wrigglesworth, 2008).

2.4.4 *Equisetum arvanse* (cola de caballo).

Equisetum arvanse, comúnmente llamada cola de caballo (Figura 4) tiene principios activos que se basan en sus abundantes sales minerales silícicas sobre todo, potásicas, magnésicas y de aluminio), saponósido (equisetonina), además

de otros compuestos como taninos, flavonoides (isoquercetrósido, glucósidos de kenferol), vitamina C, ácidos caféico y equisetólico, manitol e inositol, y trazas de alcaloides (nicotina, espermidina), tiene acción antihemorrágica, cicatrizante, antifúngica, diurética, astringente y remineralizante. Los minerales silicos es una sustancia que se asocia a los procesos de crecimiento, y que está presente tanto en los pulmones, cerebro, hígado y músculos, como también en las uñas, pelo, piel y tejido conjuntivo. Esta indicado en afecciones renales e inflamaciones de la vejiga urinaria y de la próstata, y para quienes tienen la necesidad de aumentar la cantidad de orina por tener tendencia a retener líquidos. Al limpiar las vías urinarias (acción detoxificante), contribuye a depurar la sangre y reduce ciertas afecciones de la piel. Por ello está muy indicada en caso de eccemas y herpes, así como en hongos de la piel (www.salud.bioetica.org).



Figura 4. Cola de caballo (*Equisetum arvense*). En la figura podemos observar a la planta en estado silvestre (Klinka y Cols. 2003).

2.4.5 *Medicago sativa* (alfalfa).

Medicago sativa comúnmente conocida como alfalfa es otra de las plantas que encuentran dentro de este producto herbario, la parte de esta planta más utilizada son las subunidades aéreas (Figura 5).

Sus principios activos consisten en sales minerales como, calcio, hierro, potasio, fósforo, manganeso, sodio, sílice, zinc, así como; carotenos, vitaminas C, D, E, K, B1, B2, B3, B6, B12 (trazas), colina, ácido fólico, ácido pantoténico, Isoflavonas: genisteína, biocanina daidzeína, formononetina. Derivados cumarínicos: cumestrol, medicagol, sativol, trifoliol, lucernol, dafnoretina. Saponósidos, cuyas geninas son derivados del oleaneno: neutros (soyasapogenoles), o ácidos (ácido medicagínico, hederagenina, ácido oleanólico). Fitosteroles: beta-itosterol, alfa-espinasterol, estigmasterol, cicloartenol y campesterol. Cantidades mínimas de alcaloides (en las semillas): trigonelina, estaquidrina, homoestaquidrina.

La alfalfa se considera una buena fuente importante de vitaminas y minerales; en rata se ha observado la reducción en los niveles de colesterol total (www.elarboldelavida.net).



Figura 5. Alfalfa (*Medicago Sativa*).En esta figura se puede observar a la planta (Bogdan, 2005)

2.4.6 Principales compuestos encontrados en ARCOMIG.

Los beneficios para la salud del producto herbario, están relacionados con la contribución acumulativa de varios componentes en esta mezcla compleja. La purificación de los principios activos de ARCOMIG se obtuvo mediante las

técnicas de cromatografía de partición y en capa preparativa; dicho estudio mostró la presencia de tres principales componentes en el producto: óxido de bisabolol, al cual se le atribuyen propiedades antiinflamatorias; zingerona, que es un promotor de la degradación de la grasa, es bactericida, antimutagénico y se utiliza para el tratamiento de la gastritis además de ser antiinflamatorio y por último la herniarina o 7-metoxi-cumarina a la cual se le atribuyen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antipromotor de tumores, antidiabético y antimicrobiano (Figura 6), (Departament of Plant Biology, Cornell University, sin año).

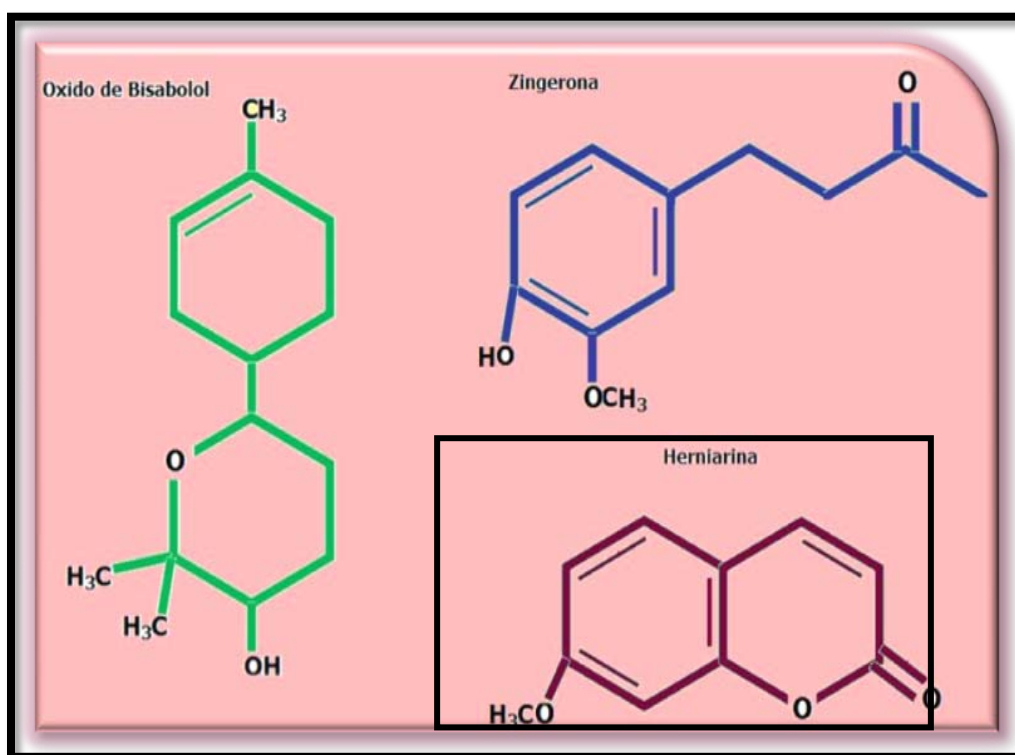


Figura 6. Principios activos identificados en ARCOMIG. Se muestran las tres principales sustancias activas del producto herbario, destacando como antineoplásica la cumarina.

Sin embargo de los tres principales principios activos encontrados en el producto herbario, la herniarina con nombre químico 7-metoxicumarina es el compuesto mencionado con propiedades anticancerígenas (Figura 7). Este compuesto pertenece a la familia de las cumarinas que son utilizados como fármacos antitumorales que inducen la muerte celular.

Existen diversos reportes del uso y tratamientos de las cumarina así como de sus derivados en la prevención y el tratamiento de diversos carcinomas. Se ha empleado en el tratamiento de cáncer de mama, próstata, riñón, melanoma, entre otros, así como agente protector contra carcinógenos. Se desconocen los posibles mecanismos mediante los cuales estos compuestos puedan ejercer su acción. Algunas investigaciones indican que es a través de la estimulación del sistema inmunitario, mientras que otras consideran un efecto directo sobre las células tumorales. En relación con esto último, varios grupos de investigadores han evaluado los efectos antiproliferativos directos de las cumarinas sobre las células malignas, encontrando que la cumarina y la 7-hidroxicumarina inducen, *in vitro*, inhibición de la proliferación en diversas líneas celulares malignas de distinta estirpe histológica alterando su ciclo celular (Sullivan y Cols. 2000). Un ejemplo de la actividad de las cumarinas en células de cáncer cervico se observo en la línea HeLa realizando ensayos para analizar la actividad citotóxica y obtener la IC50. Los resultados indican que la cumarina es citotóxica en células HeLa a una concentración inhibitoria (IC50) de 65 y 13.3 μM a 48 y 72 horas de tratamiento, respectivamente (Delgado y Cols. sin año).

Varios autores han reportado la relación estructural de la actividad citotóxica de las cumarinas compuestas, así como una tendencia selectiva dependiente de los sustituyentes (Finn y Cols. 2002; Kawaii y Cols. 2001). Sin embargo, el mecanismo de acción de las cumarinas complejas no ha sido establecido.

Las cumarinas pertenecen al grupo de principios activos fenólicos de los compuestos conocidos como benzopironas, consistentes de un anillo benceno unido a una pirona —un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos— y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopiran-2-ona, denominada cumarina (Figura 7). Estos compuestos se encuentran distribuidos en una gran variedad de plantas, su amplia distribución parece correlacionar con la capacidad que poseen de inhibir el crecimiento de diversos patógenos para las plantas. La administración de la cumarina en modelos

animales y en el humano indica que es completa y rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal, y se metaboliza principalmente en el hígado. A diferencia de otros organismos, en el humano la vía más importante es la 7-hidroxilación, catalizada por la enzima CYP2A6, específica del citocromo P450. El tiempo de vida media de la cumarina en la circulación sistémica es aproximadamente una hora y es independiente de la vía de administración. Además, el metabolito 7-hidroxilado es excretado en la orina como glucurónido (Sullivan y Cols. 2000).

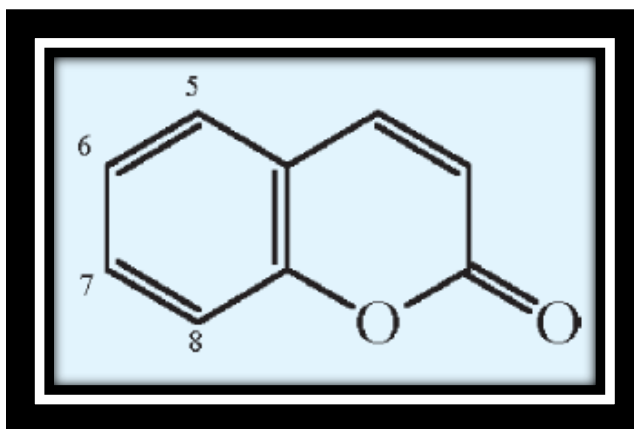


Figura 7. Estructura química de la cumarina. En la Figura podemos observar la conformación estructural general de la 7-methoxy-cumarinas

Las cumarinas poseen un esqueleto básico en todos los derivados, considerada químicamente como a fusión de dos anillos de benceno y 1,2-pirona, pueden ser clasificadas como sigue: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas con substitutos en el anillo de pirona y cumarinas misceláneas (Figura 12). Las cumarinas generalmente se encuentran en las llamadas plantas medicinales (Tlacuilo y Cols. 2007). Sobre su estructura, que se origina biosintéticamente por lactonización del ácido cumarínico (2-hidroxi- Z-cinámico), se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas. Prácticamente todas las cumarinas, poseen un sustituyente hidroxílico en posición 7, ya sea libre, como sucede en la umbeliferona, o combinado (metilo, azúcares, etc.). Las cumarinas sencillas pueden poseer además hidróxilos adicionales también libres o combinados (Machado 2005; Carretero 2000).

Es frecuente, que sobre el anillo cumarínico básico, generalmente hidroxilado en C-7, se sitúen sobre los carbonos 6 u 8 radicales isoprenílicos de 5, 10 o más raramente de 15 átomos de carbono, que por su alta reactividad pueden originar anillos adicionales de tipo furánico o piránico. A este grupo de cumarinas isopreniladas se les conoce en conjunto como cumarinas complejas debido a la gran variabilidad química de sus estructuras (Figura 8). Como grupo, su interés farmacológico no es muy grande, sin embargo debemos mencionar sus efectos sobre el sistema vascular tanto en territorio arterial como venoso y su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel como por ejemplo la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes (Machado 2005; Carretero M. 2000).

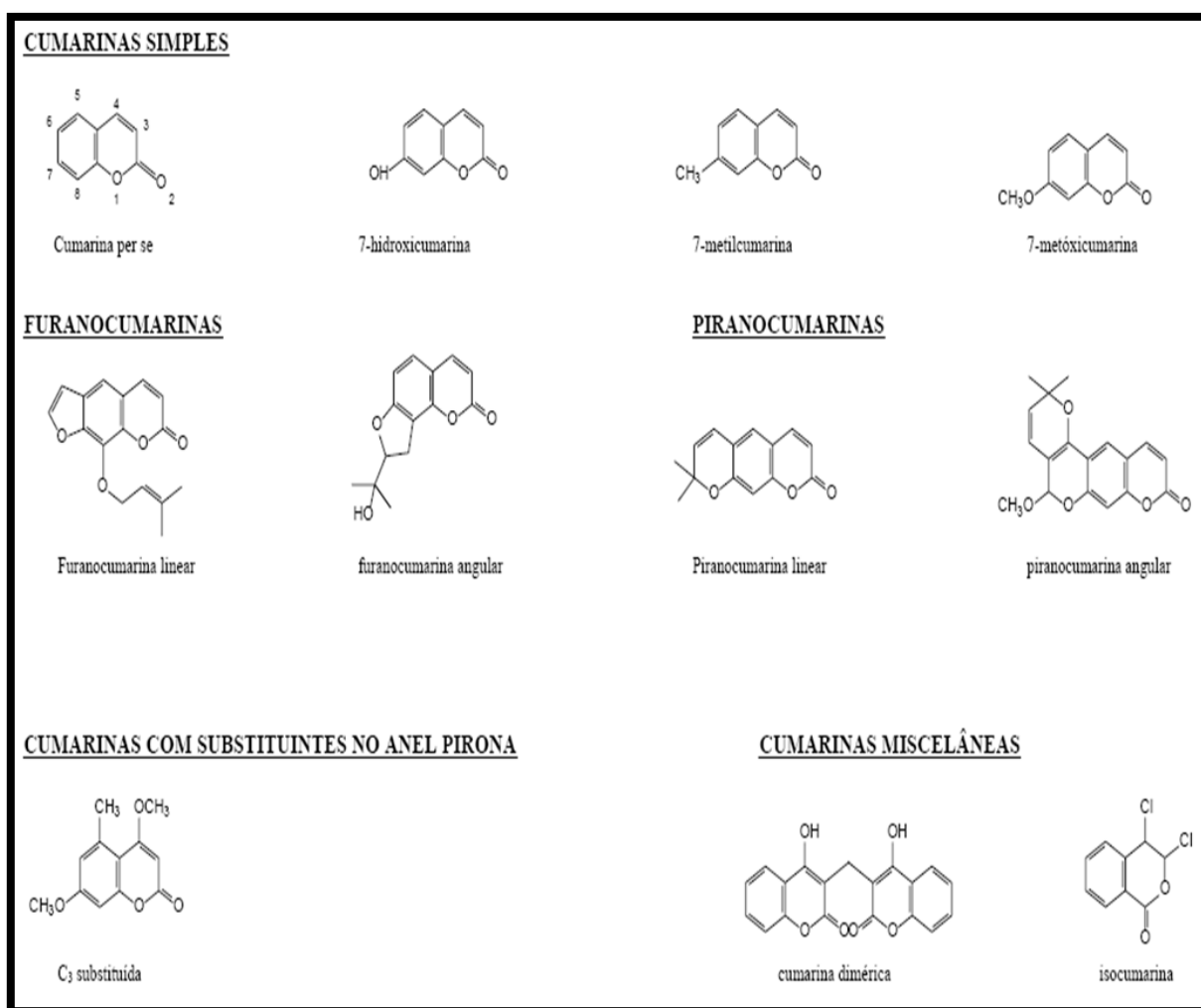


Figura 8. Clasificación de las cumarinas. La figura muestra ejemplos de las diversas cumarinas, su configuración y su clasificación.

Las cumarinas son sintetizadas, principalmente, en las hojas e niveles más altos así como en los frutos, seguido de las raíces. La síntesis de los dos metabolitos secundarios de plantas se deriva, principalmente, del metabolismo de glucosa generando intermediarios principales: ácido chiquímico y acetato. La vía del ácido chiquímico (chiquimato) genera tres aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptofano e tirosina, que son intermediarios en la biosíntesis de numerosos productos naturales aromáticos en plantas superiores, entre ellos, están los alcalóides, taninos, lignanas, ligninas y cumarinas (Figura 9).

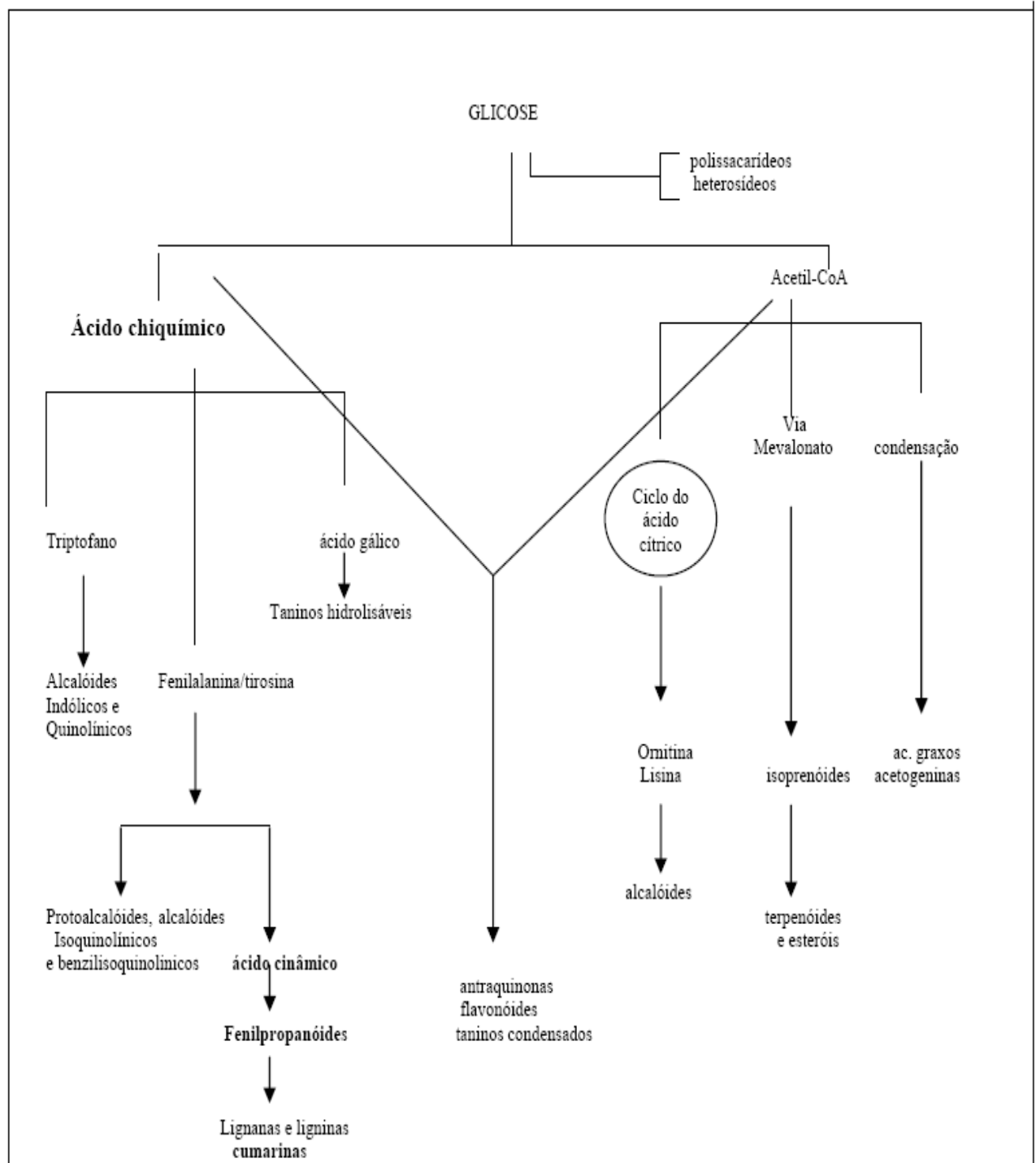


Figura 9. Ciclo biosintético de los metabolitos secundarios de las cumarinas. En la figura se pueden observar las diversas vías por las que pueden circular o estar presentes las cumarinas.

Las cumarinas son derivadas del metabolismo de la fenilalanina, siendo uno de los primeros precursores de ácido *p*-hidróxi-cinámico (ácido *p*-cumarínico), que es hidroxilado en la posición del C-2'. Otro isomero *Z* se lactoniza, produciendo espontáneamente, umbeliferona (7-hidroxycumarina). En algunos casos, la glicosilación del ácido cinámico ocurre, (impidiendo la lactonización). En otros casos, las cumarinas surgen de la hidrólisis enzimática. La mayoría de las cumarinas se derivada biogénicamente de la vía del ácido chiquímico, más un número significativo de ellas parece derivar de una vía mixta (ácido chiquímico y acetato) como las 4-fenilcumarinas, 4-*n*-propilcumarinas, por ejemplo, derivan totalmente de la vía del acetato (Figura 10).

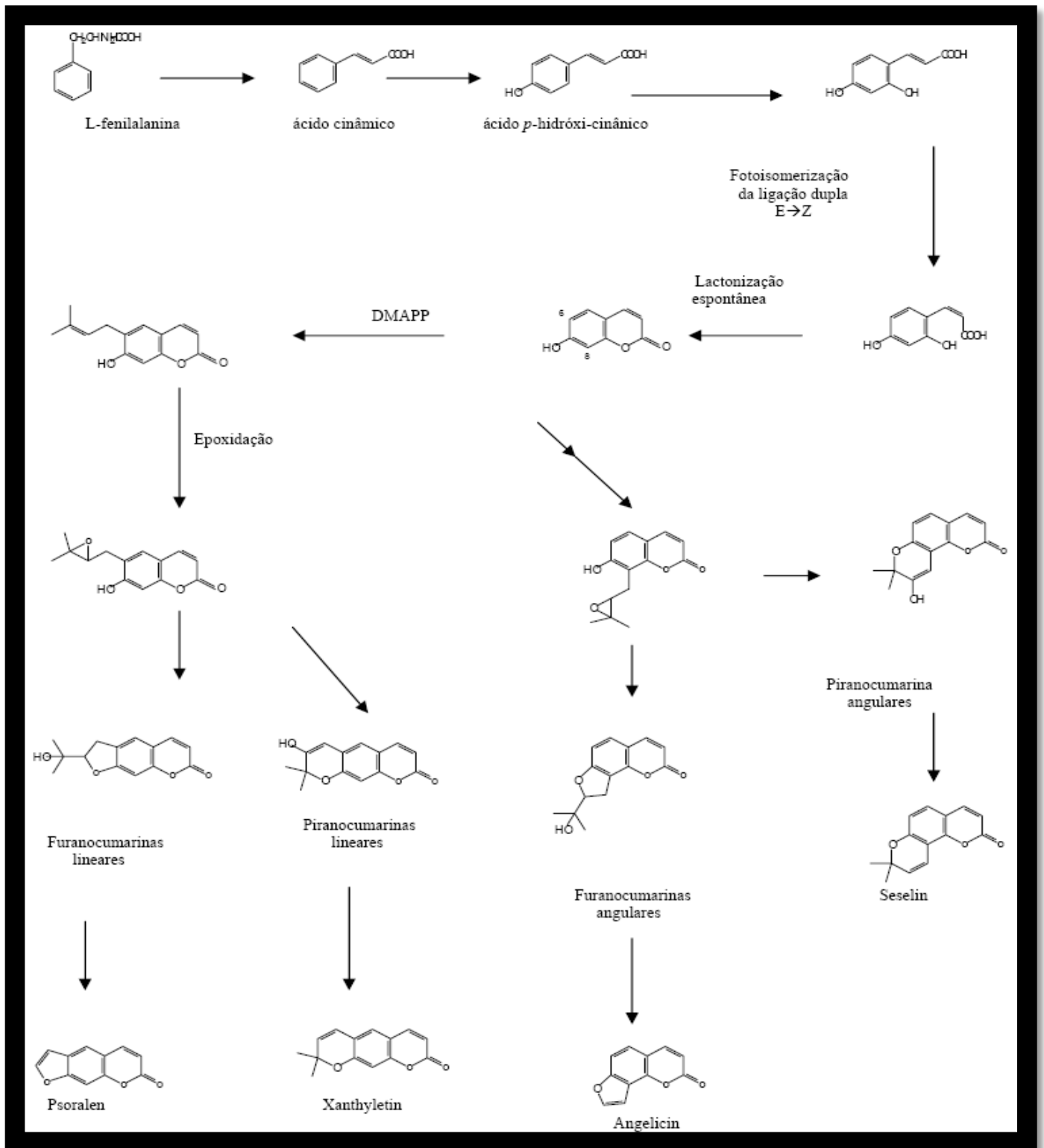


Figura 10. Origen biosintético de cumarinas y derivados. Muestra los pasos de la biosíntesis que dan lugar a una cumarina.

2.5 Técnicas de evaluación del efecto antineoplásico.

2.5.1 Cultivos celulares.

El cultivo de células es el proceso mediante el cual las células son aisladas de los tejidos con el fin de mantener poblaciones celulares mediante el mantenimiento y la multiplicación y el control *In Vitro* de estas, los cultivos pueden ser de diversos tipos de células ya sean [células procariotas](#), [eucariotas](#) o [vegetales](#). En la práctica el término "cultivo celular" se usa normalmente en referencia al cultivo de células aisladas de [eucariotas pluricelulares](#), especialmente [células animales](#) (Segretín, sin año).

Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, ya que permiten estudiar los procesos que ocurren en las células, y en la producción de moléculas de interés industrial, ingeniería de tejidos, etc.

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas, pueden vivir, multiplicarse e incluso presentar ciertas propiedades diferenciales si se las cultiva en placas de plástico y con medios de cultivo adecuados. Así, las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, para estudiar los efectos del agregado o remoción de moléculas específicas, como hormonas o factores de crecimiento etc. Para lograr el aumento del volumen celular estas se deben contener en algún medio que le proporcione los nutrientes necesario como son diversos aminoácidos; además de esto, se deben tener cuidados adicionales para evitar al máximo contaminación de los cultivos pues debido a la adición de suero fetal bobino (SFB) al medio que le proporciona nutrientes adicionales, es que diversos microorganismo pueden proliferar en los medios por la alta cantidad de nutrientes (Segretín).

A diferencia de las bacterias, la mayoría de las células que forman parte de tejidos no pueden vivir en suspensión, requieren una superficie sólida sobre la cual crecer y multiplicarse. Este soporte generalmente es la base de una placa o frasco de plástico, aunque a veces los requerimientos son más complejos y el plástico debe

antes recubrirse con componentes de la matriz extracelular (sustancia que rodea y contiene a las células en los tejidos, y con la cual interactúan), como por ejemplo el colágeno y la laminina.

Para aumentar el volumen celular se requiere de un cultivo primario que son aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios al multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una *monocapa* (capa de una célula de espesor). Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se les subcultiva a un recipiente con medio fresco por medio del rompimiento de la *monocapa* es decir del rompimiento de las uniones célula por medio de diversas enzimas proteolíticas (como tripsina y colagenasas) que degradan las proteínas de la matriz.; también se utilizan agentes (como el EDTA -ácido etilendiaminotetraacético) que secuestran al ión calcio, del cual depende la adherencia celular. De esta forma, y mediante una suave agitación, se obtiene una suspensión celular. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses (Segretín).

2.5.1.2 Células HeLa.

Las células HeLa son una línea celular donada por Henrietta Pleasant, ya casada Henrietta Lacks, apellido de su esposo Howard, a la cual se le diagnóstico cancer cervical fallecida por esta causa en 1951(Figura 11); mediante una biopsia enviada al Dr.George Gley, director del laboratorio de cultivo de tejidos del departamento de cirugía, quien estaba tratando de cultivar células tumorales sin éxito en sus ensayos. Sin embargo en esta ocasión las células sobrevivieron y en veinte horas se dividieron; en reconocimiento a la donadora a la línea celular se le reconoce como HeLa, esta nueva línea celular abrió el camino para la elaboración de la vacuna Salk. Las células HeLa siguieron reproduciéndose en cualquier

medio de cultivo siendo distribuidas a diversos laboratorios y empresas farmaceuticas convirtiendose rapidamente en uno de los medios más preciados para los estudios de cancer. Veinte años más tarde Nixon Richard firmo el National Cancer Act for the Conquest of cancer siendo ese momento el inicio de las contribuciones de esta linea celular, base de muchos de los descubrimientos en cancer y en genética, muchos de ellos asociados a premios nobel. Esta linea celular tiene como características principales un crecimiento agresivo y una alta resistencia a la poptosis, la cual se debe principalmente a una combinacion de papilomavirus 18 que produce una proteina que degrada p53 sin mutarla, y a varias alteraciones en los cromosomas 1,3,5 y 6 (Dosne 2006).

Los proyectos en cancer experimental se basan cada vez más en líneas celulares. Para el modelo *in vivo* de cultivos celulares, las observaciones en microscopia optica son de gran utilidad en la evaluacion de nuevos candidatos para el tratamiento antienoplasico ya que a través de estas observaciones se puede evaluar si dicho candidato tiene la capacidad de causar algun efecto en la morfologia celular (Roldan y Cols. 2006).

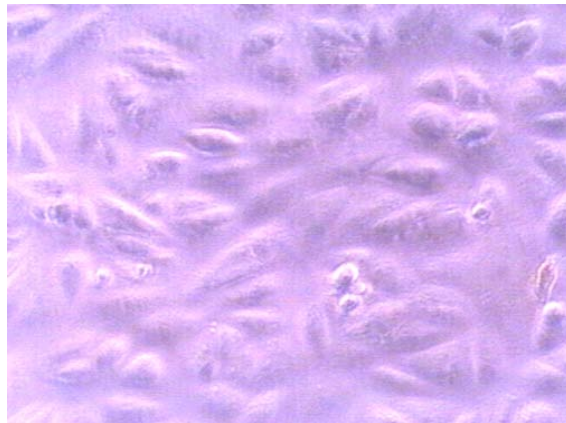


Figura 11. Células HeLa. La figura muestra el cultivo de células HeLa vistas en microscopio óptico a 40x.

2.5.2.3 Valoración de citotoxicidad *In Vitro*.

La valoración de la citotoxicidad *In Vitro* de las líneas celulares derivadas de tumores humanos se emplea como bioensayo preliminar para el tamizaje de productos de origen natural con potencial actividad anti-cancerígena. En este

proceso la valoración de la citotoxicidad sigue siendo válida y útil en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios, que los grupos de investigación básica utilizan ampliamente alrededor del mundo.

Para dar solidez a dichas valoraciones es necesario conocer su sensibilidad a agentes con acción citotóxica demostrada. Para la selección de productos con potencial anticancerígeno, el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos estableció en 1989 el tamizaje de las líneas celulares que llegan acumular más de 60, las cuales han sido utilizadas para evaluar una serie de agentes antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción, generando perfiles de sensibilidad frente a los cuales se puede comparar el perfil de nuevas sustancias en estudio, lo que permite plantear hipótesis sobre sus mecanismos de acción y sus blancos moleculares.

A lo largo de los años el modelo ha mostrado buena correlación entre el patrón de actividad de un compuesto y el panel de células y sus mecanismos de acción, generando información útil en el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos.

Desde 1999, el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos realiza y recomienda a otros laboratorios iniciar el tamizaje reduciendo el panel de líneas celulares altamente sensibles y sólo evaluar con el panel amplio, los productos que muestren actividad a este nivel (Jhoana y Cols., 2006).

2.5.2 Apoptosis por epifluorescencia en una cinética celular.

La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo fisiológico esencial en los organismos vivos, presente en la diferenciación celular durante el desarrollo y en el recambio celular tisular continuo en el ciclo vital. La muerte celular apoptótica tiene características morfológicas y bioquímicas específicas, como contracción citoplasmática, ondulación de la membrana, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN y otras más. Al final del proceso apoptótico toda la célula se disgrega en fragmentos envueltos en la membrana llamados

cuerpos apoptóticos, mismos que son rápidamente fagocitados por los macrófagos. La apoptosis se presenta en cuatro fases: de iniciación, efectora, de degradación y de limpieza; en todas ellas intervienen factores inhibidores, inductores, efectores y potenciadores de la regulación y desarrollo del proceso. De especial atención es la fase de iniciación, ya que es objeto de una regulación muy compleja y puede ser disparada por una amplia variedad de estímulos, pues no todas las células desencadenan apoptosis en respuesta al mismo estímulo (Hernández y Cols. 2006).

Una de las técnicas utilizada para el análisis de este proceso es el utilizar marcadores como el yoduro de propidio, el cual se intercala en el núcleo celular, este marcador al ser excitado a una longitud de onda de entre 45 nm y 55 nm como lo es la luz ultravioleta, dejando observar a través de un microscopio de epifluorecencia los cambios morfológicos que se presentan el núcleo y membrana celular.

2.5.3 Modelo murino de cepa BALB/C con tumor Ascítico de Ehrlich.

Los modelos murinos tienen la ventaja de ser animales de bajo costo, fácil cuidado y reproducción; presentan un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones. Comparte con el hombre el privilegio de ser de las especies de mamíferos mejor estudiadas desde el punto de vista genético. Existe una cantidad enorme de líneas genéticamente definidas, además de miles de mutaciones. Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales para generar quimeras, lo que permite la realización de mutaciones (Medina y Cols. 2008).

El estudio de los tumores malignos en animales experimentales para observar su comportamiento, cambios cromosómicos y su correlación histológica *In Vivo* pueden ser útiles para comprender algunos aspectos que pudieran tener aplicaciones clínicas (Michelli y Cols. 2007).

En cuanto a los modelos animales utilizados con el fin de probar tratamientos antineoplásicos estos se pueden dividir en dos grupos, de acuerdo al sitio anatómico de donde se deriva el tumor que se desea estudiar. En el modelo ortótopico, el tumor se genera en el tejido u órgano de donde deriva la malignidad a analizar (por ejemplo, implantación de hematoma en el hígado). En el modelo heterotópico el tumor se crea en un órgano diferente al sitio donde se genera el tumor en forma natural (por ejemplo la implantación subcutánea de tumores de diverso origen diferente a los cánceres que afectan la piel y el espacio dérmico). La elección del modelo se basa en la disponibilidad de tumores o líneas celulares y animales, y en la conveniencia del investigador (Eastham y Cols. 1996).

Los efectos del microambiente tumoral en el modelo preclínico puede afectar significativamente el valor pronostico de los estudios clínicos y estos efectos no tienen muchos estudios, entre los factores microambientales que afectan al actividad terapéutica están la arquitectura tisular, la respuesta local del tejido, el patrón de vascularización y la vigilancia inmunológica; el análisis realizado generalmente a un modelo murino con una inducción neoplásica se refiere a un estudios en su curva de crecimiento, análisis histopatológico, análisis de linfocitos citotóxicos y supervivencia (Rojas y Cols. 2000).

2.5.4 Histopatología por inclusión en parafina.

La histología es la [ciencia](#) que estudia todo lo referente a los [tejidos](#) orgánicos: su estructura microscópica, su desarrollo y sus funciones. La Histología se identifica a veces con lo que se ha llamado anatomía microscópica. Los tejidos y las células para examen microscópico se conservan por medio de una fijación cuidadosa que reduce las alteraciones de la morfología *In Vitro*. El procesamiento del tejido termina con su inclusión en un material que facilite su corte. La finalidad de la fijación del tejido es protegerlo del desarrollo bacteriano, evitar la autólisis, las distorsiones y retracciones, y preparar las diversas estructuras para posteriores tratamientos.

III. Propuesta.

Con base en lo anterior, en este trabajo hemos propuesto hacer un estudio antineoplásico *In Vitro* e *In Vivo* usando el producto comercial “ARCOMIG” con el fin de corroborar su actividad previamente sugerida.

IV. Justificación.

Las neoplasias afectan a una amplia parte de la población humana, en México existen datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica a través del Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos (SUIVE) y del Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones (SEED), que desde el siglo XX, la mortalidad y morbilidad han tenido un incremento causado por cáncer. Con base en lo anterior, el desarrollo de nuevos tratamiento de este padecimiento es prioridad para el Plan de Desarrollo 2007-2012 de la Secretaria de Salud. Considerando que existen diversos productos que se utilizan en la medicina popular como tratamientos alternativos de dicho padecimiento sin tener estudios científicos que validen las propiedades curativas o preventivas que les son atribuidas, ejemplo de estos, tenemos a ARCOMIG, un producto herbario que se utiliza en la medicina popular con resultados favorables. Sin embargo, este requiere de un estudio científico para analizar y con ello evaluar sus propiedades antineoplásicas, lo que permitiría incorporarlo como un tratamiento alternativo, integral, curativo y o preventivo, viable, eficaz y seguro.

V. Hipótesis de trabajo.

Si el producto herbario ARCOMIG tiene actividad antineoplásica se observará un efecto inhibitor del crecimiento celular, e inhibición de metástasis en el modelo murino, citotoxicidad e inducción de apoptosis en las células HeLa.

VI. Objetivo general.

Evaluar el efecto antineoplásico del producto herbario ARCOMIG realizando estudios del efecto citotóxico y apoptótico en un modelo *In Vitro* de cultivos de células HeLa así como el efecto antiangiogénico y la inhibición de metástasis en un modelo *In Vivo* murino de BALB/C, para proponerlo como un producto integral, curativo o preventivo en el tratamiento de neoplasias.

6.1 Objetivos específicos.

- a) Determinar a partir de una curva concentración-respuesta la IC_{50} para inocular con ARCOMIG los cultivos de células HeLa.
- b) Evaluar el efecto citotóxico de ARCOMIG sobre los cultivos de células HeLa a partir de observaciones en microscopia de fases.
- c) Evaluar el efecto apoptótico de los cultivos de células HeLa en una cinética celular empleado la técnica de epifluorescencia con yoduro de propidio.
- d) Usar un modelo murino de cepa BALB/C de cáncer por inoculación de tumor ascítico de Ehrlich.
- e) Realizar estudios histológico a los tumores provenientes del modelo murino para determinar si estos presentan angiogénesis y/o metástasis.

VII. Materiales y Métodos.

7.1 Mantenimiento y producción celular.

Se realizaron cultivos de células de cáncer cervico uterino HeLa manteniendo el stock en botellas de 25 ml (Figura 12) con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos/antimicótico (penicilina, estreptomina y gentamicina); al llegar las células a una confluencia del 80% al 100% se realizan pases celulares para aumentar el stock celular o son subcultivadas en microplacas de 96 pozos para realizar los experimentos.

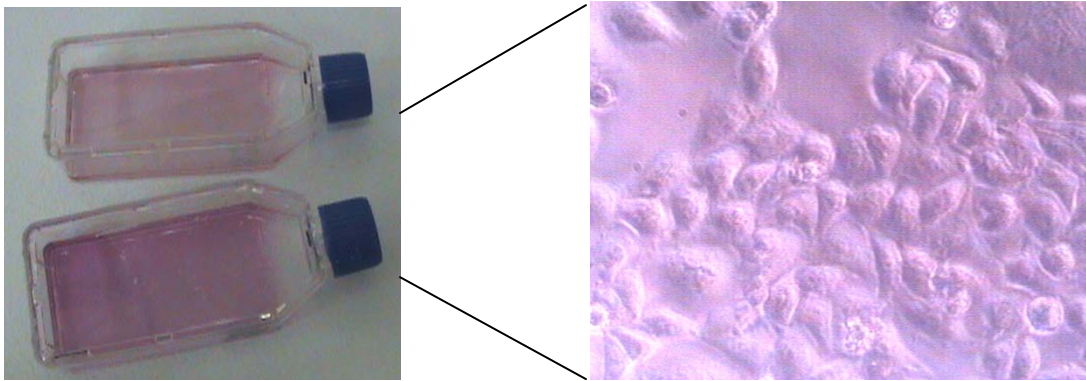


Figura 12. Cultivos de células HeLa. Se observan las células HeLa creciendo en las botellas de cultivo a una confluencia de 70%.

7.2 Curva concentración-respuesta (IC_{50}).

La IC_{50} se determinó en base a la viabilidad celular, para ello se sembraron microplacas de 96 pozos con 50,000 células cada pozo en medio DMEM al 2% de SFB mantenidas en un atmosfera húmeda con 5% de CO_2 a $37^{\circ}C$ (Figura 13). ARCOMIG fue inoculado en las células HeLa cultivadas en 6 microplacas de 96 pozos de las cuales 3 placas servirían para el análisis con el stock de ARCOMIG a un pH regulado de 7.5 y tres para el análisis con el stock del pH de ARCOMIG, el cual es de 3.5. En cada microplaca se realizaron diluciones seriadas de la fila 3 a la fila 8 es decir de la dilución 1:2 a 1:64, la fila 1 sirvió como control con células mantenidas con medio DMEM al 2% y las células de los pozos de la fila 2 fueron

inoculadas con ARCOMIG concentrado, previamente el producto fue filtrado con un filtro de 0.22 μm .

La densidad de la viabilidad celular después de 7 días de tratamiento se determinó en base a la técnica de azul tripano, cuantificando las células viables con una cámara Neubauer y con ello obtener un índice de viabilidad expresado en porcentaje sacando promedio para así obtener una gráfica de concentración-respuesta (IC_{50}).



Figura 13. Microplaca de 96 pozos con ensayos. La imagen muestra células cultivadas en microplaca de 96 pozos tratadas con diferentes concentraciones de ARCOMIG para determinar la IC_{50} .

7.3 Efecto citotóxico de cultivos celulares de HeLa.

Se montó el modelo *In Vitro* para evaluar la citotoxicidad realizando cultivos en microplacas de 24 pozos de la línea celular HeLa a las cuales se le agregó 1 ml de ARCOMIG con medio de mantenimiento al 2% en diluciones seriadas es decir el segundo pozo se llevara a una dilución de 1:2 ya que se le agregaron 100 μl del primer pozo, así que la concentración se reduciría a la mitad con respecto al pozo anterior y así subsecuentemente hasta llegara a una dilución de 1:8 en la fila 4 esto se realizó por triplicado. Todas las células fueron incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ con un atmosfera humeda de 5% de CO_2 realizando observaciones diarias en microscopio óptico de contraste de fases, tomando fotografías del efecto observado.

7.4 Efecto apoptótico de células HeLa en un cinética celular empleado la técnica de epifluorescencia con yoduro de propidio.

Una vez determinada la IC₅₀ se procedió a sembrar las células HeLa en microplacas de 8 pozos con cubreobjetos siendo inoculadas con ARCOMIG diluido 1:4 en medio DMED suplementado con 2% de suero fetal bovino un pH 7.5 con un tratamiento de duración de 4 días.

Las células se fijaron cada 12 h con alcohol etílico al 70% a una temperatura de -20°C, teniendo todas las muestras fijadas se procedió a agregar yoduro de propidio marca SIGMA diluido 1 mg por mL de solución PBS incubándolas durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Posteriormente las células se lavaron con PBS y observaron con la ayuda de un microscopio de fluorescencia utilizando un filtro de 540 nm y luz UV para así tomar fotos de lo observado.

7.5 Modelo murino.

Para el modelo *In Vivo* se formaron seis grupos de ratones de cepa BALB/C singénicos de 2 semanas de edad aproximadamente con un peso de entre 15 g y 20 g hembras cada grupo con una n=10 ratones. El modelo se conformo por los siguientes grupos; I control con cáncer (cáncer sin tratamiento), II tratamiento como estimulante del sistema inmunitario (sin cáncer y con tratamiento con ARCOMIG), III tratamiento como anticanceroso o curativo (se deja crecer el tumor 15 días y posteriormente se les da tratamiento), IV tratamiento como anticancerígeno o preventivo (se le da 20 días tratamiento y posteriormente se le inoculan las células tumorales) y V control de individuos sanos (sin cáncer y sin tratamiento, con una dieta normal), VI tratamiento como inhibitorio (el mismo día que se inocularon las células tumorales se inicia tratamiento) (Tabla 1). Los grupos con cáncer se estandarizaron a través de la inoculación de 50 µL de células de tumor ascítico de Ehrlich equivalente a 40 000 000 células tumorales por individuo, estas se inocularon en la parte interna del muslo derecho, los ratones se pesaban cada tercer día de igual forma se medía la longitud del tumor.

ARCOMIG fue suministrado en el bebedero, previamente diluido 30 mL de ARCOMIG en 90 mL de agua (dilución 1:4) teniendo la aceptación de los ratones (Figura 14).

Tabla 1. Grupos del modelo murino. Se muestran las características que conformaban cada grupo experimental.

Grupo I	Inducción de mioma. Sin tratamiento con ARCOMIG	Grupo control para observar el comportamiento natural de la enfermedad.
Grupo II	Sin mioma con tratamiento con ARCOMIG	Grupo donde se estudia el efecto sobre el estímulo del sistema inmunitario de ARCOMIG sobre un sujeto sano.
Grupo III	Inducción de mioma con Tratamiento con ARCOMIG (Figura 7.)	Grupo donde se analiza el efecto anticanceroso o curativo de ARCOMIG sobre individuos con miomas avanzados.
Grupo IV	20 días de Tratamiento con ARCOMIG y una posterior inducción de mioma	Grupo donde se estudia el efecto de ARCOMIG como un producto preventivo es decir anticancerígeno.
Grupo V	Dieta Normal (grupo control)	Grupo que nos sirve como punto de comparación ya que es un grupo sano sin sometimiento a ningún tratamiento ni cáncer.
Grupo VI	Inducción de mioma y Tratamiento con ARCOMIG iniciados en los mismo tiempos.	Grupo en el que se estudiara la efectividad de ARCOMIG como inhibitorio de proliferación de células neoplásicas.



Figura 14. Administración de ARCOMIG en el modelo murino. Se observa que los ratones consumen ARCOMIG directamente del bebedero.

Después de la inoculación se les tomaba peso y longitud del tumor a todos los grupos cada tercer día, para conocer el desarrollo de cada grupo (Figura 15).



Figura 15. Modo de inoculación, toma de peso, longitud y desarrollo de Tumor. Se observa el procedimiento llevado en los grupos después de la inoculación de las células tumorales así como la evolución tumoral del grupo que no fue sometido a tratamiento.

7.5.1 Análisis Histológico de los tumores del modelo murino.

Después de que los grupos terminaron su periodo de experimentación, los animales son sacrificados, obteniendo los tumores, en su caso, los cuales se fijaron en una solución de formol al 10% para su posterior análisis histológico. Lo anterior se realiza en dos fases: la primera es el proceso de deshidratación gradual que se logra al pasar la muestra fijada en formol a la deshidratación con alcohol a diferentes grados hasta llegar al absoluto; la segunda etapa es el aclaramiento, que se realiza con xilol, después que el tejido se deshidrata con alcohol se pasa a través de xilol en cambios sucesivos, hasta sustituir el alcohol por xilol. El tejido penetrado por xilol, se pasa varias veces por parafina caliente que se disuelve fácilmente en el xilol. La parafina llena los espacios antes

ocupados por el agua y al endurecerse, hace que el tejido esté listo para el corte. Se utiliza el histoquinette para realizar estos cambios (Cortéz y Cols. 2009).

Posteriormente se realizaron cortes de los tumores obtenidos sometiéndolos a una inclusión en parafina (Figura 16) la cual al solidificarse permite la realización de cortes de $0.5 \mu\text{m}$ para permitir el paso de luz, mismos que después de ser fijados en una laminilla de vidrio se sometieron a un proceso de tinción con Hematoxilina vs eosina, para su posterior análisis por el histopatólogo.

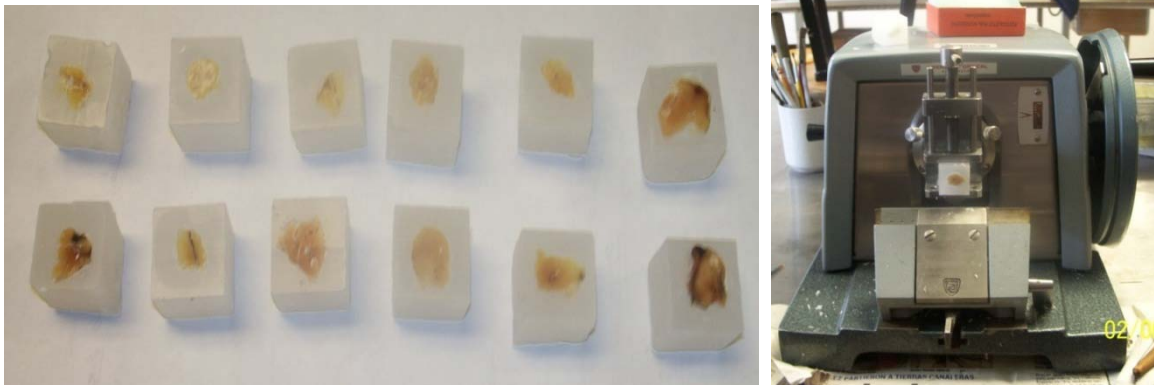


Figura 16. Tumores en parafina y microtomo. Se observan los cortes del muslo de los ratones incluidos en cubos de parafina para el análisis histológico y el micrótopo, aparato para realizar los cortes de estos cubos (Cortéz y Cols. 2009).

VIII. Resultados.

8.1 Curva dosis respuesta (IC₅₀).

Los resultados obtenidos de la curva concentración respuesta arrojan que la dilución 1:4 (grafico 1 y 2.) es la concentración que tiene un efecto inhibitorio de las células a un 50%. Los datos de viabilidad obtenidos por el conteo de la técnica con azul tripano se muestran en la tabla 2 y 4 respectivamente.

Sin embargo el análisis estadístico con ANOVA no refleja diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad celular de los tratamientos con las diversas diluciones (Tabla 3 y 5).

Tabla 2. Viabilidad celular después del tratamiento con ARCOMIG a un pH de 3.5 después de 7 días.

	pH 3.5		
	Suma	media	log de la media
control	260000	23636.36	4.37
1:2	80000	7272.73	3.86
1:4	140007	12727.91	4.10
1:8	160000	14545.45	4.16
1:16	230000	20909.09	4.32
1:32	190000	17272.73	4.24
1:64	40000	3636.36	3.56
Conocen.	70000	6363.64	3.80

Media del
log de la
media

4.05

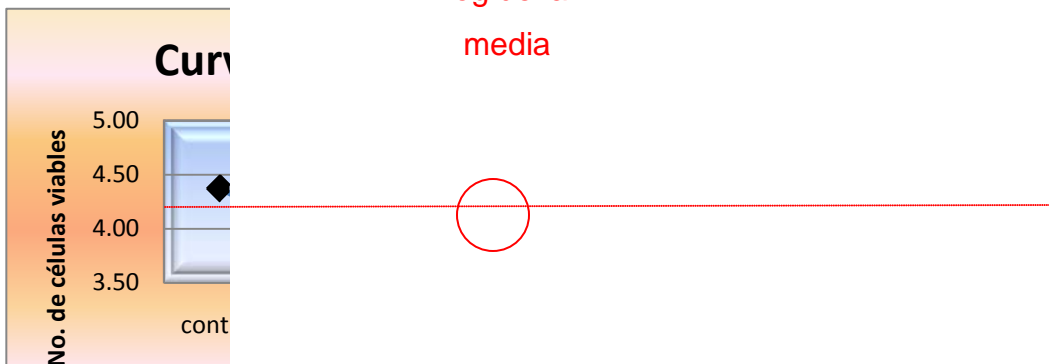


Gráfico 1. En la grafica se muestra que el 50% de concentración inhibitoria de ARCOMIG (la IC₅₀) cae en la dilución 1:4 marcada con el círculo en rojo siendo esta la concentración.

Tabla 3. ANOVA. Análisis de varianza realizado a las células viables tratadas a diversas diluciones a un pH de 3.5 después de 7 días de tratamiento

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3962492049	7	566070293	3.7795847	0.00136753	2.12632428
Dentro de los grupos	1.1982E+10	80	149770501			Significancia
Total	1.5944E+10	87				

Dado que el valor de la F (0.05) calculada es mayor que el valor de mi F crítica se puede sugerir que hay diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las células tratadas con las diferentes concentraciones de ARCOMIG a un pH de 7.5.

Tabla 4. Viabilidad celular después del tratamiento con ARCOMIG a pH 7.5. Número de células viables tratadas a diversas diluciones a un pH de 7.5 después de 7 días de tratamiento.

	suma	media	log de la media
Control	100000	9090.91	3.96
1:2	90000	8181.82	3.91
1:4	140000	12727.27	4.10
1:8	50000	4545.45	3.66
1:16	310000	28181.82	4.45
1:32	410000	37272.73	4.57
1:64	310000	28181.82	4.45
Concen.	90000	8181.82	3.91
		Media del logaritmo de las medias	4.13

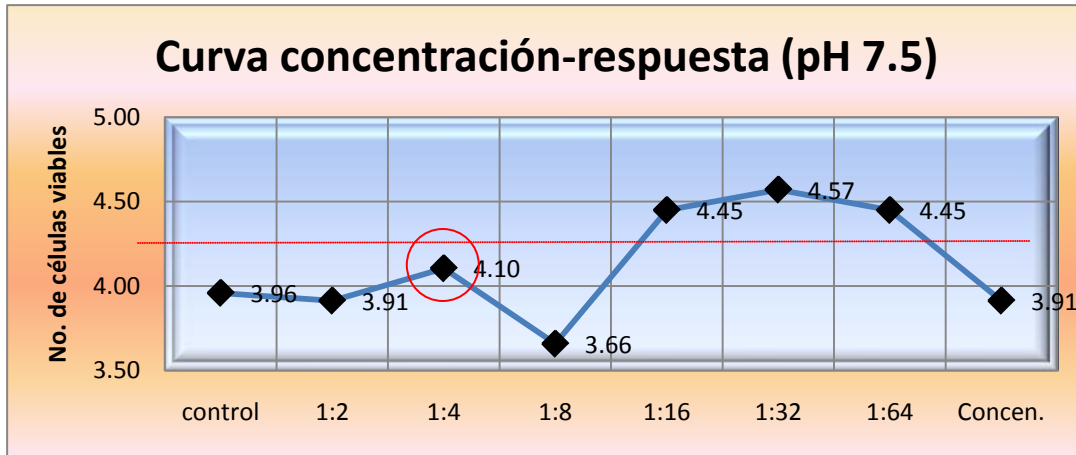


Grafico 2. Viabilidad celular. La figura muestra la tendencia de la viabilidad de las células tratadas con ARCOMIG a diferentes concentraciones a un pH de 7.5.

Tabla 5. ANOVA. Análisis de varianza realizado a las células viables tratadas a diversas diluciones a un pH de 7.5 después de 7 días de tratamiento.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.1577E+10	7	16538961	7.8	3.2339E-07	2.12632428
Dentro de los grupos	1.6855E+10	80	210681818			
Total	2.8432E+10	87				

Dado que el valor de la F (0.05) calculada es mayor que el valor de mi F crítica se puede sugerir que hay diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las células tratadas con las diferentes concentraciones de ARCOMIG a un pH de 7.5.

8.2 Efecto citotóxico de las células tratadas a diferentes diluciones.

Las observaciones diarias de las células tratadas con ARCOMIG en microscopia óptica de contraste de fases muestran mayor efecto citotóxico en las células tratadas en las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 con ARCOMIG a un pH regulado de 7.5 (Figura 17 B), ya que las células tratadas con ARCOMIG a un pH de 3.5 muestra un efecto citotóxico un poco menos evidente (Figura 18 B), el efecto más evidente

se observo en el cuarto día de tratamiento, después de esta etapa las células control empezaron a decaer con mayor rapidez.

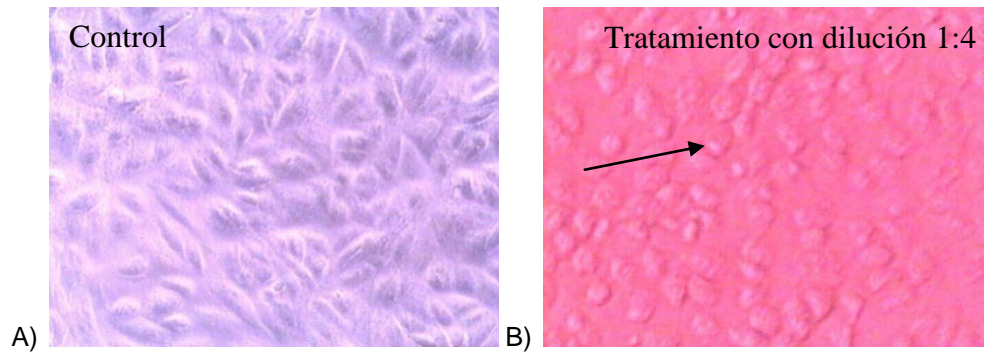


Figura 17. Células HeLa control y sometidas a tratamiento con ARCOMIG a pH 3.5. La figura A) muestra los cultivos de células HeLa sin tratamiento; Se puede la buena viabilidad de las células tumorales de cervix en buenas condiciones, la figura B) Muestra las células tumorales tratadas con ARCOMIG a un pH de 7.5, con una disminución en el número de ellas pero sobresale el arredondamiento de todas ellas.

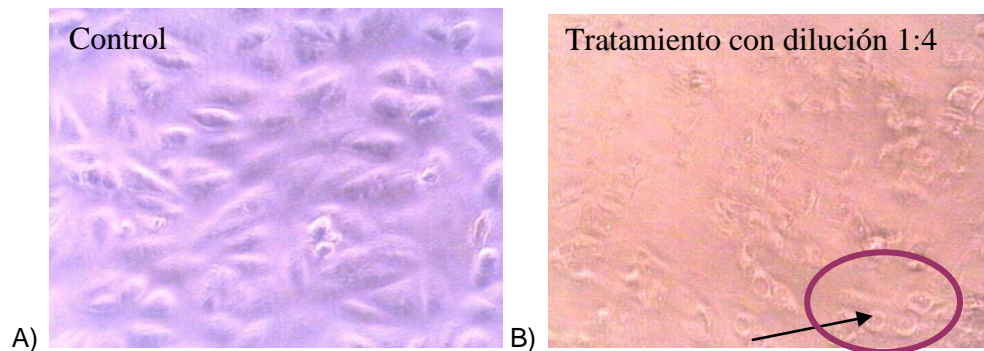


Figura 18. Células HeLa control y sometidas a tratamiento con ARCOMUG a pH 3.5. La figura A) muestra los cultivos de células HeLa sin tratamiento; Se puede observar el gran número de las células tumorales de cervix en buenas condiciones, la figura B) Muestra las células tumorales tratadas con ARCOMUG a un pH de 3.5, con una disminución en el número de ellas, y en el círculo se muestra células con cambios morfológicos.

8.3 Cinética celular con epifluorescencia.

Se realizó la cinética celular tomando la curva concentración-respuesta como referencia para el tratamiento así como las observaciones en microscopia de contraste de fases por tal las células fueron tratadas con ARCOMIG a un pH regulado de 7.5 a una concentración 1:4.

Se observan cambios morfológicos más evidentes con el tratamiento a partir de las 24 h (Figura 22) observando retracción de las células y por tal pérdida de contacto célula-célula, empezando a ver una deformación celular a las 36 horas (Figura 23) así como una fragmentación nuclear acentuándose esto a las 48 horas de tratamiento (Figura 24) y observando vesículas eliminadas al medio extracelular a las 48, 60 y 72 (Figura 24,25 y 26) horas que en contraponiéndose con los controles iniciales y finales muestran células integra en su morfología (Figura 20 y 27).

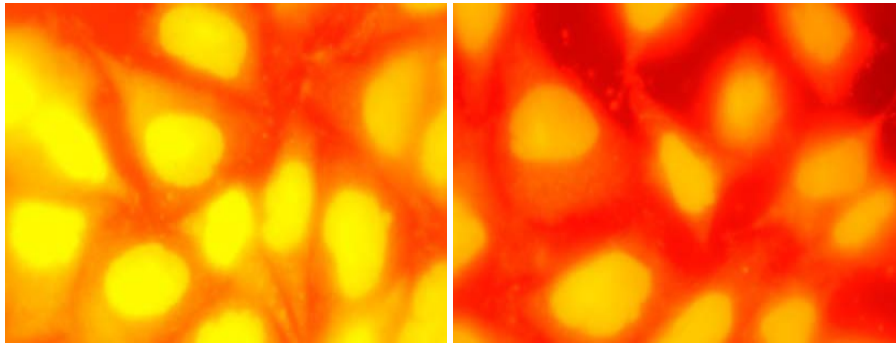


Figura 20. Células control con epifluorescencia con yoduro de propidio. Se observan un grupo de células HeLa fijadas y tratadas con yoduro de propidio al tiempo cero las cuales muestran un núcleo y citoesqueleto íntegro.

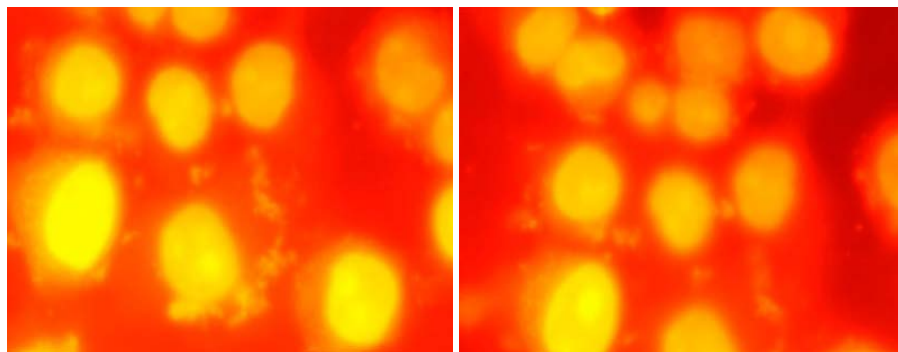


Figura 21. Células HeLa con epifluorecencia con yoduro de propidio con un tratamiento con ARCOMIG de 12 h. En la figura se observan daños en el citoesqueleto de las células sin embargo el núcleo continua integro.

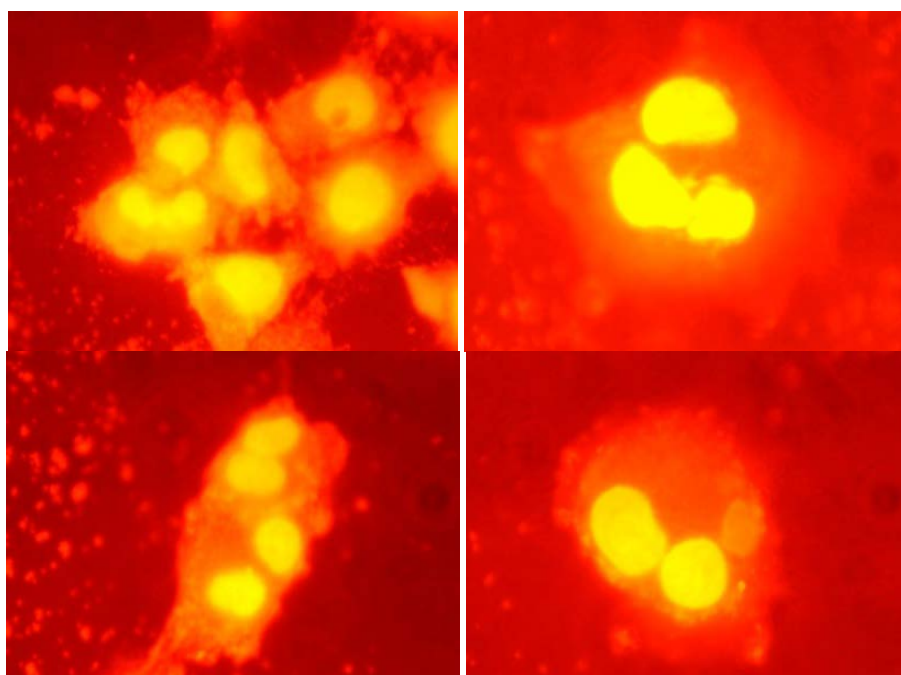


Figura 22. Células HeLa con epifluorecencia con yoduro de propidio con un tratamiento con ARCOMIG de 24 h. Se observan daños más evidentes en el citoesqueleto de las células y en algunas se muestran indicios de núcleo fragmentado.

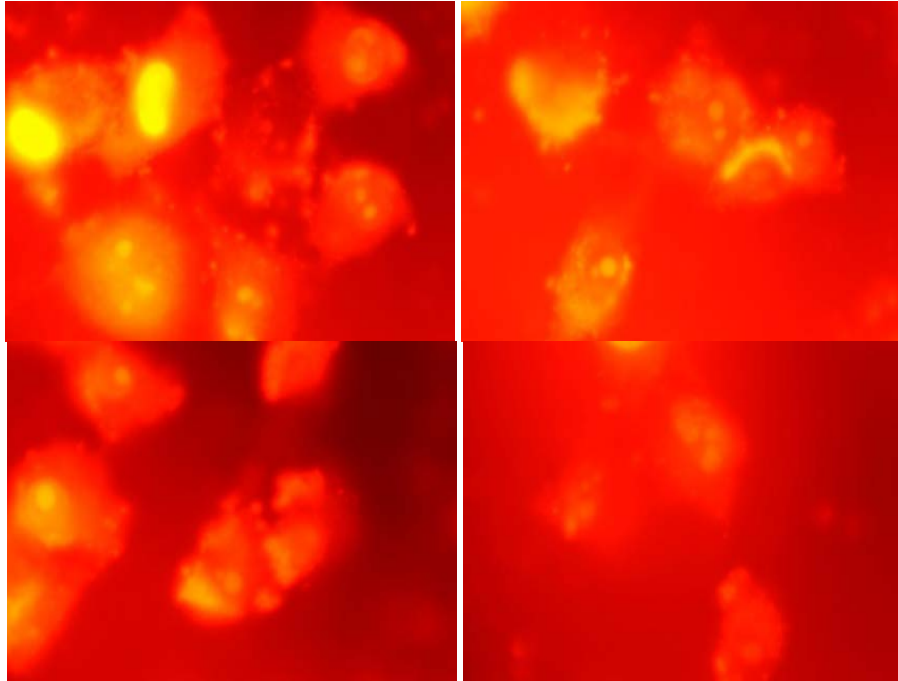


Figura 23. Células HeLa con epifluorecencia con yoduro de propidio a un tratamiento con ARCOMIG de 36 h. La figura muestra el núcleo fragmentado en la mayoría de las células.

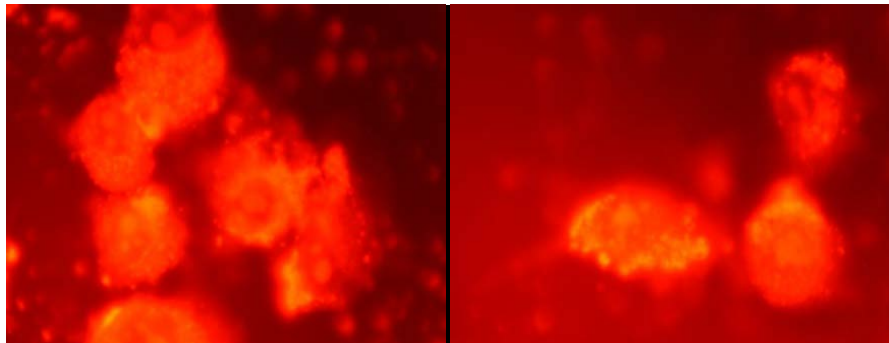


Figura 24. Células HeLa con epifluorecencia con yoduro de propidio a un tratamiento con ARCOMIG de 48 h. En la figura se puede observar células con el núcleo y el citoesqueleto fragmentado.

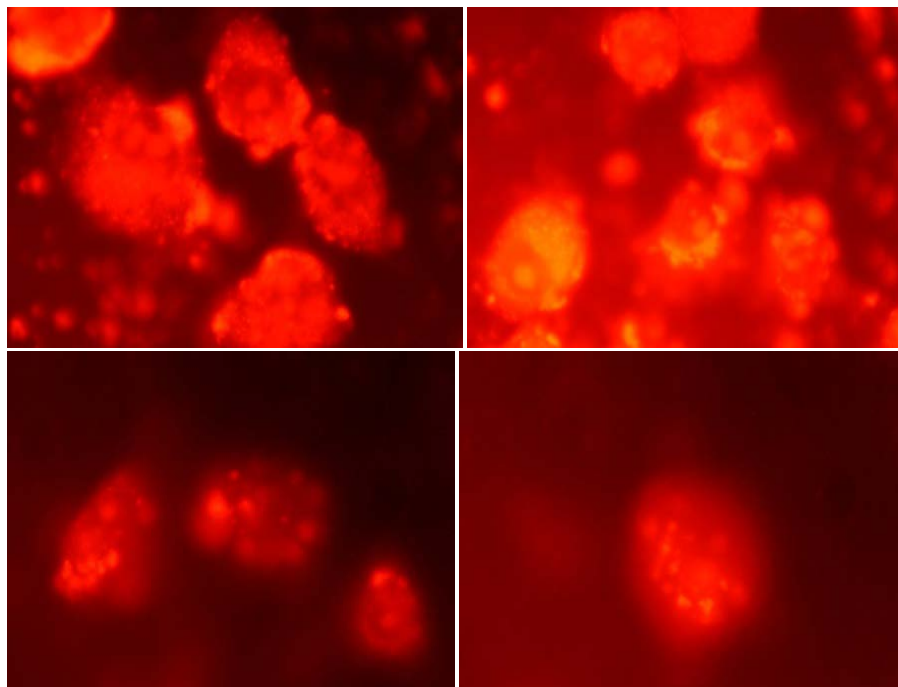
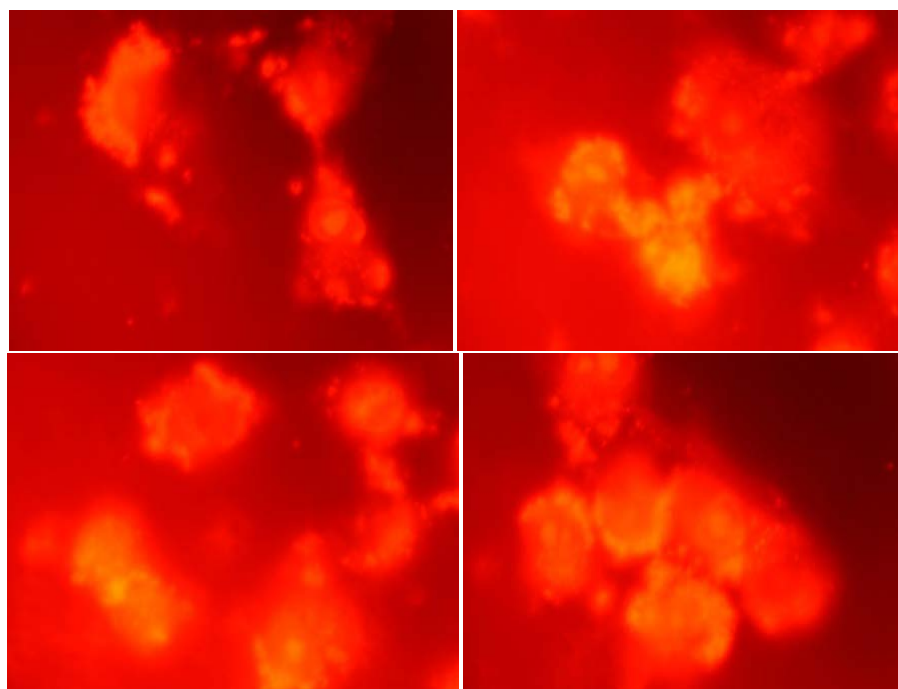


Figura 25. Células HeLa con epifluorescencia con yoduro de propidio a un tratamiento con ARCOMIG de 60 h. En la figura se puede observar células con el núcleo y el citoesqueleto fragmentado.



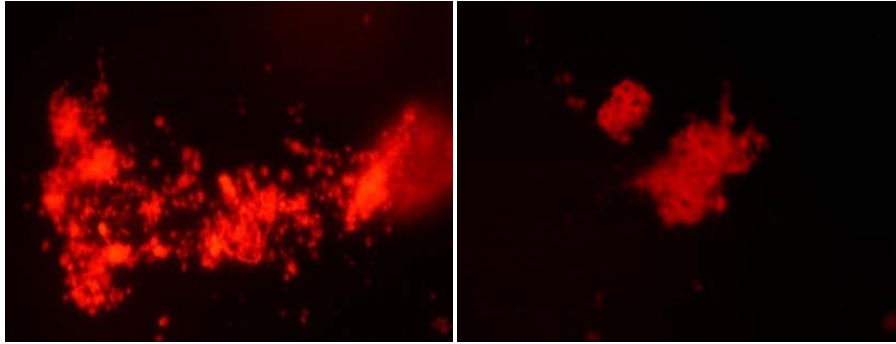


Figura 26. Células HeLa con un tratamiento con ARCOMIG de 72 h. En la figura se puede observar células con el núcleo y el citoesqueleto fragmentado.

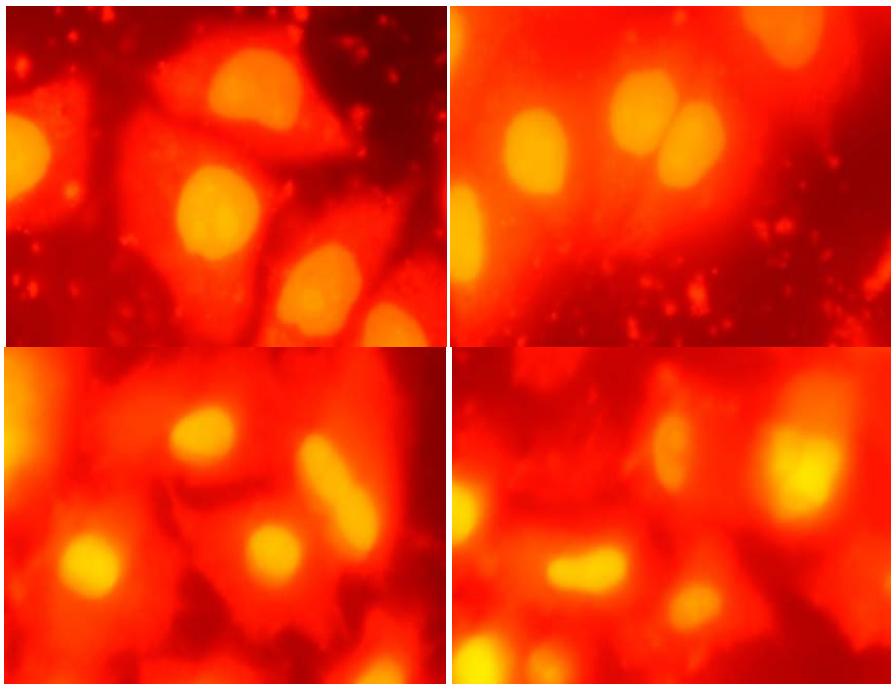


Figura 27. Células HeLa sin tratamiento con ARCOMIG a los 72 h. Se observan un grupo de células HeLa fijadas al tiempo cero las cuales muestran un núcleo íntegro.

8.4 Modelo murino de cepa BALB/C con neoplasia por tumor ascítico de Ehrlich.

Se logro estandarizar la técnica de inoculación de células de tumor ascítico de Ehrlich en cepas BALB/c de forma intramuscular (Figura 28) ya que generalmente el tumor se crecía intraperitoneo, se inocularon 40 000 000 de células por sujeto equivalentes a 50 μ L de células en suspensión, después de trasplantar el tumor en tres ocasiones para que las células se encontraran optimas condiciones (Figura 29).

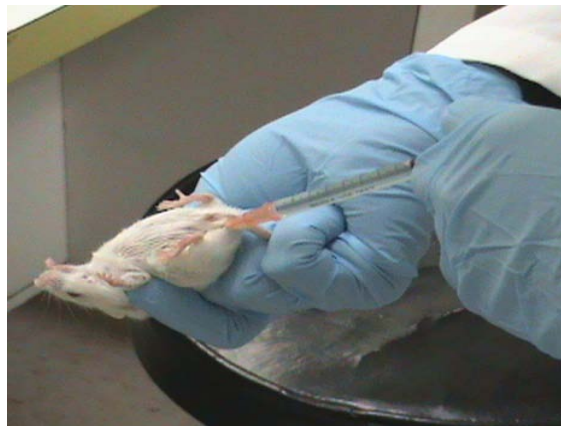


Figura 28. Inoculación de células tumorales. La figura muestra la inoculación de las células tumorales Erlich intraperitoneo en los ratones cepa BALB/C.



Figura 29. Ratón con sarcoma. Se observa el éxito de la inducción tumoral con células Ehrlich por vía intramuscular, el círculo muestra un tumor duro en el muslo del ratón.

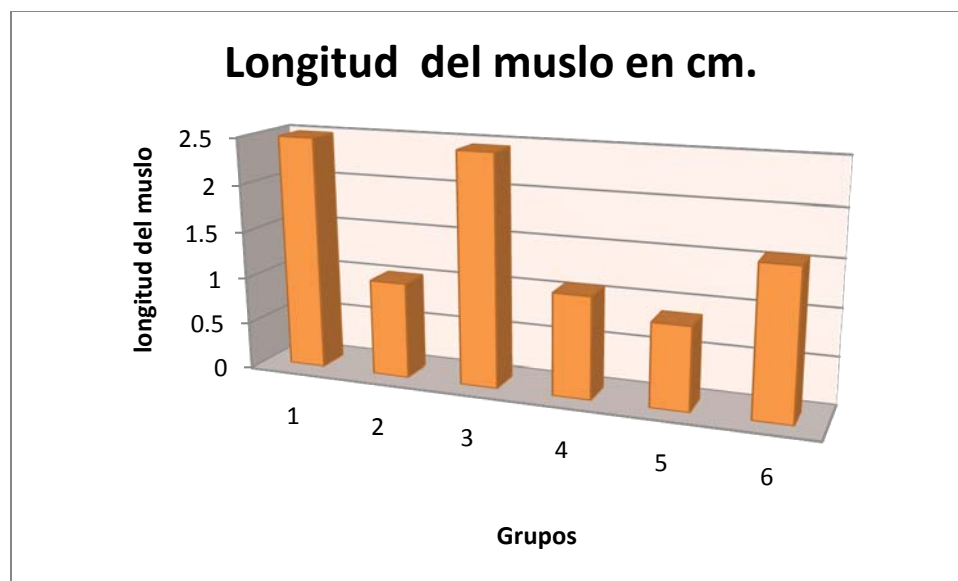
A nivel macroscópico se observo que el grupo I y el grupo III sujeto a tratamiento después de 15 días de crecimiento del sarcoma, no tuvo mejoría notoria ya que murieron en un tiempo de 10 días iniciado el tratamiento al igual que el grupo I en

el cual se dejó un avance natural de la enfermedad en divergencia del grupo IV y VI el cual no mostro crecimiento de las células tumorales inoculadas mostrando buena salud (Figura 30).

En cuanto a las medidas realizadas de peso, longitud del tumor (Tabla 6 y 7; Grafica 3 y 4) se observo que en los ratones con tratamiento el tumor era de menor tamaño y peso correspondientes al grupo IV y VI en comparación con los del grupo I y III que evidentemente tienen una longitud y peso mayor.

Tabla 6. Longitud del muslo en cm. La tabla muestra las longitudes en centímetros del muslo obtenidas en los diferentes grupos del modelo murino.

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
2	1.3	2.5	1.4	0.8	1.1
2.4	0.7	2.6	1.1	0.9	1.7
2.7	1	2.7	1.1	0.8	2.7
2	1	2	1	0.9	1.1
2.8	1.1	3	1.3	1	1.4
2.4	1.2	3	0.9	0.9	1.6
2.5	0.9	2.3	0.9	0.7	1.4
2.6	0.8	2	1	1.1	1.4
2.8	1.2	2	1.1	0.8	1.5
2.7	1	2.4	1	0.9	1.8



Grafica 3. Longitud del muslo en cm. La grafica muestra que los grupos I y III tienen la mayor longitud

Tabla 7. Peso del muslo en mg. La tabla muestra las longitudes del muslo obtenidas en los diferentes grupos del modelo murino.
Peso del muslo

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
5.1	0.23	2.04	0.58	0.13	1.93
4.1	0.53	2.08	0.6	0.13	1.4
3.07	0.2	1.47	0.611	0.12	1.37
3.03	0.34	1.61	0.93	0.15	1.97
3.66	0.3	1.53	0.54	0.14	1.36
7.04	0.25	2.69	0.67	0.11	1.46
3.23	0.58	2.5	0.64	0.13	1.39
3.55	0.23	3.25	0.53	0.18	1
6.05	0.76	5.02	0.78	0.12	1.7
8.2	0.47	3.02	0.48	0.12	1.2



Grafica 4. Se observa que los grupos I y III presentan los pesos más elevados.

8.5 Análisis Histopatológico de los tumores obtenidos del modelo murino.

Se obtuvieron 60 cortes histológicos a partir de los tumores de los grupos del modelo murino los cuales presentan diferencias entre ellos (Figura 29).

A nivel macroscópico se observa que los miomas obtenidos de los grupos I y III muestran mayor tamaño, sin embargo es importante resaltar que el grupo I tiene vascularizaciones propias de la masa tumoral a diferencia del grupo III que no muestra estas vascularizaciones (Figura 8 Tabla 8).

Por otro lado también observamos que en los grupos IV y VI se inhibió el crecimiento de la masa tumoral.

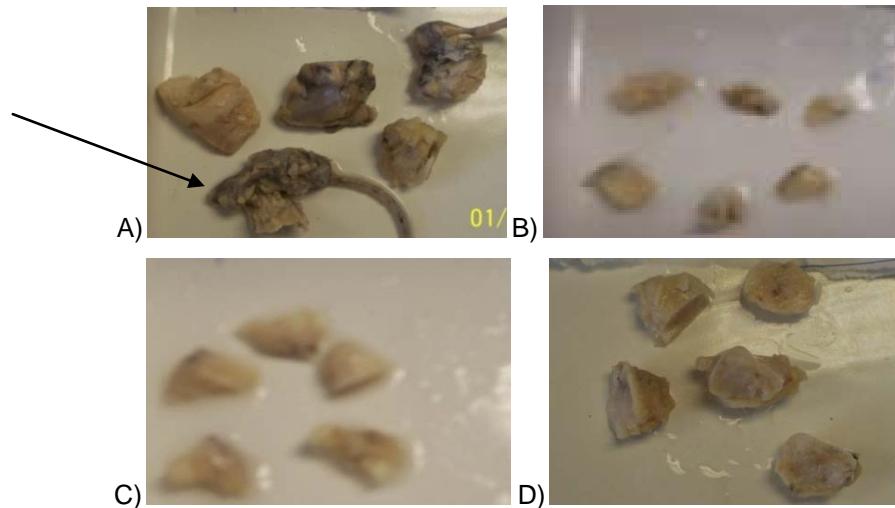


Figura 30. Tumores fijados en formol al 10%. La figura A) muestra los tumores obtenidos del grupo I (la flecha indica las vascularizaciones), la figura B) muestra los tumores del grupo II al cual no se le indujo cancer, la figura C) muestra los miomas obtenidos del grupo IV y VI en donde ARCOMIG, en la figura D) observamos que los miomas del grupo III.

En cuanto el análisis histopatológico a nivel microscópico de los miomas se obtuvo que el grupo I tiene presencia de amilogénesis (formación de venas) o vascularizaciones (arterias con eritrocitos y plaquetas), metástasis (invasión de otros órganos como riñón e intestinos) (Figura 32) y transformaciones de la células en cuanto a forma, tamaño y núcleo celular así como un proceso de lisis y necrosis celular avanzado mostrando un tejido amorfo (Figura 31).

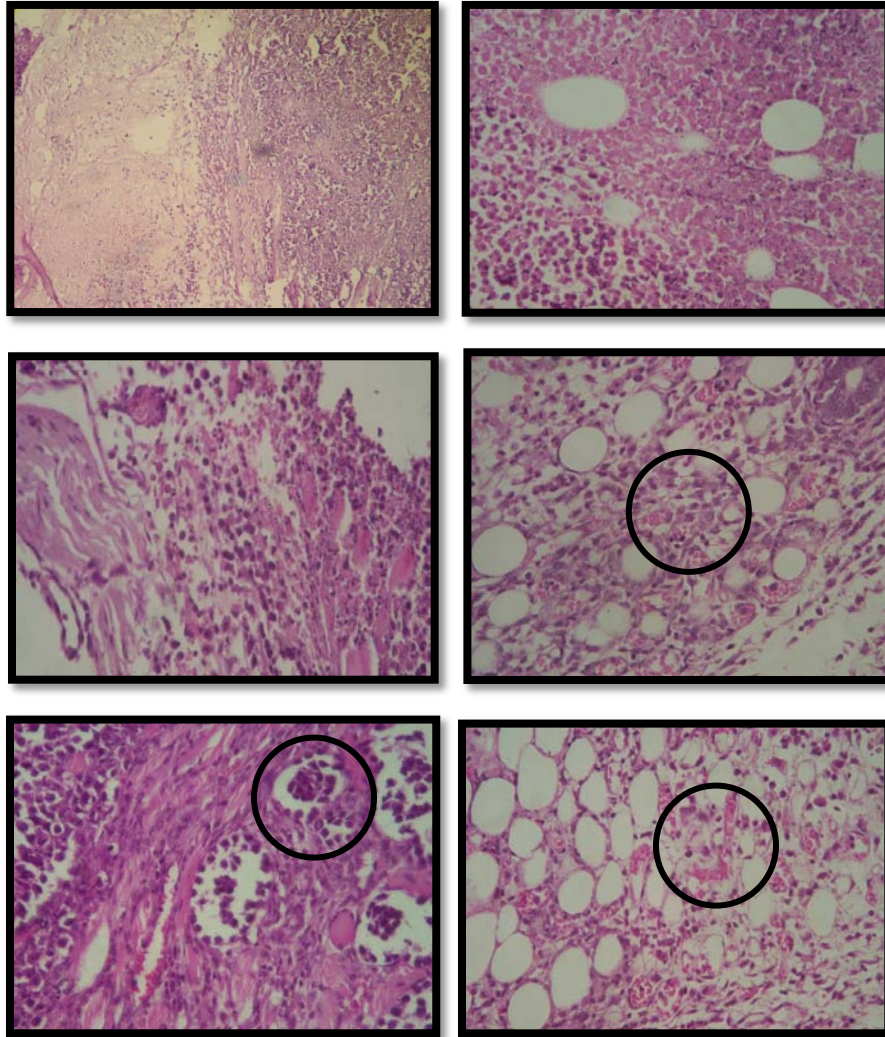


Figura 31. Laminillas de los cortes histológicos del grupo I. En la figura se observa la presencia de zonas necróticas, con presencia de células citoplasmáticas cancerosas invadiendo todo el tejido con lisis celular y por tal un tejido amorfo, los círculos muestran presencia de vascularizaciones.

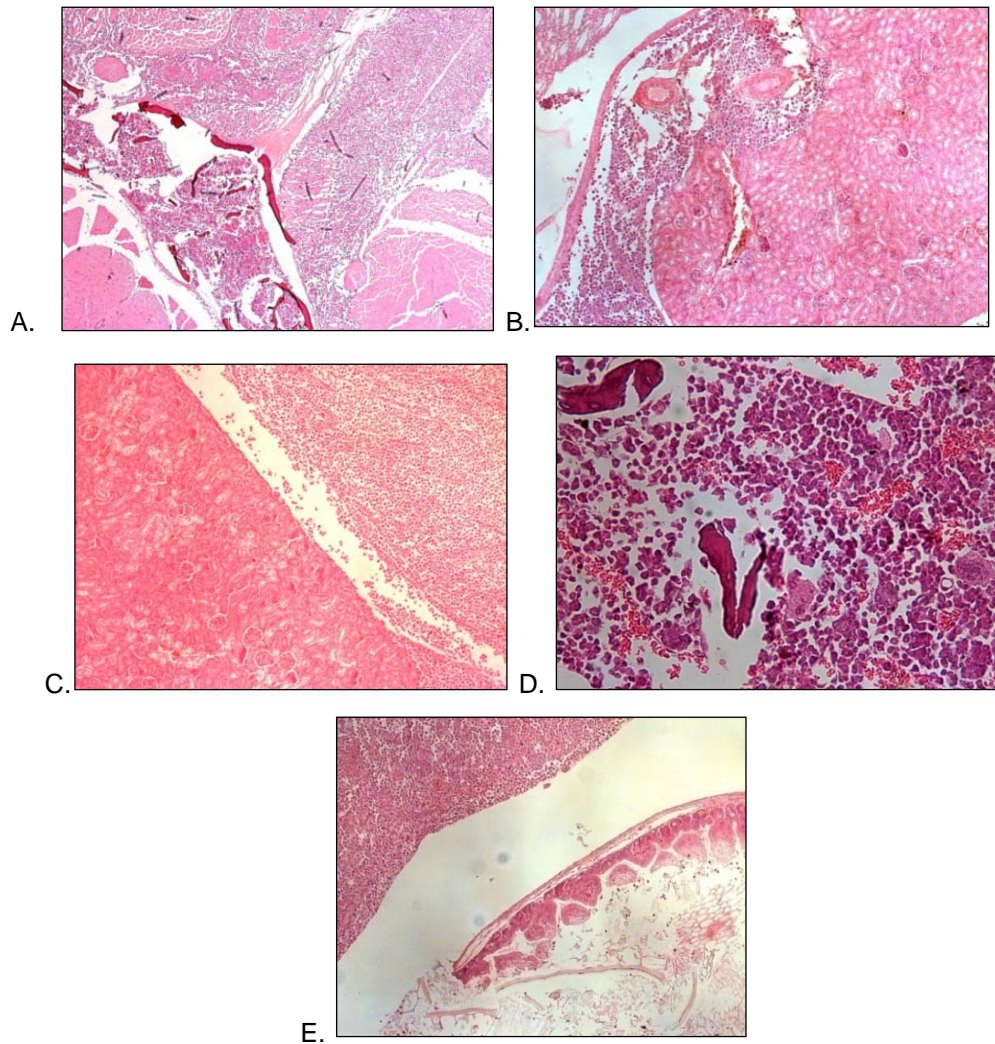
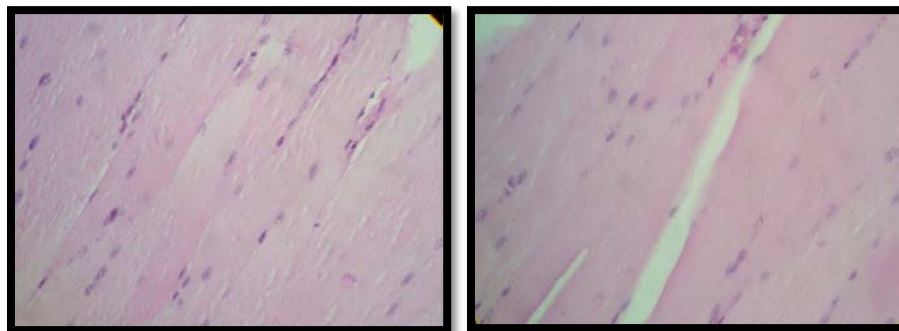


Figura 32. Laminillas que muestran un proceso de metástasis en el grupo I. La figura A, B y C, muestra pulmón invadido por células tumorales, la figura E. muestra intestino invadido por las células tumorales.

Los resultados del análisis histológico de los grupos II y V muestran células perfectamente agrupadas formando las fibras del tejido muscular liso (Figura 33).



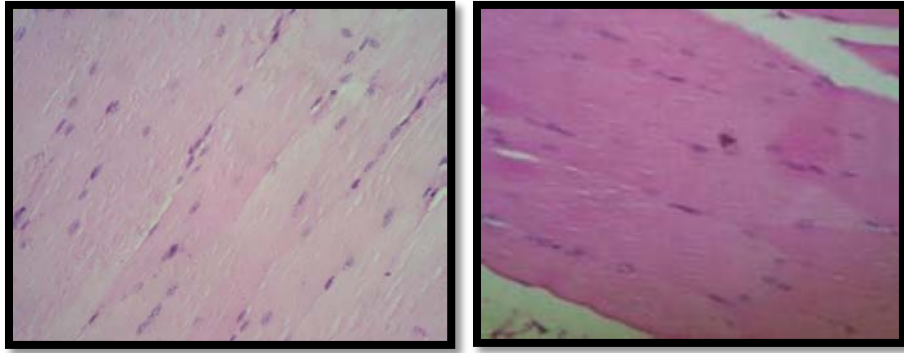


Figura 33. Laminillas del los grupos II y V.En todas las figuras se puede observar tejido sano, con células formando fibras musculares.

En cuanto a los resultados del análisis histológico realizado a los sujetos del grupo IV (Figura 34.) se observan células tumorales limitadas que no continuaron con la invasión ya que se observa un mayor porcentaje de tejido sano con células que forman fibrillas y poca invasión de las células neoplásicas.

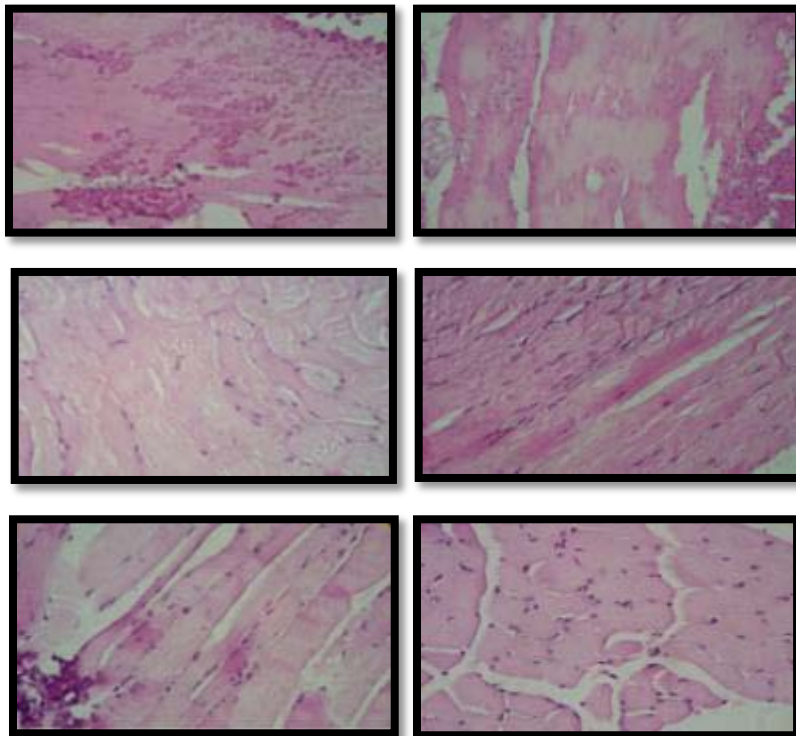


Figura 34. Laminillas del grupo IV. En la figura se puede observar la gran cantidad de tejido sano con poca presencia de células tumorales en los miomas obtenidos de los animales que fueron sometidos un tratamiento con ARCOMIG.

Los resultados del análisis histopatológico obtenido del grupo III muestran que aunque hay una invasión muy amplia, se pueden observar espacios con tejido no invadido y no fueron observadas vascularizaciones (Figura 35).

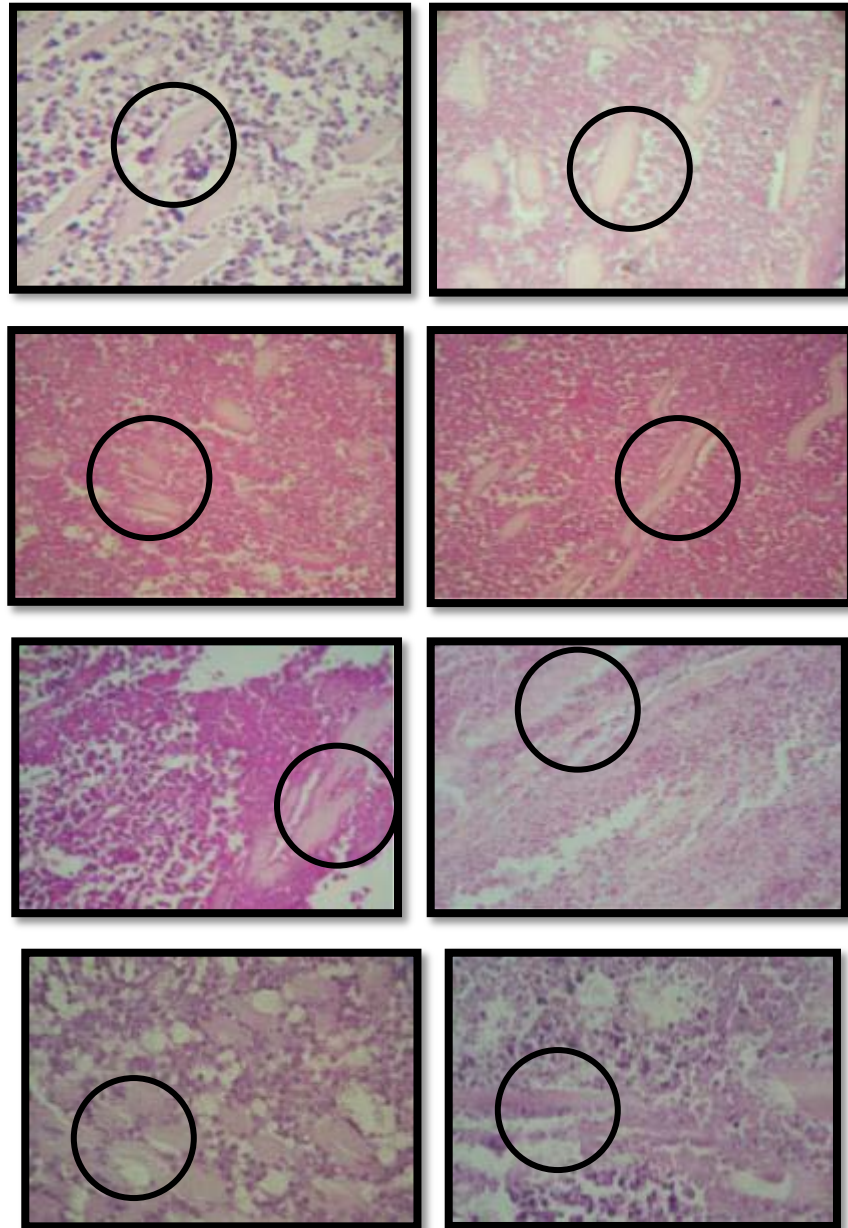


Figura 35. Laminillas del grupo III. En todas las figuras se puede observar fragmentos de tejido saludable señalado por los curculos.

Tabla 8. Tabla de resultados del diagnostico histopatológico microscópico y macroscópico.

Grupos	Análisis patológico microscópico	Análisis patológico macroscópico
Grupo I	Todos los casos presentan necrosis del 90% con invasión en el tracto digestivo y riñón con presencia de metástasis y angiogenesis.	Presencia de células tumorales con combinaciones necróticas y tejido friable con predominancia en región abdominal abarcando 3 cuadrantes dos inferiores y uno medio, mismo tejido se observa en región de torácica abarcando todo el contenido torácico-abdominal y dorsal así también se observan dilataciones de vasos sanguíneos propios del tejido tumoral.
Grupo II	Negativo a tumor, se observa musculo estriado normal.	Se observa pierna, muslo y pata se observa un tejido aparentemente normal.
Grupo III	Presentan necrosis del 70% al 80%.	Se observa miembro inferior que incluye pierna, muslo y pie, en el muslo se observa musculo con crecimiento de tejido tumoral con necrosis de consistencia blanda y homogénea. No se observa metástasis.
Grupo IV	Se presentaban necrosis en un 30% en el musculo estriado del muslo sin metástasis.	Se observa miembro inferior que incluye pierna, muslo y pie, en el muslo se observa musculo con crecimiento de tejido tumoral pequeño de consistencia blanda y homogénea no se observa metástasis.
Grupo V	Negativo a tumor, se observa musculo estriado normal.	Se observa miembro inferior que incluye pierna, muslo y pie con apariencia sana.
Grupo VI	Se presentaban necrosis en un 30% en el musculo estriado del muslo sin metástasis.	Se observa miembro inferior que incluye pierna, muslo y pie con apariencia sana.

IX. Discusión.

Se realizó el análisis antineoplásico de ARCOMIG ya que aunque la quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas más empleada en el tratamiento del cáncer en la actualidad solo del 2% al 4% de los tumores malignos responden a la quimioterapia por lo que tienen un afectividad limitada. Por otra parte, estos agentes farmacológicos producen graves efectos secundarios y colaterales severos e irreversibles, lo que representa un obstáculo para extender su uso. Es por ello que la introducción y exploración de nuevas estrategias para mejorar la eficacia y especificidad en el tratamiento de cáncer es necesaria con el fin de encontrar mejores opciones terapéuticas ampliando la licencia de nuevos agentes terapéuticos ya que el objetivo debe ser es incrementar la supervivencia mientras se mejora la calidad de vida de un individuo con esta patología como lo citan Santos y Cols. 2006 y Sullivan, 2000.

Además de los programas de desarrollo de fármacos estándares, actualmente se están diseñando y o evaluando nuevos candidatos terapéuticos con mejores características farmacológicas para el tratamiento de cáncer y cada vez se da más énfasis al desarrollo de nuevos agentes naturales antitumorales derivados de plantas. En la actualidad existen un gran número de estudios de productos antitumorales derivados de plantas con evidencias clínicas. Los estudios dentro de este campo llamado fitoterapia indican que la medicina tradicional derivadas de productos naturales vale la pena ser investigada ya que se han obtenido resultados favores además de innovadores como lo indican Konkimalla y Cols. 2008 y Jiménez, 2006 y ARCOMIG entrando en esta categoría es digno de ser estudiado.

ARCOMIG al ser un producto manufacturado a partir de una serie de plantas medicinales como la manzanilla (*Matricaria chamomilla*), angélica (*Angelica archangelica*), cola de caballo (*Equisetum arvense*), alfalfa (*Medicago sativa*) y ajo (*Allium sativum*), entra dentro del rubro de fitoterapia ya que dichas plantas

contienen principios químicos activos que son responsables de las propiedades del producto.

Este producto ha sido evaluado por Berry, en la inhibición de diversas variedades de células cancerígenas humanas, siendo particularmente efectivo en la línea celular de leucemia linfocítica humana (CEM) y cáncer de pulmón (LuCa1); así como en neuroblastoma de ratón (B50) y osteosarcoma canino (K9), y en células cancerígenas de mama, próstata y cerebro encontrando una aparente inhibición de células CEM a una concentración baja del producto de (16x). Además se ha descrito la actividad antioxidante *In Vitro* del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DDPH) observando una rápida y potente reducción del radical libre e inhibiendo la producción intracelular de ROSs, especies reactivas del oxígeno intracelular, en células humanas de colon, todo estos ensayos realizados por Aregullin y Cols. 2006.

Tlacuillo y Cols mencionan que las propiedades del producto herbario son atribuidas a los principios activos encontrados en el, estos componentes provienen de las diversas hierbas con las que está elaborado, dichas plantas han sido ya blanco de diversos estudios con finalidades terapéuticas o que son precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica que, para la planta, suelen ser metabolitos de ella.

Todas las plantas contenidas en ARCOMIG tiene citada actividad antineoplásica, *Matricaria chamomilla* fue evaluada en diversas líneas celulares, encontrado que causan mínima inhibición del crecimiento a células normales, mientras que en diversas líneas celulares de cáncer humano causa una disminución significativa en la viabilidad debido a que inducen apoptosis en las células cancerosas pero no en las células normales, confirmando en análisis *In Vivo* que la apigenina 7-O-glucósido es uno de los principales constituyentes de los extractos de manzanilla inhiben el crecimiento celular de cáncer este análisis realizado por Janmejai y Cols. 2007; la apigenina, inhibe significativamente los tumores inducidos a

ratones con rayos UV, provocando la reversión en la fase G2/M disminuyendo la keratinocitosis y contribuye a inhibir o disminuir la conversión de papilomas a carcinomas en experimentos realizados por Gardiner, 1999. Algunos trabajos científicos relacionan las propiedades del ajo con la prevención de procesos tumorales, esto es debido a que la solución acuosa de ajo morado inhibe el 'Helicobacter pylori', bacteria asociada a una mayor incidencia de úlcera gastroduodenal y cáncer gástrico, por otra parte, un trabajo de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill, en Estados Unidos, muestra que las personas que consumen ajo crudo o cocinado con regularidad reducen a la mitad el riesgo de padecer cáncer. El dialil sulfuro (DAS), componente del ajo, tiene propiedades quimioprotectoras contra diversos tipos de cáncer; el azufre que contienen estos compuestos son capaces de inducir apoptosis en varias líneas celulares como las de colon DM 320; también se demostró que aumenta la producción de ROSs, causando la detención del ciclo celular en la etapa G2/M, ya que la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y lactato deshidrogenasa (LDH) se redujeron con el tratamiento de DAS, lo que demostró la antiproliferatividad y los efectos citotóxicos, respectivamente como lo concluyen Sriram y Cols. 2008. El S-allylmercaptocysteine (SAMC) extraído del ajo puede aumentar la sensibilidad del cáncer de próstata ya que se encontró que aumenta la eficacia inhibitoria del docetaxel en comparación con el efecto que causa el fármaco sólo. Así mismo en un modelo experimental de ratones, se encontró que la combinación de docetaxel y SAMC fue 53% más potente que docetaxel solo y que no hubo toxicidad en el hígado, riñón y médula ósea de los ratones tratados con la terapia combinada. Estos resultados sugirieron que la SAMC es capaz de aumentar el efecto contra el cáncer del docetaxel sin causar efectos tóxicos adicionales en estudios *In Vivo*. El análisis por citometría de flujo y el análisis de Western Blot CPRH sobre las líneas celulares, demostraron que la mezcla de SAMC y docetaxel indujo la detención del ciclo celular en la fase G2/M y la inducción de apoptosis lo que fue concluido por Engdal y Cols. 2008 así como Stan y Cols. 2007.

Estudios realizados a *Angélica archangelica* un componente más de ARCOMIG muestran que tiene aplicaciones anticancerígenas en ratones expuestos a radiaciones ultravioleta, que se asemejan a las exposiciones humanas de rayos UV. Se encontró que la angelicina que es uno de los compuestos principales de angélica evita a partir de sus metil derivados, que se lleven a cabo mutaciones en el DNA causado por exposiciones a rayos ultravioleta. También se ha estudiado el efecto antiproliferativo de una tintura de los frutos de *Angélica archangelica* y los componentes activos utilizando el cáncer de páncreas humano como línea celular (PANC-1) como modelo. Observando una importante actividad antiproliferativa al inocular la tintura del fruto resultado de las dos más abundantes furanocoumarinas en la tintura, imperatorin y xanthotoxin. Además de la tintura del fruto, también la hoja de *Angelica archangelica* ha sido estudiada, examinando el efecto del extracto de su hoja en el crecimiento de cáncer de mama *In Vitro* e *In Vivo* utilizando ratones. Los resultados muestran que el extracto de la hoja tiene actividad antitumoral expresándose en los ratones con una marcada reducción en el crecimiento del tumor todos estos trabajos realizados por Sigurdsson y Cols, 2005.

Aunque los trabajos anteriores muestran indicios de la actividad antineoplásica contenida en los ingredientes de ARCOMIG se necesita de un estudio un estudio multiescala que analice el efecto antineoplásico acumulativo de todas las plantas del producto herbario "ARCOMIG" desde la perspectiva genética, molecular, celular, farmacológica, inmunológica hasta la contribución acumulativa de esta mezcla compleja para ayudar a incorporarlo como un tratamiento alternativo, integral, curativo y o preventivo, viable, eficaz y seguro. Es por ello que la evaluación antineoplásica del producto herbario ARCOMIG propuesta para este trabajo, conlleva un estudio integral, efectuando la evaluación en un modelo *In Vivo* de BALB/C en el cual se estudien las cualidades antiangiogénicas, la inhibición de metástasis y la estimulación al sistema inmunitario del producto metabolizado, además de una evaluación *In Vitro* para analizar la citotoxicidad así como la inducción de apoptosis, la influencia del producto herbario en el ciclo celular y el nivel de expresión génica inducido por este producto, asimismo el

estudio contempla la evaluación de la 7-metoxi-cumarina, como fármaco antineoplásico, citado como uno de los tres principales compuestos encontrados en ARCOMIG con propiedades anticancerígenas y con ello abarcar todos los aspectos que puedan estar relacionados con la actividad de ARCOMIG y así poder ayudar a que este producto sea incorporado como tratamiento en el sistema de salud de nuestro país.

Allevatos y Col. 2008 y García y Col.2006 mencionan que el principio básico en el que se sustenta la quimioterapia intensiva es la presunción de la existencia de una curva de dosis-respuesta, de agentes citotóxicos de corta semivida con fundamental toxicidad modulada y la posibilidad de rescate hematológico posterior es por ello que un análisis de este tipo es tomada como una prioridad para empezar el estudio de un posible fármaco antineoplásico como lo es ARCOMIG y así el presente trabajo contribuyó a la elaboración de una curva concentración-respuesta la IC_{50} para inocular con ARCOMIG los cultivos de células HeLa. Villacencio y Cols. 2008 indican que esta línea celular tumoral contiene como característica un alto índice en la proliferación y alta resistencia al proceso de apoptosis, además de ser una línea celular utilizada tanto en el análisis de creación de nuevos fármacos y tratamientos candidatos a antineoplásicos.

Teniendo como resultados que la concentración a la que el 50% de células siguen siendo viables o inversamente cuando se presenta el 50% de muerte celular, es la concentración 1:4 lo cual corresponde con las indicaciones del proveedor el cual menciona diluir 30 mL de ARCOMIG en 90 mL de agua, además de ello la prueba de ANOVA nos muestra que si tenemos diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de las diferentes concentraciones del tratamiento a las que fueron sometidas por tal se rechaza la hipótesis nula.

Los resultados anteriores nos podrían indicar antecedentes de un análisis previo del efecto citotóxico del producto antes de su comercialización, conjuntamente se

observa mayor efecto en las células tratadas con ARCOMIG a un pH regulado de 7.5 lo cual indicaría que el producto herbario contiene algún compuesto que reacciona al pH ya que las células tratadas con ARCOMIG a un pH de 3.5 parecen sufrir poco o nulo daño, siendo que el pH es muy ácido. A través de estos resultados se pudo implementar un modelo *In Vitro* para evaluar el efecto citotóxico y el efecto apoptótico de ARCOMIG.

Segretín, sin año, menciona que los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, por ello el análisis del efecto citotóxico producido en las células tumorales HeLa por medio de las observaciones al microscopio de contraste de fases es importante, en ellos se muestran cambios en la morfología de las células, lo que indica que hay efecto citotóxico, este es un parámetro importante en la evaluación de un candidato a fármaco antineoplásico y ha sido realizado en la mayoría de los análisis realizados a dichos candidatos a tratamientos antineoplásicos, ejemplo de estos son los trabajos realizados por Quispe y Cols. 2009; Delgado y Cols 2008; Galicia y Cols., 2007; Tabares y Cols 2007; Roldan y Gómez 2006; Jhoana y Cols. 2006 y Vargas y Cols. 2006; con lo cual se contribuye a proporcionar datos para corroborar las propiedades medicinales atribuidas popularmente a este producto.

Dosne, 2006 indica que la línea celular utilizada en este ensayo han dado múltiples contribuciones siendo base de muchos de los descubrimientos en cancer y en genética, muchos de ellos asociados a premios novel. Esta línea celular tiene como características principales un crecimiento agresivo y una alta resistencia a poptosis que se debe principalmente a una combinacion de papilomavirus 18 que produce una proteína que degrada p53 sin mutarla, y a alteraciones varias en los cromosomas 1,3,5 y 6, características importantes que deben ser tomadas en cuentas para los posteriores análisis que pueden estar enfocados al analisis de la influencia de ARCOMIG sobre estas características.

Los modelos *In Vivo* de cultivos celulares, las observaciones en microscopia optica son de gran utilidad en la evaluacion de nuevos candidatos para el tratamiento antienoplasico ya que atravez de estas observaciones se puede evaluar si dicho candidato tiene la capasidad de causar algun efecto en la morfologia celular como lo describe Roldan y Cols. 2006, es por ello que fueron utilizadas en este estudio para evaluar tanto la citotoxicidad del producto asi como el efecto apoptótico.

La valoración de la citotoxicidad *In Vitro* de las líneas celulares derivadas de tumores humanos se emplea como bioensayo preliminar para el tamizaje de productos de origen natural con potencial actividad anti cancerígena y es justo lo que se pretendió hacer con ARCOMIG. En este proceso la valoración de la citotoxicidad sigue siendo válida y útil en las primeras etapas de selección de compuestos premisorios, y con este análisis en ARCOMIG se da solidez a dichas valoraciones es necesario conocer su sensibilidad a agentes con acción citotóxica demostrada para la selección de productos con potencial anti cancerígeno, para con ello poder generar perfiles de sensibilidad frente a los cuales se puede comparar el perfil de ARCOMIG, lo que permite plantear hipótesis sobre sus mecanismos de acción y sus blancos moleculares, generando información útil de la acción de ARCOMIG como agentes anticancerígeno.

En cuanto a la inducción de apoptosis, las células muestran cambios característicos de este proceso como cambios morfológicos como la condensación celular fragmentación del núcleo y DNA celular, disrupción del citoesqueleto y alteraciones en la superficie celular, formación de vesículas fusionadas con la membrana plasmática, contracción de la célula y por tal pérdida de contacto con células aledañas esto a parir de la técnicas utilizada para el análisis de este proceso con marcadores como el yoduro de propidio, el cual se intercala en el núcleo celular, este marcador al ser excitado a una longitud de onda de entre 45 nm y 55 nm como lo es la luz ultravioleta, dejando observar a través de un

microscopio de epifluorescencia los cambios morfológicos que se presentan el núcleo y membrana celular.

Las características apoptóticas antes mencionadas son citadas por García y cols. 2009; Domínguez, 2008; Jiménez, 2006; Hernández y Cols. 2006; Gutiérrez y Cols. 2006; Fan y Cols. 2005; Aigner y Col. 2002; López y Cols. 2002, indicando que este proceso es una de las características clásicas de un proceso apoptótico y sabiendo que las células que presentan alteraciones drásticas en los procesos de auto regulación como lo es la muerte celular programada y por ello tienen la limitante de esta expresión apoptótica, el conocer que ARCOMIG realiza una estimulación que lleva a la inducción de este proceso regulador nos ayuda a utilizar estos conocimientos como base para proponer a este producto herbario, como un tratamiento que estimula este proceso necesario y fundamental en el tratamiento de neoplasias.

Los posteriores estudios deben de enfocarse a identificar la vía de señalización en la cual ARCOMIG interfiere, alterando así la maquinaria intracelular responsable de este proceso. La muerte celular vía apoptosis es una variable cada vez más estudiada para la mejor comprensión del desarrollo del cáncer y el establecimiento de nuevas y mejores estrategias para la prevención y tratamiento de la enfermedad recomendaciones que también dan García y Cols. 2009; Domínguez, 2008; Jiménez, 2006, es por ello que se decidió realizar el estudio de la inducción de ARCOMIG sobre este mecanismo. Al ser sometido ARCOMIG a futuros análisis se puede explicar si la apoptosis producida inducida por ARCOMIG se debe a diversos factores como la isquemia leve, el estrés oxidativo, la citotoxicidad linfocitaria, los factores de necrosis tumoral, la interacciones o pérdidas de las relaciones entre las células epiteliales y la matriz extracelular, la radioterapia, las drogas citotóxicas o por la expresión de nuevos oncogenes. La resistencia a la apoptosis en los tumores puede explicar, en parte, la baja respuesta de esos tumores a la quimioterapia. La importancia de la apoptosis en las neoplasias se basa en el papel en la eliminación de células pre-neoplásicas, ser necesaria y

funcional en los tumores ya establecidos, es necesaria la respuesta terapéutica adecuada a las diferentes armas farmacológicas antitumorales por ello Domínguez 2008; Gutiérrez y Cols. 2006; Fan y Cols. 2005; Aigner y Col. 2002; López y Cols. 2002 lo mocionan como un análisis prioritario en la evolución de nuevos tratamientos antineoplásicos.

El ensayo *In Vivo* se muestran resultado favorables del producto principalmente como un tratamiento preventivo y en menor escala curativo ya que en los grupos donde se dio tratamiento con ARCOMIG el análisis histopatológico a nivel macroscópico muestra que estos grupos no presentan un proceso necrótico o es un proceso de necrosis inicial así mismo se observa una masa tumoral de menor longitud y peso, a nivel microscópico observamos en los grupos sin tratamiento tienen un proceso de metástasis avanzado invadiendo principalmente el sistema digestivo e invasión en los pulmones, por otro lado se observan vascularizaciones propias de la masa tumoral lo cual indica un proceso de angiogénesis. En los grupos sometidos a un tratamiento con ARCOMIG, se observas tejido liso sano, con células bien agrupadas formando fibras.

El desarrollo de un modelo *In Vivo*, murino es importante para visualizar el comportamiento del ARCOMIG metabolizado, en este caso por ratones de cepa BALB/C inoculados con tumor ascítico de Ehrlich. Este modelo nos sirve como base para analizar las propiedades antineoplásicas del producto después de ser metabolizado, otros datos importantes en este ensayo son el tiempo de sobrevivencia el cual fue mayor en los grupos con tratamiento ya que estos finalizarón con una n=10 mientras que el grupo control sin tratamiento termino con una n=6 y con un nivel elevado de necrosis. Además de los resultados de las comparaciones de las laminillas obtenidas de la técnica de fijación con parafina con tinción con H y E el grupo que fungió para analizar ARCOMIG como un tratamiento anticanceroso muestra más proporciones de tejido sin invasión de las células Ehrlich, además de que el grupo control que no fue sometido a tratamiento presenta metástasis y la masa tumoral muestra vascularizaciones propias del

tumor es decir angiogénesis, mayor peso y tamaño con respecto los grupos tratados con ARCOMIG. El estudio de los tumores malignos en este modelo murino nos mostro el comportamiento de ARCOMIG correlacionando los resultados de histología lo que puede ser útil para comprender algunos aspectos que pudieran tener aplicaciones clínicas como lo menciona Michelli y Cols. 2007.

Aunque este ensayo nos fue útil es recomendable estudiar más afondo los efectos del microambiente tumoral en el modelo preclínico que puede afectar significativamente el valor pronostico de los estudios clínicos, entre los factores microambientales que afectan al actividad terapéutica están la arquitectura tisular, la respuesta local del tejido, el patrón de vascularización y la vigilancia inmunológica; el análisis realizado generalmente a un modelo murino con una inducción neoplásica se refiere a un estudios en su curva de crecimiento, análisis histopatológico, análisis de linfocitos citotóxicos y supervivencia según Rojas y Cols. 2000. El análisis realizado en el modelo murino para evaluar la acción de ARCOMIG básicamente se enfoco a la arquitectura tisular, la respuesta local del tejido y el patrón de vascularizaciones quedando análisis por realizar.

Los resultados obtenidos en todos los experimentos anteriores se pueden deber a los activos de la mayoría de las plantas de las que esta manufacturada ARCOMIG ya que estas dentro de sus metabolitos contienen activos con acciones ya citadas como las cumarinas encontradas en la manzanilla del tipo umbeliferona y herniarina, que fueron citadas por Tlacuilo y Cols. 2007; Jiménez, 2006; Marinho y Cols. 2006; Raal y Cols. 2003; Gardiner, 1999. Angélica contiene cumarinas sencillas y numerosas furanocumarinas como la arcangelicina, el bergapteno o la imperatorina esto lo mencionan HMPC, 2007; Nivinskiene y Cols. 2003; Carretero 2000 y sabiendo que uno de los componentes que identificados en ARCOMIG es una cumarina, 7-metoxi-cumarina o hernianina, la cual podría ser el principal agente con propiedades anti cancerígenas y antipromotor de tumores, además de óxido de bis-abolol, al cual se le atribuyen propiedades antimutagénicas como lo

meciona el Departamento de la Biología de las plantas de la Universidad de Cornell.

Existen diversos reportes del uso y tratamientos de las cumarina así como de sus derivados en la prevención y el tratamiento de diversos carcinomas que inducen la muerte celular. Se ha empleado en el tratamiento de cáncer de mama, próstata, riñón, melanoma, entre otros, así como agente protector contra carcinógenos. Se desconocen los posibles mecanismos mediante los cuales estos compuestos puedan ejercer su acción. Algunas investigaciones indican que es a través de la estimulación del sistema inmunitario, mientras que otras consideran un efecto directo sobre las células tumorales. En relación con esto último, varios grupos de investigadores han evaluado los efectos antiproliferativos directos de las cumarinas sobre las células malignas, encontrando que la cumarina y la 7-hidroxicumarina inducen, *In Vitro*, inhibición de la proliferación en diversas líneas celulares malignas de distinta estirpe histológica alterando su ciclo celular como el estudio realizado por Sullivan y Cols. 2000. Un ejemplo de la actividad de las cumarinas en células de cáncer cervico-uterino se observo en la línea HeLa realizando ensayos para analizar la actividad citotóxica y obtener la IC50. Los resultados indican que la cumarina es citotóxica en células HeLa a una concentración inhibitoria (IC50) de 65 y 13.3 μM a 48 y 72 horas de tratamiento, respectivamente esto citado por Delgado y Cols.

Varios autores han reportado la relación estructural de la actividad citotóxica de las cumarinas compuestas, así como una tendencia selectiva dependiente de los sustituyentes (Finn y Cols. 2002; Kawaii y Cols. 2001). Sin embargo, el mecanismo de acción de las cumarinas complejas no ha sido establecido por tal, es otro de los estudios que se pretenden realizar a futuro para ayudar a que ARCOMIG sea tomado como un tratamiento efectivo.

El estudio de este compuesto debe de guiarse en estudios previos que muestran que la administración de la cumarina en modelos animales y en el humano indica

que es completa y rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal, y se metaboliza principalmente en el hígado. A diferencia de otros organismos, en el humano la vía más importante es la 7-hidroxilación, catalizada por la enzima CYP2A6, específica del citocromo P450. El tiempo de vida media de la cumarina en la circulación sistémica es aproximadamente una hora y es independiente de la vía de administración. Además, el metabolito 7-hidroxilado es excretado en la orina como glucurónido (Sullivan y Cols. 2000). Como grupo, su interés farmacológico no es muy grande, sin embargo debemos mencionar sus efectos sobre el sistema vascular tanto en territorio arterial como venoso y su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel como por ejemplo la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes da indicios de alguna actividad farmacológica, Machado, 2005; Carretero, 2000 es por ello que la 7-metoxicumarina puede ser estudiado individualmente para proponerlo como fármaco antineoplásico estudiando las cualidades en esta área.

Los resultados obtenidos muestran indicios de que el producto herbario ARCOMIG tiene efectos antineoplásicos, esto podría estar relacionado con las propiedades antineoplásicas atribuidas a las plantas de las cuales está elaborado, teniendo un mayor efecto cuando se utiliza como un tratamiento preventivo. Este trabajo sirve para impulsar el estudio a nivel genético realizando posteriormente un análisis de microarreglos de cDNA y microarreglos líquidos de citocinas, análisis del ciclo celular por citometría de flujo así como la evaluación de la 7-metoxi cumarina como fármaco antineoplásico.

X. Conclusión

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto antineoplásico del producto herbario ARCOMIG contribuyen a corroborar las propiedades antineoplásicas que le son popularmente atribuidas y destaca la posibilidad de proponerlo como un candidato a tratamiento del padecimiento cáncer ante la Secretaria de Salud si se contribuye con posteriores estudios que reafirmen y consoliden sus propiedades usando mas modelos de células neoplásicas.

XII. Bibliografía

Aigner T. y Kim H. A. 2002. Apoptosis and cellular Vitality Issue in osteoarthritic cartilage degeneration. *Cell signaling* 37(11): 719-72.

Alexander Batista Duharte 2003. Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. *MEDISAN* 7(2):75-88.

Allevatos M. Marini M. y Branciforte M. 2008 Fármacos antineoplásicos cutáneos. *Acta Terapéutica Dermatológica*. 31: 222-231.

Aregullin M., Berry J.P. y Cadena L. 2006 Antioxidant Activity and Inhibition of human cancer cells by the herbal product, ARCOMING. *Jornal Medic Science*. 6(2):229-234.

Aregullin M. sin año. Reporte de análisis químico de ARCOMIG. Departamento de Biología de Plantas. Universidad de Cornell.

Benítez L. 2004 Los microarreglos de DNA y su aplicación clínica *Acta Médica Grupo Ángeles medigraphic.com*. 2(2):127-125.

Berry J.P., Laux M.T. y Rodríguez E. 2002. Inhibition of protein tyrosine kinase activity and induction of apoptosis in epithelial cell by oxindole alkaloids of *uncaria tomentosa*. *Journal Medic Science*, 2:110-114.

Berry John. Final report toxicological evaluation of ARCOMIG. Assistant Scientist NIEH Marine and Freshwater Biomedical Science Center University of Miami.

Bianchini F. and Vainio H. 2001 *Allium* Vegetables and Organosulfur Compounds: Do They Help Prevent Cancer? *Environmental Health Perspectives* 109(9):893-902.

Bordón E., Lloret M., Pinar B., Rey A. y Lara P. 2007 Proliferación celular en cáncer de cérvix uterino. Bases genómicas de respuesta oncológica a la irradiación. *Revista electrónica de formación en oncología Biocáncer* 4: 1-7.

Carretero Acame María Emilia 2000 Compuestos fenólicos: Sikimatos (II). *Panorama Actual de Medicina* 24 (233): 432-435.

Castillo J. 2004. Citometría de Flujo: Introducción, Aplicaciones, Clínica, Investigación y Cáncer. Centro de Diagnóstico Onco-inmunológico Ltda. *Laboratorio de Citometría de Flujo Hospital del Trabajador, Concepción, Chile.*

Committee on herbal medicinal products (HMPC). 2007 Reflexion paper on the risks associated whit furocoumaririns contained in preparations of *Angelica archangelica*. *European Medicines Agency Post-authorization Evaluation of Medicines for Human Use.*

Cortés S., Mosqueda M., Herrera G., Muñoz B., Olivares O. y Rodríguez D. 2009 Manual de Técnicas Histológicas para el apoyo de las ciencias biológicas y de la Salud UAM-X.

Delgado C., Cerbón M., Solano J. y Quintero, A.†. Sin año Mecanismo molecular de una nueva cumarina citotóxico en una línea celular de cáncer cervico uterino. Facultad de Química. UNAM.

Dosne Christiane, 2006 Células HeLa como prototipo del cultivo celular inmortalizado. *Medicina Buenos Aires* 66,487 488.

Delgado I., Cervantes D., Ortiz R., Barrera S., y Rojas A. 2008 Generación de un potente vector adenovial oncolítico y selectivo para neoplasias PVH+. *Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, México*, 11(004); 337-351.

Domínguez Rojas Maritere 2008 Efecto del éster fenetílico del ácido cafeínico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares in vitro. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN.

Eastham J., Chen S., Sehgal I., Yang G., Timme T., Hall S. y Thompson T. 1996 Prostate cancer gene therapy: herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed ganciclovir in mouse and human prostate cancer models. *Hum Gene Ther* 7: 515-523.

Engdal S, Steinsbekk A, Klepp O, Nilsen OG. 2008 Evidence of a novel docetaxel sensitizer, garlic-derived S-allylmercaptocysteine, as a treatment option for hormone refractory prostate cancer. *Int J Cáncer*. 122(9):1941-8.

Fan T., Han L., Cong R y Liang J. 2005 Caspace Family proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 37(11):719-727.

Galicia J., Vázquez J. y Gallegos E. 2007 Efecto de la C Ficocianina de Spirulina máxima sobre células HeLa y Calo. *Biotecnología Farmacéutica* 1 (2).

Ganén I. y Aguilar M. 1996 Cáncer y virus. Facultas de Ciencias Medicas Provincia de Guantánamo. Revisiones bibliográficas. p. 23-27

García Robles R., Ayala P. y Acosta N. 2009 Alteraciones en la regulación de la apoptosis vía Fas/FasL en el cáncer gástrico. *Revista científica salud Bogotá (Colombia)* 7(1):83-94.

García A., Gómez C., Ruiz L. y Gracia I. 2006 Evaluación antineoplásica in vitro de la casiopeina III L y su posible sinergia con otros fármacos comerciales en líneas tumorales humanas de estirpes diferentes. Unidad de Experimentación

Animal, Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Depto. de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM. 2° Congreso Nacional de Química Médica.

Gardiner P. 1999 Chamomile (*Matricaria recutita*, *Anthemis nobilis*). *Longwood Herbal and the Center for Holistic Pediatric Education and Research*. Pp.1-21

Guzmán-Vázquez E.2004 Las pruebas de Elisa. *Gaceta Médica México* 140 (3).

Guzmán L., Alcocer M. y Madrid V. 1998. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra el cáncer cervico uterino. *Salud Pública de México* 40(1):38-46.

Gutiérrez G., Mendoza C., Montañó L. y López R. 2006. Ceramide induces early and late apoptosis in human papiloma virus + cervical cells by inhibiting reactive oxygen species decay, diminishing the intracellular concentration of glutathione, and increasing nuclear factor-kappaB translocation. *Anti-cancer Drugs*, pp. 1-11.

Hall V., Rocha M. y Rodríguez E. 2002 Plantas Medicinales Volumen II. Monografías medicinales. Farmacéuticas CIMED (Centro de Información de Medicamentos) Universidad de Costa Rica, pp.1-110.

Hernández M., Sabanero M., Barbosa G., Gallegos M. Estaurosporina y dexametasona, inductores apoptotico en células corionicas y transformadas.2006. Instituto de Investigación en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Guanajuato, Instituto de Ciencias de la Reproducción Humana. 2° Congreso Nacional de Química Médica.

Hanssen Henry 2006. Agentes infecciosos y cáncer. *Universitas Médica* 47(1):6-16.

Janmejai K. Srivastava and Sanjay Gupta 2007 Antiproliferative and Apoptotic Effects of Chamomile Extract in Various Human Cancer Cells *J. Agric. Food Chem.*, 55 (23): 9470–9478.

Jhoana C., Milena S., Johanna S., Cordero P., y Ancizar F. 2006. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valorización de citotoxicidad in vitro. *Biomédica Instituto Nacional de Salud Bogotá Colombia. Red de Revistas Científicas de América latina y el Caribe, España Y Portugal.* 26 (001); 161-168.

Jiménez Medina Eva María, 2006 Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de caléndula, propiedades inmunomoduladoras y citotóxico. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y biología molecular. Universidad de Granada España.

Konkimalla V., Wang G., Kaina B., Efferth T. 2008 Microarray-based Expression of DNA Repair Genes Does not Correlate with Growth Inhibition of Cancer Cells by Natural Products Derived from Traditional Chinese Medicine. *Câncer Genomics Proteomics.* 5(2): 79-84.

Luna J., Rodríguez P., Mendoza J., Sánchez F., Herrera J., Zafra G., Monroy A., Lizano M., Maldonado V., Meléndez J., Dueñas A., García A., De la Garza J. y Gariglio 2006. P. 2º Congreso Nacional de Química Médica.

López R., Gutierrez G., Mendoza C., Ventura J., Sánchez L., Maldonado E., Zentella A. y Montañó F. 2002 Ceramide promotes the death of human cervical tumor cells in the absence of biochemical and morphological markers of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 293: 1028-1036.

Machado S. 2005 Actividad antibacteriana de cumarina naturais e derivados. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas.

Departamento de microbiología e parasitología. *Programa de pós-graduação em Biotecnologia*. P.1-81.

Marie F., Nigenda G., Lozano R, Arreola-Ornelas H., Langer A. y Frenk J. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud pública de México / vol. 51, suplemento 2*.

Marinho M., De Biaggi L., Morais K, Aimbire C y Weffort A. 2006 Comparison of Chemical Constituents of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert Essential Oil and its Anti-Chemotatic Activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(5):717-724.

Michelli P, J. Celaya, M. Aguilar 2007 Estudio Citogenética y Anatomopatológico del Tumor Ascítico Transplantable de Ratón, Sarcoma 180/TG. *Revista Sociedad Médica Quir Hospital de Emergencias Pérez de León* 38(2): 40-45.

Nivinskiene O., Butkiene R. y Mockute D. 2003. Changes in the chemical composition of essential oil of *Angelica archangelica* L. roots during storage. *Chemija (vilnius)* 14 (1):52-56.

Pineda C., Cano A. Escobar-Sánchez, M.L., Osorio S., y Sánchez-Sánchez, L.2006. FES-Zaragoza, UNAM Efecto antiproliferativo y apoptótico de la lactona sckhuriolida en células provenientes de cáncer cervico uterino caski. 2º Congreso Nacional de Química Médica

Quispe A., Callacondo D., Rojas D., Posso M. y Vaisberg A. 2009 Actividad citotóxica de *Physalis Peruviana* (Aguaymanto) en cultivos celulares de adenocarcinoma colorectal, próstata y leucemia mieloide crónica. *Rev. Gastroenterol. Perú* 29(3); 239-246.

Raal A., Arak E. Orav A., Ivask K. 2003 Comparación de aceites esenciales de de *Matricaria recituta* L. de origen diverso. *Ars Pharmaceutica*, 44(2): 159-165.

Rojas A., Oberg K., Kittrell F., Medina D. y Aguilar E. 2000. Differential Effects of HSV-tk Gene Therapy in Orthotopic and Heterotopic Mammary Tumors. *Baylor College of Medicine* pp. 1-12.

Santos L., León-Galvan F. y Marino-Marmolejo 2006. Vía de señalización de Notch y nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer. *Salud publican de México* 48(2):155-165.

Serman Felipe. 2002. Cáncer cervico uterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena Obstétrico Ginecológico*. 67(4); 318-323.

Shepherd A., Manson M., Ball H. y McClellan L.2000 Regulation of rat glutamate-cysteine ligase (γ -glutamylcysteine synthetase) subunits by chymio preventive agents and in aflatoxin B1-induced preneoplasia. *Carcinogenesis* 21(10):1827.

Sigurdssona S., Ögmundsdottirb H., and Sigmundur Gudbjarnasona S. 2004 Antiproliferative Effect of *Angelica archangelica* Fruits. *Z. Naturforsch.* 59:523-527.

Sigurdsson S, Ogmundsdottir H., Hallgrimsson J, Gudbjarnason S. 2005 Antitumour activity of *Angelica archangelica* leaf extract. *In Vivo*. 19(1): 191-4.

Sriram N, Kalayarasan S, Ashokkumar P, Sureshkumar A, Sudhandiran G. 2008 Diallyl sulfide induces apoptosis in Colo 320 DM human colon cancer cells: involvement of caspase-3, NF-kappaB, and ERK-2. *Mol Cell Biochem*. 311(1-2):157-65.

Sullivan J., Prado H., Aguilar D., Molina J., Mandoki J y Medina F. Efecto en el ciclo celular de líneas de adenocarcinoma pulmonar por cumarina y 7-hidroxycumarina 2000 *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 13(4): 192-197.

Secretaría de Salud / Dir. Gral. de Epidemiología / Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas / 2001. **Morbilidad y mortalidad del cáncer en México.**

Stan SD, Kar S, Stoner GD, Singh SV. 2007 Purification and characterization of a Cu,Zn-SOD from garlic (*Allium sativum* L.). Antioxidant effect on tumoral cell lines. *Appl Biochem Biotechnol.* 143(2):129-41.

Tabares P., Ávila L., Torres F., Cardona D., Quiñones W., Forero J., Rugeles M. y Echeverri F. 2007. Metabólicos secundarios y efectos antivirales de algunas especies de la familia Euphorbiaceae. *Red de revistas científicas de América latina y el Caribe, España y Portugal. Scientia Et Technica.* 13(033):107-110.

Thomas Seufferlein², Johann Ahn¹, Denis Krndija¹, Ulrike Lothar¹, Guido Adler¹ and Götz von Wichert 2009 Tumor biology and cancer therapy – an evolving relationship *Cell Communication and Signaling* 7:19-24.

Tlacuilo A. Morales y Acosta A. 2007 Aislamiento de nuevos principios activos a partir de plantas terrestres. *in FÁRMATE*, 3(16):1-12.

Tubiana Maurice 1995 El Cáncer. Breviarios Fondo de cultura económica. México D.F.

Vargas A., Gallegos E., Vega L. Cruz A., y Olvera R. 2006. Efecto in vitro de las ficobiliproteínas en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. *Revista del centro de investigación.* 7(25); 5-12.

Villacencio M., Perez B. y Mendoza E. 2008 Citotoxicidad en células HeLa de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotánica* .26;137-145.

Wagner H. 2005 Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st century: New developments and challenges IUPAC, *Pure and Applied Chemistry* 77(1): 1–6.

Yang W, Li W, Chen J, Chen X, et al. 2007 Preventive effects of 4 Se-enriched plants on rat stomach cancer induced by MNNG--1. inhibitory effects of different selenium resources on rat aneuploid cell incidence in mucosal epithelium of gastric antrum. 36(5):612-4.

www.salud.bioetica.org