

SEP

TECNM

DITD



**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE ATLIXCO**

Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de Puebla

**EVALUACIÓN DEL EXTRACTO JSE1 EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA MCF-7 Y MDA-MB-231**

OPCIÓN 1.

TESIS PROFESIONAL.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUIMICO

PRESENTA:
MARIELA GARCIA GARCIA

ASESOR INTERNO :
M.T.A. GUADALUPE GABRIELA BARCENA VICUÑA

ASESOR EXTERNO
DRA. IRMA FABIOLA DOMÍNGUEZ AVILÉS

ATLIXCO, PUE. JULIO DE 2019

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. CÁNCER.....	3
2 CÁNCER DE MAMA.....	3
2.1 Etiología del cáncer de mama	3
2.2 CLASIFICACION ACTUAL DEL CANCER	4
2.2.1 Luminal a y b.....	4
2.2.2 Her-2	4
2.2.3 Basal like	5
2.3 LINEAS CELULARES.....	5
2.3.1 MCF-7	6
2.3.2 MDA-MB-231	6
3 <i>Justicia spicigera</i> Schlechtendal (Acanthaceae).....	10
3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	10
3.1.1 Taxonomía.....	10
3.2 Distribución geográfica.....	11
3.3 Fitoquímica y Farmacología.....	11
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
5 JUSTIFICACIÓN	17
6 OBJETIVOS.....	18
6.1 Objetivo general	18
6.2 Objetivos específicos	18
7 DISEÑO METODOLÓGICO	19
7.1 Colecta e identificación de la planta.....	19
7.2 Preparación del extracto.....	19
7.3 Materiales y Reactivos.....	19
7.3.1 Cultivo celular.	19
7.4 Procedimiento de proliferación celular en las células MCF-7(+RE) Y MDA-MB-231 (triple-).....	20
7.5 Detección de Kaempferitrina por HPLC.....	20
7.6 RESULTADOS.....	21
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS.....	30

RESUMEN

El cáncer, es una alteración biológica y genética de las células que componen los tejidos de nuestros órganos, que se puede originar en cualquier parte del cuerpo cuando, las células crecen de manera descontrolada sobrepasando al crecimiento de las células normales, lo cual impide que el cuerpo funcione como debería.

En 2015 el cáncer fue la segunda causa de muerte en el mundo y en el 2012 más de 408,000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama en América, de las cuales 92,000 fallecieron a causa de esta enfermedad.

En México, el cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres. Existen varias maneras de tratar el cáncer de mama, dependiendo de su tipo y estadio, tratamientos locales como cirugía y radioterapia y tratamientos sistemáticos que son la quimioterapia y la hormonoterapia.

Debido a la toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos y al desarrollo de resistencia por parte de las células tumorales a múltiples fármacos anticancerígenos, es imperante, la búsqueda de nuevas moléculas y tratamientos, que pudieran tener un efecto farmacológico. Dentro de la naturaleza existe una gran fuente de posibles fármacos anticancerígenos, como lo ha sido, la molécula de Paclitaxel, principio activo del Taxol®, obtenido de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* y ahora producido por cultivo de células en suspensión, obtenidos de esta planta.

En la presente investigación, se plantea la evaluación de la planta medicinal *Justicia spicigera*, sobre diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Existen anteriores reportes sobre la actividad del extracto de la planta, así como de su principio activo, pero al mismo tiempo, existen diferencias en cuanto a la actividad de extractos metanólicos o acuosos, lo cual hace necesario evaluar diferentes tipos de extractos y la obtención de los mismos sobre diferentes líneas celulares de cáncer de mama.

Es por ello que se plantea la realización de extractos estandarizados acuosos y alcohólicos de la planta medicinal *Justicia spicigera*, obtenidos bajo diferentes parámetros de extracción y su evaluación en dos diferentes líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Año con año aumenta su incidencia. El cáncer de mama es el que más afecta a la población femenina mexicana. A nivel mundial, en el año 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en la mujer fueron los de mama (25.2%), colon y recto (9.2%), pulmón (8.7%), cuello uterino (7.9%) y estómago (4.8%). Se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. (W. Stewart, 2014).

En mujeres mexicanas el cáncer de mama encabeza la incidencia con un 30.9% del total., seguido por cáncer en órganos genitales con 17.6% y cáncer en órganos digestivos con 12-8%. (INEGI, 2016).

El cáncer de mama se define como "el crecimiento anormal y desordenado de las células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios", el cuál puede tener la capacidad de diseminarse. No está claro porque se produce el cáncer de mama, pero se estima que el 50% de las mujeres diagnosticadas con este tipo de cáncer tienen factores de riesgo identificables además de la edad y el género. Los factores considerados predisponentes o que pueden aumentar el riesgo son los hormonales, historia familiar con cáncer, enfermedad mamaria previa, sobrepeso, estilo de vida, medio ambiente (ESMO , 2013). El tratamiento actual para tratar la mayoría de los tipos de cáncer es con Taxol® cuyo compuesto activo es el Paclitaxel ®. Este compuesto, originalmente se produce en la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, pero actualmente, se comercializa, gracias a que se obtiene de un cultivo celular de la misma planta, mediante un bioproceso biotecnológico de 30 días. Es así como las plantas medicinales, nos ofrecen miles de compuestos activos con muchas actividades farmacológicas, entre ellas, la de antitumorales, como el Taxol. La alta incidencia de la enfermedad, la poca cantidad de agentes antitumorales y la diversidad vegetal que existe y que aún no ha sido estudiada, nos brinda la necesidad de la búsqueda de nuevos agentes citotóxicos a partir de plantas medicinales, que nos permitan en un futuro, obtener nuevos agentes antitumorales.

En el presente trabajo de investigación, se plantea la evaluación de la planta medicinal *Justicia spicigera*, sobre dos diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Esta planta cuenta con algunos antecedentes publicados sobre su actividad en cáncer (por nuestro grupo de investigación), pero es necesario saber el tipo de extracto y temperaturas de extracción de la planta que sean las idóneas para obtener la mejor actividad citotóxica.

Es por ello que se plantea la realización de extractos estandarizados acuosos y alcohólicos de la planta medicinal *Justicia spicigera*, obtenidos bajo diferentes parámetros de extracción y su evaluación en dos diferentes líneas celulares de cáncer de mama las líneas celulares empleadas y ya citadas anteriormente fueron la línea celular MCF-7 es una línea de tipo epitelial, expresa receptores de estrógeno y progesterona pero no expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2-), y la línea celular MDA-MB-231 esta línea pertenece a un subtipo de cáncer de mama de tipo basal y se caracteriza por la ausencia de expresión para receptor de estrógeno, de progesterona, y la represión del receptor de crecimiento epidérmico 2 (HER2).

1. CÁNCER

El término cáncer engloba un conjunto de enfermedades que se pueden presentar en diversas partes del organismo, cuyas características principales son: crecimiento celular descontrolado, evasión de apoptosis, favorecimiento de la angiogénesis y acumulación de múltiples alteraciones genéticas, entre otros. (World Health O. , 2013)

Otra característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Siendo esta la principal causa de muerte por cáncer. (World Health o. , 2016). Esta enfermedad se desarrolla debido a alteraciones de los genes responsables del control del ciclo celular, dichas alteraciones son el resultado de interacciones entre factores genéticos y agentes externos (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2014) , ya sean de carácter ambiental, químico o biológico como algunos virus (Hengge, 2008), bacterias y parásitos.

2 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el crecimiento de células malignas en el tejido mamario, que generalmente se detecta como un bulto en el seno. Existen dos tipos principales de este tipo de cáncer que son: el carcinoma ductal (80% de los casos), que comienzan en los conductos que llevan la leche desde la mama, hasta el pezón; y el carcinoma lobulillar (10-15% de los casos) que comienzan en partes de las mamas, llamadas lobulillos, que producen la leche.

2.1 Etiología del cáncer de mama

No hay una sola causa que explique el origen del cáncer de mama, pues éste se asocia con la combinación de muchos factores genéticos, hormonales y del medio ambiente. En relación con los factores genéticos, estos se encuentran entre el 5-10% de los casos de cáncer de mama (Domchek S, 2003). Por esta razón, las mujeres que han tenido madres o hermanas con esta enfermedad tienen un mayor riesgo de desarrollarla en el futuro. Mediante estudios en grandes poblaciones se ha encontrado que cuando la mujer ha tenido una vida menstrual muy larga (menarquia temprana y menopausia tardía, después de los 50 años), aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Además, tener el primer hijo antes de los 20 años parece proteger contra el cáncer de mama (quality, 2001).

En relación con los aspectos ambientales, se ha encontrado que el número de casos nuevos varía enormemente de acuerdo a las diferentes regiones del mundo.

Otros aspectos de gran relevancia respecto el cáncer de mama son la variedad histológica (tipo) del tumor y su etapa o estadio.

El estadio hace referencia a la extensión o gravedad del cáncer que aqueja a un individuo con base en la extensión del tumor original (primario) y la extensión de la diseminación en el cuerpo. La estadificación ayuda al médico a planear el tratamiento de una persona y puede usarse para estimar su pronóstico (el resultado o curso posible de la enfermedad). (Wiley, 2000).

La estadificación se basa en los conocimientos que se tienen del desarrollo del cáncer. Las células cancerosas se dividen y crecen sin orden ni control para formar una masa de tejido que se llama tumor.

Conforme crece el tumor, puede invadir órganos y tejidos cercanos. Las células cancerosas pueden también desprenderse del tumor y entrar en el torrente sanguíneo o en el sistema linfático. Al moverse por el torrente sanguíneo o por el sistema linfático, el cáncer puede diseminarse desde el sitio primario para formar nuevos tumores en otros órganos. Cuando el cáncer se disemina, se llama metástasis (Wiley., 2000).

Los cánceres de mama humanos son heterogéneos, y los esfuerzos recientes se han centrado en la caracterización tanto intra como inter-heterogeneidad tumoral de una manera clínicamente relevante. El manejo clínico actual de la enfermedad comprende la evaluación morfológica (tamaño, grado, estado de los ganglios linfáticos), y las pruebas de receptor de estrógeno (ER) y el factor de crecimiento epidérmico receptor humano 2 (HER2). Sin embargo, todavía hay mucha variación en los resultados clínicos de los pacientes estratificados a estos parámetros. Por ejemplo, más del 75% de los pacientes tienen cánceres ER + de mama, pero sus resultados y respuestas a la terapia son extremadamente variados. Esta heterogeneidad clínica puede explicarse por la diversidad de los conductores genómicos que subyacen a la enfermedad. (Tomao F, 2015)

2.2 CLASIFICACION ACTUAL DEL CANCER

2.2.1 Luminal a y b

Luminal A, caracteriza a neoplasias con alta expresión del receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP) y genes asociados (ej.: GATA3, XBP1 y TFF1), así como baja expresión de genes asociados a la región cromosómica de HER2/ERBB2 (receptor tirosina quinasa 2 del EGF). Además, presentan baja expresión de genes asociados a proliferación (como Ki67), bajo grado nuclear y, en general, no presenta mutaciones en el gen TP53. Se asocia con una evolución clínica favorable, respondiendo bien a la terapia hormonal antiestrogénica.

Luminal B, exhibe bajos niveles del RE, el RP y genes relacionados; y muestra variabilidad en la expresión de genes asociados a la región cromosómica de HER2/ERBB2. Exhibe una mayor tasa de proliferación de las células tumorales, mutaciones en el gen TP53 y alto grado nuclear. Presenta una evolución clínica no muy favorable; y su respuesta a terapia endócrina no es completa

2.2.2 Her-2

Está principalmente caracterizado por una alta expresión de los genes presentes en la región cromosómica 17q12; la cual incluye a HER2/ERBB2 y GRB7. Además, muestra baja expresión de genes asociados a los subtipos Luminales y Basal, alta expresión de genes asociados a proliferación celular y alto grado nuclear. Son neoplasias agresivas cuya evolución clínica es mala, sin embargo, responden bien a la terapia anti-HER2

2.2.3 Basal like

Comprende neoplasias con alta expresión de citoqueratinas basales (CK5/6/14/17) y del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), pero baja expresión de genes relacionados a los subtipos Luminales y de la región cromosómica de HER2/ERBB2. A su vez, se observa alta frecuencia de mutación en los genes BRCA1, TP53 y Rb1, alta tasa de proliferación celular y alto grado nuclear. Presenta una muy pobre evolución clínica, siendo neoplasias muy agresivas que responderían mejor a la quimioterapia.

Estos subtipos fueron originalmente definidos en función de los perfiles transcripcionales y han proporcionado información relevante sobre la biología del cáncer de mama. Estudios posteriores han demostrado que estos subtipos también se pueden distinguir a nivel genético, epigenético y proteico. Estos estudios se realizaron considerando el estado de metilación del ADN, la variación en el número de copias de los genes en el genoma, las mutaciones en secuencias codificantes, el perfil de expresión de ARN no codificante y el perfil proteico de los carcinomas (Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, 2012).

2.3 LINEAS CELULARES.

Las líneas celulares son células de origen animal o humano que se han adaptado a vivir en cultivo, poseen una capacidad de proliferación limitada, debido a que han sufrido un proceso de transformación, que puede ocurrir espontáneamente, ser inducido por compuestos químicos, radiaciones o virus; que implica la alteración de las características de crecimiento (Freshney, 2000).

Las líneas celulares establecidas se pueden dividir en dos tipos principales: adherentes que se fijan al material plástico de un frasco o placa y por lo tanto tienen que desprenderse de esa superficie antes de utilizarlas y no adherentes que normalmente se fijan a la superficie del recipiente de cultivo (Morgan, 1995).

La propagación de las líneas celulares requiere que el número de células aumente continuamente. Las condiciones de cultivo han sido seleccionadas para favorecer al máximo la proliferación celular. Estas condiciones son; baja densidad celular, baja concentración de Ca^{2+} y la presencia de factores de crecimiento. Dentro de estos requerimientos se cuentan: el medio de cultivo nutritivo, condiciones de pH, temperatura y ambiente controlado. El medio de cultivo debe ser un medio líquido, que contenga una fuente de carbono, aminoácidos esenciales, oligoelementos, un sistema regulador de pH, iones y factores de crecimiento aportados por el suero fetal bovino (FBS) con el que generalmente se suplementa el medio. Adicionalmente los medios de cultivo celular contienen rojo fenol como indicador de pH, para permitir un constante monitoreo de esta variable (Freshney, 2000).

Las líneas celulares utilizadas en el presente proyecto de investigación son: MCF-7, MDA-MB-231.

2.3.1 MCF-7

La línea MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama humana cultivada que es ampliamente utilizada para estudios de biología acerca de esta enfermedad, así como su mecanismo hormonal de acción.

La línea celular se derivó originalmente en la Michigan Cancer Foundation de un derrame pleural alineante de una mujer posmenopáusica con cáncer de mama metastásico que había sido previamente tratada con radioterapia y terapia hormonal. Las células expresan receptores y respuestas biológicas a una variedad de hormonas incluyendo estrógeno, andrógeno, progesterona, glucocorticoides, insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, prolactina y hormona tiroidea (Osborne K. H., 1987).

Una de las contribuciones más importantes de la línea celular MCF-7 a la investigación del cáncer de mama ha sido su utilidad para el estudio del receptor estrógeno (RE) alfa, ya que esta línea celular expresa niveles sustanciales de RE imitando la mayoría de los cánceres de mama humanos invasivos que expresan RE. Es de destacar que el mantenimiento de la expresión del receptor estrógeno alfa en las líneas celulares cultivadas es especialmente difícil, y esto ha dado lugar a la generación de mucho más RE negativas que las líneas celulares de cáncer de mama humano RE positivas (Lee, 2015). Estudios más recientes han demostrado que el estrógeno simultáneamente induce y reprime un gran número de genes, lo que indica compleja red de cambios que se coordinan para alterar el crecimiento (Lee, 2015).

Las células MCF-7 han servido como modelo para el estudio de la respuesta del estrógeno tanto *in vitro* e *in vivo*. La vía de señalización RE es un ejemplo de vía biológica compleja que controla una variedad de funciones tales como proliferación celular, apoptosis y angiogénesis que son explotadas por células de cáncer de mama para servir como una vía de supervivencia principal impulsada por la hormona femenina estrógeno (Osborne K. &, 2013).

2.3.2 MDA-MB-231

La línea celular de cáncer de mama MD-MB-231 se obtuvo en el año 1973, de un paciente del Centro de Cáncer M. D. Anderson. Con morfología epitelial, las células de cáncer de mama MDA-MB-231 aparecen fenotípicamente como células en forma de huso. *In vitro* la línea celular MDA-MB-231 tiene un fenotipo invasivo. Es capaz de crecer en agarosa, un indicador de transformación y tumorigenicidad, y muestra una eficiencia de formación de colonias, relativamente alta. *In vivo*, las células MDA-MB-231 forman tumores de almohadillas de grasa mamaria en ratones desnudos. Se ha demostrado que la inyección intravenosa de células en la vena de la cola de ratones desnudos produce metástasis experimental (INC., 2016)

Clínicamente, el cáncer de mama puede dividirse en distintos subtipos que tienen implicaciones en el pronóstico y tratamiento. Los pacientes con cáncer de mama por lo general tienen la expresión de receptor de estrógeno (RE), receptor progesterona (RP), y amplificación del oncogén HER-2 / Neu.

La línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama carece de estos tres marcadores moleculares, lo que caracteriza al cáncer del tipo basal epitelial o triple negativo (Chavez, 2010).

El tratamiento de pacientes con cáncer de mama triple negativo, que carece de la expresión de RE, PR, y HER-2 /Neu, ha sido un desafío debido a la heterogeneidad de la enfermedad y la ausencia de objetivos moleculares bien definidos. Los triples negativos constituyen entre el 10% y el 20% de todos los cánceres de mama, afectan más frecuentemente a los pacientes más jóvenes y son más frecuentes en las mujeres [18].

3. FITOFÁRMACOS COMO ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

Existen diversos tipos de tratamientos para el cáncer de mama, que puede ser tratamientos sistemáticos que son con fármacos, que se pueden administrar por vía oral o directamente al torrente sanguíneo como quimioterapia y hormonoterapia. Entre los medicamentos de quimioterapia para el tratamiento del cáncer de mama, se incluyen en la Tabla 1. (BreastCancer, 2015) , y la cirugía o radioterapia.

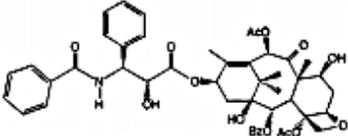
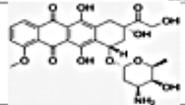
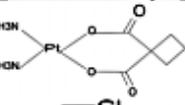
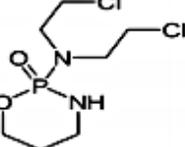
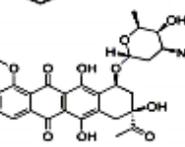
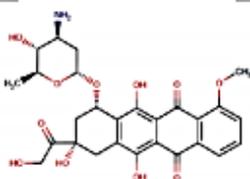
Nombre	Nombre genérico	Origen	Molécula	Referencia
Abraxane	Paclitaxel unido a albúmina	Botánico		(Miele, Spinelli, Miele, Tomao, & Tomao, 2009)
Adriamicina Doxil	Doxorrubicina	Biológico		(Shahi & Manga, 2007)
Carboplatino	Paraplatin	Sintético		(de Sousa, Wlodarczyk, & Monteiro, 2014)
Cytosan	Ciclofosfamida	Sintético		(Lieberman, Druker, Refojo, & Arzt, 2008)
Daunorrubicina	Cerubidine	Biológico		(Hande, 1998)
Ellence	Epirubicina	Biológico		(Tanei, y otros, 2009)

Tabla 1 Medicamentos de quimioterapia para el tratamiento de cáncer de mama. Tomado de BreastCancer, 2015.

Algunos efectos secundarios comunes originados por los medicamentos que componen a la quimioterapia para el cáncer de mama son bajo recuento de glóbulos blancos, anemia, infecciones, hinchazón (edema) náusea, vómito, diarrea. Neuropatía, dolor muscular o articular y periodos regulares (BreastCancer, 2015)

Las terapias contra el cáncer están limitadas por las bajas concentraciones de fármacos que llegan al tumor. La eliminación rápida y la distribución generalizada del fármaco en órganos y tejidos no enfermos requieren administración en grandes cantidades que a menudo da como resultado toxicidad sistemática y efectos adversos. (Bassiouni, 2012)

El desarrollo de la resistencia a los agentes quimiopreventivos es otro de los principales retos en el tratamiento efectivo del cáncer. Las células tumorales son capaces de generar resistencia a múltiples fármacos a la mayoría de fármacos anti-cáncer. La resistencia al

tratamiento resulta de una variedad de factores incluyendo variaciones individuales y diferencias genéticas de células somáticas en tumores, incluso en el mismo tejido. (Bassiouni, 2012)

La utilización de las plantas contra el cáncer está en la base de muchos tratamientos que se utilizan en quimioterapia y en gran parte de la investigación actual en busca de nuevas moléculas contra el cáncer (Mazzio EA, 2009)

La búsqueda de agentes de origen vegetal contra el cáncer se inició en la década de 1950, cuando se llevó a cabo el descubrimiento y desarrollo de los alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina) y el aislamiento de podofilotoxinas citotóxicas (Gordon MC., 2005). Los primeros agentes introducidos en el uso clínico fueron los alcaloides de la vinca, vinblastina (VLB) y vincristina (VCR), aislados del *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae) (Gueritte F, 2005)

El paclitaxel, también llamado Taxol, fue aislado por primera vez de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae).

El uso de plantas medicinales en México se ha dado desde los tiempos prehispánicos, en donde las diferentes culturas de nuestro país utilizaban la flora medicinal para la restauración de la salud. Desde entonces se había adquirido un conocimiento sobre las plantas medicinales de forma empírica y esa información se transmitía de generación en generación. (Osborne J. , 1987)

México es un país con una gran diversidad en plantas entre ellas las medicinales, de las cuales se calcula que existen alrededor 5000 plantas medicinales. (Osborne J. , 1987) El estudio de la diversidad biológica de las plantas relacionadas con el uso tradicional como medicamentos, nos pueden ayudar a entender cómo actúan y de este modo asegurar su utilización en la exploración racional, debido a que las plantas medicinales siguen siendo culturalmente adecuados para el tratamiento de varias enfermedades, es importante documentar sus usos y realizar estudios sobre sus actividades farmacológicas para asegurar su eficacia y seguridad.

La utilización de plantas como fuentes de agentes terapéuticos para aislar compuestos bioactivos para uso directo como fármacos, por ejemplo: digoxina, morfina, reserpina, Taxol, vinblastina, vincristina.

La toxicidad de los fármacos quimioterapéuticos crea a veces un problema significativo en el tratamiento. Por lo tanto, se han propuesto varias terapias para el tratamiento del cáncer, muchas de las cuales utilizan productos derivados de plantas. En la actualidad existen cuatro clases de agentes anticancerosos derivados de plantas, los alcaloides derivados de la vinca (vinblastina. Vincristina y vindesina), y epipodofilotoxinas (etopósido y tenipósido), los taxanos (paclitaxel y docetaxel) y los derivados de camptotecina (camptotecina e irinotecan). Las plantas todavía tienen un enorme potencial para proporcionar nuevos fármacos y como tal son un depósito de productos químicos naturales que pueden proporcionar quimioprotector potencial contra el cáncer. (Desai, 2008)

3 *Justicia spicigera* Schlechtendal (Acanthaceae)



Justicia spicigera
Schlechtendal (Acanthaceae)
Foto: Brenda Peña Agüero, octubre
2010.

3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

3.1.1 Taxonomía

Justicia spicigera (muitle) es un arbusto que crece en México, América Central y algunas áreas de los Estados Unidos de América. Esta planta ha sido utilizada, desde tiempos prehispánicos, como un tinte para la artesanía y pinturas y en la medicina tradicional, no sólo en México sino también en Guatemala y en algunas áreas de los Estados Unidos de América. *Justicia spicigera* Schlechtendal (Muitle) es una planta medicinal integrante de la familia de las Acantáceas (*Acanthaceae*), familia que reúne 256 géneros y 2770 especies de zonas tropicales y subtropicales (Ghosal, 1979).

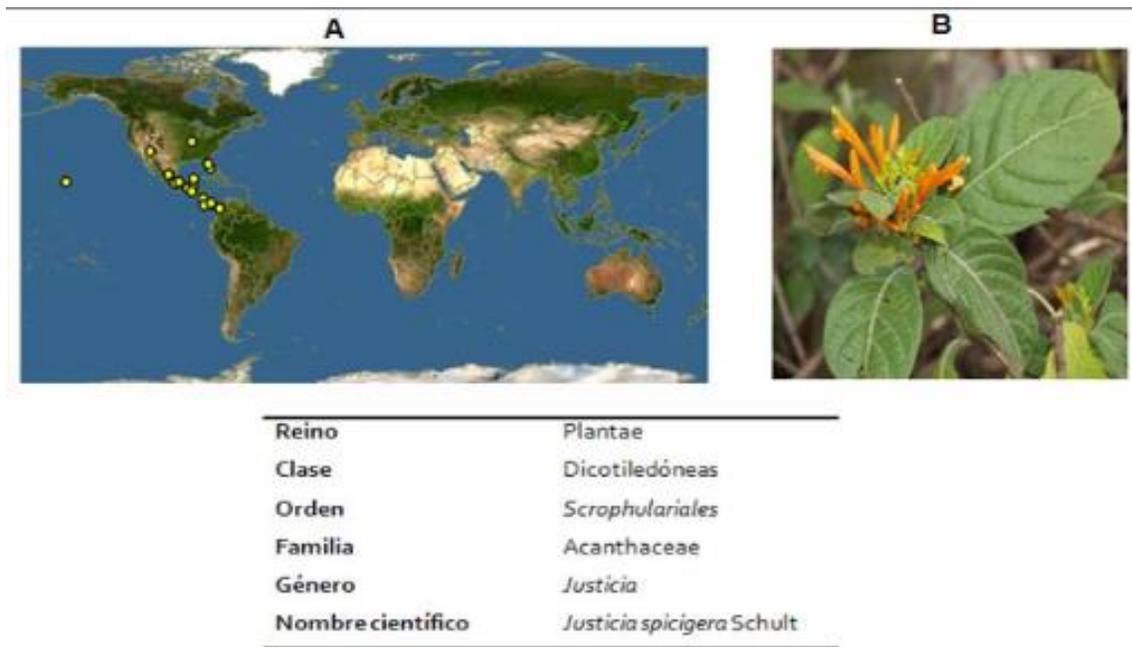
Es popularmente conocida con varios nombres: Chak lool, ts'i'its, get ink, bisil k'aax, cross k'aax tsiits, e ichkan en Maya, en la Península de Yucatán; andichkaan Caandathana en Popoluca en Veracruz; pasto y pasto índigo, en Oaxaca; charatzicua en Tarascan, Michoacán; micle, mohintle, mohintli y mohuite, en Hidalgo; moitli, mayotte, moyotli, mozote y muh, en la Huasteca, en San Luis Potosí; muicle, en Jalisco; muitle, trompeta, y pasto azul, en Veracruz, y tsi'is anduhaa-ink-Español en Zapoteco, en los estados de Oaxaca y México (Arellano, 2003).

La clasificación actual comprende 36 géneros y 27 especies también conocido como hierba del limalín, hierba azul, hierba tinta, mohuite o muicle (database, 2016).

3.2 Distribución geográfica

Justicia spicigera es una planta originaria de México, que crece en los Estados de Chiapas, Nayarit, San Luís Potosí, Valle de México, Veracruz, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán e Hidalgo (M M. , 1996). Se encuentra presente en diversos climas desde cálido, seco y templados a un nivel del mar hasta los 3000 m.

Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos (Callejo, 1996) y de igual forma crece en matorrales y bosques (Monrroy, 2007).



Reino	Plantae
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Scrophulariales
Familia	Acanthaceae
Género	<i>Justicia</i>
Nombre científico	<i>Justicia spicigera</i> Schult

Descripción taxonómica de *J. spicigera* y su distribución geográfica. A Distribución Geográfica. B Flor y Hojas. Tomado de IBUNAM y DiscoverLife

3.3 Fitoquímica y Farmacología

Existen varios informes publicados con respecto a la planta *Justicia spicigera*. Los investigadores han centrado la investigación en estudios farmacológicos debido al uso de esta planta en la medicina tradicional. Sin embargo, estudios fitoquímicos de *Justicia spicigera* no se han investigado a profundidad. Son diversos productos químicos encontrados en *Justicia spicigera*, tales como hidratos de carbono simples, mucílagos, pectinas, glucósidos, pigmentos, resinas, aceites esenciales y minerales (potasio, acetato de calcio y de oxalato, sulfato y cloruro de sodio). También se han encontrado compuestos fenólicos, desde el metabolismo secundario de la planta. (Osuna-Torres L, 2005)

Los flavonoides tales como Kaempferitrina, y triramósido y kaemferol se han aislado de las hojas y de los taninos de las flores (Osuna-Torres L, 2005).

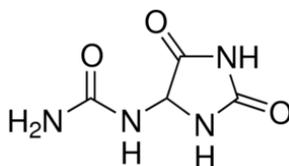
Sepúlveda *et al.*, 2009 (Sepúlveda G, 2009) reporta la actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y contenido total de flavonoides en tres órganos de la planta (tallos, hojas y flores), en dos tipos de extractos (acuoso y metanólico), evaluando la actividad antioxidante por el método de determinación de fenoles totales por Folin-Ciocalteu (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) y flavonoides totales por un método colorimétrico basado en el tricloruro de aluminio bajo condiciones ácidas. Valores bajos de IC50 (Índice de inhibición obtenida)

indican una alta actividad anti radical como fuente de actividad captadora del radical DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo).

Los resultados muestran que, para un mismo órgano de la planta, en diferente extracto (metanólico y acuoso) el orden de capacidad antioxidante y fenoles totales cambia drásticamente; extractos metanólicos poseen alta capacidad antioxidante (hojas \geq flores \geq tallos) que los extractos acuosos (tallos \geq flores \geq hojas). El contenido total de fenoles fue de 1.33 a 5.01g GAE/100 peso seco, para un mismo solvente donde la cantidad más alta fue encontrada en hojas y flores, el contenido de flavonoides entre 0.18-1.30 CE/100 peso seco. Valores reportados por otras especies de la familia (Acanthaceae) indican diferentes valores de capacidad antioxidante, fenoles totales y contenido de flavonoides dependiente de la especie de la planta y el extracto en el que se encuentra. Los extractos metanólicos de hojas de *J. spicigera* muestran actividad antioxidante con una IC50 de 48.86 μgml^{-1} siendo más alta que lo reportado para *Dicliptera verticillata* (IC50 785 $\mu\text{g/mL}^{-1}$). Resultados similares se mostraron en el contenido total de fenoles (5.01 g GAE/100g peso seco), siendo más alto en las flores comparado con otras plantas como *Dicliptera verticillata* (2.82 g GAE/100g peso seco).

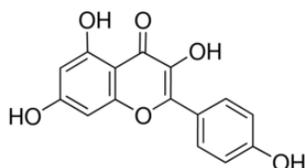
El estudio hace énfasis en la distribución diferente de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante encontrada en los órganos de la planta de *J. spicigera*, donde extractos metanólicos de las hojas poseen más alta capacidad antioxidante que los extractos metanólicos de tallos con alto contenido fenólico.

La planta produce metabolitos secundarios del tipo fenólico, como los taninos, lignanos, flavonoides y algunos compuestos fenólicos simples, estos son sintetizados primariamente por productos de la ruta del ácido shikimico, los cuales pudieran estar asociados a su propiedad curativa (M M. , 1996). En estudios se ha reportado en hojas de muitle, alantoina (compuesto nitrogenado derivado de las purinas), flavonoides como la kaempferitina y su bis-ramnósido kaempferol (Euler KL, 1982), terpenoides como el β - glucosil-O-sitosterol, y la criptoxantina (caroteno) (Dominguez X. , 1990). La alantoina es un producto del metabolismo de las purinas. Su principal efecto es ser fuerte estimulador de la proliferación celular y reconstrucción de tejido. Niveles de alantoina se han evaluado e indican que es un marcador sensitivo de estrés oxidativo como el glutatión y la cisteína (Yardim, 2004). En la industria cosmética, la alantoina tiene la ventaja de no ser toxica ni irritante a la piel ya que su uso es recomendado para el tratamiento de úlceras, heridas de curación lenta y utilizada en quemaduras como cicatrizante (©Merk 2010).



Estructura Química
Alantoina

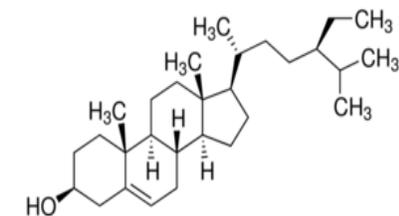
El Kaempferol es un flavonoide natural que se encuentra presente en algunas plantas, principalmente encontrado en té, brócoli y Ginkgo (Y, 2008); es un antioxidante potente que ayuda a prevenir el daño oxidativo de las células, lípidos y ADN, además de prevenir la arteriosclerosis (Watell, 2003). Se ha confirmado que el kaempferol actúa como agente quimiopreventivo, demostrando así ser el principal inhibidor de la formación de cáncer en las células (A). Estudios *In vitro* realizados por Kowaski et al., 2005 (Kowalski J, 2005) muestran que el kaempferol inhibe la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) la cual juega un papel importante en los inicios de la formación de la placa arterosclerótica; así mismo López-Sánchez et al., 2007 (López-Sánchez C, 2007) mencionan que el Kaempferol ayuda a prevenir la arteriosclerosis inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la formación de plaquetas en la sangre, también, a través de la captación de macrófagos de un compuesto oxidado (oxLDL). Zheng *et al.*, 2001 (Zheng W, 2001), demuestran que el kaempferol puede tener beneficios para las personas que tienen riesgo de cáncer, ya que en líneas celulares pancreáticas (MIA PaCa-2 y Panc-1) se muestra un efecto anti-cáncer, con el tratamiento con kaempferol por 4 días y se muestra MIA PaCa-2 con proliferación celular significativamente inhibida y proliferación de células Pancreaticas-1. Estudios realizados por Vivek *et al.*, 2008 (Vivek S, 2007) encuentran que el kaempferol induce apoptosis en células glioma (neoplasia que se produce en el cerebro espinal) por un elevado estrés intracelular (incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) acompañada con un decremento en agentes de actividad antioxidante (superóxido dismutasa (SOD-1) y tiorredoxina (TRX-1)).



**Estructura Química del
Kaempferol**

El β -sitosterol es el esteroles más abundante en las plantas y ampliamente distribuido. Este esteroles, relacionado estructuralmente con el colesterol, contiene un grupo β -etilo en el C-24 del esqueleto del colesterol, lo que lo hace más lipofílico. Desde los pasados 10 años el papel de los sitosteroles en la salud humana y de los animales ha sido establecido, dando énfasis, tanto *In vitro* como *In vivo*, en su actividad inmunológica y anti-inflamatoria (Garcia, 2008). Así mismo ha demostrado su efectividad clínica como agente capaz de disminuir los niveles de colesterol, así como en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (M B. , 1993). Prieto *et al.*, 2006 (Prieto JM, 2006) comprueban el efecto *In vivo* en ratas Wistar y ratones Swiss del β -sitosterol en un modelo de dermatitis de contacto por hipersensibilidad retardada (DTH) ensayado en modelos de liberación de eicosanoides en leucocitos polimorfonucleares de rata y plaquetas humanas estimuladas con ionóforo A23817 en incubaciones de 15 min. Obteniendo a las 24 enzimas implicadas en la iniciación del fenómeno inflamatorio (cascada del ácido araquidónico), indicando así, que este compuesto

puede modular el edema mediado por respuesta celular sin ningún efecto a corto plazo en la cascada del ácido araquidónico.



Estructura Química de β -sitosterol

Se han aislado de *J. spicigera* los flavonoides kaempferitrina, y su triramnósido (Euler K. &, 1982). Otros compuestos aislados son el β -sistosterol, el 3-O-glucósido de β -sistosterol, la alantoina, la criptaxantina y una antocianina muy polar que presenta el comportamiento fluorescente de las infusiones de esta planta (Dominguez, 1990). Anteriormente se mostró la presencia de kaempferitrina en extractos de etanol de *Justicia spicigera* (Euler K. A., 1982). En este estudio, se demostró que Kaempferitrina (KM) fue el compuesto más abundante en *J. spicigera* y que su contenido (12,75 mg / g) fue 2,3- veces y 5,9 veces más bajos que los reportados para las plantas medicinales *Hibiscus cannabinus* y *Cinnamomum osmophloeum*, respectivamente (Lin, 2011). Este estudio muestra que *Justicia spicigera* es una buena fuente de flavonoides kaempferitrin. Así, *Justicia spicigera* podría ser una buena fuente de fármacos anticancerosos, debido a su baja toxicidad, efectos antitumorales e inmunomoduladores.

Este arbusto posee escasa información sobre sus propiedades biológicas, a nivel extracto se ha comprobado sus actividades antimicrobianas y anti-protozoario. Extractos etanólicos de hojas de *Justicia spicigera* Schlecht muestran actividad contra el parásito *Giardia* al ser evaluados en medio TYL-S-33 usando tofozoides de *Giardia* donde cambios a nivel celular son observados (pérdida de tamaño, forma y daño en la estructura nuclear, así como rompimiento del nucleoesqueleto de las proteínas).

En el 2006 Macotela (Ponce-Macotela M, 1994) evaluó 14 extractos de plantas medicinales conocidas por sus propiedades (anti-diarreicas, anti-protozoarias) usando tofozoides de *Giardia* los cuales fueron incubados con los extractos de la plantas, la viabilidad de tofozoides fue determinada usando MTT(3-[4,5-dimetiltrazol-2-*i*]2,5) como prueba negativa (tofozoides con extracto de planta) y como control positivo (incubado con tinidazol), los resultados muestran que el orégano *Lipia berrabdieri* planta que se ha reportado ser potente contra tinidazol (droga utilizada contra protozoarios) muestra similares índices de mortalidad que *J. spicigera* (*J. spicigera*=91±0.5; *L. berrandieri*=90±0.6) siendo estos los dos mejores resultados anti-giardia. Cáceres, *et al.*, 2000 realizaron pruebas de citotoxicidad en extractos acuosos de *Justicia spicigera* en líneas de células leucémicas (TF1 TB1), carcinoma cervical (CALO, INBL) y células multipotentes hematopoyéticas 32D y fibroplastos normales (3T3) (como control).

Estudios previos revelan que el extracto acuoso de muile no muestra tener actividad hematopoyética *In vitro* tanto en progenitores hematopoyéticos de células humanas como de ratón, de lo anterior; estudios recientes revelan que extractos acuosos de *J. spicigera* inducen la apoptosis de líneas celulares leucémicas TF1 (control), pero no en la línea celular TB-1 transfectadas con el proto-oncogen bcl-2 (inhibidor de la apoptosis), entonces se demostró

que el efecto es dependiente a la dosis y en estrecha relación con el ciclo celular independiente del estado de transformación de las células (Cáceres Cortés, 2000). Experimentos adicionales a ello, con fibroblastos de ratón (3T3) y dos líneas celulares, carcinoma cervical CALO e INBL, las células presentan cuerpos apoptóticos que indica la principal de muerte por apoptosis, esto soporta la evidencia de que *Justicia spicigera* tiene actividad citotóxica por inducir muerte celular (Cáceres Cortés, 2000). En un estudio de extractos acuosos y etanólicos de las partes aéreas de *J. spicigera* y otras tres plantas medicinales (*Ibervillea sonora*, *Cucurbita ficifolia*, *T. lucida*) las cuales fueron ensayadas usando dos líneas celulares T47D (cáncer de seno) y Hela (cáncer cérvico) usando como control positivo la colchicina (fármaco antimitótico que inhibe la división celular en metafase o anafase) en los resultados todas presentaron inhibición de crecimiento del 50% (ED50) y citotoxicidad de (ED50 \leq 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1) a líneas celulares T47D y solo el extracto etanólico de *J. spicigera* mostró el mejor efecto citotóxico a Hela (cáncer cervicouterino) con una (ED50 5.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1) en comparación con las otras plantas *T. lucida* (ED50 \geq 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1) *I. sonora* (ED50 \geq 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1). Este estudio corrobora uno de sus populares usos para el tratamiento de cáncer (Gamborg, 1968).

Un estudio de toxicidad evaluado con *Artemia salina* (bioensayo usado ampliamente para monitorear la presencia toxica de componentes antitumorales) demostró alto potencial citotóxico con un valor de LC50 37.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 alrededor de lo que marca la literatura como potencialmente citotóxico LC50 37.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1. De *J. procumbes* usada en la medicina china para la fiebre y el cáncer, se han aislado dos lignanos (justicidina A) (con citotoxicidad KB = cáncer farolarinal) con DC50 \leq 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 (N). En *J. pectoralis* se han aislado lignanos (justicidina B) en extractos etanólicos mostrando actividad citotóxica *In vitro* 9PS (leucemia murino) en líneas celulares ED50 3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1, 9KB (ED50 7.3 x 10⁻² $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1) e inactiva a NSCLN6 (carcinoma bronquial en líneas celulares humanas) (HJ).

Kaempferitrina, (KM) induce apoptosis en células HeLa y actúa como agente quimiopreventivo ya que inhibe el crecimiento del tumor de estas células en el ratón desnudo (Alonso-Castro, Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera*, 2012), (Alonso-Castro, Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells, 2013). Se le atribuyen efectos antidiabéticos ya que incrementa la captación de glucosa en la célula (efecto insulino miméticos) (Ortiz-Andrade, 2012). En modelos *In vitro* estimula la función inmune de los macrófagos y células NK 132. Además, un estudio reciente sugiere que la Kaempferitrina ejerce un efecto tipo antidepresivo a través del sistema serotoninérgico.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama en México es un importante problema de Salud. El tratamiento de esta enfermedad depende de factores asociados al tipo tumoral, la localización del tumor, y el grado de diseminación del tumor (metástasis). En la mayoría de los casos la resección quirúrgica resulta efectiva para el tratamiento local mientras que la quimioterapia permite reducir el riesgo de recidivas. No obstante, muchas pacientes tienen reincidencias en sitios distantes como resultado de la propagación del tumor que no es detectado en el momento del tratamiento inicial. Existen muy pocas alternativas en el tratamiento químico terapéutico, sobre todo en el cáncer de tipo triple negativo. Por lo tanto, es imperativo la búsqueda de nuevos fármacos citotóxicos efectivos para diferentes líneas de cáncer de mama, que puedan representar en un futuro cercano, nuevos fármacos quimioterapéuticos. En el presente proyecto de investigación planteamos la realización de extractos estandarizados acuosos y alcohólicos de la planta medicinal *J. spicigera*, obtenidos bajo diferentes parámetros de extracción y su evaluación en dos diferentes líneas celulares de cáncer de mama.

5 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama, es el más común en las mujeres de todo el mundo. Debido a lo complicado que es la biología del cáncer, solo se cuentan con muy pocos fármacos en el mercado, uno de los más importantes, es el Taxol®, quimioterapia actual en todo el mundo, cuyo compuesto activo es el Paclitaxel, compuesto que se obtiene a partir de cultivo de células vegetales de la planta *Taxus brevifolia*.

Los tratamientos existentes suelen ser invasivos, dolorosos y llegan a presentar múltiples efectos adversos. Además, se presentan casos de resistencia a la quimioterapia y en casos como el cáncer triple negativo, no existe un agente quimioterapéutico, capaz de inhibirlo. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas farmacéuticas que puedan ayudar al tratamiento de esta enfermedad.

Debido a que la flora medicinal nos ofrece una variada alternativa en miles de compuestos naturales que aún no han sido evaluados, es una importante fuente de posibles nuevos fármacos antitumorales.

Es por ello que se plantea la evaluación y estandarización de extractos acuosos y alcohólicos de la planta medicinal *J. spicigera*, la cual se ha demostrado que ejerce cierto efecto en la inhibición de la propagación del cáncer de mama, pero en el presente protocolo, se plantea la estandarización de diferentes tipos de extractos, y la determinación de la efectividad sobre dos diferentes líneas celulares completamente distintas. Una dependiente de hormonas y una triple negativo.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Determinar la actividad de un extracto estandarizado de *Justicia spicigera* JSE1 sobre las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

6.2 Objetivos específicos

- Obtener diferentes tipos de extractos estandarizados de la planta *Justicia spicigera*.
- Determinar el efecto de los diferentes extractos sobre la viabilidad de las líneas tumorales MCF-7 Y MDA-MB-231.
- Analizar el efecto del extracto sobre la morfología celular de las líneas tumorales MCF-7 Y MDA-MB-231.
- Determinar la concentración del compuesto activo Kaempferitrina en el extracto de JSE1.

7 DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Colecta e identificación de la planta

Las hojas de *Justicia spicigera* fueron colectadas en Atlixco y la identificación se realizó por parte del herbario del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

7.2 Preparación del extracto

La preparación del extracto, es un paso muy importante para tener buenos resultados en la evaluación farmacológica, la extracción se llevó a cabo mediante la técnica de extracción exhaustiva en el equipo Soxhterm®. Se pesaron 10 g de hojas secas y trituradas que se repartieron en dos dedales de celulosa (Whatman) en cada dedal se colocaron 5 g de la planta. Se realizaron extracciones acuosas y etanólicas. Para la extracción se utilizó el programa Soxtherm Manager®, el cual se estabilizó con parámetros de extracción definidos para estos experimentos, como temperatura, impacto, evaporación. Después de realizarse la extracción, los extractos se llevaron a sequedad total en un rotaevaporador (Heildoph). Se pesó el extracto crudo y se realizó la resuspensión en el solvente de origen. El peso crudo fue muy importante, ya que con ello se obtuvo la concentración con la cual se realizaron las pruebas. El residuo o extracto crudo se reconstituyó con agua estéril a una concentración 1:10 (P/V).

Posteriormente se realizó sedimentación y filtraciones en membrana de 0.2µ dentro de la campana de flujo laminar.

7.3 Materiales y Reactivos

7.3.1 Cultivo celular.

El manejo de células se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar bajo buenas prácticas de laboratorio.

Se utilizaron dos líneas celulares humanas de cáncer de mama: MDA-MB-231 triple negativo (ER, PR y HER negativo) y MCF-7 doble positivo (ER y PR positivo), las líneas se obtuvieron por parte de la Doctora Paola Maycotte González. Investigadora Cátedras CONACYT, SNI: NIVEL I

Las líneas celulares se cultivaron con el medio correspondiente, las células de la línea celular MCF-7 se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 5 g/L de glucosa y L-glutamina, sin piruvato, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico e incubadas a 37°C con 5% de CO₂.

Y la línea celular MDA-MB-231 se cultivó en medio F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. El medio de cultivo de las líneas celulares se cambió cada 2-3 días.

7.4 Procedimiento de proliferación celular en las células MCF-7(+RE) Y MDA-MB-231 (triple-).

Este procedimiento se realizó para mantener las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231, cuando las células llegaron a un nivel de confluencia de aproximadamente el 80% de proliferación, la renovación de medio se llevó a cabo de 2 a 3 días, aunque la confluencia no fue mayor al 80% de proliferación. Para la proliferación se requirió primeramente el retirar y desechar el medio de cultivo anterior (las células vivas permanecieron adheridas a la caja de cultivo), y al ser lavadas con una solución de PBS, las células muertas fueron eliminadas junto con otros residuos.

Posteriormente se añadieron 500µL de tripsina-EDTA a la caja de cultivo y se incubaron durante 5 minutos a 37°C en 5% de CO₂, lográndose observar en un microscopio invertido, cuando las células se despegaron de la caja, se agregó medio con suero para la inactivación de la tripsina-EDTA.

Se realizó la aspiración con una pipeta Pasteur, y la suspensión se colocó en nuevos tubos Eppendorf de 1.5 mL, en donde se realizó una centrifugación para formar una pastilla de células al fondo del tubo. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en medio F-12, y MEM, se realizó un conteo celular con una cámara de Neubauer. En donde se realizaron diluciones para sembrar en placas de 96 pozos (Corning Inc. Costar®). Posteriormente se incubaron 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5 % de CO₂ para permitir su adherencia. Pasadas las 24 horas se aplicaron los extractos realizados a diferentes temperaturas con una sola concentración de 100 µL, esto para determinar cuál extracto es el que ejerce efecto sobre las líneas tumorales. Se utilizó el equipo IncuCyte® que hace un análisis en tiempo real, programando el software con un tiempo establecido, y con los requerimientos necesarios para cada uno de los experimentos.

Se dejaron los extractos por 48 horas y se aplicó yoduro de propidio para la determinación de muerte celular.

7.5 Detección de Kaempferitina por HPLC

La detección y la cuantificación de kaempferitina se realizó mediante un sistema de high performance liquid chromatography (HPLC) de fase inversa. Con un equipo 2795 (Waters Corp., Milford, MA, EUA), equipado con una bomba cuaternaria y un automuestreador. El sistema de detección fue de diodos y se utilizó un sistema software fue un Millennium 32 para la identificación e integración de las conversiones. La columna fue Kromasil C-18 con una longitud de 150 X 4.6 mm y de diámetro interno y de 0.45 mm tamaño de partícula (Metachem Technologies Inc) con un volumen de inyección de 5 mL, y un flujo de 0.4 mL / min. La fase móvil fue agua: ácido acético (grado HPLC Merck Dormstadt, Alemania) en 2% de agua y acetonitrilo (Merck, Dormstadt, Alemania HPLC grade), con un gradiente % B 10 a 70 en 20 min. Los tiempos de retención de los picos de radiación ultravioleta (UV) fueron comparados con los tiempos de retención de los estándares inyectados previamente. La calibración fue obtenida con concentraciones de 124 a 496 mg/mL. La concentración de kaempferitina en los extractos fue calculada con estas calibraciones. El máximo de absorbancia fue de 260 nm con tiempos de retención e 10.54 min

7.6 RESULTADOS

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de los extractos etanólicos y acuosos de la planta *Justicia spicigera*, sobre la proliferación y la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 Y MDA-MB-231. Dichos extractos fueron obtenidos de la extracción en el equipo Soxtherm® con etanol y agua a tres diferentes temperaturas, para determinar la efectividad biológica y las diferencias de actividad entre los dos tipos de solvente

En la extracción exhaustiva que se realizó en el equipo Soxtherm® los pesos crudos obtenidos (Tabla 2) tanto acuosos como etanólicos, dieron un rendimiento alrededor de 2 mg. Estos datos son importantes para determinar la concentración que se evaluará en las pruebas *in vitro*

TABLA2. Pesos crudos de extractos de *Justicia spicigera* a diferentes temperaturas de extracción

Solvente	60° C	80° C	100° C
Etanol	2.4 mg	2.25 mg	2.1 mg
Agua	1.53 mg	2.21 mg	1.6 mg

En los ensayos de morfología realizados se encontró que el extracto acuoso y etanólico de la planta *Justicia spicigera* afectan la proliferación celular, pero no la viabilidad de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, presentan una disminución en cuanto a la confluencia de las células, todas estas ya presentadas con los extractos etanólicos y acuosos a diferentes temperaturas y misma concentración.

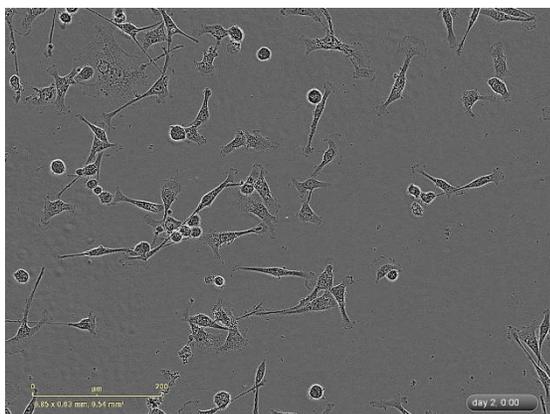


Ilustración 1 Línea Celular MDA-MB-231
Extracto Etanólico 60° C

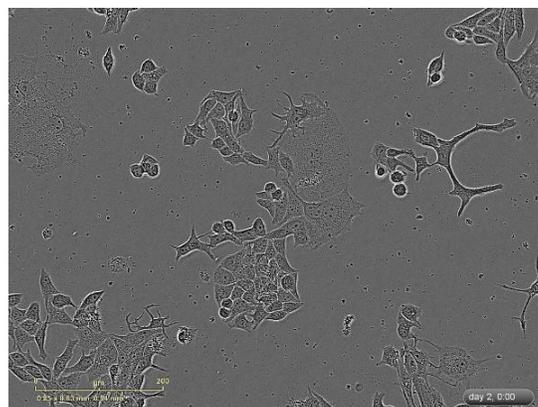


Ilustración 4 Línea Celular MCF-7 Extracto Etanólico 60° C

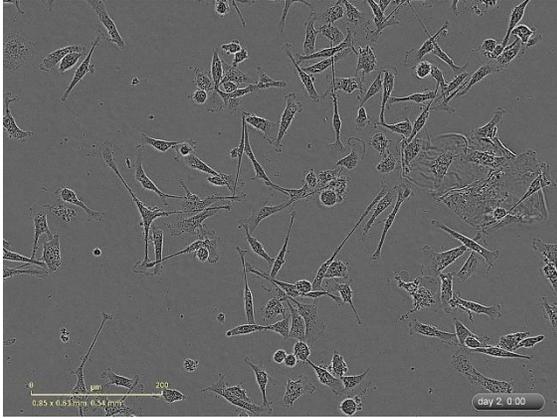


Ilustración 2 Línea Celular MDA-MB-231 con extracto Etanólico 80°C

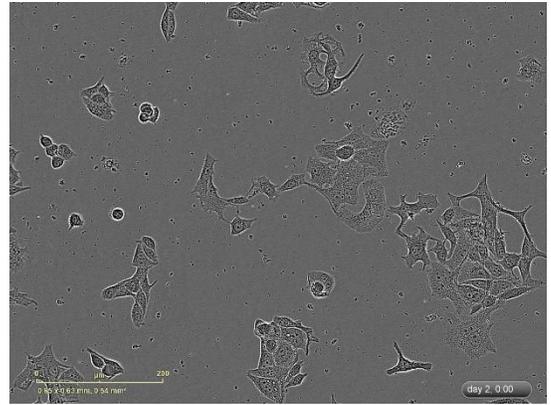


Ilustración 5 Línea Celular MCF-7 Extracto Etanólico 80° C

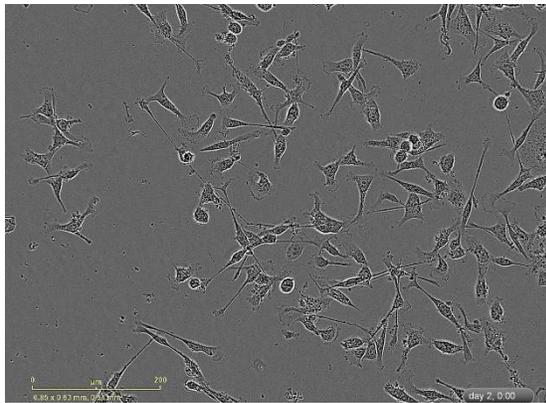


Ilustración 3 Línea Celular MDA-MB-231 con Extracto Etanólico 100° C

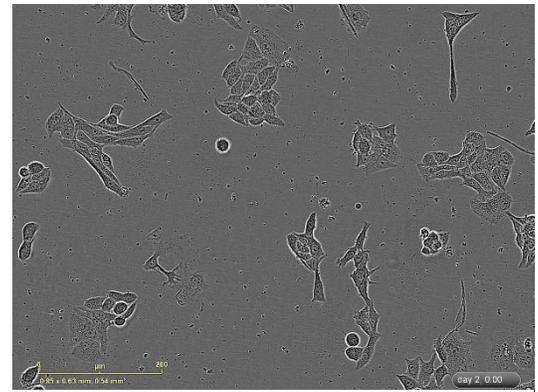


Ilustración 6 Línea Celular MCF-7 Extracto Etanólico 100° C

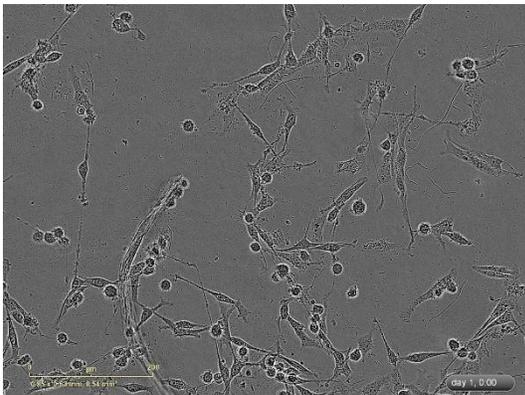


Ilustración 7 Línea Celular MDA-MB-231 Extracto Acuoso 60°C

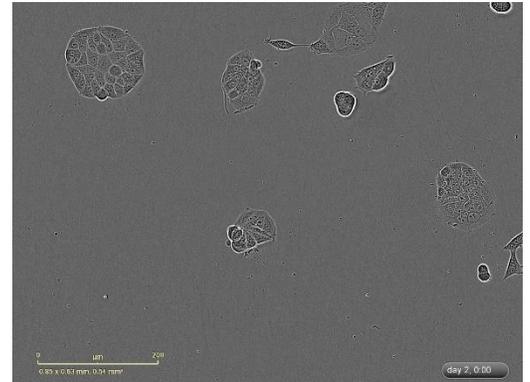
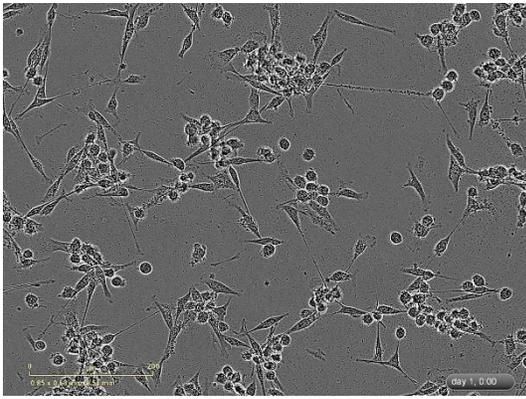
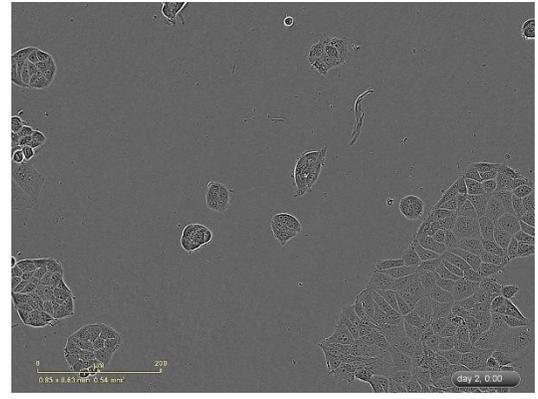


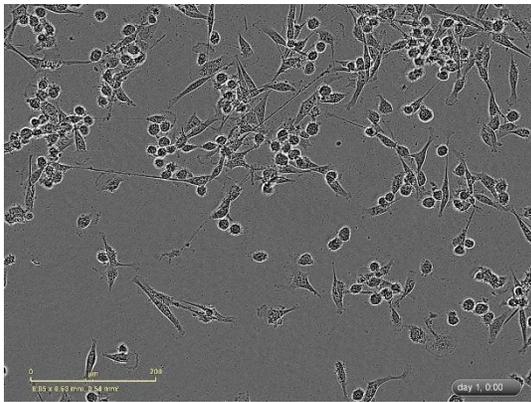
Ilustración 11 Línea Celular MCF-7 Extracto Acuoso 60° C



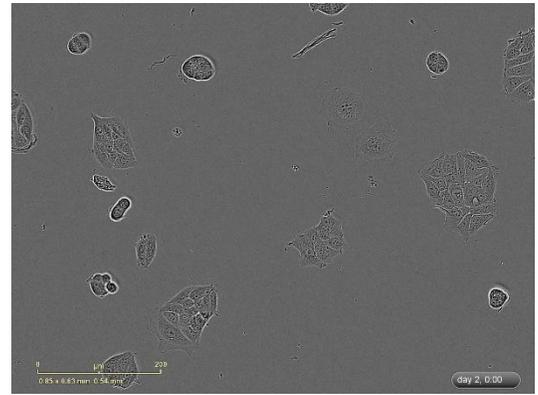
**Ilustración 8 Línea Celular MDA-MB-231
Extracto Acuoso 80°C**



**Ilustración 12 Línea Celular MCF-7 Extracto
Acuoso 80°C**



**Ilustración 9 Línea Celular MDA-MB-231
Extracto Acuoso 100°C**

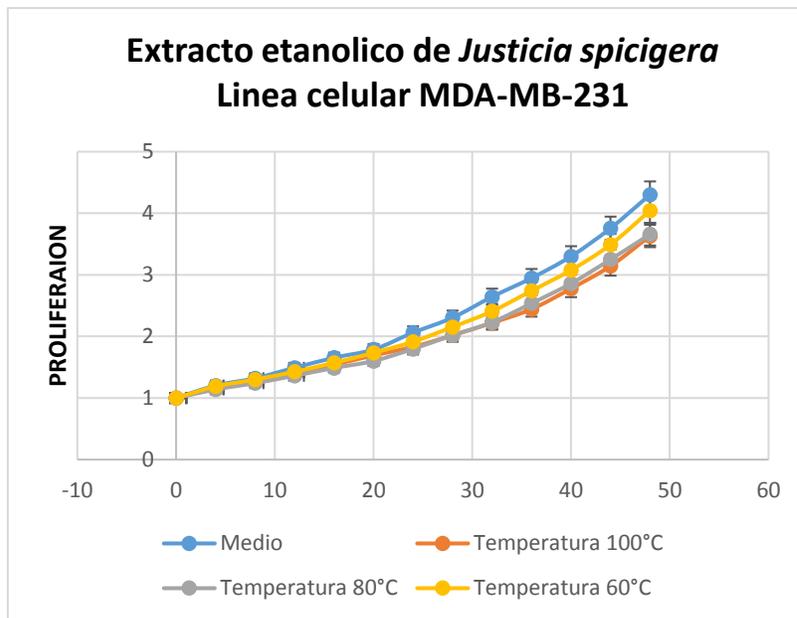


**Ilustración 13 Línea Celular MCF-7 Extracto
Acuoso 100°C**

Los resultados aquí mostrados sugieren una actividad antiproliferativa como principal mecanismo de acción del extracto, pues este actúa en contra del crecimiento y división de las células.

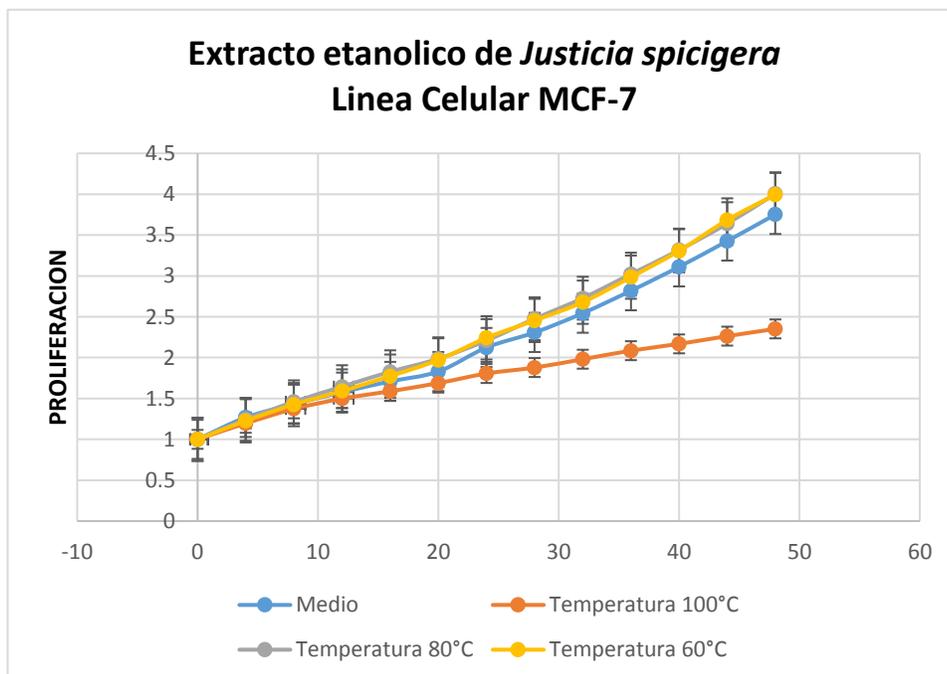
Son necesarios más estudios para determinar el mecanismo molecular por el cual los extractos etanólicos y acuosos de *J. spicigera* inducen la inhibición del crecimiento en estas células y su posible participación en la regulación de las proteínas implicadas en el control del ciclo celular; además de evaluar su efectividad en otras líneas celulares de cáncer y su capacidad tóxica en células no cancerosas, así como también la actividad biológica en modelos de cáncer *In vivo*.

En los ensayos de proliferación celular realizados en el equipo IncuCyte®, se encontró (Grafica 1) que en el extracto etanólico de *Justicia spicigera* en la línea celular MDA-MB-231, las temperaturas de extracción etanólica, no actúan de diferente forma debido a que no hay una diferencia significativa en la proliferación celular pues no se ve diferencias significativas entre uno y otro.



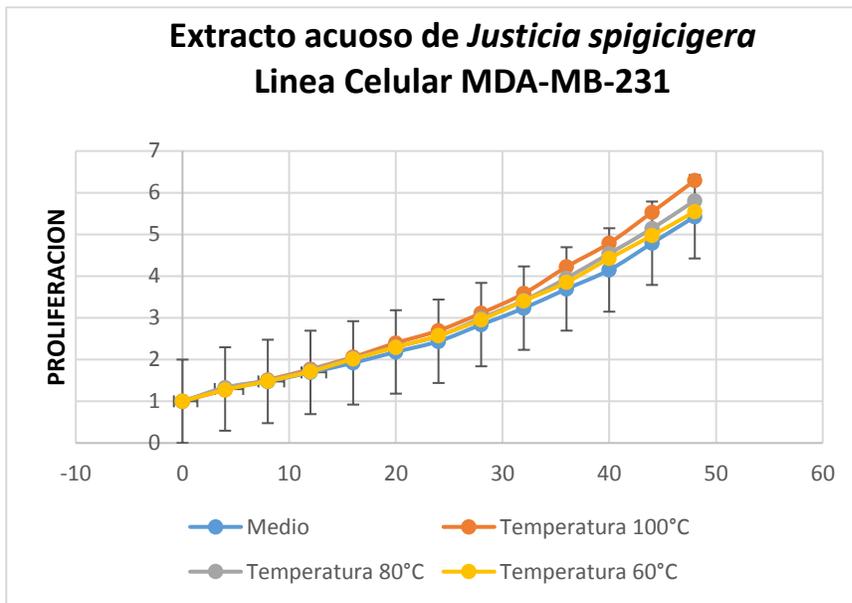
Grafica 1 Ensayo de Proliferación Celular en línea MDA-MB-231 Extracto Etanólico de *Justicia spicigera*.

El ensayo de proliferación celular (Grafica 2) del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en la línea celular MCF-7 mostró que, a una temperatura de 100°C, la proliferación celular disminuyó notablemente comparándose contra el control.



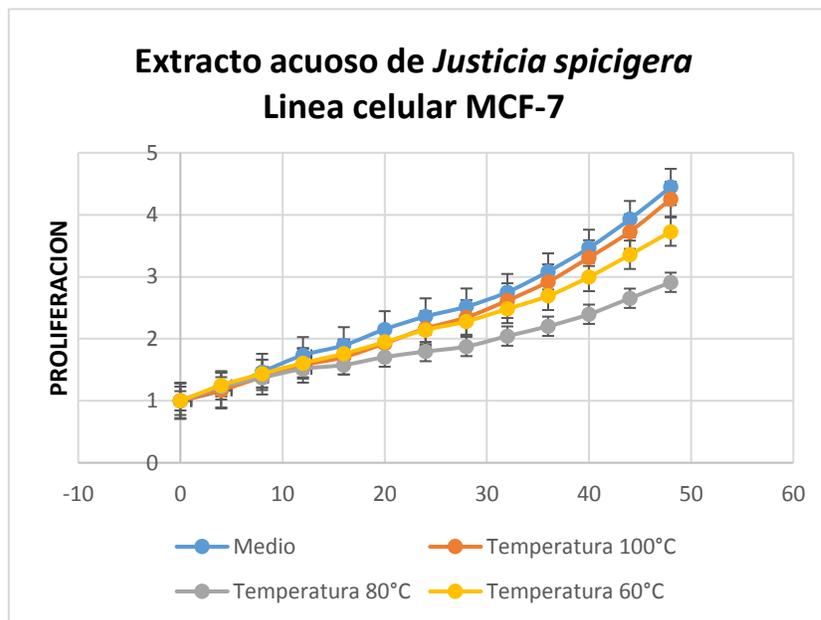
Grafica 2 Ensayo de Proliferación Celular en línea MCF-7. Extracto Etanólico de *Justicia spicigera*.

Continuando con los ensayos de proliferación se muestra (Grafica 3) que en el extracto acuoso de *Justicia spicigera* en la línea celular MDA-MB-231, no existe una diferencia significativa contra el control como ocurre con el extracto etanólico en la línea MCF-7.



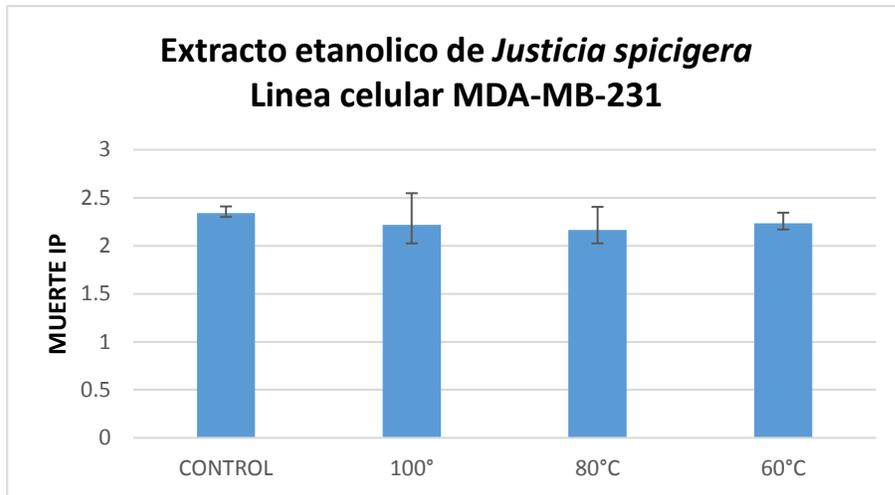
Grafica 3 Ensayo de Proliferación Celular en línea MDA-MB-231. Extracto Acuoso de *Justicia spicigera*.

En el ensayo de proliferación celular (Grafica 5) con extracto acuoso de *Justicia spicigera* en la línea celular MCF-7 cabe destacar que la temperatura favorable fue la de 80°C puesto que se nota gran diferencia entre las otras temperaturas de que la proliferación fue menor que, en el control, y con una mejor actividad que los extractos a las otras temperaturas. Por lo tanto, la temperatura de extracción es muy importante, y se deduce que los metabolitos que se están extrayendo son diferentes entre las tres diferentes extracciones.



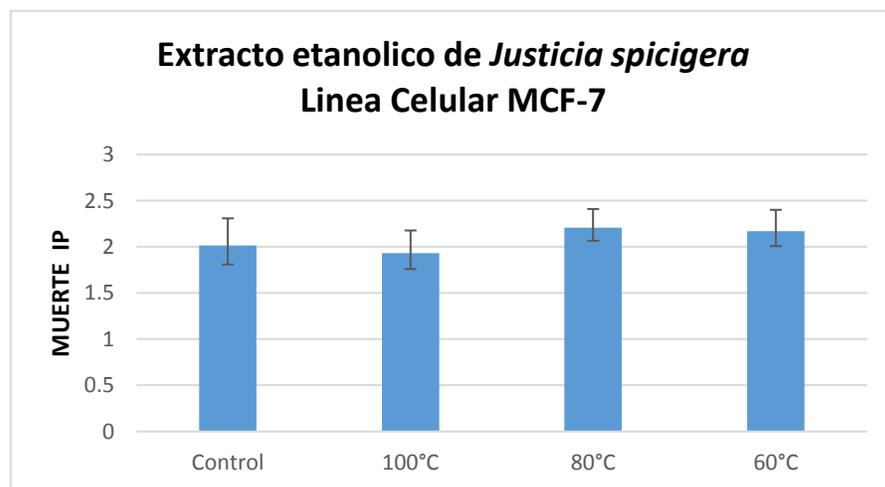
Grafica 5 Ensayo de Proliferación Celular en línea MCF-7. Extracto Acuoso de *Justicia spicigera*.

La viabilidad celular es un estudio importante para saber si las concentraciones manejadas en las pruebas biológicas, así como el tipo de extractos son seguras y en cuanto ejercen la citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer frente al control. En cuanto a los datos que se muestran (Grafica 6) en el ensayo de viabilidad celular con extracto etanólico de *Justicia spicigera* en la línea celular MDA-MB-231 se hace notar cambios en las temperaturas de 100° C y 80° C, puesto que no hubo muerte celular solo se nota un retraso en cuanto a crecimiento.



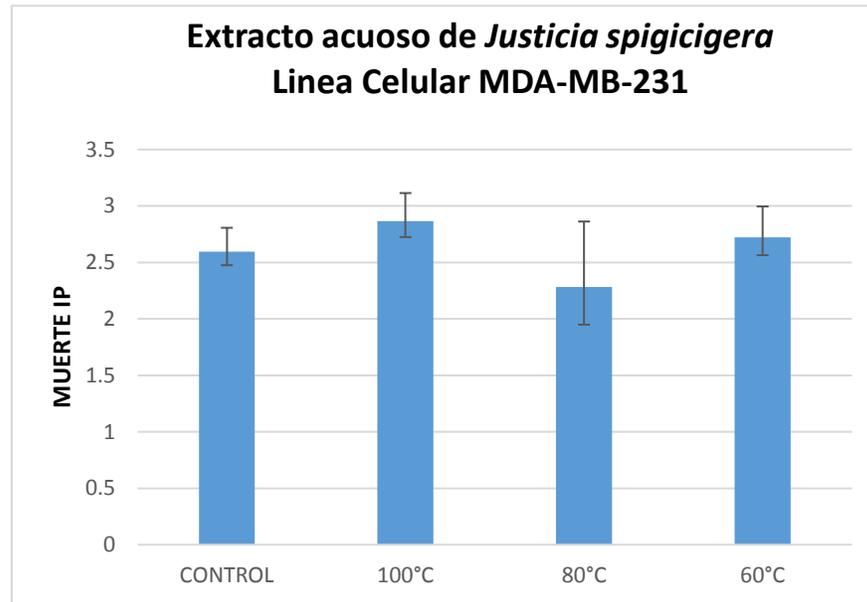
Grafica 6 Ensayo de Viabilidad Celular en línea MDA-MB-231. Extracto etanólico de *Justicia spicigera*.

En el ensayo de viabilidad celular (Grafica 7) con extracto etanólico de *Justicia spicigera* en la línea celular MCF-7 cabe destacar que en la temperatura de 100° C hubo una leve disminución en la viabilidad celular MCF-7 en donde las células crecieron lentamente.



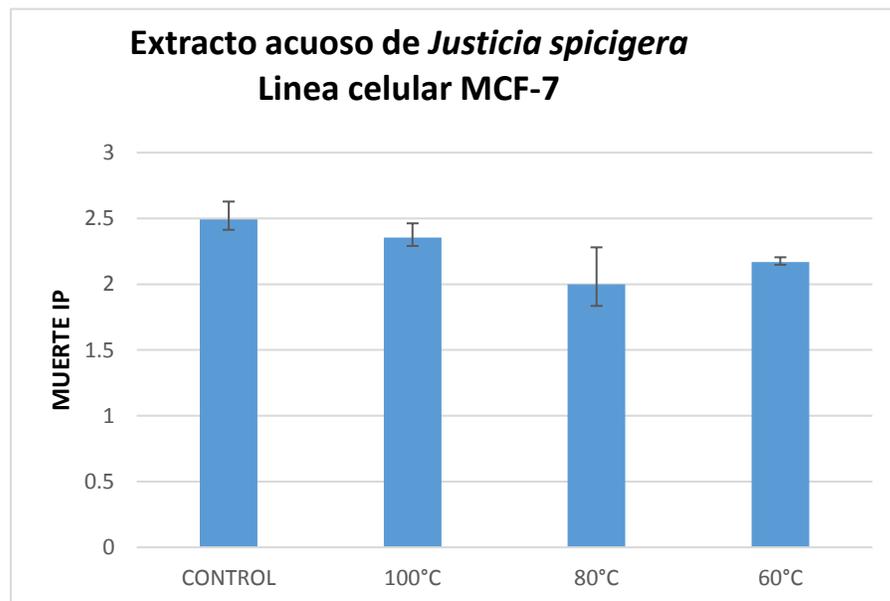
Grafica 7 Ensayo de Viabilidad Celular en línea MCF-7. Extracto etanólico de *Justicia spicigera*.

Los datos mostrados en (Grafica 8) del ensayo de viabilidad celular con extracto acuoso de *Justicia spicigera* en la línea celular MDA-MB-231 podría concluirse que en la temperatura de 80° C existe una disminución en cuanto a crecimiento celular. Este dato sería de gran importancia puesto que se trata de una línea celular triple negativo.



Grafica 8 Ensayo de Viabilidad Celular en línea MDA-MB-231. Extracto Acuoso de *Justicia spicigera*.

En el ensayo de viabilidad celular (Grafica 9) con extracto acuoso de *Justicia spicigera* en la línea celular MCF-7 cabe destacar que en la temperatura de 80° C hubo una diferencia ya que se nota que si hubo muerte celular.



Grafica 9 Ensayo de Viabilidad Celular en línea MCF-7. Extracto Acuoso de *Justicia spicigera*.

La concentración de kaempferitrina en el extracto fue de 0.57 miligramos por cada gramo de planta, según el estudio de áreas que se hizo del cromatograma de identificación obtenido en el sistema HPLC

En el Cromatograma (Ilustración 14) se observa, el tiempo de retención de kaempferitrina al minuto 15.3 , y se confirmó con el espectro UV del estándar (Sigma) el cual tiene un tiene dos picos máximos, a 263.2 y 342.1 nm.

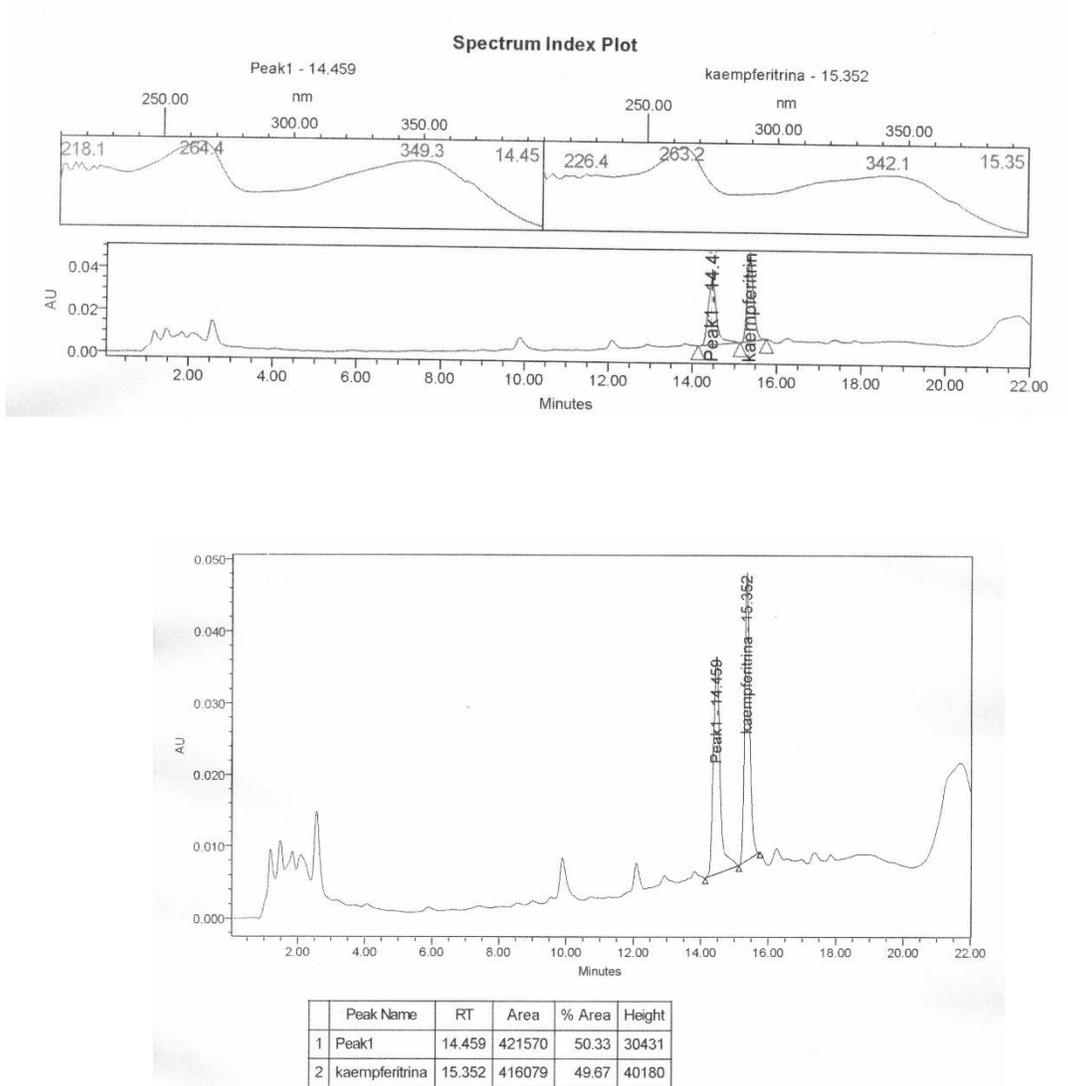


Ilustración 14 Cromatograma *Justicia spicigera*

CONCLUSIONES

El presente trabajo respalda la posible actividad anticancerígena de los extractos de *Justicia spicigera* previamente reportada, mostrando que los extractos etanólicos y acuosos de esta planta actúan como un agente citostático sobre las células de cáncer de mama sin afectar su viabilidad.

Haciendo la comparación de las dos líneas celulares trabajadas en este proyecto nos damos cuenta que si existen diferencias sobre la actividad de la planta en las dos líneas celulares de cáncer de mama. Al parecer, los extractos acuosos y etanólicos inhiben más la proliferación celular en las líneas receptoras de hormonas MCF-7 que sobre la triple negativo MDA-MB-231.

Es definitorio, que la temperatura de extracción es importante para la actividad biológica buscada, ya que los extractos etanólicos a 100°C disminuyen la proliferación celular y el extracto acuoso a 80°C, también lo hace, ambos sólo sobre la línea receptora de estrógenos MCF-7. Esta era una de los objetivos que se planteaban. Definir el tipo de extracto y temperatura, así como la línea celular en el cuál la planta ejercía su mejor actividad.

La proliferación celular es un proceso cuidadosamente regulado que responde a necesidades específicas del organismo, es decir el incremento del número de células por división celular. Esta es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo, es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos. Por otro lado la citotoxicidad es el daño celular provocado por la acción de anticuerpos específicos o por células citotóxicas.

En el presente trabajo de investigación sabemos que tenemos presente Kaempferitrina en una concentración de 0.57 miligramos/gramo de planta

Se ha reportado que este compuesto ejerce una actividad citotóxica y antitumoral, en un estudio se detectó que inducía apoptosis en células HeLa ya que este compuesto actuaba como agente quimiopreventivo pues inhibía el crecimiento del tumor en los ratones desnudos.

Futuros estudios son necesarios para determinar otros compuestos químicos presentes en el extracto etanólico a 100°C y acuoso a 80°C, así como esclarecer el mecanismo molecular por el cual ejercen sus propiedades anticancerígenas en las células de cáncer de mama.

REFERENCIAS

- .Domínguez XA, A. H.-D. (1990). Estudio químico del "muitle" (*Justicia spicigera*). *Revista Química Latinoamericana*, 21: 142-143.
- A, W. (s.f.). Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin accumulated human breast cancer cells, by high-liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 328-333.
- Alonso-Castro, A. e. (2012). Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera*. *Journal of ethnopharmacology*, 888-894.
- Alonso-Castro, A. e. (2013). Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells. *Journal of ethnopharmacology*, 476-489.
- Andrade-Cetto A, & H. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*, 99:325-348.
- Arellano, L. (2003). Gamma diversity. Derived and a determinant of alpha diversity and beta diversity an analysis of three tropical landscapes. En *Acta Zool* (págs. 90:27-76). Mexico.
- Argueta, A. C. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. *Instituto Nacional Indigenista (INI)*, I,II,III.
- Bassiouni, Y. &. (2012). Nanocarrier-Based Drugs: The Future Promise for Treatment of Breast Cancer. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* , 05(02), 225-232.
- BreastCancer. (23 de Junio de 2015). *BreastCancer.org*. Recuperado el 21 de Septiembre de 2018, de <https://www.breastcancer.org/es/tratamiento/quimioterapia/medicamentos>
- C, A. (2007). Gene expression profiles for therapeutic decisions in breast cancer. *Med. Chile*, 257-263.
- Cáceres Cortés, B. M. (2000). La citotoxicidad in vitro de *Justicia spigera*("muitle") en líneas celulares hematopoyéticas y no hematopoyéticas E3 dependiente del ciclo celular. En *Gaceta Médica México* 136 (págs. 175-178).
- Callejo, J. (1996). *La historia oculta del mundo vegetal*. Madrid, España.
- Chariandy. (1999). Screening of medicinal plants for Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Chavez, K. J. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *National Institute of Health*, 1-2(32), 35-48.
- Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. (2012). *Network, Cancer Genome Atlas*, 490(7418): 61-70.
- database, P. (15 de Diciembre de 2016). *Natural Resources Conservation Service. USDA (United States Department of*. Obtenido de <http://plants.usda.gov/java/nameSearch?keywordquery=justicia+spicigera&mode=sci> nam
- Desai, A. g. (2008). Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. *National Institutes of health*, 581-591.
- Domchek S, e. a. (2003). Application of breast cancer risk prediction models in clinical practice. *Journal of Clinical Oncology*, 593-601.

- Dominguez. (1990). Estudio químico del muitle (*Justicia spicigera*). *Revista Latinoamericana de Química* 21, 142-143.
- Dominguez, X. (1990). Estudio químico del "muitle" (*Justicia spicigera*). *Revista Quimica Latinoamericana*, 21: 142-143.
- ESMO . (2013). Recuperado el 14 de Marzo de 2018, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272011000200008
- Euler KL, A. M. (1982). Insolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera* . *Journal Of Natural Products* , 220-221.
- Euler KL., A. M. (1982). Isolation of Kaempferitrin forma *Justicia spicigera*. 45:220-222.
- Euler, K. &. (1982). Isolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural*, 220-221.
- Euler, K. A. (1982). Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of natural products*, 220-221.
- Freshney, R. (2000). Culture of animal cell. En *A manual of basic technique*. New York.
- Gamborg, O. (1968). *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. Berlin.
- Garcia, E. (2008). *Protección y estabilización de compuestos fenólicos obtenidos a partir de muicle (Justicia spicigera) por medio de su interacción intermolecular con proteína de soya* . Mexico.DF.
- García, H. S. (1996). Medicina maya tradicional. Confron- tación con el sistema conceptual chino.
- Ghosal, S. (1979). Simplexolin a new lignan from *Justicia simplex*. *Phytochemistry* 18, 503-505.
- Gordon MC., D. J. (2005). Plants as a source of anticancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* , 100.
- Gueritte F, F. J. (2005). The vinca alkaloids. In *Anticancer Agents from Natural Products* .
- Hardisson, D. (16 de Junio de 2015). *Patología Quirúrgica*. Recuperado el 23 de Marzo de 2017, de http://www.conganat.org/10congreso/trabajo.asp?id_trabajo=1984&tipo=1#Nuevos
- Hengge, U. (2008). Role of viruses in the development of squamous cell cancer and melanoma. En *Advances in experimental medicine and biology* (pág. 624).
- Herrera- Mata, H. (2002). Biological activity of "Sanginaria" (*Justicia secunda*) extracts . *Pharmaceutical Biology*, 206-212.
- Herrera-Arellano A, .. J.-D.-Á.-N. (2009). Uso de terapias alternativa/complementaria en pacientes seropositivos a VIH. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 47(6):651-658.
- HJ, J. (s.f.). Justicidin B, a cytotoxic principle from *Justicia pectoralis*. *Journal of natural products* , 599-600.
- HTB-26TM), M.-M.-2. (. (2014). *American Type Culture Collection*. Recuperado el 7 de Julio de 2017, de <http://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#characteristics>
- Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. (s.f.). *The Journal of Clinical Investigation*, 12.
- INC., C. B. (2016). *Obtenido de MDA-MB-231/GFP Cell Line*:. Recuperado el 26 de Octubre de 2017, de <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-201-gpf+mda-mb-231-cell-line.pdf>
- INEGI. (2016). Estadísticas a proposito del dia mundial de la lucha contra el cancer de mama. Mexico.

- JORDA, L. S. (1997). *MCF-7: The First Hormonerresponsive responsive Breast Cancer Cell Line*. Chicago.
- Kowalski J, S. A. (2005). Effect of kaempferol on the production and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in 1774.2 macrophages. *Pharmacological Reports*, 57: 107-112.
- Lee, A. V. (2015). MCF-7 Cells-Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Natl Cancer Inst*, 107.
- Lin, T. L. (2011). Antidyslipidemic activity of hotwater extracts from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. *Phytotherapy Research*, 1317-1322.
- Livasy CA, K. G. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 264-271.
- López-Sánchez C, M.-R. F.-S.-A.-M. (2007). Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion-induced damage in at brain. *Brain Research* , 1182:123-137.
- M, B. (1993). Treat-ment of several familial hipercolesterolemias in lingchildhood with sitosterol and sitostanol. *Journal of Pediatrics* , 122:292-296.
- M, M. (1996). En *Plantas medicinales mexicanas*. Mexico, DF: Botas.
- Mazzio EA, S. K. (2009). In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. . *Phytother Res*, 3, 385-398.
- Medlineplus. (s.f.). (Cancer de mama) Recuperado el 30 de Junio de 2017, de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000913.htm>
- Monroy, C. O. (2007). En *Plantas medicinales en el estado de Morelos* (pág. 39). 2a. edicion.
- Morgan, S. &. (1995). *Cultivo de células animales*. España: Acrabia.
- N, F. (s.f.). Antitumor agents, 81. Justicidin-A and diphyllin, two cytotoxic principles from *Justicia procumbens* . *Journal of Natural Products* , 348-350.
- Organizacion Mundial de la Salud. (s.f.). Recuperado el 05 de Julio de 2017, de <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- Organización Mundial de la Salud, OMS. (Febrero de 2014). Recuperado el Noviembre de 2018, de <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>>.
- Ortiz-Andrade, R. e. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schldl (Acanthaceae). *Journal of ethnopharmacology* 143, 455-462.
- Osborne, J. (1987). Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast cancer research and treatment*, 111-128.
- Osborne, K. &. (2013). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *National Institutes of Health*, 233-247.
- Osborne, K. H. (1987). Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. En *Breast Cancer Research and Treatment* (págs. 111-128).
- Osuna-Torres L, T.-P. M.-C. (2005). *Justicia spicigera* Schldl.(Acanthaceae). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Barcelona, España: Publicacions Edicions de la Universitat de.
- Pérez, e. a. (s.f.). Diagnóstico histopatológico y factores pronósticos en cáncer infiltrante de glándula mamaria. *Cancerologia*, 3.
- Ponce-Macotela M, N.-A. I.-G.-C. (1994). In vitro effect against *Giardia* of 14 plants extracts. *Revista Investigación Clínica* 46, 343-347.

- Prieto JM, R. M. (2006). Anti-inflammatory activity of β -sitosterol in a model of ozazolone induced contact-delayed-type-hypersensitivity. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 57-62.
- quality, E. A. (2001). MedlinePlus. *Cancer de mama*. Obtenido de <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000913.htm>
- Salud, S. d., & Epidemiología, S. d. (2011). SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México.
- Sepúlveda G, R. C. (2009). Antioxidant activity and content of phenolic and flavonoids from *Justicia spicigera*. *Journal of Biological Sciences*, 629-632.
- SR Morris, C. L. (2007). Gene Expression profiling in Breast Cancer. *Curr Opin Oncol*, 547-551.
- Thomas, D. (2004). Further range extensions of Mexican Acanthaceae. *Polibotanica*, 1-12.
- Tomao F, P. A. (2015). Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *OncoTargets and therapy*., 177-193.
- Vega-Ávila E, E.-S. A.-A.-L. (2009). Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 52:78-82.
- Vivek S, J. C. (2007). Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Molecular Cancer Therapeutics*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6: 2544-2553.
- W. Stewart, B. &. (2014). *World Cancer Report*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Walboomers, J. e. (s.f.). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical. *The Journal of pathology*, 189.
- Watell, A. (2003). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology*, 65:35-42.
- Wiley, J. (2000). Recuperado el 30 de Junio de 2017, de <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/staging-spanish#q7>.
- Wiley., J. (2000). Recuperado el 5 de Julio de 2017, de <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/staging-spanish#q7>.
- World Health, O. (2013). *World Health Organization*. Recuperado el 14 de marzo de 2018, de <http://www.who.int/topics/cancer/en/>
- World Health, o. (2016). *World Health Organization*. Recuperado el 14 de Marzo de 2018, de <http://www.who.int/topics/cancer/en/>
- X, L.-L. (1994). Plantas, medicina y poder: breve historia de la herbolaria mexicana. *Procuraduría Federal del Consumidor*, 176.
- Y, Z. (2008). Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cells proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer celss. *Journal of Surgical Research*, 17-23.
- Yardim, S. (2004). Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allantoin a Marker of Oxidative Stress. *Free Radical Research*, 623-628.
- Zheng W, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49 :(11).
- Zimerman JR, H. G. (2003). *Cáncer de Mama localmente avanzado- E III*.