

Escuela de
Obstetricia y
Puericultura
Casa Central

**EFFECTO DE *SKYTANTHUS ACUTUS* SOBRE LA VIABILIDAD EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.**

Tesis para optar el Grado de Licenciado/a en Obstetricia y Puericultura.

Profesor Guía: Dr. Joan Villena García.

Estudiantes:

Bárbara Gamboa Guzmán.

Carolina González Vega.

Karin Ortega Cano.

Eva Solís Tapia.

Viña del Mar, Chile

2019.

**EFFECTO DE *SKYTANTHUS ACUTUS* SOBRE LA VIABILIDAD EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.**

Tesis para optar el Grado de Licenciado/a en Obstetricia y Puericultura.

Agradecimientos.

Al comienzo de la tesis éramos un grupo de cinco amigas que llenas de entusiasmo y ganas de aprender investigarían el “Efecto de *Skytanthus acutus* sobre la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama”, idea propuesta por el Dr. Joan Villena. A lo largo del camino nuestra amiga y compañera Camila Muñoz Montenegro tuvo que desistir de esta investigación, sin embargo, vemos su participación plasmada en esta tesis.

Quisiéramos agradecer al Dr. Joan Villena quién nos confió este proyecto de tesis para llevarlo a cabo durante estos dos semestres quién más que nuestro profesor guía fue quién nos enseñó el modo de trabajo metódico dentro de un laboratorio, resolviendo nuestras dudas y siempre estando dispuesto a ayudarnos. En conjunto, dar gracias a la colaboración del Dr. Carlos Jara Gutiérrez quien nos encaminó en el análisis de datos estadísticos.

Por último, quisiéramos agradecer a nuestra familia por estar siempre a nuestro lado apoyándonos y motivándonos a ser mejores personas.

Tabla de Contenido.

Índice de figuras y tablas.	6
Resumen.	7
Hipótesis.	11
Objetivo General.	11
Objetivos Específicos.	11
Operacionalización de Variables.	12
Tabla 3: Operacionalización de variables. Comparación de los efectos de la planta Skytanthus Acutus en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama y líneas celulares de tejido sano.	
Elaboración propia.	14
Marco Teórico.	15
I. Cáncer	15
III. Cacho de Cabra	19
Metodología	22
Materiales:	22
Método:	22
Diseño:	24
Universo:	24
Muestra:	24
Instrumento de recolección de datos	25
Fuentes de información	25
Análisis Estadístico.	27
Discusión.	31
Conclusiones.	32
Anexos.	39

Índice de figuras y tablas.

Tabla 1: Operacionalización de variables. Determinación de la concentración de extracto de <i>Skytanthus acutus</i> con mayor efecto beneficioso sobre las líneas celulares del cáncer de mama.	12
Tabla 2: Operacionalización de variables. Efectos que tiene la <i>Skytanthus acutus</i> en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama.	13
Tabla 3: Operacionalización de variables. Comparación de los efectos de la planta <i>Skytanthus acutus</i> en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama y líneas celulares de tejido sano.	14
Figura 1: Marco teórico Cacho de Cabra. Estructura química Skythantine alfa, beta y gama	21
Figura 1: Efectos de diferentes extractos de <i>Skytanthus acutus</i> (Hexano, Diclorometano y Etanol) sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7.	26
Figura 2: Efectos de diferentes extractos de <i>Skytanthus acutus</i> (Hexano, Diclorometano y Etanol) sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231	27
Figura 3: Efectos de diferentes extractos de <i>Skytanthus acutus</i> (Hexano, Diclorometano y Etanol) sobre la viabilidad de la línea celular MCF-10A.	28

Resumen.

Introducción: El cáncer es la segunda causa de muerte en Chile y el mundo, siendo el de mama la primera causa de muerte oncológica en mujeres chilenas, por lo cual se considera necesario indagar nuevos tratamientos y cuidados paliativos para tratar este tipo de cáncer, ¿Cuál es el efecto de los extractos de *Skytanthus acutus* sobre la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama?

Método: Se realizó un estudio cuantitativo experimental, donde se analizó el porcentaje de viabilidad celular de 3 líneas celulares de mama, dos cancerígenas y una no tumoral, tratadas con 3 extractos de *Skytanthus acutus* a diferentes concentraciones. Los datos se obtuvieron utilizando el protocolo de trabajo para el análisis de productos naturales (Anexo 1) mediante tinción con Sulforodamina B. Se obtuvo un total de 1008 resultados expresados en absorbancia, los cuales fueron convertidos a viabilidad celular porcentual respecto a los controles. Para el proceso de análisis estadístico se utilizaron los programas Microsoft Office 365, Excel, Word y Statsoft Statistica.

Resultados: En las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231, y MCF-10A se puede observar una relación inversamente proporcional entre las concentraciones de los extractos (Hexano, Diclorometano, Etanol) y la viabilidad celular.

Como excepción, se observa que en la línea MCF-7 a la concentración de 250 µg/mL de Etanol (ET) presenta un menor porcentaje de viabilidad celular respecto a la concentración de 500 µg/mL

Asimismo, en la línea MCF-10A el extracto Hexano (HEX) obtuvo un porcentaje menor de viabilidad celular para la concentración de 250 µg/mL, en cambio, para la de 500 µg/mL alcanzó un mayor porcentaje de viabilidad celular.

Conclusiones: Los extractos de *Skytanthus acutus* disminuyen la viabilidad celular de las líneas cancerígenas, pero a su vez, se observó que también reduce la viabilidad en la línea celular no tumoral

Palabras clave: Cáncer de mama, *Skytanthus acutus*, Cacho de Cabra, Extractos, Apocynaceae.

Introducción.

La esperanza de vida de la población mundial ha ido en aumento durante las últimas décadas, conllevando a un proceso de envejecimiento acelerado, lo que ha significado un cambio epidemiológico, principalmente en los países que se encuentran en desarrollo o en vías de éste. Chile no queda exento de ello, según el Instituto Nacional de Estadística (INE) la esperanza de vida al nacer en el año 2017 era de 77 años para los hombres y, en el caso de las mujeres de 82 años de edad, valores mayores en comparación con los países de la región y que cada vez se parece más a países desarrollados (1). Este aumento en la esperanza de vida se debe a una mejoría en los tratamientos y detección temprana de enfermedades que antes se consideraban catastróficas, con una disminución de la mortalidad durante la niñez, la maternidad y la senescencia.

Por otra parte, se ha generado disminución en la natalidad. El promedio mundial para el año 2016 fue de 2,44 hijos por mujer. En Chile, a partir de los años 60 se produjo una baja considerable en los nacimientos, según el Banco Mundial se redujo de 5,1 hijos por mujer en los años 60 a 1,7 hijos por mujer en un transcurso de 56 años (2). Cabe mencionar que esta disminución de la natalidad se debe en su mayoría a la masificación de los métodos anticonceptivos, dentro de estos se encuentran las píldoras orales las cuales fueron dispensadas y vendidas a partir del 23 de abril de 1960 (3).

En conjunto, el aumento de la esperanza de vida con la baja natalidad ha hecho que el envejecimiento poblacional haya aumentado considerablemente en estos últimos años, generando así diversos problemas, entre ellos el aumento de las enfermedades o patologías crónicas no transmisibles, causando una disminución en la calidad de vida de las personas. En nuestro país y el mundo, la principal causa de muerte son las enfermedades cardiovasculares, en segundo lugar, no muy lejano, se encuentran los tumores malignos o neoplasias, las cuales durante las últimas décadas han ido en aumento (4), se proyecta que las defunciones por cáncer a nivel mundial continuarán incrementándose, y se calculan 12 millones de defunciones para el año 2030, debido a esta causa (5). En Chile, en el año 1997 se reportaron 17.000 defunciones por cáncer, 19 años después, se elevó a 26.027 muertes (6), lo que corresponde al 23% del total de defunciones anuales (7). Uno de cada seis fallecimientos producidos es atribuible a esta patología a nivel mundial (8).

Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se debe a los cinco principales factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol (8). Todos estos factores son modificables, es por esto que, para prevenir esta patología, uno de los pilares fundamentales es mantener un estilo de vida saludable.

Al analizar las causas de mortalidad específica por tipo de cáncer y sexo al año 2015 en Chile, encontramos que dentro de los tipos de cáncer más comunes en los hombres se encuentra el cáncer de estómago, de próstata y de pulmón (6), con 25.2, 23.5 y 20.7 muertes por cada 100.000 habitantes, respectivamente. Por otro lado, el cáncer de mama o seno con 16.6 muertes por cada 100.000 habitantes, se considera como la primera causa de muerte oncológica en mujeres chilenas, seguido del cáncer de bronquios y pulmón con 13.8 muertes por cada 100.000 habitantes (9).

El cáncer de mama es de vital importancia, ya que ha cobrado la vida de 1.499 personas durante el año 2016, según el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) (4), cifras que han ido en aumento durante los últimos años y que se han visto influenciadas por distintos factores de riesgo, entre ellas al aplazamiento de una gestación o la decisión de no gestar, lo que está estrechamente relacionada con la transición demográfica que se vive a nivel mundial.

Dentro de las políticas públicas que se han hecho en Chile para resolver la problemática del cáncer de mama se ilustra que en el año 2001, se incluyó la toma de mamografías en la atención primaria de salud, lo que mejoró el pronóstico y la calidad de vida de las mujeres, ya que logró establecer un protocolo de seguimiento, el que ha ido en mejoramiento continuo gracias a la creación de guías anticipatorias específicas de esta patología por parte del Ministerio de Salud (10) (11).

En el año 2004 se creó el Acceso Universal con Garantías Explícitas en Salud (AUGE), que posteriormente cambió de nombre a Garantías Explícitas en Salud (GES). Cuando

comenzó a regir el 1 de julio del 2005 cubría 25 patologías, dentro de éstas se incluyeron 13 tipos de cánceres más comunes, entre ellos el de mama (12), para el año 2007 abarcó 56 problemas de salud, aumentó a 80 enfermedades en el año 2011, y durante el año 2019 se agregaron 5 patologías más, es decir, a fin de año habrá un total de 85 patologías GES (13).

Las Garantías Explícitas en Salud constituyen un conjunto de beneficios garantizados por Ley para las personas afiliadas a Fonasa e ISAPRES.

Las cuales son exigibles:

- **Acceso:** Derecho por Ley de la prestación de Salud.
- **Oportunidad:** Tiempos máximos de espera para el otorgamiento de las prestaciones.
- **Protección financiera:** La persona beneficiaria cancelará un porcentaje de la afiliación.
- **Calidad:** Otorgamiento de las prestaciones por un prestador acreditado o certificado (14).

Hasta el día de hoy, el cáncer de mama forma parte de las GES, lo que implica que, ante cualquier sospecha tanto en hombres como en mujeres sobre 15 años, se tiene acceso a confirmación diagnóstica, tratamientos, rehabilitación, seguimiento y cuidados paliativos con un plazo definido para cada etapa (11). Cabe destacar que la mayor incidencia del cáncer de mamá ocurre desde los 50 a 59 años, por lo tanto, la pesquisa es primordial en tales rangos de edad, debido a que avanza de manera rápida, progresiva y silenciosa.

Por lo antes expuesto, es de vital importancia fiscalizar que el tamizaje en la atención primaria de salud sea operativo, para así dar una buena educación a toda la población sobre los signos y síntomas que se pueden tener y de esta manera estar en alerta para acudir a los servicios de salud.

Por otro lado, será necesario indagar sobre nuevos tratamientos y cuidados paliativos para tratar el cáncer, y así, mejorar la calidad de vida de las personas, en este mismo sentido los tratamientos naturales deben tomar un papel relevante como una alternativa complementaria a los tratamientos convencionales.

Pregunta de Investigación.

¿Cuál es el efecto de los extractos de la planta Cacho de Cabra (*Skytanthus acutus*) sobre la viabilidad en líneas celulares de cáncer de mama?

Hipótesis.

Los extractos de la planta Cacho de Cabra (*Skytanthus acutus*) disminuyen la viabilidad de las líneas celulares del cáncer de mama, resultando favorable como tratamiento complementario.

Objetivo General.

Determinar el efecto de los extractos de la planta Cacho de Cabra (*Skytanthus acutus*) sobre la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama.

Objetivos Específicos.

- Determinar el efecto de los extractos de la planta Cacho de Cabra (*Skytanthus acutus*) con mayor efecto beneficioso sobre las líneas celulares del cáncer de mama.
- Contrastar los efectos que tiene la planta Cacho de Cabra (*Skytanthus acutus*) en el crecimiento entre las líneas celulares del cáncer de mama.
- Comparar los efectos de los extractos de la planta Cacho de Cabra (*Skytanthus acutus*) en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama y una línea celular de tejido mamario no tumoral.

Operacionalización de Variables.

1. Determinar la concentración de extracto de *Skytanthus acutus* con mayor efecto beneficioso sobre las líneas celulares del cáncer de mama.

Variable	Definición	Tipo de variable	Dimensión	Indicador	Subindicadores	Fuente de verificación
Extracto de <i>Skytanthus acutus</i> que genera efectos beneficiosos en líneas celulares.	El extracto de <i>Skytanthus acutus</i> que sea beneficiosa en líneas celulares MCF-7 en cáncer de mama.	Cuantitativa /continua.	Extractos que actuaron en los casos favorables.	Más beneficiosa entre los extractos.	Frecuencia en porcentajes (%).	Lector de microplacas .
Concentración con mayor efecto de los extractos de <i>Skytanthus acutus</i> beneficiosos en líneas celulares.	Concentración de <i>Skytanthus acutus</i> que genera un mayor efecto, de los extractos beneficiosos, en líneas celulares MCF-7 en Cáncer de mama.	Cuantitativa /continua.	Concentración de extracto que actuaron en los casos favorables.	Más beneficiosa entre las concentraciones (500, 250, 125, 62,5 y 25 µg/mL	Frecuencia en porcentajes (%).	Lector de microplacas .
Extracto de <i>Skytanthus acutus</i> que genera efectos beneficiosos en líneas celulares.	El extracto de <i>Skytanthus acutus</i> que sea beneficiosa en líneas celulares MDA-MB-231 en cáncer de mama.	Cuantitativa /continua.	Extractos que actuaron en los casos favorables.	Más beneficiosa entre los extractos.	Frecuencia en porcentajes (%).	Lector de microplacas .
Concentración con mayor efecto de los extractos de <i>Skytanthus acutus</i> beneficiosos en líneas celulares.	Concentración de <i>Skytanthus acutus</i> que genera un mayor efecto, de los extractos beneficiosos, en	Cuantitativa /continua.	Concentración de extracto que actuaron en los casos favorables.	Más beneficiosas entre las concentraciones (500 µg/mL, 250 µg/mL 125	Frecuencia en porcentajes (%).	Lector de microplacas .

	líneas celulares MDA-MB-231.			$\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$		
--	---------------------------------	--	--	--	--	--

Tabla 1: Operacionalización de variables. Determinación de la concentración de extracto de *Skytanthus acutus* con mayor efecto beneficioso sobre las líneas celulares del cáncer de mama. Elaboración propia.

2. Contrastar los efectos que tiene la *Skytanthus acutus* en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama.

Variable	Definición	Tipo de variable	Dimensión	Indicador	Codificación	Fuente de verificación
Extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera detención del crecimiento celular.	El extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera detención del crecimiento celular de MCF-7.	Cualitativa/Ordinal.	Detención del crecimiento celular.	Si No	Si (0) No (1)	Lector de microplacas.
	El extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera detención del crecimiento celular de MDA-MB-231.	Cualitativa/Ordinal.	Detención del crecimiento celular	Si No	Si (0) No (1)	Lector de microplacas.
Extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera proliferación celular.	El extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera proliferación celular de MCF-7.	Cualitativa/Ordinal.	Proliferación celular.	Si No	Si (0) No (1)	Lector de microplacas.
	El extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera proliferación celular de MDA-MB-231.	Cualitativa/Ordinal.	Proliferación celular.	Si No	Si (0) No (1)	Lector de microplacas.
Extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera disminución en la cantidad celular.	El extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera disminución celular de MCF-7.	Cualitativa/Ordinal.	Disminución celular.	Si No	Si (0) No (1)	Lector de microplacas.
	El extracto de <i>Skytanthus acutus</i> genera disminución	Cualitativa/Ordinal.	Disminución celular.	Si	Si (0)	Lector de microplacas.

	celular de MDA-MB-231.			No	No (1)	
--	------------------------	--	--	----	--------	--

Tabla 2: Operacionalización de variables. Efectos que tiene la *Skytanthus acutus* en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama. Elaboración propia.

3. Comparar los efectos de la planta *Skytanthus acutus* en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama y líneas celulares de tejido sano.

Variable	Definición	Tipo de variable	Dimensión	Indicador	Codificación	Fuente de verificación
Efectos de la planta <i>Skytanthus acutus</i> en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama.	Efectos de la planta <i>Skytanthus acutus</i> en el crecimiento de MCF-7 del cáncer. de mama	Cualitativa /Ordinal	Efectos en el crecimiento de líneas celulares del cáncer de mama.	Beneficioso Tóxico	Beneficioso (0) Tóxico (1)	Lector de microplacas .
Efectos de la planta <i>Skytanthus acutus</i> en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama.	Efectos de la planta <i>Skytanthus acutus</i> en el crecimiento de MDA-MB-231 del cáncer de mama.	Cualitativa /Ordinal	Efectos en el crecimiento de líneas celulares del cáncer de mama.	Beneficioso Tóxico	Beneficioso (0) Tóxico (1)	Lector de microplacas .
Efectos de la planta <i>Skytanthus acutus</i> en el crecimiento de líneas celulares de tejido sano.	Efectos de la planta <i>Skytanthus acutus</i> en el crecimiento de líneas celulares de tejido sano.	Cualitativa /Ordinal	Efectos en el crecimiento de líneas celulares de tejido sano.	Beneficioso Tóxico	Beneficioso (0) Tóxico (1)	Lector de microplacas .

Tabla 3: Operacionalización de variables. Comparación de los efectos de la planta *Skytanthus Acutus* en el crecimiento de las líneas celulares del cáncer de mama y líneas celulares de tejido sano. Elaboración propia.

I. Cáncer

Fisiológicamente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las reemplazan. En algunas ocasiones, se produce un crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo humano, suele suceder cuando hay modificaciones en el material genético, produciendo que estas células se dividan constantemente y no mueran como lo hacen las células normales (15). Este aumento celular anormal forma una masa que recibe el nombre de tumor, el cual puede ser benigno o maligno, este último es el más dañino, y el que da origen al cáncer como tal (16).

El cáncer puede ser localizado, es decir, ubicado en un solo lugar del cuerpo o se puede diseminar a otros sectores del organismo, originando una metástasis (17), que tiene lugar, cuando algunas células cancerosas se desprenden y se mueven a sitios distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y forman nuevos tumores lejos del tumor original (18).

Los tumores malignos (cáncer) son la segunda causa de muerte a nivel nacional y tienen mayor incidencia en las edades avanzadas en ambos sexos: en 2015, el 70% de las defunciones ocurrieron en personas de 65 años o más. Asimismo, provocaron más muertes en hombres que en mujeres: 13.503 y 12.261 descensos, respectivamente (19).

Habitualmente, se utiliza la cirugía para diagnosticar el cáncer, mediante una extracción del tejido (biopsia) al que posteriormente se le realizarán distintas pruebas, las que pueden ser con microscopio o con pruebas de laboratorio. La cirugía, también, tiene como función el prevenir, determinar la etapificación y tratar el cáncer, razón por la que se clasificaron con distintos nombres, entre ellas se encuentra la cirugía curativa, que consta de la localización y extirpación de un tumor local, la cirugía para reducir el cáncer, en la cual no se puede eliminar el tumor por completo, por lo que solo se realiza la resección de una parte, también se encuentra la cirugía paliativa, en las que se tratan las complicaciones asociadas o

causadas por el cáncer en sus etapas avanzadas, la cirugía de apoyo que es para facilitar la administración de fármacos o extracción de sangre a partir de un instrumento localizado en una vena de gran tamaño, la cirugía reconstructiva, la que se utiliza para mejorar la apariencia física, en el caso del cáncer de mama, la reconstrucción mamaria y la cirugía preventiva o profiláctica, que se utiliza para extirpar tejidos que pudiesen convertirse en cáncer (20).

Uno de los tratamientos utilizados para mitigar el cáncer es la quimioterapia, ésta consta de la administración de fármacos, los cuales dependen del desarrollo de cáncer y el tipo (21). Ésta se puede aplicar de diferentes maneras, antes de la cirugía o también llamada quimioterapia neoadyuvante, cuya función es reducir el tamaño del tumor, y después de la cirugía o quimioterapia adyuvante, en la cual se busca eliminar las células cancerígenas que pudiesen haber quedado o que se hayan diseminado.

Dentro de los efectos secundarios que se pudieran observar en personas tratadas con quimioterapia, se encuentra la caída de pelo, náuseas y/o vómitos, úlceras bucales, diarrea, por ende, un cambio en el peso o pérdida del apetito y cambios en las uñas, por otro lado, se puede observar cansancio, un incremento en la probabilidad de generar infecciones y la tendencia a sangrados o de producirse hematomas (22). Existen distintas alternativas para sobrellevar estos efectos adversos, dentro de ellas se encuentra la acupuntura y la aromaterapia las cuales son utilizadas para tratar las náuseas y algunos tipos de dolores. También existen tratamientos como la hipnosis, distintos masajes, yoga, musicoterapia, meditación, entre otras, que ayudan a mejorar el estrés, la fatiga y la ansiedad. Por último, pero no menos importante está el hacer ejercicio, esto mejoraría los signos y síntomas del tratamiento oncológico (23).

La quimioterapia se diferencia de la radioterapia, en que la primera de ellas afecta sistemáticamente a todas las células del cuerpo, independiente de si son cancerosas o no, en cambio, la radiación, se caracteriza porque afecta a la parte del cuerpo que se encuentra comprometida por el cáncer.

La radioterapia supone la utilización de partículas u ondas de alta frecuencia. La función de la “radiación es actuar sobre el ADN que se encuentra dentro de las células produciendo pequeñas roturas. Estas roturas evitan que las células cancerosas crezcan y se dividan, y les causan la muerte” (24), por lo que afecta a las células que poseen una alta tasa de división celular.

Por último, está el trasplante de células madre que se utiliza habitualmente en afecciones sanguíneas o relacionadas con el sistema linfático, tales como la leucemia, linfoma o mieloma múltiple (25).

II. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad en la cual las células de la mama se multiplican sin control (26), se considera una enfermedad heterogénea dividida en subtipos, siendo un 75-80% de las neoplasias mamarias dependientes del estímulo estrogénico (27).

El inicio de la patología comienza con diversos cambios o mutaciones en los genes de un organismo. Una célula que inicia el proceso carcinógeno es alta y descontroladamente proliferativa (28) e inmortal, debido a que no responde a las señales de entrar en apoptosis, es incapaz de corregir los errores que se van acumulando en su material genético, y probablemente no envejezca.

Este tipo de cáncer está conformado por un grupo de neoplasias malignas que se origina en la proliferación acelerada a causa de la pérdida del control del ciclo celular por alteración en al menos uno de los siguientes genes: BRCA1, BRCA2, P53 y PTEN, y en otros casos por razones desconocidas (29).

Se pueden considerar dos términos importantes, uno de ellos es carcinoma in situ, se refiere al tipo de cáncer que se encuentra aislado en la luz de los ductos o de los lobulillos glandulares, sin invadir los tejidos adyacentes (29). Por otro lado, el carcinoma invasivo

prolifera hasta romper la membrana basal y propagarse hacia los tejidos que rodean a los ductos y lobulillos mamarios, ingresando así al tejido circundante.

Estadios del Cáncer de Mama.

Dentro de los factores de riesgo más comunes para contraer esta patología se encuentra la edad, el sobrepeso u obesidad, mujeres que no han amamantado, que no han tenido hijos, terapia hormonal de reemplazo (22), antecedentes familiares y/o personales de cáncer de mama, entre otras (24). Cabe señalar que tanto mujeres como hombres pueden desarrollar este cáncer, en el caso de los varones, esta neoplasia es poco frecuente, pero tienen peor pronóstico. Para el año 2014 fallecieron 14 hombres por esta causa, representando menos del 1% de los casos de cáncer de mama (10).

Por otro lado, existen factores protectores para el cáncer de seno, dentro de ellos se encuentra el ejercicio, un embarazo en edad temprana, la lactancia materna, entre otros más (21).

Para comenzar el diagnóstico en este tipo de usuarias se realiza una evaluación inicial, incluyendo examen físico de mamas, mamografía en mujeres sobre los 50 años o, en su defecto, ecotomografía en usuarias de menor edad, resonancia magnética y/o biopsias del tejido afectado (21).

Las mamografías se clasifican en:

- BI-RADS 0: Estudio incompleto el cual necesita de estudios adicionales.
- BI-RADS 1: Normal, examen negativo.
- BI-RADS 2: Normal o con hallazgos no patológicos.
- BI-RADS 3: Anormalidad (hallazgos probablemente benignos).
- BI-RADS 4: Anormalidad sospechosa de malignidad.
- BI-RADS 5: Alta probabilidad de malignidad.
- BI-RADS 6: Cáncer de mama (30).

Dentro de los tratamientos para combatir este tipo de cáncer, se encuentra la cirugía, radioterapia, quimioterapia y hormonoterapia, la terapia se elige según el estadio del cáncer (31).

La sobrevida de las mujeres dependerá del estadio que estén cursando, esto queda demostrado en el artículo “Resultados del tratamiento del cáncer de mama, Programa Nacional de Cáncer del Adulto” donde se analizaron 5.119 registros de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama en Chile entre el 2000 y el 2010, donde a mayor estadio, la sobrevida disminuye: Estadío I: 93,3%, estadío II: 84,2%, estadío III: 61.8% y estadío IV: 26,6% (31).

Quienes se someten a quimioterapia se ven enfrentados a los múltiples efectos adversos producidos por la farmacocinética de los actuales tratamientos lo que va disminuyendo su calidad de vida, tales como fiebre, diarrea, vómitos, erupción cutánea. En los últimos años se ha comenzado a utilizar terapias complementarias y alternativas, como llevar una alimentación estricta, aumentar el consumo de vitaminas, productos herbarios o remedios homeopáticos (32), a los efectos secundarios producidos por la quimioterapia, de esta manera las personas tratadas se sienten protagonistas de la mejoría de su salud y bienestar.

III. Cacho de Cabra

Esta planta fue descrita por primera vez en el año 1834 por Franz Julius Ferdinand Meyen, quien fue un médico, botánico y zoólogo alemán (33). El Cacho de Cabra pertenece a la familia Apocynaceae, ésta es una familia de angiosperma que se encuentra distribuida en lugares tropicales, semitropicales y en regiones templadas como la India, Malasia, Australia, África y América continental (34).

La fitoquímica de esta familia contiene glucósidos cardiotónicos, alcaloides reserpina, rescinamina, vincristina, aspodospermina, quebrachamina, hipoquebrachina, aspidosamina, vinblastina, quebrachina y yohimbina (34).

Los alcaloides de la familia Apocynaceae tienen un fuerte efecto biológico y medicinal (35). Algunas especies como *Thevetia peruviana* (Pers) Shum y *Nerium oleander* L. contienen glucósidos cardiotónicos, los cuales son utilizados en el tratamiento de enfermedades cardíacas, por otro lado, la *Rauvolfia serpentina* (L.) Kurz produce los alcaloides reserpina y rescinamina, éstas poseen propiedades hipotensoras y sedantes. A partir de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, se obtiene más de 90 alcaloides; entre ellos la vincristina y la vinblastina que son drogas modernas para el tratamiento de leucemia, coriocarcinomas, entre otras (36), esto debido a que producen una interrupción en el proceso de la división celular (37) (38).

Cacho de cabra o también llamado cuerno de cabra (*Skytanthus acutus*) es una especie de arbusto poco frecuente con flor endémica, compuesta por 5 pétalos de color amarillo, que se da en el norte arenoso chileno, en regiones como Antofagasta, Atacama y Coquimbo y en el extremo norte argentino, mide aproximadamente 1 metro. Crece en suelos arenosos o pedregosos de preferencia cerca del mar o en lugares con influencia de aire húmedo (39).

La planta *Skytanthus acutus* está compuesto por una esquitantina o skytantina la cual es un alcaloide monoterpénico, es decir, un metabolito secundario producido por la síntesis de plantas formado por dos moléculas de isoprenos también recibe el nombre de monoterpenos, quienes se encuentran habitualmente en los aceites esenciales de algunas plantas (40).

Las esquitantinas fueron aisladas por primera vez de las hojas del *Skytanthus acutus* en 1960 (41). La estructura de este alcaloide se estableció sobre la regla del isopreno y se confirma a través del producto de deshidrogenación de Skytantina. Por medio del examen TLC (Cromatografía en capa fina) y GLC (Cromatografía de gas-líquido) se evidenció la presencia de diferentes fracciones de Skytantina. Tras esta prueba se describen 3 fracciones que resultaron ser Skytanthina isomérica C₁₁H₂₁N y la cuarta una Skytanthina deshidratada. A través de GLC se logra establecer la configuración de estas sustancias, utilizando Iridomirmecina, Ácido nepetalico, Ácido nepetalico 85°, Ácido nepetalico 115°; obteniendo

tres Skythanthines naturales, designadas como α - Skythanthine, β -Skythanthine y δ -Skythanthine (42).

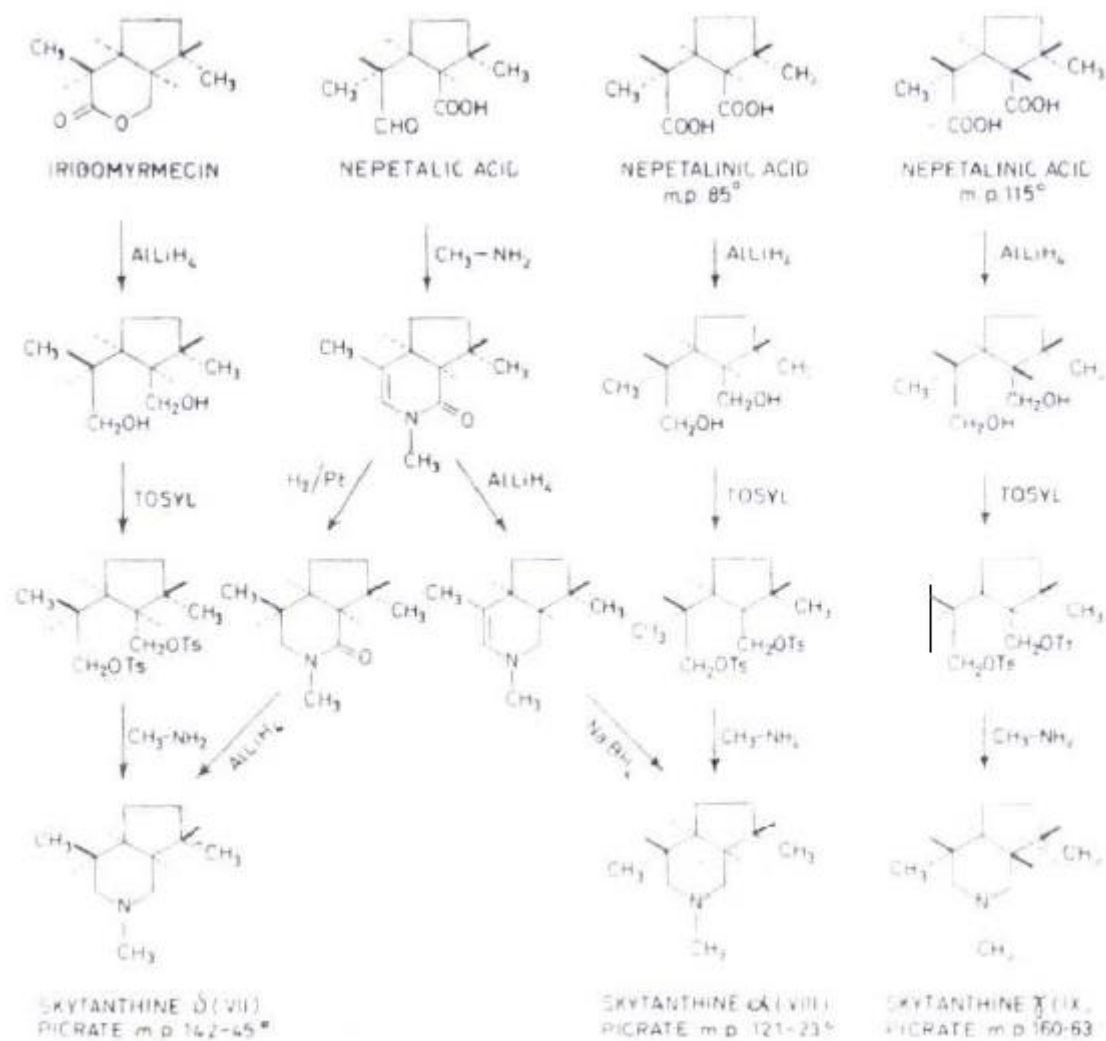


Figura 1: Estructura química Skythanthine alfa, beta y gama. Extraído de “Skythanthine a new group of natural alkaloids”.

Metodología

Materiales:

- Etanol.
- Extractos *Skytanthus acutus* (HEX, DCM, ET).
- Matraces.
- Placas de 96 pocillos.
- Pipetas de diversa capacidad.
- Puntas de pipeta estéril.
- Guantes.
- Pipeta graduada.
- Balanza analítica.
- Agitador Vortex.
- Agua MilliQ estéril.
- Agua destilada.
- Sulforodamina B.
- Trisbase.
- Refrigerador
- Campana
- Lector de placas
- Líneas celulares: Dos de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y una línea celular normal MCF-10A.
- Computador con el programa Microsoft Office 365, para utilizar Excel y Word. Además del programa Statsoft Statistica.

Método:

Protocolo de trabajo para el análisis de productos naturales (Anexo 1) mediante tinción con Sulforodamina B.

1.- Soluciones:

Se utilizarán 3 extractos de la planta *Skytanthus acutus*: Hexano (HEX), Diclorometano (DCM) y Etanol (ET), y se observarán los efectos en 3 líneas celulares: dos líneas de cáncer de mama, MCF-7 y MDA-MB-231, y una línea celular normal MCF-10A.

- Se preparará una solución madre con cada extracto de la planta “Cacho de Cabra”.
- Para preparar la solución madre “Hexano” se ocupará 50 mg del extracto por 1 mL de Etanol.
- Para preparar la solución madre “Diclorometano” se ocupará 50 mg por 1 mL de Etanol.
- Para preparar la solución madre “Etanol” se ocupará 50 mg por 1 mL de Etanol.

Solución de trabajo:

Cada vez que se comience a trabajar en una nueva placa se preparará una solución de trabajo, en la cual se extraerá 20 μ L de la solución madre (la que contendrá etanol al 100%) y se le agrega 180 μ L de agua estéril, es decir, se diluye la solución madre (50 mg/mL) 10 veces, quedando una concentración de 5 mg/mL con Etanol al 10%. Posteriormente, cuando se añada al medio celular volúmenes de 10 - 5 - 2,5 - 1,25 - 0,5 μ L de los extractos correspondientes por lo cual el Etanol se encontrará al 1% de concentración final en el medio celular.

2.- Placas

La densidad celular de siembra en los pocillos será entre 3 - 5 $\times 10^3$ cel/pocillo, las células serán incubadas a 37 °C en un incubador con atmósfera 5% CO₂ y 95% O₂, y finalmente tratadas con los compuestos durante 72 hrs.

Se utilizarán placas de 96 pocillos, 4 placas corresponderán a la línea celular MDA-MB-231, 4 placas a MCF-7 y 4 placas que pertenecen a la línea celular MCF-10A con células no tumorales, cada placa se dividirá en 3 columnas de 32 pocillos cada una. Cada columna será tratada con un extracto la primera columna con HEX la segunda con DCM y la tercera con ET.

La primera y última fila de las 3 columnas corresponderá al control negativo, es decir, no se le agrega ningún extracto o solución. La segunda fila de todas las columnas corresponderá al control solvente, al cual se le añade Etanol a la concentración final 1%.

Para la obtención de resultados se hará el siguiente procedimiento:

- Se fijará la placa con 25 μ L de Ácido Tricloroacético (TCA) (25 μ L/pocillo) durante 1 hora a 4°C.
- Se lavará con agua destilada 3 veces por inmersión y se teñirá con Sulforodamina B al 0,1% (50 μ L/pocillo) por 30 minutos.
- Se lavará por inmersión con Ácido Acético 3 veces.
- Se leerá Trisbase 10 mM 100 μ L.

Diseño:

Es un estudio de tipo experimental, ya que se trabajará en un laboratorio evaluando los efectos de los extractos de la planta (*Skytanthus acutus*) sobre las líneas celulares del cáncer de mama. Además de ser prospectivos por haber participación de los investigadores.

Universo:

Se utilizarán dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y una línea celular no tumoral (MCF-10A) para realizar esta investigación.

Muestra:

Ambas líneas celulares a utilizar serán de cáncer de mama. La primera línea celular a utilizar es MCF-7 (Michigan Cancer Foundation - 7), la cual se aisló en una mujer de 69 años con enfermedad metastásica en el año 1973 por el Dr. Soule y colaboradores en un Instituto de Detroit (43).

En el caso de la línea celular MDA-MB-231, esta se aisló por primera vez en una mujer de 51 años con adenocarcinoma mamario (44).

La tercera línea celular que se ocupará es MCF-10A, es una línea celular de tejido epitelial mamario humano no tumoral.

Para el proceso de análisis estadístico se utilizaron los programas Microsoft Office 365, Excel, Word y Statsoft Statistica. Los datos recolectados a partir de la lectura de placas de las líneas celulares ($n = 1008$ datos), expresados en absorbancia fueron convertidos a viabilidad celular porcentual. Estos últimos datos, fueron ordenados en una planilla de Excel. A partir de esta planilla se obtuvieron gráficos de barra por línea celular con los valores de la media y desviación estándar, de cada extracto y sus concentraciones.

Se realiza un análisis para determinar la distribución de los datos, determinando si estos son paramétricos o no paramétricos. En este estudio, los resultados de todas las líneas fueron no paramétricos según Friedman ANOVA, entonces se utilizó el test de Kruskal-Wallis para determinar la significancia (P) las que fueron menor a 0,05 de las variables en cuestión.

El total de la muestra analizada correspondió a 1008 datos de viabilidad celular porcentual, donde cada línea celular cuenta con 336 datos, y cada extracto por línea celular 112 datos.

Criterios de Inclusión y Exclusión:

Criterios de Inclusión:

- Líneas celulares como MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A

Criterios de Exclusión:

- Células contaminadas.

Instrumento de recolección de datos

- Lector de microplacas.

Fuentes de información

- **Unidad de estudio:** Líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (cáncer de mama) y MCF-10A (línea celular normal) tratadas con extracto de la planta *Skytanthus acutus*.

- **Unidad informante:** Planilla Excel con datos obtenidos a partir de la lectura de placas de las líneas celulares mencionadas.
- **Unidad referencial:** Espacio físico y equipos del laboratorio Bruno Günther y laboratorio de la Universidad de Valparaíso, Facultad de medicina, edificio R3.

Línea celular MCF-7

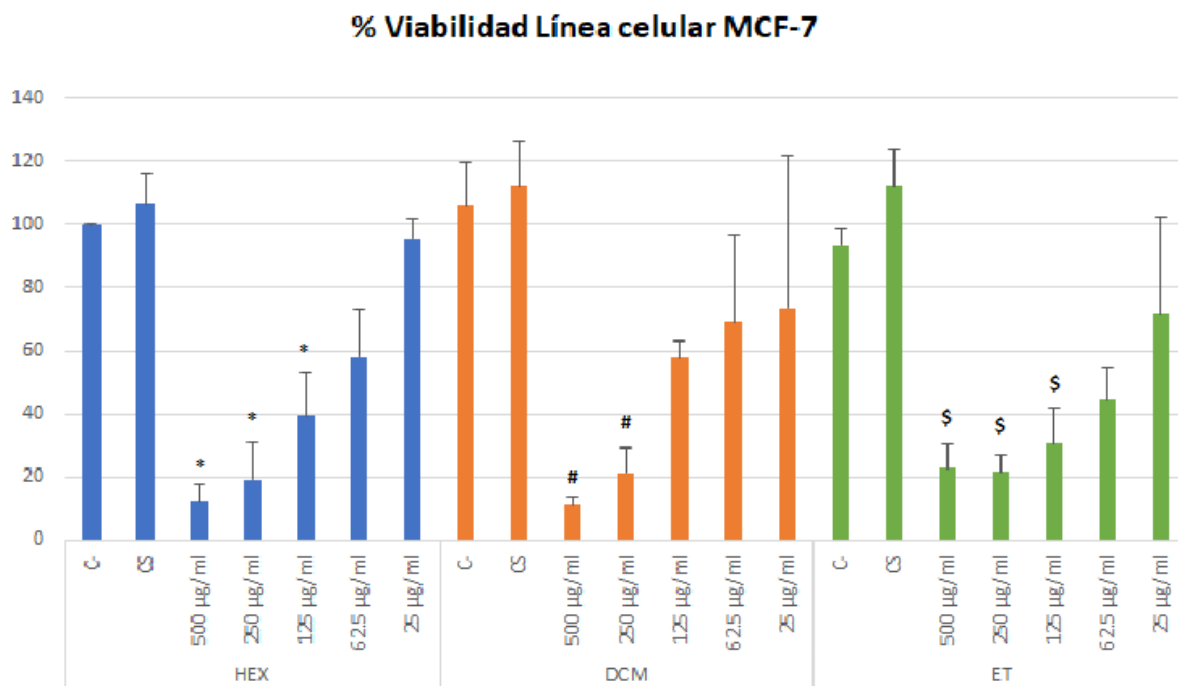


Figura 1: Efectos de diferentes extractos de *Skytanthus acutus* (Hexano, Diclorometano y Etanol) sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7. Elaboración propia.

*: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

#: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

\$: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

En la figura 1 se puede observar que el extracto Hexano (HEX) presenta una relación inversamente proporcional respecto al porcentaje de viabilidad de la línea celular MCF-7. Produciendo una diferencia significativa respecto al control en las concentraciones 500, 250 y 125 µg/ml, reflejando un porcentaje de viabilidad celular de 12,3%, 19,01% y 39,47% respectivamente.

Respecto al extracto Diclorometano (DCM), a mayor concentración presenta un menor porcentaje de viabilidad celular. De esta forma se presenta una diferencia significativa respecto al control en las concentraciones 500 y 250 µg/mL, con porcentaje de viabilidad celular de 11,01% y 21,25% respectivamente.

Finalmente, el extracto Etanol (ET) actúa de forma similar a los extractos anteriores salvo por la concentración de 250 µg/mL la cual presenta un menor porcentaje de viabilidad

celular respecto a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, de 21,60% y 22,76% respectivamente. De esta manera se presenta una diferencia significativa respecto al control en las concentraciones de 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$.

Línea celular MDA-MB-231

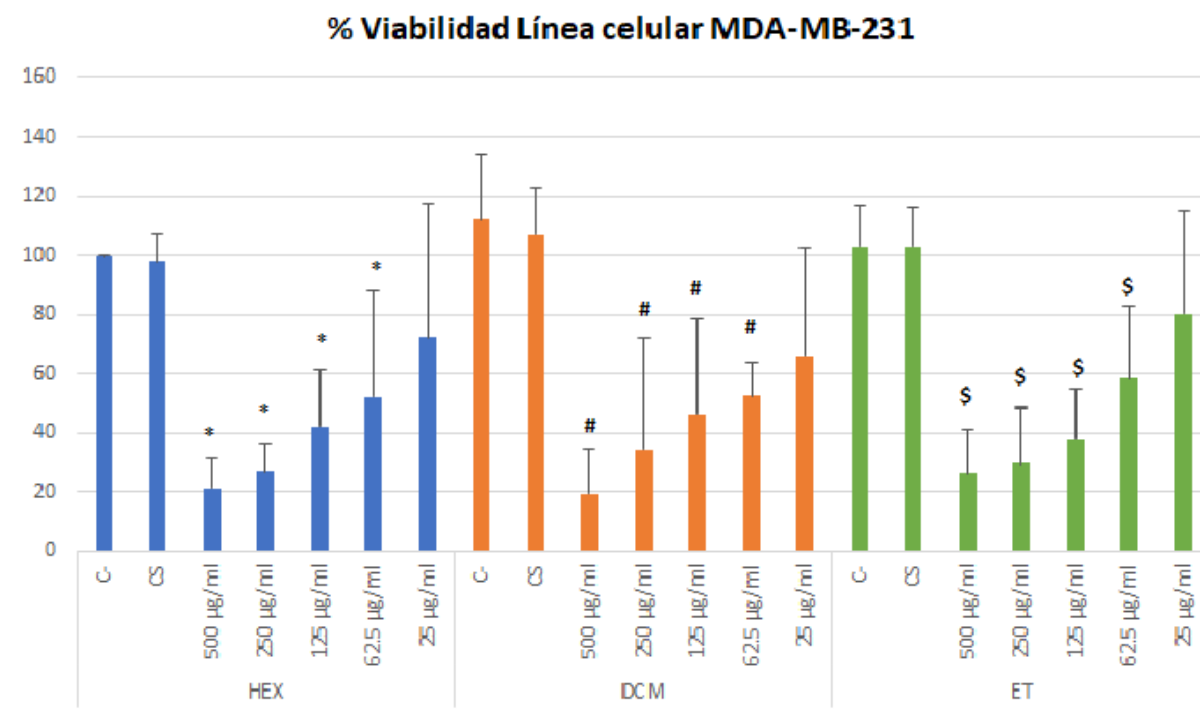


Figura 2: Efectos de diferentes extractos de *Skytanthus acutus* (Hexano, Diclorometano y Etanol) sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231. Elaboración propia.

*: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

#: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

\$: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

En la figura 2 se puede observar que en la línea celular MDA-MB-231 la viabilidad depende de la concentración del extracto, a mayor concentración menor porcentaje de viabilidad, esto sucede de la misma manera para los tres extractos: Hexano (HEX), Diclorometano (DCM) y Etanol (ET). Todos ellos tuvieron diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de viabilidad con respecto al control en las concentraciones de 500, 250, 125 y 62.5 $\mu\text{g/mL}$.

El extracto con mayor efectividad fue distinto para las diferentes concentraciones, A los 500 $\mu\text{g/mL}$ fue el de DCM con un porcentaje de viabilidad del 19.48%, a los 250 $\mu\text{g/mL}$ el de hexano tiene menor porcentaje de viabilidad con un 27,05%, el mismo extracto es quien tiene mayor efectividad a los 62.5 $\mu\text{g/mL}$ con un 52,00% de viabilidad, y a los 125 $\mu\text{g/mL}$ es el de etanol el que tiene el menor porcentaje de viabilidad con 37.84%

Línea celular MCF-10A

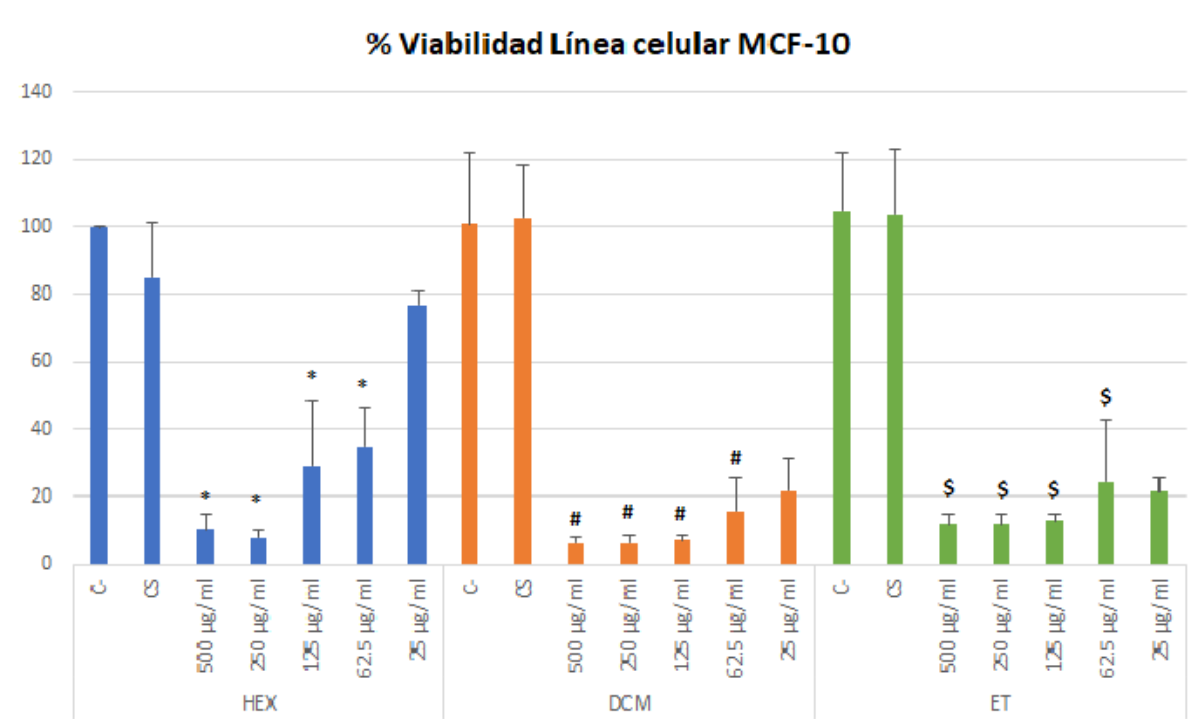


Figura 3: Efectos de diferentes extractos de *Skytanthus acutus* (Hexano, Diclorometano y Etanol) sobre la viabilidad de la línea celular MCF-10A. Elaboración propia.

*: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

#: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

\$: Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (C-) $p < 0,05$.

En la figura 3 se puede rescatar que la viabilidad celular de la línea MCF-10A tratadas con el extracto Hexano (HEX) presentan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control en las concentraciones de 500-250-125-62,5 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ tuvo el menor porcentaje de viabilidad (7,76%), en cambio, la viabilidad celular aumenta a la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ (76,77%) respecto al control.

Por otro lado, con respecto al extracto Diclorometano (DCM) la viabilidad celular no presenta grandes cambios entre las distintas concentraciones siendo diferentes estadísticamente las concentraciones de 500-250-125-62,5 $\mu\text{g/mL}$.

Para finalizar, el extracto Etanol (ET) presenta características muy similares al DCM, ya que los valores de viabilidad celular de las concentraciones 500-250-125-62,5 $\mu\text{g/mL}$ son todos ellos diferentes estadísticamente con respecto al control, con valores de viabilidad celular aproximados entre el 10-20%.

Discusión.

Cabe señalar que no existe estudio previo de la actividad biológica del Cacho de cabra (*Skytanthus acutus*), siendo éste el primero en analizar la actividad citotóxica sobre líneas celulares del cáncer.

Un estudio publicado en la Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas en el año 2010 analizó el efecto de la *Janaguba*, planta perteneciente también a la familia Apocynaceae, en el tratamiento del tumor Sarcoma 180, donde mostró actividad anticancerígena en ratones albinos machos suizos, evidenciando una inhibición del crecimiento tumoral del 67,7% y 68% a dosis de 300 mg / kg y 400 mg / kg, respectivamente (45).

Dentro de la familia Apocynaceae también han mostrado efecto antiproliferativo en otras especies, pero no en todas, tal como se menciona en el estudio “Análisis antiproliferativos y fitoquímicos de extractos de hojas de diez especies de Apocynaceae”. Los extractos de hojas de *Alstonia angustiloba*, *Calotropis gigantea*, *Catharanthus roseus*, *Nerium oleander*, *Plumeria obtusa* y *Vallaris glabra* mostraron actividades positivas de efecto antiproliferativo. En cambio, los extractos de *Allamanda cathartica*, *Cerbera odollam*, *Dyera costulata* y *Kopsia fruticosa* no mostraron actividad antiproliferativa (45).

En esta investigación, *Skytanthus acutus* mostró reducir la viabilidad celular de las líneas cancerígenas MCF-7 y MDA-MB-231. En la investigación antes mencionada se establece que extractos de *C. gigantea* y *N. oleander* fueron más activos o comparables a los compuestos estándar de Xanthorrhizol, Curcumina y Tamoxifeno (46).

En un estudio de dos extractos de *Tecoma stans*, mostraron actividad antiproliferativa en la línea celular MCF-7 (47), esto es relevante porque de esa planta se obtiene el alcaloide esquitantina el que fue aislado por primera vez en *skytanthus acutus* (42).

Conclusiones.

Este tipo de investigaciones aporta significativamente a la ciencia, la cual se encuentra en búsqueda de un tratamiento efectivo contra el cáncer, enfermedad que ha ido en aumento durante las últimas décadas y que seguirá siendo un problema de salud a nivel mundial, por esta razón es que se recomienda continuar investigando y generando interés en los investigadores para que prontamente se encuentre una cura definitiva, o en su defecto, un tratamiento complementario que no produzca efectos secundarios tan marcados como los que se han visto.

El extracto de hexano disminuye la viabilidad en las tres líneas celulares siendo más potente línea no tumoral (MCF-10A).

El extracto de DCM disminuye la viabilidad en las tres líneas celulares, pero en el caso de MCF-10A, el efecto se mantiene a concentraciones menores por lo cual es más activo

Para finalizar, el Etanol disminuyó la viabilidad en las tres líneas celulares, siendo en la línea celular MCF-10A el efecto mayor a concentraciones menores, por lo cual es más activo.

Por lo tanto, el tratamiento con los extractos de *Skytanthus acutus* genera citotoxicidad en la línea celular no tumoral (MCF-10A), por esta razón no existiría diferencias entre células tumorales y no tumorales.

Bibliografía.

1. Instituto Nacional de Estadísticas. Compendio Estadístico Estadísticas INd, editor. Santiago: Instituto Nacional de Estadísticas; 2017.
2. World Bank Group. Fertility rate, total (births per woman). [Online].; 2017 [cited 2018 Diciembre 3]. Available from: <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.TFRT.IN>.
3. Galán G. 50 años de la píldora anticonceptiva. Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología. 2010; 75(4).
4. Instituto Nacional de Estadísticas. Estadísticas Vitales: Informe Anual 2016 Estadísticas INd, editor. Santiago: Instituto Nacional de Estadísticas; 2018.
5. OPS. Sitio Web de la Organización Panamericana de la Salud. [Online].; 2010 [cited 2019 Julio 1]. Available from: https://www.paho.org/uru/index.php?option=com_content&view=article&id=216:el-cancer-segunda-causa-muerte-america-latina&Itemid=451
6. INE. ANUARIO DE DEMOGRAFÍA INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS SERVICIO REGISTRO CIVIL E IDENTIFICACIÓN MINISTERIO DE SALUD. In 1997 [cited 2018 Dec 3]. p. 1–448. Available from: https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=f787eadcd9&attid=0.1&permmsgid=msg-f:1618840955156182983&th=167747458ff037c7&view=att&disp=inline&realattid=f_jp8en8sg0&sadbat=ANGidJ9MPeBiUUviijoWlrPdD4Ufk4RNR1Fu4CXIc2HKYx10YpQwJZxCK
7. OMS. OPS/OMS Chile - Cáncer [Internet]. 2007 [cited 2018 Dec 3]. Available from: https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=174:cancer&Itemid=1005
8. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Cancer [Internet]. Vol. 4, The Lancet Global Health. 2016 [cited 2018 Dec 3]. p. e609–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X16301437>

9. Ministerio de Salud. Plan Nacional de Cáncer 2018-2028 Salud Md, editor. Santiago: Ministerio de Salud; 2018.
10. MINSAL. Día contra el cáncer mama - Ministerio de Salud - Gobierno de Chile [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 3]. p. 1. Available from: <https://www.minsal.cl/dia-contra-el-cancer-mama/>
11. Ministerio de Salud. La prevención y el diagnóstico precoz por cáncer de mama es vital para reducir la mortalidad [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 3]. p. 1. Available from: <https://www.minsal.cl/la-prevencion-y-el-diagnostico-precoz-por-cancer-de-mama-es-vital-para-reducir-la-mortalidad/>
12. Hospital Clínico Universidad de Chile. Sitio Web del Hospital Clínico Universidad de Chile. [Online].; 2012 [cited 2019 Julio 1. Available from: <https://www.redclinica.cl/plantilla/especialidades/oncologia/auge.aspx>.
13. MINSAL. Sitio Web del Ministerio de Salud. [Online].; 2019 [cited 2019 Julio 1. Available from: <https://www.minsal.cl/plan-auge-85/>.
14. Ministerio de Salud. Ley 19.966 Régimen de Garantías Explícitas en Salud y sus Decretos 2005-2007 Salud Md, editor. Santiago: Ministerio de Salud; 2007.
15. MedlinePlus. Cáncer. CA Cancer J Clin [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 3];66(1):7–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998>
16. MedlinePlus. Cáncer [Internet]. National Library of Medicine; 2018 [cited 2018 Dec 3]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/cancer.html>
17. American Cancer Society. ¿Qué es el cáncer? [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 3]. p. 1. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
18. National Cancer Institute. ¿Qué es el cáncer? [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 3]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
19. Instituto Nacional de Estadísticas. Estadísticas Vitales Anuario 2015 Santiago: Instituto Nacional de Estadísticas; 2017.
20. American Cancer Society. Sitio Web de American Cancer Society. [Online].; 2016 [cited 2019 Julio 1. Available from:

<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-sekundarios/tipos-de-tratamiento/cirugia/como-se-usa-la-cirugia-contra-el-cancer.html>

21. American Cancer Society. Sitio Web de American Cancer Society. [Online].; 2018 [cited 2019 Julio 1. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/cancer-control/es/booklets-flyers/chemotherapy-what-it-is-how-it-helps-spanish.pdf>
22. American Cancer Society. Sitio Web de American Cancer Society. [Online].; 2017 [cited 2019 Julio 1. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento/quimioterapia-para-el-cancer-de-seno.html>
23. Mayo Clinic. Sitio Web Mayo Clinic. [Online].; 2019 [cited 2019 Diciembre 10. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/cancer/in-depth/cancer-treatment/art-20047246>.
24. American Cancer Society. Sitio Web de American Cancer Society. [Online].; 2017 [cited 2019 Julio 1. Available from: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-sekundarios/tipos-de-tratamiento/radioterapia/conceptos-basicos.html>
25. American Cancer Society. Sitio Web de American Cancer Society. [Online].; 2016 [cited 2019 Julio 1. Available from: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-sekundarios/tipos-de-tratamiento/trasplante-de-celulas-madre/por-que-se-usan-los-trasplantes-de-celulas-madre.html#referencias>.
26. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. ¿Qué es el cáncer de mama? [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 3]. Available from: https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm
27. Ramírez K, Acevedo F, Herrera M, Ibáñez C, Sánchez C. Actividad física y cáncer de mama: un tratamiento dirigido. Rev Med Chil [Internet]. 2017 Jan [cited 2018 Dec 3];145(1):75–84. Available from:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872017000100011&lng=en&nrm=iso&tlng=en

28. Pérez A, Guerra E, Rodríguez O. El cáncer como respuesta adaptativa. MEDISAN [Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 3];16(2):236–47. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000200012
29. Ariza Y, Briceño I, Ancizar F. Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética. Rev Colomb Biotechnol [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 3];1:121–34. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v18n1/v18n1a14.pdf>
30. MINSAL. Guías Clínicas AUGÉ Cáncer de Mama. Tercera ed. Santiago: MINSAL; 2015.
31. Del Castillo, SM C, Cabrera, C ME, Derio, P L, Gaete, V F, Cavada, CH G. Resultados del tratamiento del cáncer de mama, Programa Nacional de Cáncer del Adulto. Revista Médica de Chile. 2017 Diciembre; 145(12).
32. American Cancer Society. American Cancer Society. [Online].; 2015 [cited 2019 Julio 30. Available from: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-sekundarios/medicina-complementaria-y-alternativa/metodos-complementarios-y-alternativos-y-el-cancer/que-es-la-medicina-complementaria-y-alternativa.html>
33. Troelstra A. Bibliography of Natural History Travel Narratives - Anne S. Troelstra - Google Libros [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 3]. 1-482 p. Available from: <https://books.google.cl/books?id=HaclDwAAQBAJ&pg=PA300&lpg=PA300&dq=franz+julius+ferdinand+meyen&source=bl&ots=zwUoYWh7bi&sig=k2VUm gW9RknN0jf0jkAjZsxPaEE&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwin37i8obHeAhXK gJAKHSAdDG04KBD oATADegQIBR AB#v=onepage&q&f=true>
34. González-Rocha E, Cerros-Tlatilpa R. La familia Apocynaceae (Apocynoideae y Rauvolfioideae) en el estado de Morelos, México. Acta botánica Mex [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 3];(110):21–70. Available from:



http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512015000100002

35. Elsevier. Alkaloids Secrets Of Life [Internet]. 2007 [cited 2018 Dec 3]. Available from:
<https://archive.org/details/AlkaloidsSecretsOfLifeT.AniszewskiElsevier2007W/page/n29>
36. UNNE. Asterideas [Internet]. 2010 [cited 2018 Dec 3]. p. 1–203. Available from:
http://www.academia.edu/15784850/Angiosperm_Phylogenetic_Group_II
37. Oncohealth I. VINCRISTINA [Internet]. [cited 2018 Dec 3]. Available from:
<http://www.oncohealth.eu/es/area-paciente/cancer/informacion-soporte-paciente/informacion-general/tratamiento/quimioterapia/listado-farmacos/vincristina>
38. MedlinePlus. Vinblastina [Internet]. 2013 [cited 2018 Dec 3]. Available from:
<https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682848-es.html>
39. Fundación R.A Philippi. Skytanthus Acutus. [Online].; 2019 [cited 2019 Julio 20]. Available from: <https://fundacionphilippi.cl/catalogo/skytanthus-acutus/>.
40. Martínez M A. Universidad de Antioquia. [Online]. Medellín; 2003 [cited 2019 Diciembre 20]. Available from: http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
41. Lythgoe T. Alcaloides de Cassia carnaval Speg (Leguminosa). Tesis doctoral. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 1072.
42. Marini Bettolo GB. Skytanthines : a new group of natural alkaloids. Ann Ist Super Sanita. 1968; IV(5).
43. ȘERBAN C, ANCA C, MARIUS R. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research [Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 4]. Available from: <http://ar.iijournals.org/content/35/6/3147.full.pdf>
44. ECACC. Cell line profile MDA-MB-231 [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 4]. Available from: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>

- 45.** Leite de Sousa E, Sampaio Grangeiro AR, Gomes Alvez Bastos IV, Ribeiro Rodrigues GC, E Silva MJ, Ramos dos Anjos FB, et al. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tu. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010 Junio; 46(2).
- 46.** Wong SK, Lim YY, Abdullah NR, Nordin FJ. Antiproliferative and phytochemical analyses of leaf extracts of ten Apocynaceae species. Pharmacognosy Res. 2011 Abril-Junio; 3(2).
- 47.** Marzouk M, Gamal-Eldeen AM, Mohamed M, El-Sayed M. Anti-proliferative and antioxidant constituents from *Tecoma stans*. Z Naturforsch C J Biosci. 2006 Noviembre-Diciembre; 61(11-12)

Anexos.

ANEXO 1: Protocolo de trabajo para el análisis de productos naturales en líneas celulares humanas.

1. Recepción producto natural (mg) con la siguiente información: peso molecular, estructura y peso en miligramos. Si es posible información sobre solubilidad, concentración de uso y alguna referencia bibliográfica y posible comparación con un fármaco clásico.
2. Filtrar por filtros especiales (millipore para DMSO o etanol) solución de trabajo.
3. Mantener protegido de la luz.
4. Preparación solución de trabajo en fresco.
5. Mantenimiento solución madre a -20°C y solución trabajo a 4°C .
6. Disolver compuesto en DMSO o etanol (en general) a concentración 0,1 M, esta será la solución madre (1000x) a partir de la cual conseguir una solución 1 mM que será la solución de trabajo (10x). Se trabajará generalmente con 4 o 5 concentraciones diferentes (véase 12.5 – 25 – 50 – 75 -100 μM).
7. Filtrar por filtros especiales (Millipore para DMSO o etanol) para la solución de trabajo.
8. Buscar algún compuesto de referencia como control positivo, esto dependerá de la naturaleza de los compuestos a analizar, aunque en general podrían ser: tamoxifeno, daunorubicina, fluorouracilo u oxaliplatino como antitumorales de uso clínico.
9. Para obtener las concentraciones experimentales indicadas en el apartado 6, tan solo hay que colocar 1.25 – 2.5 – 5 o 10 μl de la solución 10x por cada 100 μl de medio en los pocillos de cultivo.
10. Las células deben ser lavadas y tripsinizadas antes de llegar a 90-100% confluencia, si hubieran llegado a ese porcentaje serán desechadas para la realización de experimentos, aunque puedan ser sembradas.
11. Una suspensión celular homogénea 1:1 (suspensión celular: 0.4% (wt/vol) azul de tripan) será utilizada para determinar la concentración (n° células/ml). Si la suspensión celular presentase un porcentaje elevado de células teñidas con azul de tripan (+ 5-10%) se desechará para la realización del experimento.
12. La densidad celular de siembra en los pocillos debe estar entre $3\text{-}5 \times 10^3$ cel/pocillo,

dependiendo de la línea celular y la duración del ensayo (48-72h).

13. Las células son incubadas a 37°C en un incubador con atmósfera 5% CO₂ /95% O₂ y tratadas con los compuestos a las concentraciones indicadas durante 72 horas.
14. Tras el tratamiento las células son fijadas con 50% ácido tricloroacético (25 µl/pocillo) a 4°C durante 1h.
15. Las células son lavadas con agua destilada, 3 veces por inmersión.
16. Las células son teñidas con 0.1% sulforodamina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelto en 1% ácido acético (50 µl/pocillo) durante 30 min y lavadas 3 veces con ácido acético al 1% (100-150 µl/pocillo) para eliminar el colorante no unido.
17. El colorante unido a proteína se solubiliza con 100 µl de 10 mM Tris base no tamponado.
18. La densidad celular se analiza en un lector de placas a 540 nm.
19. Los datos son expresados como media ± desviación estándar de tres o cuatro pocillos para tres experimentos independientes.
20. Los datos obtenidos deben ser tiempo cero (T₀), control negativo (C-), control de solvente (DMSO o etanol) y diferentes concentraciones de compuesto (T_i). El porcentaje de viabilidad para cada dato como:
$$\frac{[(T_i - T_z)]}{(C - T_z)} \times 100$$
 for concentrations for which $T_i \geq T_z$.
$$\frac{[(T_i - T_z)]}{T_z} \times 100$$
 for concentrations for which $T_i < T_z$.
21. Tres posibles parámetros se pueden calcular en cada caso: Inhibición del 50 % del crecimiento (GI₅₀) calculado como $\frac{[(T_i - T_0)]}{(C - T_0)} \times 100 = 50$, y que representa la concentración de compuesto que provoca una reducción del 50% de la proteína (medida como tinción por SRB) en las células control tras el tratamiento.
22. La concentración de fármaco resultante en la inhibición del crecimiento total se calcula a partir de $T_i = T_z$.
23. La LC₅₀ (concentración de fármaco que resulta en una reducción del 50% en la proteína medida al final del tratamiento farmacológico en comparación con la que al principio) indica una pérdida neta de células después del tratamiento se calcula a partir de $\frac{[(T_i - T_z)]}{T_z} \times 100 = -50$. Los valores se calculan para cada uno de estos tres parámetros si se alcanza el nivel de actividad; sin embargo, si el efecto no se alcanza o se excede, el valor para ese parámetro se expresa como mayor o menor que la

concentración máxima o mínima probada.

Anexo 2: Comparación entre líneas celulares y extractos de *Skytanthus acutus* a diferentes concentraciones con test Kruskal Wallis de significancia $p < 0,05$.

MCF-7 HEX

Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT1 LIN1 (Spreadsheet2)							
Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES							
Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =76,37478 p =,0000							
Depend.: EXT1 LIN1	1	2	3	4	5	6	7
	R:84,188	R:88,656	R:17,906	R:24,531	R:44,125	R:55,750	R:80,344
1		1,000000	0,000000	0,000004	0,010174	0,278443	1,000000
2	1,000000		0,000000	0,000000	0,002208	0,087315	1,000000
3	0,000000	0,000000		1,000000	0,470430	0,020598	0,000001
4	0,000004	0,000000	1,000000		1,000000	0,137524	0,000025
5	0,010174	0,002208	0,470430	1,000000		1,000000	0,033771
6	0,278443	0,087315	0,020598	0,137524	1,000000		0,676124
7	1,000000	1,000000	0,000001	0,000025	0,033771	0,676124	

MCF-7 DCM



		Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT2 LIN1 (Spreadsheet2)						
		Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES						
		Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =62,03017 p =,0000						
Depend.: EXT2 LIN1		1	2	3	4	5	6	7
		R:76,469	R:86,969	R:14,188	R:29,719	R:53,844	R:64,000	R:70,313
1			1,000000	0,000001	0,000980	1,000000	1,000000	1,000000
2		1,000000		0,000000	0,000013	0,082201	0,954516	1,000000
3		0,000001	0,000000		1,000000	0,011607	0,000301	0,000021
4		0,000980	0,000013	1,000000		0,748205	0,059418	0,008548
5		1,000000	0,082201	0,011607	0,748205		1,000000	1,000000
6		1,000000	0,954516	0,000301	0,059418	1,000000		1,000000
7		1,000000	1,000000	0,000021	0,008548	1,000000	1,000000	

MCF-7 ET

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT3 LIN1 (Spreadsheet2)						
		Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES						
		Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =81,52307 p =,0000						
Depend.: EXT3 LIN1		1	2	3	4	5	6	7
		R:85,563	R:97,375	R:28,094	R:22,125	R:34,219	R:52,688	R:75,438
1			1,000000	0,000012	0,000001	0,000163	0,088068	1,000000
2		1,000000		0,000000	0,000000	0,000001	0,002088	1,000000
3		0,000012	0,000000		1,000000	1,000000	0,676124	0,000784
4		0,000001	0,000000	1,000000		1,000000	0,163218	0,000072
5		0,000163	0,000001	1,000000	1,000000		1,000000	0,006947
6		0,088068	0,002088	0,676124	0,163218	1,000000		0,998511
7		1,000000	1,000000	0,000784	0,000072	0,006947	0,998511	

MDA-MB 231 HEX

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT1 LIN2 (Spreadsheet2) Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =52,48563 p =,0000						
Depend.: EXT1 LIN2		1	2	3	4	5	6	7
		R:88,250	R:86,313	R:28,219	R:33,219	R:45,344	R:50,156	R:64,000
1			1,000000	0,000004	0,000035	0,003913	0,019058	0,728370
2		1,000000		0,000009	0,000079	0,007550	0,034406	1,000000
3		0,000004	0,000009		1,000000	1,000000	1,000000	0,038455
4		0,000035	0,000079	1,000000		1,000000	1,000000	0,154211
5		0,003913	0,007550	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
6		0,019058	0,034406	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
7		0,728370	1,000000	0,038455	0,154211	1,000000	1,000000	

MDA-MB 231 DCM

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT2 LIN2 (Spreadsheet2)						
		Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES						
		Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =58,53391 p =,0000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
EXT2 LIN2		R:90,375	R:86,063	R:22,875	R:35,375	R:44,438	R:50,813	R:65,563
1			1,000000	0,000000	0,000035	0,001325	0,011963	0,644577
2		1,000000		0,000001	0,000213	0,006062	0,044944	1,000000
3		0,000000	0,000001		1,000000	1,000000	0,314301	0,004220
4		0,000035	0,000213	1,000000		1,000000	1,000000	0,179760
5		0,001325	0,006062	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
6		0,011963	0,044944	0,314301	1,000000	1,000000		1,000000
7		0,644577	1,000000	0,004220	0,179760	1,000000	1,000000	

MDA-MB 231 ET

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT3 LIN2 (Spreadsheet2)						
		Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES						
		Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =71,06406 p =,0000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
EXT3 LIN2		R:91,094	R:90,063	R:25,250	R:27,563	R:37,094	R:54,969	R:69,469
1			1,000000	0,000000	0,000001	0,000054	0,034728	1,000000
2		1,000000		0,000000	0,000001	0,000083	0,047035	1,000000
3		0,000000	0,000000		1,000000	1,000000	0,202535	0,002469
4		0,000001	0,000001	1,000000		1,000000	0,356799	0,005512
5		0,000054	0,000083	1,000000	1,000000		1,000000	0,100956
6		0,034728	0,047035	0,202535	0,356799	1,000000		1,000000
7		1,000000	1,000000	0,002469	0,005512	0,100956	1,000000	

MCF-10 HEX

		Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT1 LIN3 (Spreadsheet2)						
		Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES						
		Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =83,91666 p =,0000						
Depend.:		1	2	3	4	5	6	7
EXT1 LIN3		R:96,781	R:84,531	R:25,125	R:18,750	R:39,813	R:53,375	R:77,125
1			1,000000	0,000000	0,000000	0,000015	0,003288	1,000000
2		1,000000		0,000005	0,000000	0,002064	0,139804	1,000000
3		0,000000	0,000005		1,000000	1,000000	0,291442	0,000125
4		0,000000	0,000000	1,000000		1,000000	0,053855	0,000008
5		0,000015	0,002064	1,000000	1,000000		1,000000	0,024262
6		0,003288	0,139804	0,291442	0,053855	1,000000		0,810496
7		1,000000	1,000000	0,000125	0,000008	0,024262	0,810496	

MCF-10 DCM



Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT2 LIN3 (Spreadsheet2) Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =94,62244 p =,0000							
Depend.: EXT2 LIN3	1	2	3	4	5	6	7
	R:95,688	R:96,438	R:22,250	R:24,188	R:30,313	R:55,875	R:70,750
1		1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,011035	0,627124
2	1,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,008637	0,530708
3	0,000000	0,000000		1,000000	1,000000	0,071519	0,000504
4	0,000000	0,000000	1,000000		1,000000	0,121463	0,001051
5	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000		0,545825	0,008999
6	0,011035	0,008637	0,071519	0,121463	0,545825		1,000000
7	0,627124	0,530708	0,000504	0,001051	0,008999	1,000000	

MCF-10 ET

Multiple Comparisons p values (2-tailed); EXT3 LIN3 (Spreadsheet2) Independent (grouping) variable: CONCENTRACIONES Kruskal-Wallis test: H (6, N= 112) =77,31183 p =,0000							
Depend.: EXT3 LIN3	1	2	3	4	5	6	7
	R:95,844	R:95,594	R:29,031	R:29,281	R:35,125	R:49,625	R:61,000
1		1,000000	0,000000	0,000000	0,000003	0,001195	0,050567
2	1,000000		0,000000	0,000000	0,000003	0,001310	0,054340
3	0,000000	0,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,112658
4	0,000000	0,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,120454
5	0,000003	0,000003	1,000000	1,000000		1,000000	0,508711
6	0,001195	0,001310	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
7	0,050567	0,054340	0,112658	0,120454	0,508711	1,000000	

Anexo 3: Tablas de media y desviación estándar de líneas celulares cancerígenas y no tumorales expuestas a distintas concentraciones de extractos Hexano, Diclorometano y Etanol.

Línea Celular MCF-7:



		MEDIA	DESVEST
HEX	C-	99,985777	0,0166455
	CS	106,48096	9,9231612
	500 µg/ml	12,304125	5,1707096
	250 µg/ml	19,012781	12,102328
	125 µg/ml	39,478106	13,843754
	62.5 µg/ml	57,842055	15,229222
	25 µg/ml	95,566198	6,1042083
DCM	C-	105,77617	14,06861
	CS	111,91378	14,382713
	500 µg/ml	11,011112	2,7408391
	250 µg/ml	21,251698	7,8624433
	125 µg/ml	57,751147	5,1771934
	62.5 µg/ml	69,175351	27,709277
	25 µg/ml	73,400598	48,623301
ET	C-	93,382182	5,1441933
	CS	111,9019	11,957256
	500 µg/ml	22,765272	7,6401272
	250 µg/ml	21,602142	5,3535357
	125 µg/ml	30,538919	11,622031
	62.5 µg/ml	44,358481	10,194314
	25 µg/ml	71,520933	30,996044

Línea Celular MDA-MB-231:

		MEDIA	DESVEST
HEX	C-	99,964299	0,0718368
	CS	97,736226	9,0030929
	500 µg/ml	21,095347	10,263245
	250 µg/ml	27,053727	8,7612334
	125 µg/ml	42,039306	19,149148
	62.5 µg/ml	52,007676	35,661975
	25 µg/ml	71,858659	45,649213
DCM	C-	111,7273	21,98435
	CS	106,63438	16,208557
	500 µg/ml	19,488703	14,843283
	250 µg/ml	34,178313	37,727881
	125 µg/ml	46,347711	32,25818
	62.5 µg/ml	52,224588	11,55834
	25 µg/ml	65,996481	36,581925
ET	C-	103,00537	13,352518
	CS	102,86301	13,22679
	500 µg/ml	26,584812	14,240664
	250 µg/ml	29,645018	18,686991
	125 µg/ml	37,845994	16,411514
	62.5 µg/ml	58,439544	24,476586
	25 µg/ml	80,134187	34,93608

Línea Celular MCF-10:



		MEDIA	DESVEST
HEX	C-	99,985607	0,0107702
	CS	84,979207	16,175371
	500 µg/ml	10,179346	4,7603873
	250 µg/ml	7,7645157	2,4228155
	125 µg/ml	29,20951	19,40005
	62.5 µg/ml	35,131178	11,46229
	25 µg/ml	76,776252	4,7353267
DCM	C-	100,82571	21,454791
	CS	102,56722	15,931077
	500 µg/ml	6,0514454	1,6846192
	250 µg/ml	6,1179377	2,1084484
	125 µg/ml	6,9390594	1,6347243
	62.5 µg/ml	15,851699	9,5814201
	25 µg/ml	21,681312	9,9664308
ET	C-	104,8034	17,033613
	CS	103,54435	19,370889
	500 µg/ml	11,68928	3,0840224
	250 µg/ml	11,880879	3,0285229
	125 µg/ml	12,833506	1,9783823
	62.5 µg/ml	24,44005	18,264601
	25 µg/ml	21,418061	4,117803