

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Evaluación citotóxica de compuestos fenólicos de  
*Catasetum integerrimum* (Orchidaceae)**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :

**Enriqueta Mercedes Galicia Mendieta**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Eva Aguirre Hernández  
2017**

**Ciudad Universitaria, CDMX**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo directo e indirecto de varias personas que conforman el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más sincero agradecimiento a mi compañera de vida y amiga, la Doctora Eva Aguirre Hernández, directora de mi tesis, por depositar su confianza y por el interés mostrado y por su dedicación, paciencia y asesoramiento para la realización de este trabajo.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo, asesoramiento técnico y las sugerencias recibidas de la profesora y joven amiga, la M. en C. Lizeth Mariel Zavala Ocampo, con la que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada.

También me gustaría agradecer a la Q. A. Verónica Muñoz Ocotero por la orientación, el seguimiento, evaluación y asesoría técnica, pero sobre todo, por la motivación y apoyo recibido.

Así mismo agradezco el apoyo por la asesoría y revisión de este trabajo al Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

Hago extensiva mi gratitud a la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan del Instituto de Química de la UNAM por su apoyo en la realización de los bioensayos de actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano.

Al M. en C. Rubén San Miguel Chávez del laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Posgraduados por su ayuda en el análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Al M. en C. Francisco A. Basurto Peña, por su apoyo en la recolecta de la orquídea.

Y a la Dra. Dorismilda Martínez Cabrera del Instituto Tecnológico de Huejutla, Hgo. por su apoyo en la identificación y suministro del material vegetal.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecer les su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos difíciles de mi vida. Algunos están aquí conmigo y otros están en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado.

A todos ellos, muchas gracias.

## *Dedicatoria*

*A mi madre Mercedes, que me acompaña siempre en mi mente y en mi corazón*

*A Juan Carlos mi compañero de vida que siempre ha creído en mí, que me ha apoyado en todos mis proyectos sin pedir nada a cambio.*

*A mis hijos Elizabeth, David y José Carlos que dan sentido a mi vida y que siempre están y estarán en mi corazón con su amor y los cuales me han enseñado el amor incondicional.*

*A mis hermanos José, Rosa, Julián y Adolfo.*

*A mis demás familiares que me recuerdan mi origen, mi trayectoria y mi finitud.*

*A mis amigos y compañeros, a quienes el destino me ha presentado y que me han enriquecido como ser humano.*

*“El hombre solo puede alcanzar el conocimiento*

*con la ayuda de quienes los que lo poseen.*

*Esto debe ser entendido desde el principio.*

*Uno debe aprender de los que saben”*

*George Ivanovitch Gurdjieff*

# ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS .....	5
INDICE DE CUADROS .....	5
RESUMEN .....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	7
2. ANTECEDENTES .....	9
2.1 Definición de cáncer .....	9
2.2 Clasificación del cáncer .....	9
2.2.1 Origen .....	9
2.2.2 Tipos del tejido .....	9
2.2.3 Clasificación por el grado de anormalidad de las células .....	10
2.3 Cáncer de mama .....	10
2.3.1 Clasificación del cáncer de mama .....	11
2.3.2. Clasificación molecular de los cánceres de seno .....	13
2.4 Cáncer de mama en México .....	15
2.5 . Terapias para el cáncer de mama .....	15
2.5.1 Quimioterapia para el cáncer de seno .....	16
2.5.2 Cirugías .....	17
2.5.3 Radioterapia.....	17
2.5.4 Desventajas de los tratamientos contra cáncer .....	18
2.6 Plantas y compuestos fenólicos con actividad citotóxica.....	19
2.7 Orquídeas con actividad anticancerosa .....	20
2.8 <i>Catasetum integerrimum</i> Hook .....	22
2.8.1 Etnobotánica de <i>C. integerrimum</i> .....	23
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	25
4.1 Objetivo general .....	25
4.2 Objetivos específicos .....	25
4.3 Hipótesis .....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
5.1 Colecta e identificación de <i>Catasetum integerrimum</i> .....	26

5.2	Obtención de extractos.....	26
5.3	Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) de los extractos de <i>Catsetum integerrimum</i> .....	27
5.3.1	Condiciones de CLAR para cuantificación de ácido fenólicos.....	27
5.3.2	Condiciones de CLAR para cuantificación de flavonoides agliconas .....	28
5.3.3	Condiciones de CLAR para cuantificación de flavonoides glicosilados .....	28
5.3.4	Preparación de las muestras para inyección en el CLAR.....	28
5.3.5	Elaboración de las curvas patrón .....	28
5.4	Evaluación de la actividad citotóxica. ....	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1	Rendimiento de los extractos .....	30
6.2	Inhibición del crecimiento celular de cáncer de mama de los extractos de acetato de etilo de <i>C. integerrimum</i> .....	30
6.3	Análisis por CLAR del extracto de acetato de etilo de raíz de <i>C. integerrimum</i> .....	32
7.	CONCLUSIONES .....	36
8.	REFERENCIAS.....	37

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tejido mamario normal (American Cancer Society, 2016).....	11
Figura 2. Carcinoma ductal <i>in situ</i> (American Cancer Society, 2016).....	12
Figura 3. Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (American Cancer Society, 2016).....	13
Figura 4. Ejemplares de <i>Catasetum integerrimum</i> .....	23
Figura 5. Diagrama metodológico de las extracciones.....	27
Figura 6. Porcentaje de inhibición.....	31
Figura 7. Análisis por CLAR para la identificación de ácidos fenólicos.....	32
Figura 8. Análisis por CLAR para la identificación de flavonoides.....	33

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>C. integerrimum</i> .....	30
Cuadro 2. Efecto citotóxico contra cáncer de mama del extracto de acetato de etilo de <i>C. integerrimum</i> .....	31
Cuadro 3. Concentración y tiempos de retención de ácidos fenólicos del extracto de acetato de etilo de raíz de <i>C. integerrimum</i> .....	32
Cuadro 4. Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides del extracto de acetato de etilo de raíz de <i>C. integerrimum</i> .....	33

## RESUMEN

*Catasetum integerrimum* (Orchidaceae) es una orquídea, epífita con pseudopseudobulbo, que se distribuye desde México hasta Centroamérica. Se considera un remedio medicinal para curar llagas y heridas en la piel, para tratar la diabetes, hipertensión arterial e incluso el cáncer. Esta especie es conocida con varios nombres comunes, entre ellos: cola de pato, trompa de puerco o flor de astronauta. En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de los extractos de acetato de etilo de hoja, pseudobulbo y raíz de *C. integerrimum* en dos líneas celulares humanas de cáncer de mama. Los extractos fueron obtenidos mediante maceración y el extracto activo fue analizado por la técnica de HPLC para la identificación y concentración de compuestos fenólicos. La citotoxicidad de los extractos se determinó midiendo el porcentaje de inhibición del crecimiento celular de cáncer de mama dependiente de hormonas (MCF-7) y no dependiente de hormonas (MDA-MB-251), mediante el ensayo colorimétrico con sulforodamina B. En este ensayo de citotoxicidad *in vitro*, con una dosis de 25 µg/mL de extracto de acetato de etilo de raíz, se obtuvo una inhibición del crecimiento celular en la línea MCF-7 (79.47%), una potente actividad de la dosis de 25 µg/mL en la línea MDA-MB-251 (97.79%) y la interrupción total del crecimiento en la dosis de 50 µg/mL. El análisis cromatográfico identificó como componentes del extracto a los ácidos fenólicos: ferúlico, gálico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico, siríngico y vainillínico, de los cuales los más abundantes son el ácido ferúlico (0.686 µg/mg) y el ácido vainillínico (0.101 µg/mg). También se determinó la presencia de los flavonoides fletina, galangina, naringenina, quercetina y rutina. De estos metabolitos, los mayoritarios fueron la fletina con 304.358 µg/mg y la naringenina (90.325 µg/mg). Estos resultados muestran que los ácidos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto de acetato de etilo de la raíz de *C. integerrimum*, podrían combatir el carcinoma de mama, siendo *in vitro* más eficaces contra las células cancerígenas hormono independientes. Este estudio informa por primera vez la actividad citotóxica y fitoquímica de *C. integerrimum*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de padecimientos neoplásicos que se presenta en los seres humanos y en otras especies animales. Por consiguiente, el cáncer se puede definir como un proceso de crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Una característica de esta enfermedad, es la alteración en los mecanismos de control que regulan la proliferación y diferenciación de las células (Katsung, 1986). Esta alteración es el resultado de anomalías genéticas, que pueden aparecer por la mutación de un grupo específico de genes. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y su pérdida o inactivación da lugar a una división celular acelerada (Gibbs, 2000). Los tumores más comunes a nivel mundial son el de pulmón (1.35 millones), mama (1.15 millones) y el colorrectal (1 millón) (Ruíz et al., 2004).

En México durante el 2010 se registraron 590, 693 defunciones, siendo los tumores malignos la tercera causa de mortalidad, con aproximadamente el 13% del total de la población (INEGI, 2012). El cáncer de mama constituye una prioridad en salud ya que es una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres adultas de todas las edades y niveles de ingreso, siendo más común en aquellas que tienen entre 30 a 54 años de edad (Kanaul et al., 2009).

Hasta hoy, las estrategias principales para el tratamiento curativo o paliativo del cáncer son los procedimientos quirúrgicos, la radioterapia y la quimioterapia. Estos tratamientos causan varios efectos colaterales menores como vómito, diarrea y alopecia y efectos mayores como toxicidad neurológica, cardíaca, pulmonar y renal (Mans et al., 2000; Alonso-Castro et al., 2011), Es por ello que existe la necesidad de descubrir drogas anticancerosas alternativas, más potentes, así como más selectivas y menos tóxicas.

En México, desde épocas prehispánicas a las orquídeas se les ha dado varios usos entre ellos como alimento, medicinal, artesanal, narcótico, saborizantes, venenos, adhesivos, ceremonial, y afrodisíaco (Téllez-Velasco, 2001). Actualmente en las comunidades se les atribuyen efectos sedante, anticonvulsivo, estimulante, antiespasmódico, antiparasitario, emético y anticanceroso. También se utilizan para curar fracturas, fiebre, infecciones de

ojos, reumatismo, diarrea, insomnio, neuralgia, cólicos menstruales, ansiedad, diabetes y para la disminución de parálisis (Hossain, 2011; Kariola et al., 2014). Con respecto al tratamiento del cáncer, estudios previos han mostrado a los compuestos fenólicos como agentes potencialmente quimioprotectores frente al cáncer e incluso con acción antitumoral (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011). Estudios fitoquímicos en orquídeas revelan que la mayoría de estas plantas sintetizan compuestos como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, lignanos, quinonanos, entre otros. A dichos compuestos se les atribuyen las propiedades terapéuticas que poseen algunas especies de la familia Orquidiaceae, tales como antioxidante, anticanceroso, antimutagénico y antiinflamatorio (Huang et al., 2010).

Es de gran importancia el hecho de que las orquídeas jueguen un papel importante como medicamentos, sin embargo a pesar de que varias especies de esta familia están siendo investigadas mundialmente, la información es escasa, es por tanto, importante corroborar los usos medicinales, ya que en la medicina tradicional se les atribuyen efectos curativos. Por ejemplo, en algunas localidades de Veracruz e Hidalgo *Catasetum integerrimum* Hook se usa para tratar distintos tipos de cáncer. A pesar de la gran importancia que tiene esta especie como planta medicinal, no existe información científica sobre sus propiedades citotóxicas y su composición química. Es por ello, que en esta investigación se pretende evaluar la actividad citotóxica de *C. integerrimum* e identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos activos. Lo anterior aportará evidencias de las propiedades que se le atribuyen a dicha especie y ayudará al enriquecimiento en el conocimiento de especies medicinales confiables para la terapéutica del cáncer.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Definición de cáncer**

El término cáncer engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen y crecen sin control en cualquier parte del cuerpo. Mientras las células normales se dividen y mueren durante un periodo de tiempo programado, la célula cancerosa “olvida” la capacidad para morir y se divide casi sin límite. Tal multiplicación en el número de células llega a formar unas masas, denominadas “tumores” o “neoplasias”, que en su expansión destruyen y sustituyen a los tejidos normales, pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011).

### **2.2 Clasificación del cáncer**

Existen más de 100 tipos de cáncer, los cuales se clasifican en varias categorías de acuerdo a su origen, tipo de tejido, grado de anormalidad de las células, etc. (NCI, 2015).

#### **2.2.1 Origen**

Por el sitio primario del origen, los cánceres pueden ser de tipos específicos como cáncer de pecho, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer del riñón, cáncer oral, cáncer de cerebro etc.

#### **2.2.2 Tipos del tejido**

**1. Carcinoma.** Este tipo de cáncer se origina de la capa epitelial de las células que forman las cavidades de las partes externas del cuerpo (piel) y tejido que recubre o reviste los órganos internos (tejidos glandulares de la mama y próstata). Los carcinomas del tejido epitelial son los más frecuentes, incluyendo entre el 80 al 90%, debido a que el epitelio es el más abundante en el cuerpo. Los carcinomas son de dos tipos: carcinomas de células escamosas, los cuales son de estructura similar a la piel y los adenocarcinomas, de estructura glandular.

**2. Sarcoma.** Estos cánceres se originan en tejidos conectivos y de apoyo incluyendo los músculos, los huesos, el cartílago y la grasa. El cáncer de hueso es uno de los sarcomas

llamados osteosarcoma. Otros ejemplos incluyen condrosarcoma (del cartílago), leiomiomasarcoma (músculos lisos), rabdomiosarcoma (músculos esqueléticos), fibrosarcoma (tejido fibroso), angiosarcoma (vasos sanguíneos), liposarcoma (tejido adiposo o graso), glioma (tejido conectivo neurogénico, cerebro), entre otros.

**3. Mieloma.** Éstos se originan en las células del plasma de la médula. El mieloma es un tipo de cáncer de sangre. La leucemia (cáncer de sangre), afecta a la médula que es el sitio para la producción de glóbulos. La médula comienza a producir a los glóbulos blancos en exceso e inmaduros.

**4. Linfoma.** Éstos son cánceres del sistema linfático. A diferencia de las leucemias, que afectan a la sangre y se llaman los “cánceres líquidos”, los linfomas son “cánceres sólidos”. Éstos pueden afectar a ganglios linfáticos en los sitios específicos como el estómago, el cerebro, los intestinos, etc.

**5. Tipos mezclados.** Éstos tienen dos o más tipos de cáncer. Un ejemplo incluye el carcinosarcoma, el cual es una mezcla de carcinoma (tejido epitelial) y sarcoma (tejido conectivo).

### **2.2.3 Clasificación por el grado de anormalidad de las células**

Las células que se distinguen de entre las células normales, se consideran tumores de la calidad inferior, por el contrario, las células no diferenciadas, son altamente anormales y de alto grado.

### **2.3 Cáncer de mama**

El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células del seno. Un tumor maligno es un grupo de células cancerosas que pueden crecer penetrando (invadiendo) los tejidos circundantes o que pueden propagarse (hacer metástasis) a áreas distantes del cuerpo. Este cáncer puede aparecer en mujeres y hombres pero más del 99% de los casos ocurre en mujeres (Melé et al., 2008).

La glándula mamaria, forma parte del aparato reproductor en la mujer. Su dependencia hormonal, explica la dinámica de estos órganos, los cambios en su estructura, la aparición

de enfermedades relacionadas con las diferentes edades, los cambios cíclicos hormonales, el embarazo, la lactancia, y la menopausia. El cáncer de mama, ha sido considerado una enfermedad de las mujeres, aunque puede afectar a los hombres, con resultados igualmente letales. Este cáncer es la causa más frecuente de mortalidad por neoplasia en el sexo femenino debido a que una de cada 9 mujeres padecerá esta enfermedad (Knaul et al., 2009). Los factores de riesgo para el cáncer de mama incluyen: estilo de vida, herencia familiar, la edad, hábitos nutricionales, el consumo de alcohol, tabaquismo, sobrepeso, obesidad, la radiación, menarquía temprana, menopausia tardía, nuliparidad, embarazo a edad temprana y uso de anticonceptivos orales (Ortega, et al 2013). En la Figura 1 se muestra la anatomía de la glándula mamaria normal.

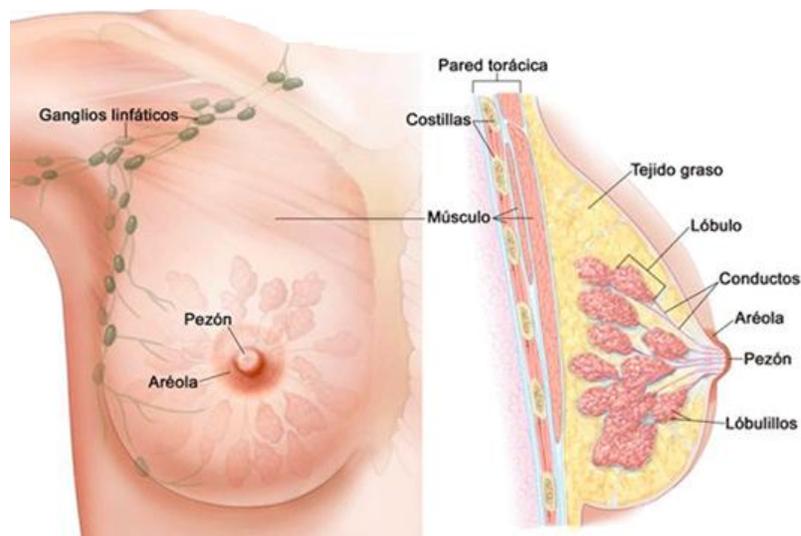


Figura 1. Tejido mamario normal (American Cancer Society, 2016)

### 2.3.1 Clasificación del cáncer de mama

Dependiendo de su origen (histogénesis topográfica) o de la morfología que el tumor adopta en su desarrollo. La mayoría de los cánceres de seno son carcinomas, un tipo de cáncer que comienza en las células epiteliales, también llamado adenocarcinoma. Otro tipo de cáncer, son los sarcomas, que inician en las células del músculo, grasa o tejido conectivo. El carcinoma mamario se clasifica también en lobulillar o ductal. Dependiendo de su circunscripción a las estructuras anatómicas de las que se originó o de la infiltración del estroma vecino, el carcinoma puede ser *in situ* o infiltrante.

**Carcinoma ductal *in situ***, también conocido como *carcinoma intraductal* (Figura 2) se considera un cáncer no invasivo o preinvasivo, debido a que las células no se han propagado (invadido) a través de las paredes de los conductos hacia el tejido que rodea el seno, o sea no pueden hacer metástasis. Casi todas las mujeres que son diagnosticadas en esta etapa del cáncer de seno se pueden curar (American Cancer Society, 2016)

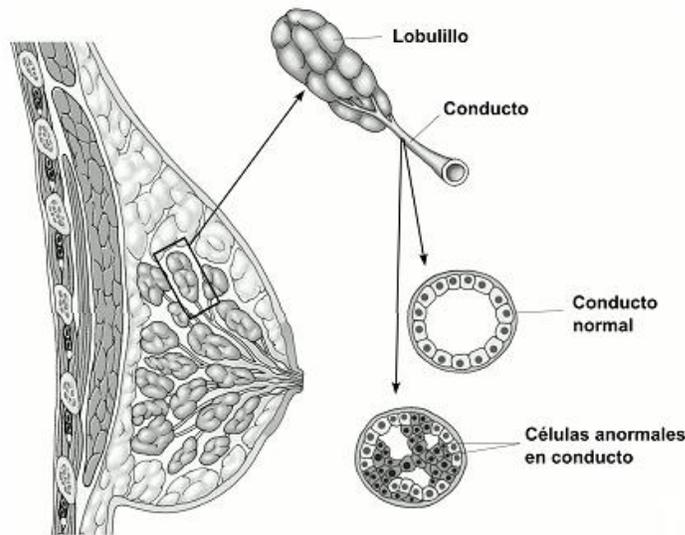


Figura 2. Carcinoma ductal *in situ* (American Cancer Society, 2016)

**Carcinoma ductal invasivo (o infiltrante).** Es el tipo más común de cáncer de seno, éste comienza en un conducto lácteo, penetra a través de la pared del conducto y crece en el tejido adiposo; dicho cáncer puede hacer metástasis y propagarse a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo a otras partes del cuerpo. Aproximadamente, 8 de 10 cánceres invasivos del seno son carcinomas ductales infiltrantes.

**Carcinoma lobulillar invasivo.** Este carcinoma comienza en las glándulas productoras de leche (lobulillos) y puede hacer metástasis a otras partes del cuerpo. Alrededor de uno de cada 10 de los cánceres de seno pueden ser de este tipo.

**Carcinoma lobulillar *in situ*.** En este tipo de cáncer, las células cancerosas crecen en los lobulillos de las glándulas productoras de leche del seno, pero no atraviesan la pared de los lobulillos (Figura 3).

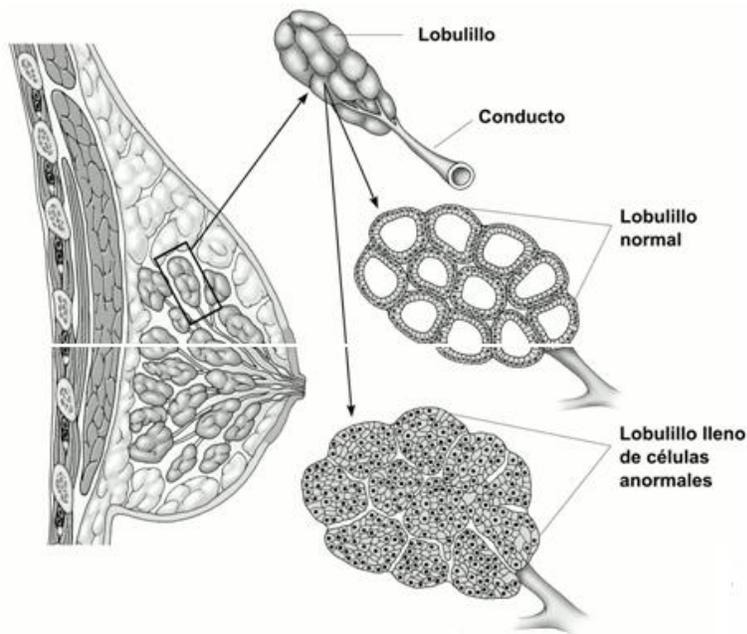


Figura 3. Carcinoma lobulillar *in situ* (American Cancer Society, 2016)

### 2.3.2. Clasificación molecular de los cánceres de seno

El cáncer de seno también se puede clasificar en función de las proteínas que se encuentran sobre la superficie de las células cancerosas o dentro de ellas, en grupos como “receptor hormonal positivo” o “triple negativo” (American Cancer Society, 2016).

Esta clasificación establece cuatro tipos de cáncer de mama: Luminal A, luminal B, HER 2 y basal like. Los tumores luminales tiene receptores hormonales positivos, los HER2 expresión de HER2 y los basal like o triple negativos no expresan ni receptores hormonales ni HER2. El subtipo Luminal A es el de mejor pronóstico y el basal like el de peor pronóstico

**Receptor de estrógeno (ER) y receptor de progesterona (PR).** Los receptores son proteínas que se encuentran en el interior o en la superficie de ciertas células y que se pueden unir a otras proteínas que circulan en la sangre. Las células normales y algunas células cancerosas del seno tienen receptores que se unen al estrógeno y a la progesterona. Si las células cancerosas contienen receptores de estrógeno o de progesterona, este cáncer

se llama cáncer con receptores de hormonas positivos. Estos cánceres se pueden tratar con medicamentos hormonales que reducen los niveles de estrógeno o bloquean los receptores de estrógeno. También puede haber cánceres que son negativos para estrógeno, pero positivos para progesterona. Si las células cancerosas del seno no contienen receptores hormonales, son identificados como negativo para receptores. El tratamiento con los medicamentos de terapia hormonal no es útil para estos cánceres. Estos cánceres se desarrollan más rápidamente que los cánceres con receptores hormonales positivos.

**Receptor de proteína HER2/neu.** Aproximadamente uno de cada cinco cánceres de seno contiene abundante cantidad de la proteína promotora del crecimiento (HER2/neu). Los cánceres que son positivos para HER2 tienen demasiadas copias del gen HER2/neu. Estos cánceres son más agresivos, es decir, crecen y se propagan con más rapidez que otros. Los cánceres negativos, no tienen exceso de HER2

**Cáncer triple negativo.** Son células cancerosas del seno que no contienen receptores hormonales ni exceso de HER2. Este tipo de cáncer tiende a crecer y a propagarse más rápidamente que la mayoría de los otros tipos de cáncer de seno. También hay cáncer triple positivo, los cuales son positivos para hormonas y HER2. Estos últimos pueden tratarse tanto con medicamentos hormonales, como con fármacos que se dirigen a HER2.

**El carcinosarcoma mamario.** Este tipo de cáncer es un tumor mixto, compuesto por componente carcinomatoso epitelial y tejido mesenquimal sin áreas de transición entre ellos, tumor bifásico, cuya incidencia es de 0.1-0.2% de los tumores malignos. Es uno de los cánceres mamarios más agresivos, de baja incidencia, compuesto por una mezcla de tejido mesenquimal y zonas carcinomatosas epiteliales sin áreas de transición entre ambos componentes, suele expresarse el gen EGFR y menos frecuente el HER-2. Estas neoplasias no responden al tratamiento hormonal y parcialmente a la quimioterapia (Melé et al., 2008).

Otros cánceres de mama menos comunes son el cáncer inflamatorio (piel del seno) y cáncer del pezón (Melé et al., 2008; American Cancer Society, 2016)

#### **2.4 Cáncer de mama en México**

En cuanto a la magnitud actual del cáncer de mama en México, a partir de 2006 éste ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años. En el año de 2010, la tasa estandarizada de mortalidad fue de 18.7 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento del 49% en los últimos 20 años. La mortalidad por área geográfica mostró diferencias notorias por entidad federativa, con las tasas más altas en los estados del centro y del norte. Seis estados concentraron la mitad de las muertes por cáncer de mama en 2010: Ciudad de México (13.4%), Estado de México 12.4%, Jalisco (8.2%), Veracruz (6.4%), Nuevo León (6%) y Guanajuato (3.8%). En el período de 1990 a 2010, la tasa de mortalidad por cáncer de mama aumentó en todos los estados, siendo los de mayor incremento Chihuahua, Coahuila y Guerrero, con aumentos de más de 200%; en contraste, aquellos con menor elevación fueron Aguascalientes, Durango y Baja California.

La tasa de mortalidad aumenta con la edad; entre 1990 y 2000 hubo incrementos de mortalidad en las mujeres de 50 a 69 años y mayores de 79 años de edad, mientras que entre 2000 y 2010 dicho aumento se acentuó a partir de los 60 años. Cabe señalar que por cada muerte ocurrida en mujeres de 25 y 49 años por cáncer de mama en 2010, hubo 2.5 defunciones de mujeres de 50 años en adelante (Knaul et al., 2009).

#### **2.5 . Terapias para el cáncer de mama**

Existe una gran gama de tratamientos y esto va de acuerdo al estadio clínico o a la etapa en la que se encuentra el cáncer mamario. El reconocimiento temprano del mismo es crucial para lograr la remoción del tumor y alcanzar la curación completa. El tratamiento del cáncer de seno es complejo y requiere de la participación de un equipo multidisciplinario para poder ofrecer a las pacientes un tratamiento óptimo. Las medidas terapéuticas tradicionales incluyen la cirugía, la radiación y la quimioterapia. En la actualidad se estudia la utilidad de la inmunoterapia y la modulación de la respuesta biológica (Hurtado et al., 2004).

Clásicamente el tratamiento del cáncer de mama se iniciaba con la cirugía y posteriormente se administra la quimioterapia y la radioterapia (tratamiento adyuvante). En la actualidad, se puede iniciar con la quimioterapia previamente a la cirugía y la radioterapia (tratamiento neoadyuvante). El tratamiento dependerá del tipo y etapa del cáncer.

### **2.5.1 Quimioterapia para el cáncer de seno**

La quimioterapia es un tratamiento con medicamentos, los cuales pueden administrarse por vía intravenosa u oral. Los medicamentos se administran en ciclos, de manera que cada período de tratamiento va seguido de un período de recuperación. Por lo general, el tratamiento dura varios meses. La quimioterapia se usa como tratamiento principal para las mujeres cuyo cáncer se ha propagado fuera del seno y del área axilar. Este tratamiento es más eficaz cuando se usan combinaciones de medicamentos.

Los medicamentos empleados contra el cáncer de seno en etapa inicial incluyen antraciclinas y taxanos, en combinación con fluorouracilo, ciclofosfamida y carboplatino.

Para los cánceres que son HER2 positivos, a menudo se administra el medicamento Herceptin con uno de los taxanos o también se puede combinar con trastuzumab y docetaxel. Muchos medicamentos de quimioterapia son útiles en el tratamiento de mujeres con cáncer de seno avanzado, tales como: docetaxel, paclitaxel, carboplatino, vinorelbina, mitoxantrona, eribulina, entre otros (NCI, 2015).

En los tratamientos antiangiogénicos se usan fármacos que actúan impidiendo que el tumor desarrolle vasos sanguíneos para nutrirse y crecer. En cáncer de mama está demostrada la actividad de Bevacizumab en combinación con quimioterapia. Los bifosfonatos se utilizan cuando el tumor produce afectación de los huesos para disminuir el dolor y las complicaciones óseas como las fracturas y la elevación de los niveles de calcio en la sangre. Los más utilizados son el zolendronato y el denosumab. El tratamiento hormonal solo es útil en pacientes con tumores receptores hormonales positivos. En dicho tratamiento, es importante tener en cuenta si la mujer es o no postmenopáusicas. La mayoría de los tipos de terapia hormonal para el cáncer de seno disminuye los niveles de estrógeno o evita que el estrógeno actúe en las células cancerosas. El tamoxifeno y toremifeno bloquean los receptores de estrógeno de las células cancerosas. Esto evita que el estrógeno se adhiera a las células y les indique que crezcan y se dividan. Los efectos secundarios más comunes de estos medicamentos incluyen cansancio, sofocos repentinos de calor (bochornos), flujo o sequedad vaginal y cambios en el humor (Santaballa, 2015).

Los casos de cáncer de seno con demasiada cantidad de la proteína HER2/neu son tratados con los siguientes medicamentos: trastuzumab, pertuzumab, lapatinib. El trastuzumab y el pertuzumab son anticuerpos monoclonales y se administran vía intravenosa. El lapatinib es un medicamento dirigido que no es un anticuerpo que se toma en forma de pastilla. Algunas mujeres experimentan daño cardíaco durante o después del tratamiento con los anticuerpos y el lapatinib causa diarrea grave.

### **2.5.2 Cirugías**

Existen dos opciones de cirugía en las mujeres con un cáncer de mama localizado:

1. **Cirugía conservadora.** Se extirpa el tumor con una pequeña cantidad de tejido sano alrededor. Con esta cirugía se conserva la mama, pero en general se debe administrar radioterapia después con objeto de eliminar las células tumorales que pudieran haberse quedado. La posibilidad de realizar dicha cirugía depende de la localización y tamaño del tumor.
2. **Mastectomía.** En esta cirugía se extirpa toda la mama.
3. **Biopsia del ganglio centinela**

El ganglio centinela es el primer ganglio que recibe el drenaje linfático del tumor, por tanto, existe la posibilidad de que el tumor se disemine. El procedimiento consiste en hacer una biopsia del ganglio y analizar si presenta células cancerígenas o no, y decidir continuar o no con la linfadenectomía.

### **2.5.3 Radioterapia**

Las radiaciones ionizantes pueden ser electromagnéticas o por partículas. Las electromagnéticas incluyen los rayos gamma y X. La radiación de partículas contiene haces de electrones, protones, neutrones y partículas alfa. Para que funcione este tratamiento se requiere que los tumores sean sensibles y accesibles, es decir, tumores superficiales o localizados en órganos, donde es posible introducir una fuente de radiación, sin dañar tejidos vitales (ejemplo, el útero).

#### **2.5.4 Desventajas de los tratamientos contra cáncer**

Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen del tipo de medicamentos, dosis administrada y duración del tratamiento. Algunos de los efectos son: caída de pelo, úlceras en la boca, pérdida o aumento de apetito, náuseas y vómitos, disminución de glóbulos blancos, rojos y plaquetas, adormecimiento de pies y manos, dolor, ardor, daño cardíaco y leve disminución en el funcionamiento mental, ocasionado por los siguientes medicamentos: docetaxel, paclitaxel, carboplatino, cisplatino vinorelbina, erubulin, exabepilona, doxorubicina, epirubicina, entre otros.

La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, han sido durante muchos años, la terapia estándar en el tratamiento contra el cáncer, sin embargo, ocasionan un impacto negativo sobre el estado nutricional de los pacientes. Tras la cirugía es relativamente frecuente un estado catabólico, desarrollo de fístulas, síndrome de mala absorción y ayuno postquirúrgico entre otros. La radioterapia en tumores de cabeza y cuello, digestivos o torácicos, presenta una toxicidad importante en la zona radiada, que se intensifica al pautarse junto a quimioterapia. Con bastante frecuencia, la toxicidad de los tratamientos se relaciona con anorexia y pérdida de peso, junto con una mala absorción de nutrientes y una limitación de la ingesta oral que puede también causar desnutrición. Otra alternativa en el tratamiento del cáncer, es la terapia biológica, la cual se basa en el bloqueo específico y dirigido contra dianas concretas de la célula tumoral gracias a este mecanismo de acción son terapias mejor toleradas pero también aumenta la complejidad en los tratamientos y la aparición de efectos no deseados (Alonso, et al., 2014).

En adición los tratamientos contra cáncer tiene diversos efectos que conducen a desarrollar resistencia a la droga, por ejemplo, la mitoxantrona que es una droga quimioterapéutica, provoca disfunciones en el hígado, infecciones en vías urinarias, neumonía y otras inflamaciones en el sistema respiratorio, lo cual limita a estos tratamientos para su administración a largo plazo (Koczurkiewicz, et al., 2016).

Debido a las desventajas de los tratamientos convencionales y al surgimiento potencial de resistencia a los fármacos y tratamientos de elección, es primordial contar y buscar alternativas terapéuticas que nos permitan combatir el cáncer de una manera inocua o con

una disminución significativa de los efectos secundarios, un recurso importante para la obtención de nuevos fármacos se encuentra en las plantas medicinales.

### **2.6 Plantas y compuestos fenólicos con actividad citotóxica**

Dentro de los trabajos que se han realizado sobre las pruebas de extractos o compuestos aislados de plantas medicinales con actividad anticancerosa, se encuentra el de Manthey y Guthrie (2002), quienes evaluaron la actividad antiproliferativa de flavonoides aislados de cítricos sobre líneas celulares de cáncer de pulmón, colon, mama, próstata y melanoma, donde obtuvieron una fuerte actividad antiproliferativa de las flavonas polimetoxiladas, donde la IC<sub>50</sub> fue de 10 µM.

Yesil – Celiktas, et al., (2010), probaron el extracto metanólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* y sus compuestos aislados (ácido carnósico y ácido rosmarinico) sobre las líneas celulares de cáncer NCI-H82, DU-145, Hep-3B, K-562, MCF-7, PC-3 y MDA-MB-231, la IC<sub>50</sub> obtenida del extracto fue de 12.50 y 47.55 µg/mL contra la línea K-562, sin embargo el ácido carnósico mostró un mejor efecto sobre la misma línea celular ya que se obtuvo una viabilidad del 13 al 30% a una concentración de 19 µM.

Otras plantas que han presentado actividad anticancerosa son *Origanum dictamnus*, *Thymus vulgaris*, *Origanum mejorana*, *Salvia officinalis* e *Hypericum perforatum*, las cuales mostraron actividad sobre la línea celular de cáncer de colon HT29 y la línea celular de cáncer de próstata PC3, ésta actividad se atribuyó a los compuestos fenólicos tales como epicatequina, naringenina, catequina, kaempferol, los cuales se encuentran en éstas plantas (Kaliora et al., 2014).

El extracto etanólico y metanólico de hojas de *Garcinia mangostana*, mostraron actividad antiproliferativa contra la línea celular de adenocarcinoma de cáncer de mama SKBR3, los resultados muestran una inhibición dosis dependiente con una DE50 de 9.25±0.64 µg/mL, este efecto está asociado con apoptosis sobre la línea celular de cáncer de mama por la determinación en los cambios morfológicos y fragmentación de ADN oligonucleosomal (Moongkarndi, et al., 2004a y Moongkarndi, et al., 2004b).

Los compuestos fenólicos tienen en su molécula uno o más grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático. Dichos metabolitos, de acuerdo al número de carbonos en su molécula se clasifican en: fenoles simples (C6), ácidos derivados del ácido benzoico (C6-C1): catecol,

anisaldehído, vainillina. Acetofenonas y ácidos fenilacéticos (C6-C2). Ácidos derivados del ácido cinámico (C6-C3) (ácido clorogénico, caféico, ferúlico). Cumarinas (C6-C3). Flavonoides (C15) (chalconas, auronas, dehidrochalconas, flavanos, flavonas, flavanonas, flavonoles y antocianinas). Biflavonoides (C30). Benzofenonas, estilbenos, xantonas (C6-C1-C6, C6-C2-C6). Quinonas (C6, C10, C14). Lignanós y neolignanós (dímeros, oligómeros). Lignina (polímeros). Taninos (oligómeros o polímeros) (Bruneton, 2001): Estos compuestos constituyen un amplio grupo de productos naturales sintetizados principalmente por las plantas, los cuales muestran gran diversidad de actividades biológicas, tales como anticáncer, antibacteriana, antioxidantes, antiinflamatoria, etc. (Huang et al., 2010).

Los efectos anticarcinogénicos de polifenoles en varias líneas celulares neoplásicas: leucemia mielóide y linfóide, carcinoma de células escamosas, cáncer gástrico, de ovario, hígado, próstata, tiroides, adenocarcinoma de colon y de mama, y neuroblastoma han sido ampliamente descritos en diversos modelos animales. En este mismo sentido, los resultados obtenidos de apigenina y quercetina en ensayos con ratones han mostrado inhibición de las metástasis pulmonar (Fotsis et al., 1997). Además, el kaempferol, quercetina, ácido cumárico y ácido elágico inhiben el crecimiento de células tumorales de mama (MCF-7), oral (KB, CAL-27), colon (HT-29, HCT-116), y de la próstata (LNCaP, DU-145) (Zhang et al, 2008; Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011). Resultados similares se han informado con los extractos de vino y té verde y sus componentes aislados (resveratrol, catequina y epicatequina) (Weisburg et al., 2004; Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011). La isoflavona, genisteína o una dieta rica en soya reducen el desarrollo tumoral mamario (MCF) y de ovario en ratas (Hsieh, et al., 1998). De manera similar, se ha observado que esta flavona inhibe la metástasis pulmonar y el desarrollo de cáncer de piel.

### **2.7 Orquídeas con actividad anticancerosa**

Es de gran importancia el hecho de que las orquídeas juegan un papel importante como medicamentos, sin embargo a pesar de que varias especies de esta familia están siendo investigadas mundialmente, la información es escasa, es por tanto, importante corroborar los usos medicinales, ya que en las comunidades se les atribuye efectos curativos contra la fiebre, efectos sedantes, anticonvulsivos, disminución de parálisis, en fracturas, emético, parasitario, purgante, para curar infecciones de ojos, reumatismo, antiespasmódico, diarrea,

estimulante, insomnio, neuralgia, ansiedad, cólicos menstruales, diabetes, diarrea y disentería, afrodisiaco y anticancerígeno (Hossain, 2011; Kariola et al., 2014).

A pesar de que no hay estudios de *C. integerrimum* sobre cáncer o de otras especies de este género, se encuentran algunos trabajos sobre la actividad de orquídeas sobre líneas celulares, entre ellos está el de Shriram, et al. (2010), quienes aislaron el 9,10-dihidro-2,5-dimetoxi fenantreno-1,7-diol del extracto metanólico de *Eulophia nuda*, este compuesto fue probado sobre las líneas celulares MCF-7 and MDA-MB-231 de cáncer de mama y mostró una buena actividad antiproliferativa ya que para la línea celular MCF-7 se obtuvo un 91% de actividad y para la línea MDA-MB-231 un 85% a una concentración de 1000 µg/mL.

Hossain (2011), en su revisión bibliográfica menciona que de las orquídeas del género *Dendrobium* se ha aislado un compuesto llamado moscatilina, el cual tiene efectos sobre 16 líneas celulares de diferentes tejidos como placenta, hígado, pulmón y estómago, la actividad mutagénica se presentó más en la línea celular de pulmón al evitar la proliferación en un 100% y en la línea celular de estómago donde presentó un 75% de antiproliferación.

El 7-hidroxi-2-metoxi-fenantreno-3,4-dione y 3',7',7-trihidroxi-2,2',4'-trimethoxy-[1,8'-bifenantreno]-3,4-dione, fueron aislados de *Bletilla striata*, ambos compuestos muestran efecto antiproliferativo y esto puede deberse a un arresto en el ciclo celular y la inducción de células ROS (Sun, et al., 2016).

Otro trabajo es el de Nugroho, et al. (2016), quienes evaluaron los extractos de cloroformo, metanol y agua de las hojas, tallos y raíces de dos especies de orquídeas, *Dendrobium lasianthera* y *Arachnis flos-aeris* sobre la línea celular T47D de cáncer de mama, sus resultados muestran que el extracto de cloroformo del tallo de *Dendrobium lasianthera* que tiene una citotoxicidad más alta que los otros extractos, su IC50 fue de 122,66 µg/mL. La separación y purificación del extracto aumentó la citotoxicidad y se obtuvo una IC50 de 37,11 µg/mL.

## 2.8 *Catasetum integerrimum* Hook

Existen más de 50 especies del género *Catasetum* en el mundo, aunque también se menciona que pueden ser más de 150 especies. Es un género neotropical de plantas principalmente epífitas que se agrupa en dos subgéneros: 1) *Clowesia* (Lindl.) Mansf., que incluye de 6 a 10 especies con flores perfectas y 2) *Catasetum* que comprende las especies restantes, caracterizadas por tener flores masculinas y femeninas dimórficas, que pueden encontrarse en la misma inflorescencia o presentarse en inflorescencias o individuos separados (Hills, Williams y Dodson, 1972).

*Catasetum integerrimum* Hook es una hierba epífita, de hasta 70 cm de alto. **Raíces carnosas**, de 2-6 mm de grosor, con raicillas colectoras rígidas, erectas, de 0.3-1 mm de ancho. **Seudopseudobulbos** de varios entrenudos, ovoides a fusiformes, de 7-26 x 2.5-8 cm, cubiertos por vainas foliares papiráceas terminadas en 1-3 espinas. **Láminas foliares** 6-10, dísticas, plicadas, articuladas con las vainas, deciduas, oblongo-oblongoladas a elípticas, agudas a acuminada, con 3-5 venas prominentes en el envés. **Inflorescencia racemosa**, erecta, apareciendo en la base del brote inmaduro, produciendo flores masculinas o femeninas. **Brácteas florales** ovado-lanceoladas, agudas a cortamente acuminadas. **Flores unisexuales**, dimórficas, no resupinadas, poco vistosas, intensamente fragantes durante el día. **Flores masculinas** verdes o verde-amarillentas, frecuentemente esfumadas y/o manchadas de rojo-púrpura. Ovario subcilíndrico, abruptamente recurvado cerca del ápice. **Sépalos y pétalos** formando una capucha amplia sobre la columna. **Labelo** calceiforme, subcónico, comprimido lateralmente, carnoso, rígido. **Flores femeninas** verdes con el labelo a veces amarillo. Ovario subcilíndrico, paulatinamente engrosado hacia el ápice, **Sépalos y pétalos** muy extendidos. Sépalos oblongo-rectangulares, obtusos. **Pétalos** elíptico - rectangulares, obtusos. Labelo calceiforme, obovoide, comprimido dorsiventralmente, carnoso, rígido. Columna muy corta, semiterete, truncada. Rostelo abreviado (Salazar, 1990). Esta especie se distingue de las otras orquídeas mexicanas por los racimos masculinos erectos, con flores verdes a menudo manchados de rojo púrpura (Figura 4).

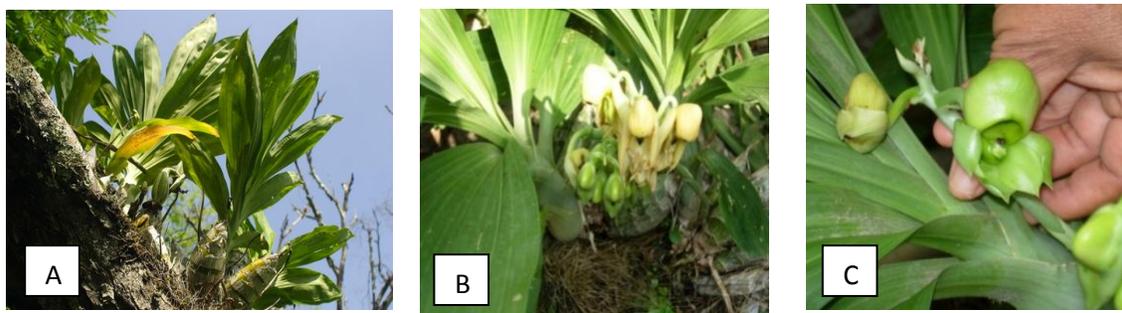


Figura 4. Ejemplares de *Catasetum integerrimum*. A. Ejemplar vegetativo (Pseudopseudobulbo y hojas). B. Flores masculinas. C. Flores femeninas.

*C. integerrimum* está distribuida en los bosques húmedos a secos, a una altitud de 0–600 msnm, se encuentra de México a Costa Rica. En nuestro país se localiza en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guerrero, Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Hágsater y Salazar, 1990).

### 2.8.1 Etnobotánica de *C. integerrimum*

*C. integerrimum* se conoce con los nombre comunes de chinela, cola de pato, trompa de puerco, cola de armadillo, flor de nido. Esta orquídea se usa en Quintana Roo para el tratamiento de la mordedura de víbora, en Tabasco para curar los ‘nacidos’ y en Yucatán para deshacer tumores y para curar forúnculos, llagas y heridas en la piel, ya sea los pseudopseudobulbos en forma de cataplasma o pelados, salados y asados (Cox, 2013; Flora de la península de Yucatán, 2015; Zolla, Argueta y Mata, 2009; Hágsater et al., 2005), en la región huasteca, en los estados de Hidalgo y Veracruz *C. integerrimum* se emplea para el tratamiento de cáncer de matriz, cáncer en la próstata, colesterol, colitis, diabetes, dolor en el riñón, inflamación en la próstata, hipertensión arterial, tratamiento de quiste y llagas. Los órganos de la planta utilizados son el pseudopseudobulbo, hojas, raíz, flores y frutos, siendo predominante el uso del primero en forma de infusión o licuado con agua. *C. integerrimum* es una de las plantas usadas tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades con sintomatología de cáncer sin estudio científico (Alonso-Castro *et al.*, 2011)

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer de mama constituye una prioridad en salud ya que es una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres adultas de todas las edades y niveles de ingreso, siendo más común en aquellas que tienen entre 30 a 54 años de edad (Kanaul et al., 2009). Razón por la cual es de suma importancia la búsqueda de nuevos fármacos o tratamientos que no causen efectos secundarios o que generen resistencia al suministrarlos, por ello, las orquídeas podrían ser una alternativa para combatir esta enfermedad ya que desde épocas prehispánicas, han sido utilizado por sus propiedades antiinflamatorias y anticancerosas. Sin embargo, a pesar de que varias especies de la familia Orchidaceae están siendo investigadas mundialmente, la información que se conoce es escasa (Hossain, 2011; Kariola et al., 2014). Las propiedades terapéuticas de las orquídeas se les atribuye a su composición química (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, lignanos, quinonanos y terpenos) (Téllez-Velasco, 2001; Huang et al., 2010; Hossain, 2011; Kariola et al., 2014). Recientemente en algunas localidades de Veracruz e Hidalgo la especie *Catasetum integerrimum* se usa para tratar distintos tipos de cáncer. A pesar de la gran importancia que tiene esta orquídea como planta medicinal en la Huasteca y algunos otros estados de México, no existe información científica acerca de sus propiedades citotóxicas y su composición química. Por tanto, en esta investigación se pretende evaluar la actividad anticancerosa de los extractos de hoja, pseudobulbo y raíz de *C. integerrimum* e identificar los compuestos del extracto activo.

## **4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto citotóxico de los extractos orgánicos de *Catsetum integerrimum* y determinar los compuestos fenólicos presentes en el extracto activo.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Obtener los extractos orgánicos de hojas, pseudobulbos y raíces de *C. integerrimum*
- Evaluar el efecto citotóxico de los extractos orgánicos
- Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos de los extractos activos

### **4.3 Hipótesis**

Si los compuestos fenólicos presentes en el extracto activo de *Catsetum integerrimum* tienen actividad anticancerosa, entonces disminuirán la proliferación celular

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Colecta e identificación de *Catasetum integerrimum***

La colecta de *C. integerrimum* se realizó en la localidad de Chontla, Veracruz, ubica al norte del estado, en la región denominada Huasteca. El sitio se localiza a los 21° 18' N y 97° 55' O a una altitud entre los 40-1300 m. Limita al oeste con Tantoyuca; al Sur con Ixcatepec y Tepetzintla; al este con Citlaltépetl y Ozuluama; al sureste con Tancoco. Los suelos son de tipo regosol, calcáreo y rendzina. El clima es cálido-extremoso con una temperatura promedio de 24 °C y precipitación pluvial media anual de 1,555 mm. La Dra. Dorismilda Martínez Cabrera corroboró con la identificación de *C. integerrimum*. Los ejemplares de herbario se depositaron en el Herbario del Instituto Tecnológico de Huejutla. Una vez realizada la colecta de la especie, se procesó el material vegetal.

### **5.2 Obtención de extractos**

Una vez realizada la colecta de la especie, se realizó la separación de cada uno de los órganos de la planta, los cuales se secaron a temperatura ambiente, se cortaron en trozos pequeños y se depositados en frascos para su extracción.

El material vegetal se sometió a tres extracciones sucesivas, utilizando tres disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo y metanol) (Figura 5). El disolvente se eliminó mediante evaporación a presión reducida para la obtención de extractos crudos, los cuales se pesaron para calcular su rendimiento en porcentaje.

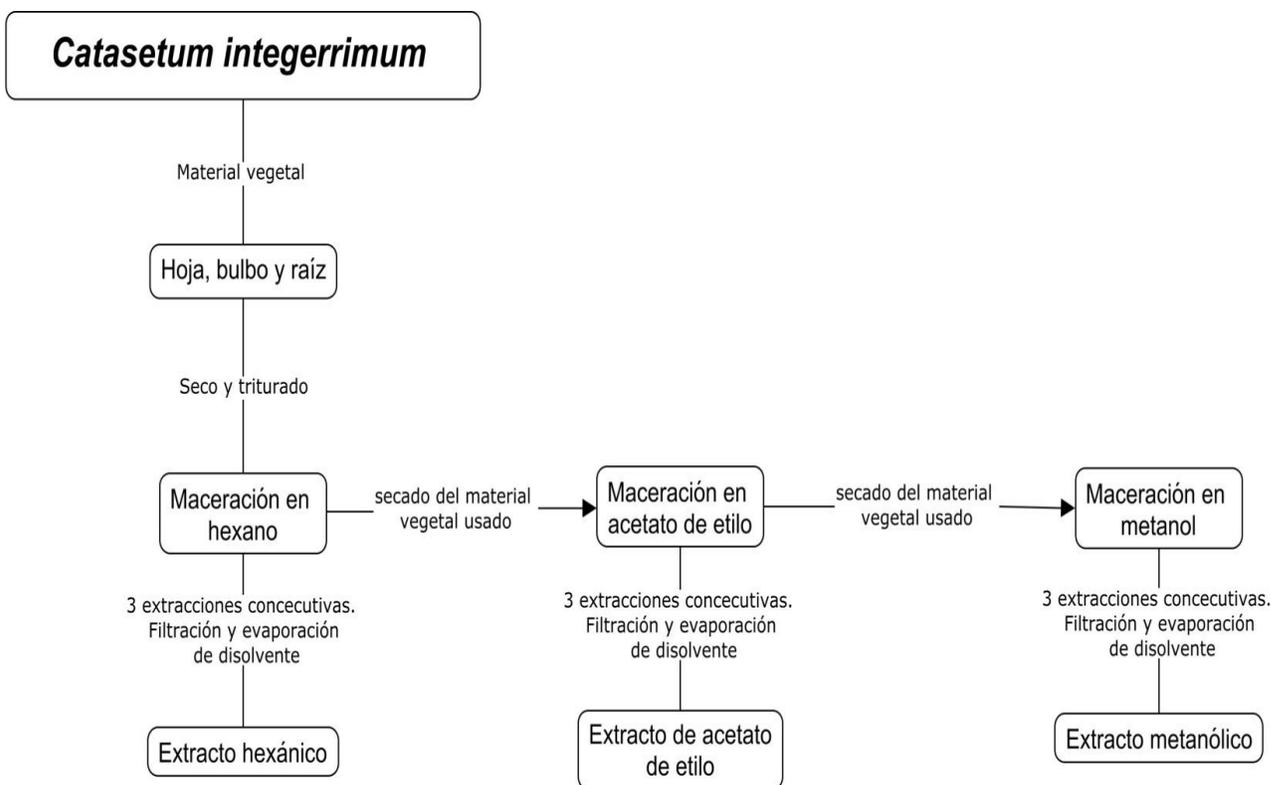


Figura 5. Diagrama metodológico de las extracciones

### 5.3 Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) de los extractos de *Catsetum integerrimum*

La determinación y cuantificación de ácidos fenólicos y flavonoides de *C. integerrimum* se realizó en un cromatógrafo marca Agilent serie 1100 equipado con un detector de luz ultravioleta y arreglo de diodos.

#### 5.3.1 Condiciones de CLAR para cuantificación de ácido fenólicos

La identificación y cuantificación de ácidos fenólicos fue realizada con una Columna Nucleosil 100 A (125 x 4.0 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil fue de 1.0 mL/min, ésta fue una mezcla de agua (A) a pH de 2.5 con TFA y acetonitrilo (B), con el siguiente gradiente: 0-10 min, A:B 85:15; 20 min, A:B 65:35 y 23 min, A:B 65:35. La temperatura fue de 30 °C. La longitud de onda fue fijada a 280 nm y el tiempo de análisis fue de 23 minutos. El volumen de inyección fue de 20 µL. Se

utilizaron como estándares ácidos clorogénico, caféico, ferúlico, gálico, siríngico y vainillínico (Sigma-Aldrich).

### **5.3.2 Condiciones de CLAR para cuantificación de flavonoides agliconas**

Se utilizó una columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula), con una fase móvil de acetonitrilo (A)-agua a pH de 2.5 con TFA (B), con el siguiente gradiente: 0-10 min, A:B 15:85; 20 min, A:B 35:65 y 25 min, A:B 35:65. El flujo fue de 1 mL/min y una temperatura de 30 °C. El equipo se calibró a las longitudes de onda de 254, 316 y 365 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL y el tiempo de análisis para este método fue de 25 minutos. Para identificar los flavonoides presentes en los extractos se usaron estándares de kaempferol, quercetina, luteolina, naringina, fletina y galangina (Sigma-Aldrich).

### **5.3.3 Condiciones de CLAR para cuantificación de flavonoides glicosilados**

El análisis de los flavonoides de los extractos se realizó en una columna C18 Hypersil ODS (125 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil se mantuvo a 1.3 mL/min y consistió de acetonitrilo (A)-agua (B) a pH 3.0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> con el siguiente gradiente: 0-10 min, A:B 12:88; 10 min, A:B 18:82; 15 min, A:B 18:82; 30 min, A:B 45:55 y 32 min, 100% de A a una temperatura de 30 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL. El equipo se calibró a una longitud de onda de 350 nm. El tiempo de análisis para este método fue de 32 minutos. Para identificar los flavonoides se usaron estándares de naringina, rutina, quercitrina, isoquercitrina y astragalina (Sigma-Aldrich) mediante su tiempo de retención.

### **5.3.4 Preparación de las muestras para inyección en el CLAR**

Se pesaron 5 mg de extractos secos y estándares y se disolvieron cada uno de ellos por separado en 1 mL de metanol grado CLAR, dichas disoluciones se filtraron mediante discos de nylon de 0.45 µm de poro y se inyectaron 20 µL de cada muestra.

### **5.3.5 Elaboración de las curvas patrón**

Para la cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *C. integerrimum* se elaboraron curvas de calibración para cada uno de los estándares, se inyectaron 5 puntos desde 0.048 µg hasta 0.4 µg de cada compuesto. Las interpolaciones se

hicieron con el programa ChemStation de Agilent Co. La variación del área en unidades de absorbancia de cada inyección fue utilizada para construir el modelo matemático de regresión lineal con la fórmula  $Y=mX+b$ , la cual se comparó posteriormente con los extractos y de esta manera se determinó la concentración de cada compuesto

#### **5.4 Evaluación de la actividad citotóxica.**

Para la evaluación citotóxica de *C. integerrinum* se emplearon seis líneas celulares de carcinoma humano: glía de sistema nervioso central (U251), próstata (PC-3), leucemia (K562), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU). Posteriormente debido a su potente efecto contra cáncer de mama, los extractos fueron probados contra cáncer de mama sensible a estrógenos (MCF7) y no sensible a estrógenos (MDA-MB231). La citotoxicidad del extracto se determinó midiendo el porcentaje de inhibición del crecimiento celular de cáncer de mama dependiente de hormonas (MCF-7) y no dependiente de hormonas (MDA-MB-231), mediante el ensayo colorimétrico con sulforodamina B (SRB), el cual permite calcular el índice de inhibición del crecimiento celular. En este ensayo se estima indirectamente el crecimiento celular a través de la determinación de proteínas celulares totales, a las cuales se une la sulforodamina. El procedimiento consistió en evaluar los extractos orgánicos y acuoso de los diferentes órganos de *C. integerrinum* en concentraciones de 50  $\mu\text{g/mL}$  para seleccionar el extracto activo y su efecto sobre determinado tipo de cáncer. Posteriormente, dicho extracto se evaluó sobre cáncer de mama a las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$ . La citotoxicidad fue determinada mediante el método propuesto por el Instituto Nacional de Cáncer (USA) (Monks et al., 1991). La citotoxicidad es reportada como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Rendimiento de los extractos

Se calculó el rendimiento de los extractos hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos de hoja, pseudobulbo y raíz de *C. integerrimum*. Los datos se muestran en el Cuadro 1, los cuales se obtuvieron en base al peso seco de cada órgano.

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de *C. integerrimum*

Órgano de <i>C. integerrimum</i> (peso seco (g))	E X T R A C T O S					
	H e x a n o		Acetato de etilo		M e t a n o l	
	Peso (mg)	(%)	Peso (mg)	(%)	Peso (mg)	(%)
Hoja (8.5)	28.12	3.3	24.25	2.8	72.45	8.52
Pseudobulbo (51.0)	40.19	0.80	49.39	0.97	148.17	2.90
Raíz (14.0)	18.47	1.3	80.55	5.74	143.58	10.21

En este cuadro podemos observar que el extracto hexánico de hoja tuvo el mayor rendimiento (3.3%), seguido por el de raíz (1.3%) y por último el de pseudobulbo (0.80%). Con respecto a los extractos de acetato de etilo, el obtenido de raíz fue el mayoritario (5.74%) en comparación con 2.8% de hoja y 0.97% de pseudobulbo respectivamente. Los extractos metanólicos de los tres órganos de *C. interregun* fueron los que tuvieron mayor rendimiento

### 6.2 Inhibición del crecimiento celular de cáncer de mama de los extractos de acetato de etilo de *C. integerrimum*

En el ensayo preliminar de citotoxicidad de *C. integerrimum*, se observó que no hubo efecto sobre todas las líneas celulares de carcinoma evaluadas, sin embargo se obtuvo un efecto importante de los extractos de acetato de etilo de esta orquídea contra cáncer de mama, por lo cual el estudio se continuó con la evaluación de los extractos contra dos líneas celulares de cáncer de mama: sensible a estrógenos (MCF7) e insensible a estrógenos (MDA-MB231). Los resultados se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Efecto citotóxico contra cáncer de mama del extracto de acetato de etilo de *C. integerrimum*

Extracto de acetato de etilo	% de inhibición del crecimiento celular			
	Mama sensible a estrógenos (MCF7)		Mama insensible a estrógenos (MDA-MB231)	
	(25 µg/mL)	(50 µg/mL)	(25 µg/mL)	(50 µg/mL)
Hoja	18.12 ± 5.0	<b>57.92 ± 10.4</b>	No citotóxico	<b>65.47 ± 2.4</b>
Pseudobulbo	37.27 ± 8.6	<b>70.82 ± 0.6</b>	39.42 ± 11.5	<b>56.67 ± 2.6</b>
Raíz	<b>54.97 ± 2.8</b>	<b>79.47 ± 2.0</b>	<b>97.79 ± 2.2</b>	<b>100</b>

Los datos representan el promedio de 3 repeticiones independientes ± el error estándar

En el Cuadro 2 se observa que los extractos de acetato de etilo de hojas, pseudobulbo y raíz de *C. integerrimum* presentaron actividad antiproliferativa mayor al 50% en la dosis de 50 µg/mL en ambas líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB231). Sin embargo, cabe destacar la actividad inhibitoria observada por el extracto de raíz en la línea MDA-MB231 con un 97.79% en la dosis de 25µg/mL y la interrupción total del crecimiento en la dosis de 50µg/mL (Figura 6).

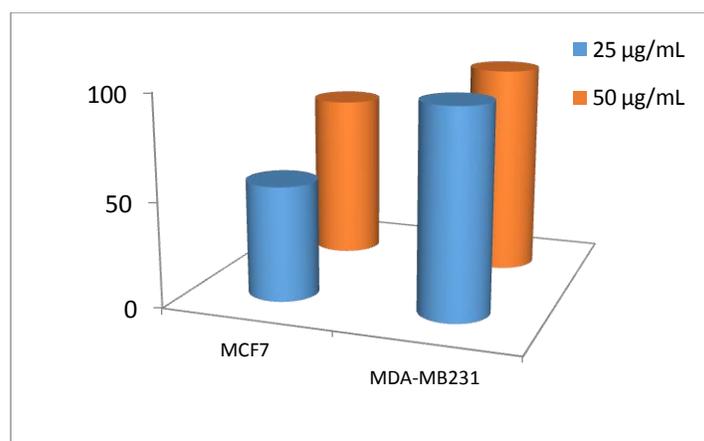


Figura 6. Porcentaje de inhibición. Dos líneas celulares de cáncer de mama tratadas con el extracto de acetato de etilo de raíz

### 6.3 Análisis por CLAR del extracto de acetato de etilo de raíz de *C. integerrimum*

El análisis por CLAR permitió identificar los ácidos fenólicos: gálico, vainillínico, p/hidroxibenzoico, ferúlico y p/coumárico (Figura 7) y su concentración, la identificación de los compuestos se determinó por medio de su tiempo de retención (Cuadro 3), de los cuales el más abundante es el ácido ferúlico con una concentración de 0.686  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (Figura 7).

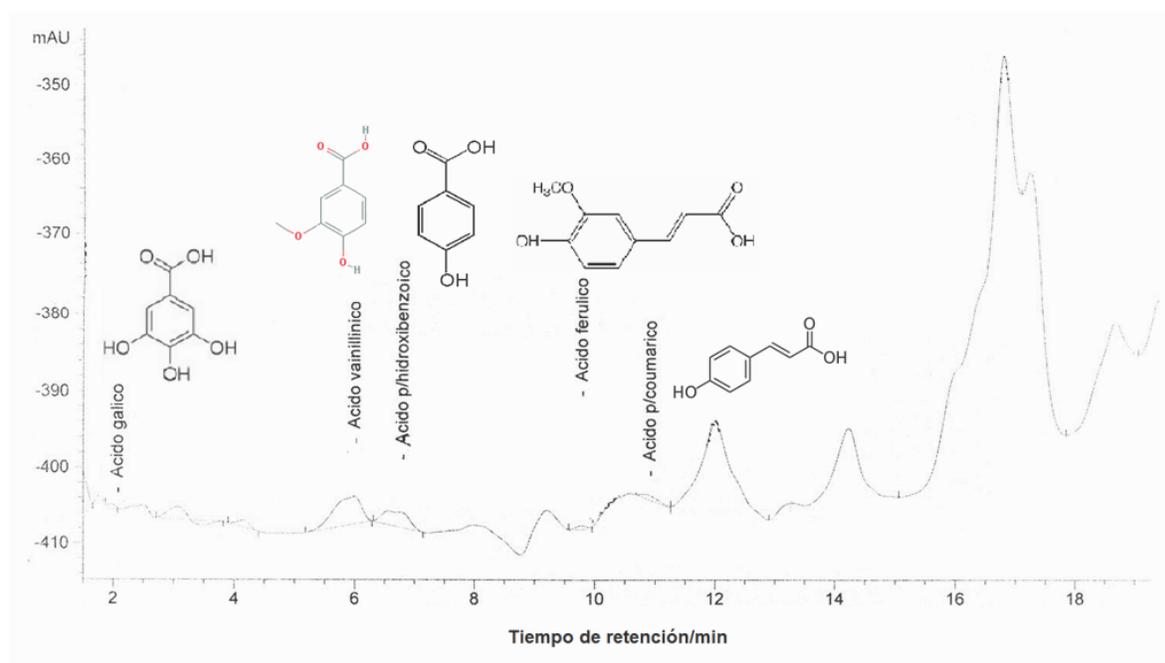


Figura 7. Análisis por CLAR para la identificación de ácidos fenólicos.

Cuadro 3. Concentración y tiempos de retención de ácidos fenólicos del extracto de acetato de etilo de raíz de *C. integerrimum*.

Ácidos fenólicos	Gálico	Vainillínico	p/hidroxibenzoico	Ferúlico	p/coumárico
Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	0.004	0.101	0.046	0.686	0.004
Tiempo de retención (minutos)	1.996	5.992	6.790	9.785	10.903

Asimismo, se determinaron y cuantificaron la rutina, quercetina, naringenina, galangina y floretina (Figura 8 y cuadro 4) siendo este último flavonoide el de mayor concentración (304.36  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

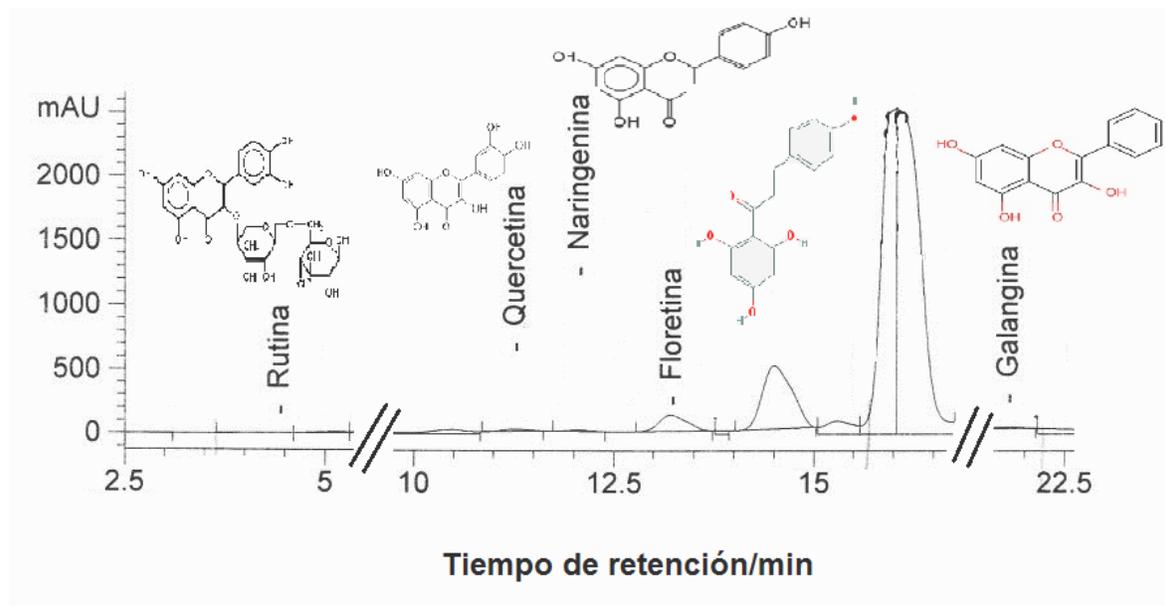


Figura 8. Análisis por CLAR para la identificación de flavonoides

Cuadro 4. Concentración de ácidos fenólicos y flavonoides del extracto de acetato de etilo de raíz de *C. integerrimum*

Flavonoides	Rutina	Quercetina	Naringenina	Floretina	Galangina
Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	2.71	15.11	90.32	304.36	8.96
Tiempo de retención (minutos)	4.423	11.262	12.061	13.214	21.789

La actividad del extracto de acetato de etilo de raíz contra la línea celular (MDA-MB231), el cual inhibió en un 100% el desarrollo de las células MDA-MB231, podría atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos, puesto que estudios realizados en diversas líneas celulares, modelos animales y ensayos epidemiológicos demuestran el papel protector de los ácidos fenólicos y flavonoides contra varios tipos de cáncer (Ramos, 2008; Veeriah, et

al, 2008; Huang et al., 2010; Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011; Kaliora et al., 2014). En este mismo sentido Ghasemzadeh y Ghasemzadeh (2011) mencionan que el kaempferol, quercetina, resveratrol, catequina, epicatequina, ácido cumárico y ácido elágico inhiben el crecimiento de células cancerosas de mama, oral, colon y próstata. Asimismo, Luo et al. (2009), demuestran que el kaempferol en una concentración de 20  $\mu$ M, inhiben el 91% del crecimiento de celular de cáncer de ovario. También, se reporta la actividad anticancerosa contra fibrosarcoma y leucemia de los ácidos caféico y gálico respectivamente (Hwang et al., 2006; Madlener et al., 2007). Igualmente se mencionan los efectos de los ácidos cafeico, ferúlico, gálico, clorogénico, elágico y cinámico sobre cáncer de mama, pulmón y estómago (Huang, et al., 2010).

Con respecto al cáncer de mama sensible a estrógenos (MCF-7), So et al. (1997) señalan el efecto positivo de la galangina, naringenina y quercetina. De igual forma, la administración de la quercetina, reduce el tamaño y la invasibilidad del carcinoma mamario en ratas Wistar hembras (Ramos, 2008). Cabe destacar la potente actividad de la quercetina sobre la línea celular MDA-MB-453, a una concentración de 100  $\mu$ mol/L mediante la inducción de apoptosis en las células malignas (Huang, et al., 2010).

Con base en la literatura, los ácidos fenólico, ferúlico, gálico, galangina, naringina y quercetina identificados en el extracto de *C. integerrimum* son eficaces contra el cáncer de mama sensible a estrógenos. Sin embargo, para el tratamiento de cáncer de mama insensible a estrógenos, solamente se menciona a la quercetina, la cual posee un efecto similar al extracto de acetato de etilo, pero a una dosis mayor. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una notable citotoxicidad del extracto, debida posiblemente, al sinergismo existente entre los compuestos fenólicos u otras moléculas presentes en éste, por lo cual el siguiente paso en la investigación será el aislamiento y prueba biológica de compuestos puros.

La citotoxicidad presentada por cada órgano de *C. integerrimum* fue diferente, hojas y raíces tuvieron actividad contra cáncer de mama insensible a estrógenos. Por otro lado, el pseudobulbo solamente fue activo contra cáncer de mama sensible a estrógenos. Dichos resultados demuestran que es la raíz la que tiene el efecto más potente, contrariamente a lo que se dice en los estudios etnobotánicos, donde el pseudobulbo es el de uso más frecuente.

Este hecho podría ser explicado considerando la función que tienen las raíces en las orquídeas epífitas, de absorción de agua y nutrientes y en el caso de especies de *Catasetum*, la producción de raicillas delgadas y rígidas, las cuales capturan hojarasca y otros detritos orgánicos (Hágsater et al., 2005), por lo cual, es posible que en este órgano se sinteticen metabolitos secundarios exclusivos o bien, estén en mayor concentración con respecto a los demás órganos.

## 7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, podemos confirmar el uso contra cáncer de mama de *C. integerrimum* por la medicina tradicional, ya que se muestra que los extractos de acetato de etilo de raíz, pseudobulbo y hojas tienen efectos antineoplásico en dos líneas celulares de cáncer de mama.

Se manifiesta por primera vez la eficacia de esta orquídea en el tratamiento de cáncer de mama no dependiente de estrógenos, enfermedad sumamente agresiva y difícil de tratar.

Se demuestra que los compuestos de mediana polaridad presentes en la raíz tienen propiedades antineoplásicas, por lo que posiblemente los ácidos fenólicos y flavonoides encontrados en este trabajo sean parcialmente responsables de dicha actividad.

## 8. REFERENCIAS

- Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gómez-Sánchez, M., Domínguez, F. & García-Carranca, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. of Ethnopharmacol* 133:945–972.
- Alonso, C.S., Soto, C.M., Alonso, G.J., Del Riego, V.A. & Miján, T.A. 2014. Efectos adversos, metabólicos y nutricionales asociados a la terapia biológica del cáncer. *Nutr Hosp.* 29(2):259-268.
- American Cancer Society. 2016. Cáncer de seno (mama) [www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002284-pdf.pdf](http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002284-pdf.pdf). (Consultada en noviembre de 2016).
- Bruneton, J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1100 pp.
- Cancer Institute (NCI). 2014. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos#m>. (Consultada octubre 2016).
- Cox, L. 2013. Orquídeas: Importancia y uso en México. *Bioagrobiencia* 6(2): 4-7.
- Flora de la Península de Yucatán. Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales [http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha\\_virtual.php?especie=357](http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=357) (Consultada septiembre 2015).
- Fotsis, T., Pepper, MS., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R. & Schweigerer, L. 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of celular proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer Res.* 57: 2916-2921.
- Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J. Med. Plants Res.* 5: 6697-6703.
- Gibbs, J.B. 2000. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* 287:1969-1973.
- Hágsater, E., Soto A., M.A., Salazar C., G.A., Jiménez, M.M., López R., M.A. & Dressler R.L. 2005. Las orquídeas de México. Productos farmacéuticos S.A. de C. V. (Instituto Chinoín). México, 304 pp.

- Hágsater, E. & Salazar C., G.A. 1990. ICONES ORCHIDACEARUM. Fascicle I. Orchids of Mexico. Part 1. Asociación Mexicana de Orquideología A.C. 206 pp.
- Hills, H., Williams, N. & Dodson, C. 1972. Floral Fragrances and Isolating Mechanisms in the Genus *Catasetum* (Orchidaceae). *Biotropica*, 4(2): 61-76.
- Hsieh, C.Y., Santell, R.C., Haslam, S. Z. & Helferich, W.G. 1998. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 58: 3833-3838.
- Hossain, M.M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances. *Fitoterapia.* 82: 102-140.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., & Zhang, Y. 2010. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer.* 62: 1–20.
- Hurtado, G., Sánchez, E., Miranda, H., Mares, J., Medina, E., Grifaldo, B., & González, J. 2004. Factores de pronóstico en cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología* 5 pp. Recuperado el 28 de agosto 2005 de [www.smeo.org.mx/aceta/junio04/7FactoresDePronosticoEncancer.pdf](http://www.smeo.org.mx/aceta/junio04/7FactoresDePronosticoEncancer.pdf).
- Hwang, H.J., Park, H.J. Chung, H.J., Min, H.Y., Park, E.J., Hong, S.K. & Lee, S.K. 2006. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Nutr Biochem.* 5: 356-362.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) 2012. Información sobre tumores malignos. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). 19 de agosto de 2013.
- Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI). 2014. <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer> (Consultada julio 2016).
- Kaliora, A.C., Dimitra, A.A. Kogiannou D., A.A., Kefalas, P, Papisideris, I.S. & Kalogeropoulos, N. 2014. Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chem.* 142: 233–241.

- Knaul, F.M., Nigenda, G., Lozano, F., Orreola-Ornelas, H., Langer, A. & Frenk, J. 2009. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México* 51:S335-S343.
- Katzung, B.G. 1986. *Farmacología básica y clínica*. 7ª. Edición. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. 1236 pp.
- Koczurkiewicz, P. Kowolik, E., Podolak, I., Wnuk, D., Piska, K., Łabędz-Masłowska, L., Wójcik-Pszczola, K., Pękala, E., Czyż, J. & Michalik, M. 2016. Synergistic Cytotoxic and Anti-invasive Effects of Mitoxantrone and Triterpene Saponins from *Lysimachia ciliata* on Human Prostate Cancer Cells. *Planta Med.* 82(18):1546-1552.
- Luo, H., Rankin, G.O., Liu, L., Daddysman, M.K., Jiang, B.H. & Chen, Y.C. 2009. Kaempferol inhibits angiogenesis and VEGF expression through both HIF dependent and independent pathway in human ovarian cancer cells. *Nutr. Cancer.* 61:554-563.
- Mans, D.R., Da Rocha, A.B. & Schwartsmann, G. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist.* 5:185-198.
- Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H.L., Krupitza, G. & Beamhaus, A. 2007. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* 245: 156-162.
- Manthey, J. & Guthrie, N. 2002. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J Agric Food Chem.* 50: 5837-5843.
- Melé, O.L., del Barrio, B.V., Bermejo A., J.I., Blanco, G.I. & Montesinos S., G.O. 2008. Carcinoma mamario. *Prog Obstet Ginecol* 51: 93-98.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, P., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Capbell, H., Maya, J. & Boyd, M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Nat Cancer Inst.* 83:757-766.

- Moongkarndi, P., Kosem, N., Luanratan, O., Jongsomboonkusol, S. & Pongpanb, N. 2004. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia*. 74: 375-377.
- National Cancer Institute (NCI). 2015. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (Consultada en noviembre 2016).
- Nugroho, L.H., Pratiwi, R., Susandarini, R., Wardoyo, E.R., Megawati, O. & Handayani, S. 2016. Isolation of Bioactive Compounds from Two Orchid Species and preliminary test of their cytotoxicity against T47D breast cancer cells. *IJPPR*. 8 (1): 150-155.
- Ortega-Cervantes, L., Rojas –García, A.E. & Robledo-Marengo, M. 2013. Morbidity of breast cancer and cervico-uterine cancer in women from the occidental region of México. *Rev Invest Clin* 65(3):221-7.
- Ramos, S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol Nutr Food Res*. 52:507-526.
- Ruíz, A.A., Cabezón, P.M., Sáez, B.M. & Lara, J.P. 2004. Cáncer de pulmón. *Biocancer*. 1:1-15.
- Santaballa, B.A. 2015. <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-elcancer/info-tipos-cancer/cancer-de-mama-raiz/cancer-de-mama> (Consultada octubre 2016).
- Shriram, V., Kumar, V., Kavi, P., Survawanshi, S., Upadhyay & Bhat, M. 2010. Cytotoxic activity of 9,10-dihydro-2,5-dimethoxyphenanthrene-1,7-diol from *Eulophia nuda* against human cancer cells. *J Ethopharmacol*. 128 (1): 251-253.
- So, F.V., Najla-Guthrie, N., Chambers, A.F. & Carrol, K.K. 1997. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters*. 112: 127-133.
- Sun, A., Liu, J., Pang, S., Lin, J. & Xu, R. 2016. Two novel phenanthraquinones with anti-cancer activity isolated from *Bletilla striata*. *Bioorg Med Chem Lett*. 26:2375–2379.

- Téllez- Velasco, M.A. 2001. La etnobotánica de la familia Orchidaceae en México. Libro de resúmenes del IV Congreso Mexicano de Etnobiología Huejutla, Hidalgo. 76 pp.
- Veeriah, S., Habermann, N., Hofmann, T., Klenow, S., Sauer, J., Bohmer, F, Wolf, S. & Pool-Zobel, B.L. 2008. Apple polyphenols modulate expression of selected genes related to toxicological defence and stress response in human colon adenoma cells. *Int. J. Cancer* 122 (12): 2647-2655.
- Weisburg, J.H., Weissman, D.B., Sedaghat, T. & Babich, H. 2004. *In vitro* cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 95: 191-200.
- Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F. 2010. Inhibitory effects of Rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum Nutr.* 65: 158-163.
- Zhang, Y., Seeram, N.P., Lee, R., Feng, L. & Hebe, D. 2008. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem.* 56: 670-675.
- Zolla, C., A. Argueta & S. Mata (coordinadores). 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana). Programa Universitario, México Universidad Nacional Autónoma de México nación multicultural. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php> (Consultada agosto 2016).