



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Evaluación del efecto citotóxico de las fracciones
cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de
Dracontium spruceanum (zhu,1996) sobre células
madre cancerosas provenientes de la línea celular de
adenocarcinoma gástrico AGS**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Hector Santiago ALVAREZ VEGA

ASESORES

Dr. Erasmo Honorio COLONA VALLEJOS

Mg. Ana Lucia MAYANGA HERRERA (Coasesora)

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Alvarez, H. (2023). *Evaluación del efecto citotóxico de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de Dracontium spruceanum (zhu,1996) sobre células madre cancerosas provenientes de la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Hector Santiago Alvarez Vega
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71419746
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9579-3258
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Erasmus Honorio Colona Vallejos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	09438212
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9759-288X
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Ana Lucia Mayanga Herrera
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	45155339
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4633-9857
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Leyda Geraldine Cabrera Córdova
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09156694
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Rosa Antonia Gonzales Gonzales

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06931752
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Zoila Raquel Siccha Ramirez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42176293
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.2. Principios Bioactivos.
Grupo de investigación	Células madre, cáncer y búsqueda de principios activos con potencial biomédico.
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC). Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT). PROCENCIA. N° 134-2017-FONDECYT
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Científica del Sur Laboratorio de Cultivo Celular e Inmunología País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Villa El Salvador Dirección: Panamericana Sur Km. 19 Latitud: -12.21943 Longitud: -76.97811
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Octubre 2020- Marzo 2021
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Biotecnología relacionada con la salud https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01 Oncología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.02.21



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 09:00 horas del 24 de febrero de 2023, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/stf-vhxs-vyc>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **HECTOR SANTIAGO ALVAREZ VEGA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20220084084, el titulado expuso su Tesis: **EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LAS FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DEL BULBO DE *Dracontium spruceanum* (Zhu, 1996) SOBRE CÉLULAS MADRE CANCEROSAS PROVENIENTES DE LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO AGS**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **HECTOR SANTIAGO ALVAREZ VEGA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 10:28 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 24 de febrero de 2023.

Mg. LEYDA CABRERA CÓRDOVA
(PRESIDENTA)

Dr. ERASMO COLONA VALLEJOS
(ASESOR)

Blga. ROSA GONZALES GONZALES
(MIEMBRO)

Dra. ZOILA SICCHA RAMIREZ
(MIEMBRO)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

ESCUELA PROFESIONAL : GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL : Mónica Paredes Anaya
OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMATICO DE SIMILITUDES : DANIEL SAUL ORÉ CHÁVEZ
DOCUMENTO EVALUADO* : EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LAS
FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DEL BULBO DE
Dracontium spruceanum (Zhu,1996) SOBRE CÉLULAS MADRE CANCEROSAS PROVENIENTES
DE LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO AGS
AUTOR DEL DOCUMENTO** : Bach. Hector Santiago ALVAREZ VEGA
FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO : 16 / 01 / 2023
FECHA DE APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMATICO : 16 / 01 / 2023
SOFTWARE UTILIZADO :
TURNITIN (X)
ITHENTICATE ()
OTRO

CONFIGURACION DEL PROGRAMA DE SIMILITUDES

Excluye textos entrecomillados (X)
Excluye bibliografía (X)
Excluye cadenas menores a 40 palabras (X)
Otro criterio () (especificar)

PORCENTAJE DE SIMILITUDES *** : 8 POR CIENTO, 8%

FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS **** :

Trabajo de Estudiante Entregado a la Universidad Nacimiento Mayor de San Marcos 2%
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/18134/Tapia_rs_Resumen.pdf?isAllowed=v&sequence=4
<https://repositorio.uam.es/handle/10486/677602> 2%
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v37n3/1726-4642-rins-37-03-471.pdf> 1%
http://www.sepi.upibi.ipn.mx/Investigacion/Documents/tesis_2014/mc_ainevarez.pdf 1%
<http://docplayer.es/55239412-Revista-de-la-sociedad-quimica-del-peru.html> 1%

1%

OBSERVACIONES:

CALIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD:

Documento cumple criterios de originalidad sin observaciones (X)
Documento cumple criterios de originalidad con observaciones ()
Documento no cumple criterios de originalidad ()

FECHA DEL INFORME : 23 / 01 / 2023


DNI: 10093526 COD:0A2046

FIRMA DEL EVALUADOR

* Tesis para grado o título de pregrado ó Trabajo de Investigación para Bachiller.

** Apellidos y nombres completos

*** En letras y números

**** Indicarlas en orden decreciente y su respectivo porcentaje


DNI 08565770
FIRMA DEL DIRECTOR EP (e)
Mg. Carmen Panfili Flores

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres, Guillermo Alvarez Chumpitaz y Elsa Vega Cruz, que me han dado todo el apoyo necesario.

A mis hermanos, a quienes aprecio y respeto por todos los años de constantes enseñanzas.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado en el marco del proyecto “EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE TRES PLANTAS MEDICINALES SOBRE CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER GÁSTRICO” CON CONTRATO N° 134-2017-FONDECYT, ahora PROCIENCIA (CONCYTEC) y la UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Amiel Perez, investigador principal del Proyecto, por todas aquellas reuniones motivadoras de fructífera discusión científica que me permitían continuar con la pasión por la investigación.

A la Mg. Ana Mayanga, por su constante apoyo en el asesoramiento de mi tesis, por su ecuánime personalidad que transmite tranquilidad durante el trabajo y por toda la confianza otorgada desde el inicio del proyecto.

Al Dr. Erasmo Colona, por su tiempo invertido y sus acertadas correcciones durante el asesoramiento de la tesis, además de las provechosas horas de clases durante el pregrado.

Al Blgo. Salyoc Tapia, por su amistad y sinceridad en cada momento durante el desarrollo experimental en el laboratorio, así como su ejemplo de perseverancia que me motivó día a día a no desistir.

Al Prof. Alejandro Fukuzaki y el Dr. Alvaro Marcelo, por brindarme su ayuda en diversos puntos en la realización de este trabajo, tanto en los procesos químicos de la obtención de fracciones de extractos como en las recomendaciones con los cultivos celulares.

A mi mejor amiga Katherine, quien me ha apoyado emocionalmente de manera inconmensurable durante toda esta travesía.

Un distintivo agradecimiento al Mg. Alberto López y a la profesora María Siles, del Laboratorio de Genética General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM,

con quienes tuve mis primeras experiencias en investigación. Así mismo, a los miembros más antiguos del laboratorio que pude conocer, Shary Ríos, Yajahaira Nevenka, Henry Bonilla y José Linares, aquellos que me apoyaron y aconsejaron en el desarrollo de los proyectos. A mis amigos del laboratorio: Marlon García, Alex Proleón, Susan Echavarría, Paul Guarnizo e Ingrid Tirado por los momentos compartidos.

Finalmente, gracias a cada uno de los miembros de la promoción *Ad astra per aspera* Base 14 de la EP genética y biotecnología con quienes compartí variadas experiencias durante la carrera que me permitieron crecer académica y personalmente.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Cáncer gástrico.....	3
2.2 Células madre cancerosas.....	4
2.3 Marcador de membrana CD44.....	5
2.4 Plantas medicinales en el descubrimiento de fármacos anticancerígenos	5
2.5 Obtención de extractos y fracciones cromatográficas de plantas medicinales y su efecto en células madre del cáncer	7
2.6 <i>Dracontium spruceanum</i> , “Jergón sachá”	9
2.7 Clasificación Taxonómica de <i>Dracontium spruceanum</i>	10
2.8 Estudios fitoquímicos de <i>Dracontium spruceanum</i>	11
2.9 Uso de cultivos celulares para la evaluación de compuestos citotóxicos.....	11
2.10 Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	12
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
3.1 HIPÓTESIS	13
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	13
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13

4.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1	Material biológico.....	14
4.2	Reactivos.....	14
4.3	Equipos	16
4.4	Materiales para obtención del extracto y fracciones cromatográficas	16
4.5	MÉTODOS	17
5.	RESULTADOS	23
5.1	Fracciones cromatográficas de eDSBCI	23
5.2	Cromatografía en capa fina de las fracciones cromatográficas de eDSBCI.....	23
5.3	Aislamiento de células madre cancerosas gástricas (GCSC)	25
5.4	Evaluación de citotoxicidad de las fracciones cromatográficas mediante el ensayo de viabilidad celular con MTT	26
5.5	Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de las fracciones F50 y F52 sobre la línea celular AGS parental	32
5.6	Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de las fracciones F50 y F52 sobre células AGS CD44+	33
5.7	Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de las fracciones F50 y F52 sobre la línea celular no cancerosa 293T	34
5.8	Comparación de los valores de IC50 de las fracciones F50 y F52 sobre células AGS parental, AGS CD44+ y las no cancerosas, 293T	35
6.	DISCUSIÓN	36
7.	CONCLUSIONES	40
8.	RECOMENDACIONES	41
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXO 1	56
	ANEXO 2	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de <i>Dracontium spruceanum</i>	10
Figura 2 Cromatografía en capa fina de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de <i>Dracontium spruceanum</i>	24
Figura 3 Análisis de la expresión del marcador de superficie CD44 por citometría de flujo.....	25
Figura 4. Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre la línea celular AGS parental a las 24 h y 48 h de exposición.....	26
Figura 5. Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre células AGS CD44+ a las 24 h y 48 h de exposición.....	27
Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre la línea celular no cancerosa 293T a las 24 h y 48 h de exposición.....	28
Figura 7 Comparación de la citotoxicidad de las fracciones F50 y F52 a 100 µg/mL sobre células AGS parental y AGS CD44+ a las 24 h y 48 h de exposición.....	31
Figura 8. Efecto de las fracciones cromatográficas F50 y F52 del eDSBCI sobre la viabilidad celular de AGS parental	32
Figura 9. Efecto de las fracciones cromatográficas F50 y F52 del eDSBCI sobre la viabilidad celular de AGS CD44+	33
Figura 10. Efecto de las fracciones cromatográficas F50 y F52 del eDSBCI sobre la viabilidad celular de células no cancerosas 293T	34
Figura 11. Comparación de valores de IC50 para cada línea celular.	35
Figura 12. Estrategia de <i>Gating</i> para el análisis de citometría de flujo de la línea celular AGS parental y las AGS CD44+	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Peso obtenido de las fracciones cromatográficas del extracto de eDSBCI	23
Tabla 2 Citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a concentración de 100 µg/mL expresados porcentajes de viabilidad.	29
Tabla 3. Valores de IC50 (µg / ml) de las fracciones cromatográficas	35

ABREVIATURAS

CCF: Cromatografía en capa fina

CD44: Grupo de diferenciación (por sus siglas en inglés, *Cluster of differentiation 44*)

CSC: Células madre cancerosas (por sus siglas en inglés, *Cancer stem cells*)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*

DMSO: Dimetilsulfóxido

eDSBCI: Extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum*.

FX: Fracción cromatográfica

GCSC: Células madre cancerosas gástricas (por sus siglas en inglés, *Gastric cancer stem cells*)

IC50: Concentración Inhibitoria del 50% del crecimiento celular (por sus siglas en inglés, *Half maximal inhibitory concentration*)

MACS: Aislamiento de células activadas magnéticamente (por sus siglas en inglés, *Magnetic-activated cell sorting*)

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

PBS: Tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés, *phosphate-buffered saline*)

UV: Ultravioleta

RESUMEN

El cáncer gástrico es diagnosticado tardíamente o se presenta recurrencia dentro de los 5 años postcirugía. Las recidivas y metástasis tienen como uno de los principales responsables a las células madre cancerosas (CSC). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto citotóxico de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* (eDSBCI) sobre CSC de la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS. Se obtuvieron 11 fracciones por cromatografía en columna y se realizó una evaluación preliminar de la citotoxicidad mediante la técnica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de las cuales se escogieron las fracciones cromatográficas F50 y F52 para hallar la respectiva concentración Inhibitoria del 50 % del crecimiento celular (IC50). Las IC50 de F50 y F52 en las CSC de AGS fue de $25.96 \pm 3.0 \mu\text{g/mL}$ y $33.54 \pm 8.8 \mu\text{g/mL}$ a las 24h de exposición, respectivamente. En conclusión, las fracciones cromatográficas F50 y F52 del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* presentan efecto citotóxico sobre las células madre cancerosas aisladas de la línea celular AGS. Es necesario realizar más estudios que permitan dilucidar las estructuras químicas de los compuestos presentes en las fracciones cromatográficas.

Palabras claves: Células madre cancerosas, cáncer gástrico, *Dracontium spruceanum*, fracciones cromatográficas, línea celular AGS, citotoxicidad.

ABSTRACT

Gastric cancer is diagnosed late or recurrence occurs within 5 years after surgery. Recurrences and metastases have cancer stem cells (CSC) as one of the main culprits. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the cytotoxic effect of the chromatographic fractions of the chloroform extract of the bulb of *Dracontium spruceanum* (eDSBCI) on CSC of the gastric adenocarcinoma cell line AGS. Eleven fractions were obtained by column chromatography and a preliminary evaluation of cytotoxicity was carried out using the MTT technique, from which the chromatographic fractions F50 and F52 were chosen to find the respective Inhibitory concentration of 50% of cell growth (IC₅₀). The IC₅₀ of F50 and F52 in the CSC of AGS was $25.96 \pm 3.0 \mu\text{g/mL}$ and $33.54 \pm 8.8 \mu\text{g/mL}$ at 24h of exposure, respectively. In conclusion, the chromatographic fractions of the chloroform extract of the bulb of *Dracontium spruceanum* have a cytotoxic effect on cancer stem cells isolated from the AGS cell line. More studies are needed to elucidate the chemical structures of the compounds present in the chromatographic fractions.

Keywords: Cancer stem cells, gastric cancer, *Dracontium spruceanum*, chromatographic fractions, AGS cell line, cytotoxicity.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico representa un importante problema de salud pública. A nivel mundial es el quinto en incidencia y cuarto en mortalidad (Sung *et al.*, 2021). En el Perú, es la primera causa de muerte por cáncer, siendo en los varones el segundo cáncer más común y el tercero en mujeres (Sung *et al.*, 2021). Además, debido a la falta de síntomas en estadios tempranos, esta enfermedad se detecta cuando el paciente presenta una condición avanzada momento en que los tratamientos solo son paliativos y prolongan la vida hasta un aproximado de 7 a 13 meses (Schütte *et al.*, 2021).

Las complicaciones del cáncer se debe en gran medida al tipo celular conocido como células madre cancerosas (CSC), que por su capacidad de autorrenovación, diferenciación, tumorigenicidad y quimiorresistencia dan origen a las recidivas y metástasis (Zhang *et al.*, 2017). Este tipo de células son identificadas, caracterizadas y aisladas mediante el estudio de marcadores de CSC. Así, las células que presentan dichos marcadores podrían servir como blanco para fármacos dirigidos que no dañen a las células sanas (Y. Fu *et al.*, 2018).

Durante siglos, las plantas medicinales han sido utilizadas por el ser humano para combatir diversas enfermedades, lo que ha permitido el descubrimiento de valiosos fármacos analgésicos (morfina), antihipertensivos (reserpina), antineoplásicos (vinblastina y taxol), entre otros (Kumar *et al.*, 2015); por ello, en la actualidad aún se viene realizando estudios fitoquímicos de los compuestos de interés presentes en estas plantas, los cuales podrían ser ampliamente utilizados como tratamientos (Tello-Ceron *et al.*, 2019).

En el Perú, la investigación sobre plantas medicinales y la obtención de metabolitos con potencial biomédico, es aún incipiente y son pocos los laboratorios con la tecnología

necesaria para aislar compuestos químicos de estas plantas (Organización Panamericana de la Salud, 2018). Por tal motivo, ante la gran riqueza de recursos biológicos que posee el país, resulta necesaria la realización de investigaciones más profundas en esta área.

Dracontium spruceanum ha sido utilizada como planta medicinal para la prevención y tratamiento de mordedura de serpientes (Collantes *et al.*, 2011). Los estudios realizados sobre esta planta están enfocados en el análisis de compuestos químicos, sin embargo, pocos han probado su potencial anticancerígeno a nivel *in vitro* (Miranda, 2019; Tapia, 2022).

Por lo expuesto anteriormente, la presente tesis tuvo la finalidad de evaluar la actividad citotóxica de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* sobre células madre cancerosas gástricas de la línea celular AGS. Esto permitirá ampliar nuestro conocimiento sobre la actividad biológica de los componentes químicos de esta planta.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer gástrico

El cáncer gástrico es la quinta neoplasia maligna más diagnosticada a nivel mundial con más de 1 millón de casos nuevos al año; además debido a su estadio avanzado al momento del diagnóstico, la mortalidad es elevada y por ello es la cuarta causa de muerte por cáncer (Sung *et al.*, 2021).

Existen varios sistemas de clasificación para el cáncer gástrico, sin embargo, el más utilizado es la clasificación de Lauren, que diferencia histológicamente según criterios micro y macroscópicos en adenocarcinoma intestinal y de tipo difuso (Lauren, 1965); además se ha agregado un tercer tipo; el indeterminado o mixto (Hu *et al.*, 2012). Se ha postulado que el primero se asocia con gastritis atrófica crónica y metaplasia intestinal, mientras que el segundo se origina en la mucosa gástrica normal (Sitarz *et al.*, 2018).

En el Perú, el cáncer gástrico está presente con una incidencia de 15.2 por cada 100 000 habitantes, siendo la mortalidad elevada en comunidades de escasos recursos económicos (Sung *et al.*, 2021). Mayormente es diagnosticado en el grupo etario de aproximadamente 62.96 ± 14.75 años; siendo el adenocarcinoma de tipo intestinal el más común (34%) seguido del adenocarcinoma de tipo difuso (18.7 %) (Tolentino y Ojeda, 2015).

El pronóstico de vida de los pacientes diagnosticados con cáncer gástrico metastásico o no resecable sigue siendo malo y las terapias actuales extienden la supervivencia a 4 meses con el mejor cuidado de apoyo (BSC, por sus siglas en inglés, *Best supportive Care*) o 12 meses con quimioterapias (Wagner *et al.*, 2017). La terapia estándar de primera línea incluye quimioterapia con fluorouracilo (5FU) y agentes de platino, con la opción de agregar antraciclina o taxanos (Chan *et al.*, 2019). En el cáncer gástrico con sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2) la

adición de trastuzumab a la quimioterapia mostró una eficacia superior en comparación con la quimioterapia convencional (Shen et al., 2013). Recientemente se aprobaron otros tratamientos de segunda y tercera línea, incluido el anticuerpo del factor de crecimiento endotelial vascular, ramucirumab, con o sin paclitaxel (Hsu y Raufi, 2021) .

2.2 Células madre cancerosas

Los principales problemas que devienen con el cáncer son la metástasis, la quimiorresistencia y las recidivas, siendo las CSC una de las principales responsables de ocasionarlos (Dawood *et al.*, 2014). Similarmente a las células madre normales, las CSC poseen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse, con lo que contribuyen a la generación de la heterogeneidad tumoral (Rossi *et al.*, 2020). De tal manera que este tipo de células podrían ser consideradas como dianas para terapias dirigidas (Miyoshi *et al.*, 2021).

Para la identificación de CSC se utilizan por lo general anticuerpos específicos para determinadas proteínas de membrana, lo que se conoce como marcadores de CSC (Abbaszadegan *et al.*, 2017). Las primeras CSC que se identificaron provinieron de una leucemia mieloide aguda (LMA), donde células con el fenotipo CD34⁺CD38⁻ fueron capaces de iniciar la LMA en ratones inmunodeficientes, pero no su contraparte CD34⁺CD38⁺ ni las CD34⁻ (Bonnet y Dick, 1997). En cuanto a las CSC del cáncer gástrico, existen diferentes marcadores identificados tales como el grupo de diferenciación 44 (CD44), CD133, ALDH, CD166 y CD24, entre otros (Bekaii-Saab y El-Rayes, 2017). De estos se ha observado que CD44 y ALDH son los más específicos para detectar y aislar células madre cancerosas gástricas (GCSC) tumorigénicas y quimiorresistentes (Nguyen *et al.*, 2017). Por otro lado, las CSC CD133⁺ demuestran ser resistentes a las quimioterapias tradicionales (Zhang *et al.*, 2011) y la sobreexpresión de este gen se relaciona con un mal pronóstico clínico (Chen *et al.*, 2016).

2.3 Marcador de membrana CD44

La glicoproteína transmembrana CD44 reconoce al hialuronano, componente esencial de la matriz extracelular (MEC) y cumple un rol importante de adhesión celular (Thorne *et al.*, 2020). Este fue el primer marcador que se identificó en CSC, y es comúnmente utilizado para el aislamiento de este tipo de células (Takaishi *et al.*, 2009). Posteriormente se descubrieron variantes específicas de CD44 como CD44v6, CD44v9, además de otros marcadores como CD24, CD133, Lgr-5 y ALDH1 los cuales se asocian con parámetros clínico-patológicos del cáncer gástrico (Wakamatsu *et al.*, 2012). Notablemente, según un metaanálisis en el que se evaluó la asociación entre la expresión de marcadores de GCSC y los resultados clínicos, se sugiere que CD44 sería el único marcador vinculado a la diferenciación tumoral, es decir que participaría en la progresión de la malignidad del cáncer gástrico (Razmi *et al.*, 2021).

A nivel de laboratorio el fenotipo de células CD44+ provenientes de líneas celulares (MKN-45, MKN-74 y NCI-N87) fueron capaces de formar esferoides *in vitro*; además, de demostrar tumorigenicidad *in vivo* al ser inyectado por vía subcutánea o en la pared del estómago de ratones inmunodeficientes y formar tumores luego de 8-12 semanas, mientras que las células CD44- no lo hicieron (Takaishi *et al.*, 2009). Otros autores evaluaron la formación de tumoresferas de CSC de líneas celulares de cáncer gástrico (HGC-27, MGC-803 y MKN-45), encontrando elevados niveles de expresión de CD44 (Song *et al.*, 2011). Por su parte, Yoon *et al.*, (2014), demostraron que la eliminación del CD44 resultó en un incremento de la quimiosensibilidad.

2.4 Plantas medicinales en el descubrimiento de fármacos anticancerígenos

En el periodo de 1981 y finales de 2014, aproximadamente el 50% de los fármacos aprobados se obtuvieron directa o indirectamente de productos naturales (Newman y Cragg, 2016). De estos, destacan las plantas medicinales las cuales han sido utilizadas

por el ser humano a lo largo de miles de años para prevenir y tratar enfermedades (Süntar, 2020). El conocimiento tradicional sobre su colección, selección y métodos de preparación fue transmitido de manera verbal de generación en generación hasta el desarrollo de la escritura, la que permitió su mejor registro (Petrovska, 2012).

Hasta el siglo XVIII, las formas más comunes de preparación de un medicamento fueron los tintes, tés, polvos, decocciones y otros; de los cuales se puede decir que ninguno cumple con la rigurosidad de los fármacos comercializados en la actualidad (Ogbonna *et al.*, 2012). Gracias al avance de la química orgánica se pudo lograr la purificación y caracterización de diversos principios activos derivados de plantas medicinales (Choudhari *et al.*, 2020).

Diversos estudios han evaluado la capacidad anticancerígena de una extensa variedad de extractos de plantas medicinales (Khan *et al.*, 2022). En otra investigación se evaluó el extracto hexánico de *Euphorbia lunulata* y se encontró que inhibió la proliferación, migración e invasión de la línea celular de cáncer gástrico SGC7901 resistente a adriamicina, un fármaco ampliamente utilizado en las quimioterapias (Z. Fu *et al.*, 2018). Otro autor probó el efecto citotóxico del extracto metanólico de *Swertia petiolata* sobre células SNU-5 de cáncer gástrico y encontró que se producía inducción de la apoptosis y estrés oxidativo (He *et al.*, 2017). Wang *et al.*, (2017) demostraron que el extracto de acetato de etilo de *Celastrus orbiculatus* inhibió la proliferación e indujo la apoptosis de las líneas celulares AGS y BGC-823 de cáncer gástrico.

En el proceso de la identificación de extractos y fracciones cromatográficas de plantas medicinales con potencial anticancerígeno se procede a aislar compuestos fitoquímicos y posteriormente evaluar su actividad biológica. En un artículo de revisión se registra que un total de 78 fitoquímicos tienen una actividad anticancerígena significativa; probado a través de experimentos *in vitro* e *in vivo*, de los cuales la mayoría fueron alcaloides 19 (24 %), flavonoides 14 (18 %) y terpenos 12 (15 %) (Khan *et al.*, 2022).

De los 78 compuestos, 24 presentan efecto contra células cancerosas gástricas, siendo en su mayoría alcaloides y flavonoides (Khan *et al.*, 2022).

Hoy en día se tienen varios compuestos fitoquímicos en avanzadas fases de investigación *in vitro* e *in vivo*. La colchicina, alcaloide de la planta *Colchicum autumnale*, induce la apoptosis mediante vías mitocondriales mediadas por caspasa-3 en células NCI-N87 de carcinoma gástrico (T. Zhang *et al.*, 2019). Tetrandrina, un alcaloide aislado de la raíz seca de *Stephania tetrandra* S. Moore, inhibe significativamente la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis y el tiempo, e induce la apoptosis mediante activación de las caspasas 3 y 9 en células BGC-823 de cáncer gástrico (Qin *et al.*, 2013). Kurarinona, una flavonona prenilada aislado de las raíces de *Sophora flavescens*, inhibe la vía de señalización STAT3 de células de adenocarcinoma gástrico SGC-7901 (Zhou *et al.*, 2015).

En la última década se vienen realizando investigaciones que demuestran que los fitoquímicos podrían ayudar en el tratamiento con quimio y radioterapia, dirigidos a las CSC; además que tienen muy baja toxicidad, en contraste con las drogas quimioterapéuticas comunes (Cianciosi *et al.*, 2018).

2.5 Obtención de extractos y fracciones cromatográficas de plantas medicinales y su efecto en células madre del cáncer

La eficacia terapéutica de cualquier planta medicinal depende de varios factores a considerar, entre ellos, la parte de la planta a utilizar, la calidad y cantidad de compuestos activos presentes, así como la variación de estos que dependen de los factores geográficos, además de los efectos sinérgicos entre metabolitos, entre otros (Singh *et al.*, 2016). Estos metabolitos pueden ser purificados para evaluar sus efectos antitumorales lo que implica un proceso de fraccionamiento guiado por bioensayo y química combinatoria. El proceso inicia con una confirmación de la actividad biológica de un primer extracto el cual se fracciona con diferentes solventes y se evalúa nuevamente su bioactividad, adicionalmente se realizan pruebas químicas de presencia de compuestos y cromatografía en capa fina (CCF), luego se realiza una cromatografía

en columna para obtener subfracciones más puras que contendrán grupos de metabolitos con características similares; así mismo se procede a realizar más ensayos *in vitro* que determinan que subfracción es la que tiene mayor actividad. Finalmente se realizan técnicas de detección y purificación química como espectroscopia infrarroja (IR), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o cromatografía de gases (Garcia-Oliveira *et al.*, 2021). Aislado el compuesto químico se vuelve a evaluar la actividad biológica *in vivo* para determinar citotoxicidad y efectos antitumorales; y posteriormente se llevan a cabo ensayos clínicos.

En la investigación de fitoquímicos con potencial anticancerígeno los principales grupos de metabolitos estudiados son los polifenoles, alcaloides, terpenoides, tioles, entre otros (Singh *et al.*, 2016). Estos son atractivos porque demuestran efectos antioxidantes, proapoptóticos y antiproliferativos en distintos tipos de cáncer, como el gástrico (Addeo *et al.*, 2021). Los fitoquímicos poseen la capacidad de dirigirse a las múltiples vías de señalización celular que se activan de forma anormal en las CSC (Chan *et al.*, 2018; Oh *et al.*, 2016). Por ejemplo, el resveratrol, compuesto polifenólico extraído de varias especies de plantas como la mora o las uvas, elimina las CSC de osteosarcoma mediante la inhibición de la vía STAT3 (Peng & Jiang, 2018); la genisteína, un fitoestrógeno isoflavónico natural proveniente de la soja, disminuye la población de CSC de cáncer de mama a través de la vía Hedgehog (Fan *et al.*, 2013); la epigallocatequina (EGCG), un polifenol derivado del té verde, inhibe la actividad de las CSC del cáncer de pulmón mediante la supresión de la vía Wnt/ β -catenina (Zhu *et al.*, 2017).

2.6 *Dracontium spruceanum*, “Jergón sachá”

Dracontium spruceanum conocido anteriormente como *Dracontium lorentense* Krause, se distribuye desde Costa Rica hasta lo largo de la vertiente oriental de los Andes a través de la Amazonía de Ecuador, Perú y el noroeste de la Amazonía de Brasil (Zhu y Croat, 2004). Esta especie presenta hojas lobulares y el peciolo está cubierto de anillos oscuros muy parecido al de la piel de la serpiente *Bothrops atrox* y llega a medir hasta 1.5 - 2 m de altura (Collantes *et al.*, 2011).

En la selva peruana esta planta es conocida como “jergón sachá” y es utilizada por los habitantes con fines preventivos contra mordedura de serpiente sobándose o chicoteándose con las hojas y peciolo, además es usada para síntomas o enfermedades como el temblor de las manos, epilepsia, diarrea, herpes, SIDA, hernia, cáncer, asma, entre otros (Jurado, 1993).

La tribu de los Ese'jeja del sudeste del Perú utilizan *Dracontium spruceanum* para la mordida de serpientes; para ello cocinan y maceran el bulbo y lo aplican de manera externa lo que inhibiría el efecto del veneno (Desmarchelier *et al.*, 1996).

2.7 Clasificación Taxonómica de *Dracontium spruceanum*

- Reino: Viridiplantae
- Filo: Streptophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Alismatales
- Familia: Araceae
- Género: *Dracontium*
- Especie: *Dracontium spruceanum* (Schott) G. H. Zhu
- Nombre común: hierba del jergón, jergón sacha, mágoro (Machiguenga), hurignpe (Amarakaeri), shandórao (Amahuaca), ronon rao and shanvi yorá (Shipibo conibo), see (Ese'ejá) y du nu yubi (Cashinaguas),



Figura 1. Partes de *Dracontium spruceanum*. (A) hojas y (B) Bulbo. (Imágenes tomadas de Miranda, 2019)

2.8 Estudios fitoquímicos de *Dracontium spruceanum*

Sobre la composición fitoquímica de *Dracontium spruceanum* se ha evidenciado la presencia de alcaloides, esteroides, cafetaninos, glicósidos fenólicos, flavonoides, taninos, azúcares, gomas, mucílagos, entre otros (Jurado, 1993).

En un estudio realizado con muestras de Pucallpa y extractos preparados con diferentes solventes orgánicos, se realizó un fraccionamiento cromatográfico del bulbo de *Dracontium spruceanum* que permitió el aislamiento de metabolitos como el sitosterol, estigmasterol, ácido p-hidroxi-benzoico, acil-glicosilado y 7-oxo-sitosterol (Collantes, 2002). Otro estudio comparativo de muestras de jergón sachá procedentes del departamento de San Martín, determinó que la muestra con mayor concentración de flavonoides correspondía a la provincia de Lamas (Bocanegra, 2007). Collantes (2011) encontró que la glucosa fue el carbohidrato mayoritario de los residuos polares, además de reportar por primera vez el aislamiento de 7-oxositosterol acilglicosilado en una planta.

2.9 Uso de cultivos celulares para la evaluación de compuestos citotóxicos

El estudio del cáncer implica el uso de muestras parafinadas, xenoinjertos, ratones genéticamente modificados, cultivos primarios, líneas celulares, entre otros. (Ferreira *et al.*, 2013). El sistema *in vitro* del uso de líneas celulares tiene una gran importancia en la investigación del cáncer y el descubrimiento de fármacos (Masters, 2000). Además, su uso para la evaluación de citotoxicidad ha sido realizado durante años teniendo un valor predictivo clínico consistente con el esperado del tumor original (Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

Dentro de las ventajas de los modelos *in vitro* de líneas celulares podemos encontrar que tienen facilidad de manipulación (Van Staveren *et al.*, 2009), alta homogeneidad (Burdall *et al.*, 2003), similitud con el tumor inicial (Tomlinson *et al.*, 1998), accesibilidad inmediata (Gazdar *et al.*, 2010), fuente ilimitada autorreplicativa (Burdall *et al.*, 2003),

reproducibilidad de resultados en condiciones óptimas (Niepel *et al.*, 2019); además, existe una gran variedad de líneas de células disponibles (Gazdar *et al.*, 2010). Sin embargo, también se debe considerar las desventajas tales como: la contaminación cruzada con otras líneas celulares (Huang *et al.*, 2017), inestabilidad cromosómica (Berg *et al.*, 2017), contaminación por micoplasma (Geraghty *et al.*, 2014) y pérdida de la heterogeneidad natural del tumor (Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

Entre las líneas celulares de cáncer gástrico más utilizadas para el estudio de compuestos citotóxicos se encuentran las líneas AGS, KATO III, SNU-5, SNU-1, SNU-16, entre otras (Lee *et al.*, 2019) (Stewart *et al.*, 2013)(Shrestha *et al.*, 2016) (He *et al.*, 2017). La línea celular AGS es de tipo adherente que deriva de un cáncer primario de fragmentos de un tumor resecado de un paciente que no recibió terapia previa (Barranco *et al.*, 1983).

2.10 Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

El ensayo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es uno de los métodos colorimétricos más utilizados para la cuantificación de células con actividad metabólica debido a su simpleza, seguridad, rentabilidad e idoneidad para las líneas celulares (Ferrari *et al.*, 1990; Mosmann, 1983).

El fundamento de esta técnica es la reducción de las sales solubles de tetrazolio MTT de color amarillo a formazán insoluble de coloración púrpura, proceso mediado por reductasas mitocondriales, no mitocondriales y de la membrana plasmática de células viables (Riss *et al.*, 2013) (Bernas y Dobrucki, 2002)(Bernas y Dobrucki, 2000).

Una característica importante de este método es el uso de un solvente (DMSO) capaz de disolver el formazán de tal manera que se pueda tener una solución de color homogénea y que sea susceptible de ser leída por un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550–600 nm (McCauley *et al.*, 2013).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* (Zhu,1996) presentan efecto citotóxico sobre células madre cancerosas provenientes de la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* (Zhu,1996) sobre la proliferación de las células madre cancerosas provenientes de la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar el efecto citotóxico de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* (Zhu,1996) sobre la proliferación de las células madre cancerosas provenientes de la línea celular AGS y la línea celular parental.
- Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC50) de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* (Zhu,1996) sobre la proliferación de las células madre cancerosas provenientes de la línea celular AGS y la línea celular parental.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Líneas celulares

La línea celular del cáncer gástrico utilizada fue AGS que deriva de un adenocarcinoma gástrico de un paciente caucásico (ECACC 89090402), la cual será denominada en adelante como AGS parental. Para el control de citotoxicidad se utilizó la línea celular no cancerosa 293T que deriva de células de riñón embrionario humano (ATCC, CRL-3216™). Ambas líneas celulares fueron proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo Celular e Inmunología de la Universidad Científica del Sur.

4.1.2 Extracto y fracciones cromatográficas del bulbo de *Dracontium spruceanum*

El eDSBCI y las 11 fracciones cromatográficas evaluadas fueron obtenidas a partir del bulbo de *Dracontium spruceanum* colectado en el marco del proyecto “Evaluación del efecto de extractos y fracciones de tres plantas medicinales sobre células madre del cáncer gástrico” y procesado en el Laboratorio de Química y Bioquímica de Productos Naturales de la Universidad Científica del Sur. La colecta del bulbo de *Dracontium spruceanum* se realizó en la ciudad de Lamas en el Departamento de San Martín a una altura aproximada de 310 a 920 msnm y con coordenadas de latitud de 6°23´01.8S y 76° 30 21.6 °W. La planta fue previamente identificada en el museo de historia natural (anexo 2)

4.2 Reactivos

4.2.1 Reactivos para cultivo celular

- Medio de cultivo DMEM F-12, pH 7.2 (Sigma)

- Antibiótico-antimicótico: Estreptomicina/Penicilina/Anfotericina (SPA) 100X (Biowest)
- Suero Fetal Bovino (SFB) (Biowest)
- Tripsina 10X (Biowest)
- Acutasa (Biowest)
- Glutamina 200mM (Biowest)
- Buffer Fosfato Salino (PBS), pH 7.2
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)
- Azul de tripán 0.4 % (Sigma)

4.2.2 Reactivos para la selección de células por microbeads magnéticos.

- *Microbeads* conjugados con anticuerpo anti-CD44 (Miltenyi Biotec)
- Reactivo de Bloqueo del FcR (Miltenyi Biotec)
- Buffer autoMACS (Miltenyi Biotec)
- Columnas MS (Miltenyi Biotec)
- Separador MiniMACS (Miltenyi Biotec)

4.2.3 Reactivos para citometría de flujo

- Anticuerpo anti-CD44 PE (BD Biosciences)
- Reactivo de Bloqueo del FcR (Miltenyi Biotec)
- Buffer de corrida autoMACS (Miltenyi Biotec)

4.2.4 Reactivos para el ensayo de viabilidad celular

- Kit EZcount™ MTT Cell Assay (Hi media)

4.2.5 Solventes orgánicos

- Benceno (Merck)

- n-hexano (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Acetona (Merck)
- Metanol (Merck)

4.3 Equipos

- Cabina de Bioseguridad tipo II (Telstar)
- Citómetro de Flujo (Guava easyCyte)
- Microscopio invertido (Nikon)
- Centrífuga (BOECO)
- Microcentrífuga (Termo Fisher)
- Lector de microplaca (Biotek, synergy)
- Incubadora de CO₂ (Termo Fisher)
- Licuadora (Oster)
- Balanza electrónica (Sartorius)
- Baño ultrasonido (Brason)
- Estufa Venticell 55 (MMM group)
- Rotavapor (IKA)
- Lámpara UV (UVP)

4.4 Materiales para obtención del extracto y fracciones cromatográficas

- Tamiz malla ASTM E-11 / 1mm (Gilson company, INC)
- Papel whatman N°1 (Thermo Fisher)
- Filtros de 0.4 µm (Merck)
- Placas de CCF de sílica gel G-60 F254 (Merck)
- Columna de vidrio de 50 x 4 cm

- Sílica gel G-60 (Merck)
- Cloruro de antimonio III

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Obtención del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* (eDSBCI)

El bulbo de la planta se secó a 39°C por una semana, fue molido en una licuadora y pasado por una malla metálica (ASTM E-11 / 1mm). Se pesó 500.35 g y se dejó reposando por 24 horas en 800 mL de cloroformo. para luego sonificarlo por tres horas en un baño ultrasonido a 40°C. Se filtró a través de un papel whatman N°1 y se almacenó en un recipiente tapado a temperatura ambiente. Este último paso se repitió por 5 veces.

Los extractos se juntaron, filtraron a través de un filtro de 0.4 µm y se evaporaron utilizando un rotavapor a 40°C y 340 mbar. Una vez seca la muestra (aspecto caramelo marrón claro), se mantuvo por 48 horas en una estufa con circulación de aire a 38 °C. El eDSBCI se dejó en reposo en un desecador por 72 horas y cubierto de la luz con papel aluminio.

4.5.2 Obtención de fracciones por cromatografía en columna

Se preparó una columna de vidrio de 50 x 4 cm con sílica gel G-60 (0.040-0.063 mm). Se lavó con 200 mL de n-hexano. El eDSBCI fue disuelto en 10 mL de cloroformo y añadido en la columna por la parte superior. Luego, se eluyó, siguiendo la serie eluótopa, con una mezcla de cloroformo-n-Hexano, cloroformo, cloroformo-acetona, acetona, acetona –metanol, metanol y agua. Posteriormente, se colectaron aproximadamente 3mL de eluatos en tubos de 10 mL controlados por el número de gotas.

4.5.3 Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó un análisis CCF de cada eluato. Se usaron placas de CCF de sílica gel G-60 F₂₅₄, fase estacionaria, y una fase móvil constituida de Benceno-Acetona-Acetato-Metanol (10:1:1.5:0.5) con variación del metanol en función de la polaridad de las fracciones. Las muestras se colocaron en las placas y estas fueron puestas de manera vertical en una cubeta de vidrio durante 10 minutos para que se produzca la migración de las bandas.

Las placas fueron observadas con luz visible, UV 366 nm (onda larga) y UV 254 nm (onda corta) además se utilizó una solución de cloruro de antimonio III a 100°C para evidenciar principalmente la presencia de terpenos, esteroides y carotenoides.

4.5.4 Almacenamiento de fracciones cromatográficas

Cada fracción cromatográfica fue secada en estufa a 40°C hasta obtener un peso seco, luego fueron pesadas, disueltas en DMSO y almacenadas a -80 °C hasta su uso en los ensayos biológicos.

4.5.5 Cultivo celular

La línea celular AGS fue cultivada en medio DMEM F – 12, suplementado al 10% suero bovino fetal y 1X de antibiótico-antimicótico, incubadas a 37 °C y 5% de CO₂. Por otro lado, la línea celular no cancerosa 293T se cultivó en las mismas condiciones y además se le adicionó L-glutamina a una concentración final en el medio de cultivo de 2 mM. Ambas líneas celulares se utilizaron en los ensayos cuando alcanzaron el 70 a 80 % de confluencia en placa; para lo cual fueron desprendidas con Tripsina 1X o Acutasa 1X y posteriormente repartidas en *Flasks* o placas de cultivo. Para criopreservar las células se utilizó medio DMEM F–12 al 5% de DMSO.

4.5.6 Aislamiento de células madre cancerosas gástricas (GCSC) mediante el sistema MACS.

Para seleccionar GCSC, se utilizó la tecnología de selección de células activadas magnéticamente (MACS, del inglés *Magnetic-activated cell sorting*) con anticuerpos anti-CD44 unidos a *microbeads* magnéticos siguiendo el protocolo de los fabricantes con algunas modificaciones (130-095-194, Miltenyi Biotec).

En las placas de cultivo con 70%-80% de confluencia se agregó acetasa para desprender las células, se las transfirió a un tubo de 15 mL y se centrifugó a 1400 RPM por 5 minutos. Se contó en cámara de Neubauer entre 3 a 7×10^6 células, se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 1500 RPM por 10 min. Posteriormente, el sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 80 μ L de buffer autoMACS para luego añadir 10 μ L de reactivo de bloqueo de FcR y 10 μ L de *microbeads* magnéticos anti-CD44. Se incubó a 4°C por 15 minutos. Se agregó 1 mL de PBS 1X y se centrifugó a 1500 RPM por 10 min.

Las células se resuspendieron en 500 μ L buffer autoMACS. Luego se pasaron por una columna paramagnética MS, previamente lavada 3 veces con 500 μ L de PBS 1X, sostenida por el separador MiniMACS (Miltenyi Biotec), de modo tal que las células marcadas con el anticuerpo quedaron en la columna. Para retirar las células no marcadas se agregaron 500 μ L de PBS 1X, repitiéndose este paso tres veces. Finalmente, la columna se retiró del separador magnético y con la ayuda de un émbolo se eluyó las células marcadas (CD44+) de la columna con 1 mL de buffer autoMACS, luego estas células fueron cultivadas con medio DMEM F-12 suplementado e incubadas a 37 °C al 5% de CO₂.

4.5.7 Análisis de células AGS CD44+ por citometría de flujo

Se realizó citometría de flujo para verificar el porcentaje de GCSC aisladas de la línea celular AGS, las que serán denominadas en adelante como AGS CD44+. Luego de adaptadas las células en aquellas placas de cultivo con 70% a 80% de confluencia se

agregó Acutasa 1X para desprenderlas, se las transfirió a un tubo de 15 mL y se centrifugó a 1400 RPM por 5 minutos. Se realizó el conteo en cámara de Neubauer y se transfirió aproximadamente 3×10^5 células en un tubo de microcentrífuga con buffer autoMACS. Esto se centrifugó a 1500 RPM por 10 min.

Descartado el sobrenadante se agregó 89 μ L de buffer autoMACS y 10 μ L de reactivo de bloqueo de FcR y se dejó incubando a 4° C por 10 min. Posteriormente, se agregó 1 μ L de anticuerpo anti-CD44 PE (Ficoeritrina) y se incubó a 4°C por 20 min. Luego se agregó 1 mL de buffer autoMACS y se centrifugó a 1500 RPM por 10 min. Finalmente, se resuspendió en 300 μ L del buffer y se realizó la lectura en el citómetro de flujo. Paralelamente en este ensayo se utilizaron células no marcadas.

4.5.8 Ensayo de citotoxicidad de las fracciones cromatográficas de eDSBCI mediante el ensayo de viabilidad celular con MTT

4.5.8.1 Identificación de las fracciones cromatográficas con mayor potencial citotóxico.

Se trabajó con las AGS parental, células no cancerosas 293T y las AGS CD44+. Una vez obtenida una cantidad de células adecuada en cultivo (70% u 80% de confluencia) se procedió a desprenderlas con tripsina 1x, colectarlas y centrifugarlas hasta obtener un pellet; este se resuspendió en 1 mL de DMEM F – 12 para realizar el conteo de células en cámara de Neubauer. En función de la cantidad de células se les añadió medio DMEM F – 12 suplementado de modo que se repartieron 2500 células contenidas en 100 µL a cada pocillo de una placa de 96. Transcurridas 24 h se reemplazó el medio de cultivo por nuevo medio con cada una de las 11 fracciones cromatográficas del eDSBCI disueltas a 100 µg/mL. Además, se utilizó como control negativo DMSO al 0.5% (vehículo) disuelto en medio de cultivo y como control positivo se usó DMSO al 15%. Así mismo, se añadió un grupo tratado con eDSBCI para realizar una comparación con las fracciones. Estas placas fueron incubadas por 24h y 48h de exposición a las fracciones, una vez cumplido el tiempo se evaluó el porcentaje de viabilidad celular, para ello se agregó el reactivo MTT, siguiendo el protocolo de los fabricantes (Venugopal *et al.*, 2017), a una concentración final de 0.5 µg/mL en cada pocillo y se dejó incubar por 3 horas en oscuridad, luego se retiró el sobrenadante y se añadió 100 uL de DMSO al 100%, 15 minutos después se realizó la lectura en un lector de microplacas a longitudes de onda de 570 nm y 650 nm.

4.5.8.2 Determinación del IC50 de las fracciones cromatográficas con mayor potencial citotóxico.

Una vez identificadas las fracciones cromatográficas con mayor potencial citotóxico en células AGS parental y las AGS CD44+ y con menor efecto en la línea celular no cancerosa, 293T, se procedió a determinar experimentalmente la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular (IC50) de dichas fracciones (F50 y F52). Las

células fueron distribuidas en placas de 96 pocillos de la misma manera que en el anterior ensayo y después de 24 h, el medio fue reemplazado por DMEM suplementado con diferentes concentraciones de 1.16, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las fracciones cromatográficas F50 y F52. También se utilizó controles positivos y negativos (DMSO 15% y 0.5%, respectivamente). Finalmente, mediante el ensayo de MTT se evaluó el porcentaje de viabilidad celular a las 24h de exposición a las fracciones cromatográficas. La lectura se realizó en un lector de microplacas Synergy a longitudes de onda de 570 nm y 650 nm.

4.5.9 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos de la identificación de las fracciones con potencial citotóxico se realizó un ANOVA de un factor y la prueba *post hoc* de Tukey para comparar y hallar diferencias significativas entre grupos tratados con respecto al control negativo ($p\text{-value} < 0.05$). Para el cálculo del IC50 se realizó una curva dosis-respuesta mediante un modelo de regresión no lineal. En ambos casos se empleó el programa estadístico GraphPad Prism 8.

5. RESULTADOS

5.1 Fracciones cromatográficas de eDSBCI

Del fraccionamiento por cromatografía en columna, se colectaron 952 eluatos que fueron juntados en 56 fracciones; posteriormente analizadas por CCF y agrupadas de acuerdo con su perfil cromatográfico en 11 fracciones (Tabla 1 y Figura 2).

Tabla 1. Peso seco obtenido de las fracciones cromatográficas del eDSBCI

Fracciones	Peso seco de las fracciones cromatográficas (mg)
F1	27.6
F8	31.5
F21	113.3
F37	24.4
F39	33.6
F40	62.7
F43	36.7
F46	59.6
F49	188
F50	29.5
F52	45.2

5.2 Cromatografía en capa fina de las fracciones cromatográficas de eDSBCI

Del revelado de las placas de CCF con cloruro de antimonio III se observó que las fracciones F1 y F8 no evidenciaban ninguna banda, mientras que a partir de fracción F21 hasta la F40 se pudo apreciar compuestos de polaridad intermedia que migran a lo largo del cromatograma, por otro lado, las fracciones F43, F46, F49, F50 y F52 presentan los compuestos de mayor polaridad debido a que las manchas migran una corta distancia (Figura 2).

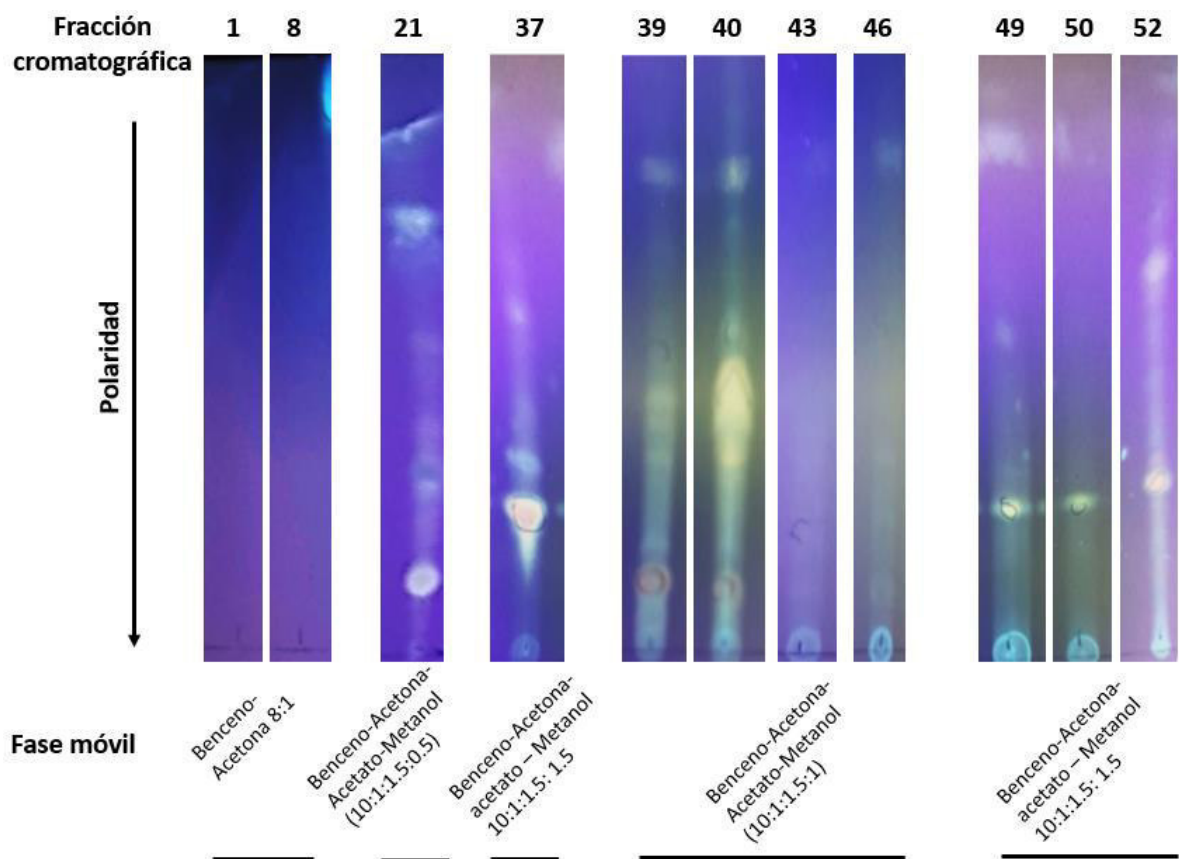


Figura 2 Cromatografía en capa fina de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum*, reveladas con cloruro de antimonio III y observadas con luz ultravioleta de onda larga (UV 366 nm).

5.3 Aislamiento de células madre cancerosas gástricas (GCSC)

El aislamiento de las células madre cancerosas, AGS CD44+, fue verificado mediante citometría de flujo obteniéndose que el 92.28% de la población celular seleccionada expresaba el marcador CD44, mientras que en la población inicial o parental fue el 63,29% (Figura 3).

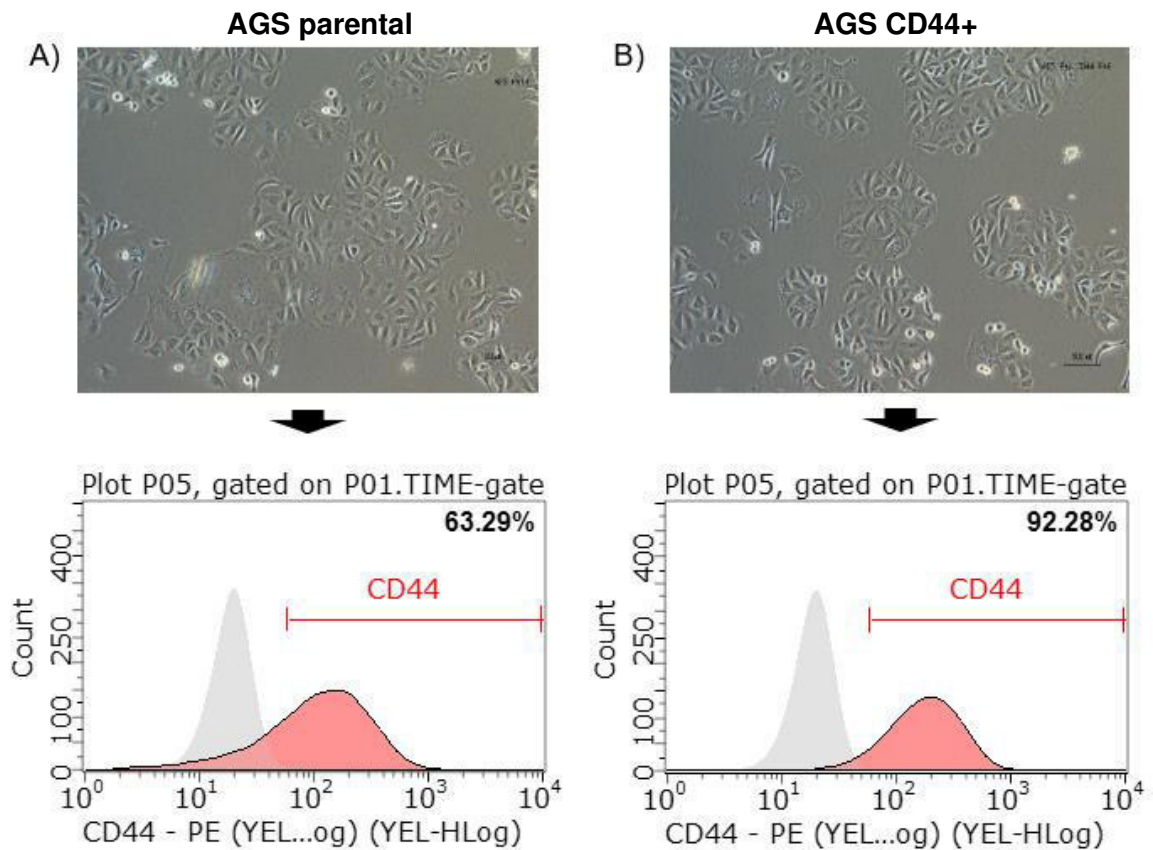


Figura 3 Análisis de la expresión del marcador de superficie CD44 por citometría de flujo. A) El 63.29% de células AGS parentales expresan CD44. B) La población celular seleccionada expresa el marcador CD44 en un 92.28%. Ambas poblaciones celulares, AGS parental y AGS CD44+ (CSC) tienen morfología fusiforme. Las micrografías fueron tomadas con un microscopio invertido con aumento total de 100X.

5.4 Evaluación de citotoxicidad de las fracciones cromatográficas mediante el ensayo de viabilidad celular con MTT

5.4.1 Efecto citotóxico de las fracciones cromatográficas del eDSBCI en la línea AGS parental

De la evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre la línea celular AGS parental, se observó que a las 24 horas hubo una disminución significativa de la viabilidad celular en los grupos tratados con las fracciones F43, F46, F50 y F52 con respecto al control negativo; mientras que a las 48 h se observó que sólo las fracciones F43, F50 y F52 mantuvieron el efecto citotóxico (Figura 4 y tabla 2).

El eDSBCI redujo la viabilidad celular a 31.9 ± 5.2 y 22.5 ± 4.3 % para las 24 h y 48 h respectivamente; las fracciones con mayor efecto al del eDSBCI fueron F50 y F52 con porcentajes de viabilidad de 12.6 ± 1.6 % y 17.4 ± 2.1 % a las 24 h respectivamente y de 14.3 ± 5.2 % y 18.1 ± 6.8 % a las 48 h respectivamente.

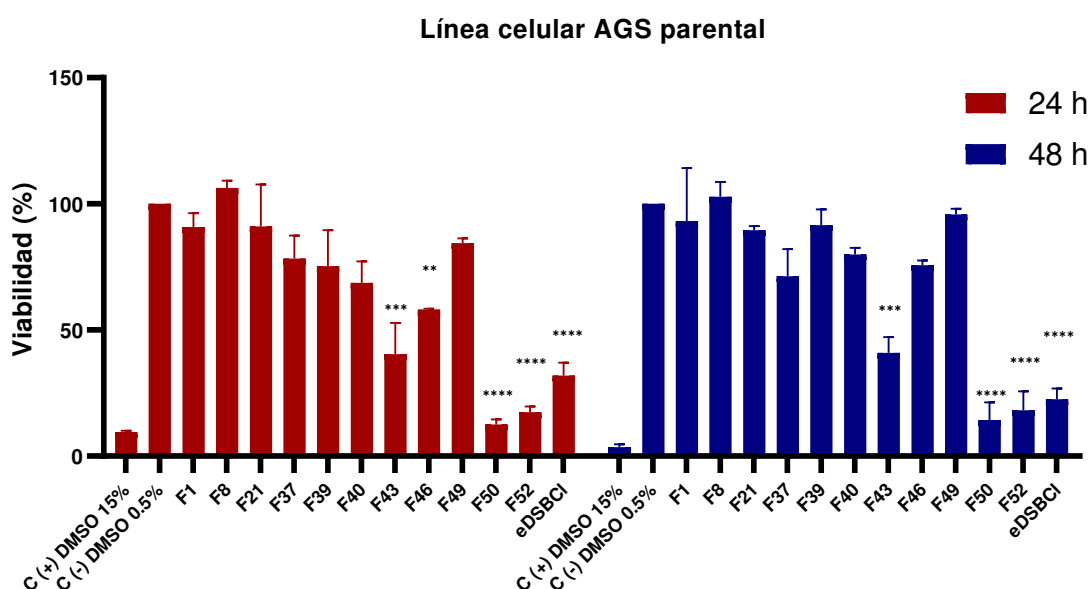


Figura 4. Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre la línea celular **AGS parental** a las 24 h y 48 h de exposición. C (+), control positivo; C (-), control negativo; F, fracción cromatográfica; eDSBCI, extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ comparado con su respectivo C (-).

5.4.2 Efecto citotóxico de las fracciones cromatográficas del eDSBCI en las células madre cancerosas gástricas (AGS CD44+)

De la evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre las células AGS CD44+, células madre cancerosas gástricas, se observó que a las 24 horas hubo una disminución significativa de la viabilidad celular en los grupos tratados con las fracciones F43, F50 y F52 con respecto al control negativo; mientras que a las 48 h se observó que mantuvieron el efecto citotóxico (Figura 5 y tabla 2).

El eDSBCI redujo la viabilidad celular a 53.6 ± 14.6 y 24.8 ± 1.0 % para las 24 h y 48 h respectivamente; las fracciones con efecto superior al del eDSBCI fueron F50 y F52 con porcentajes de viabilidad de 21.3 ± 4 % y 29.8 ± 0.9 % a las 24 h respectivamente y de 11.31 ± 6.1 % y 16.06 ± 6.1 % a las 48 h respectivamente.

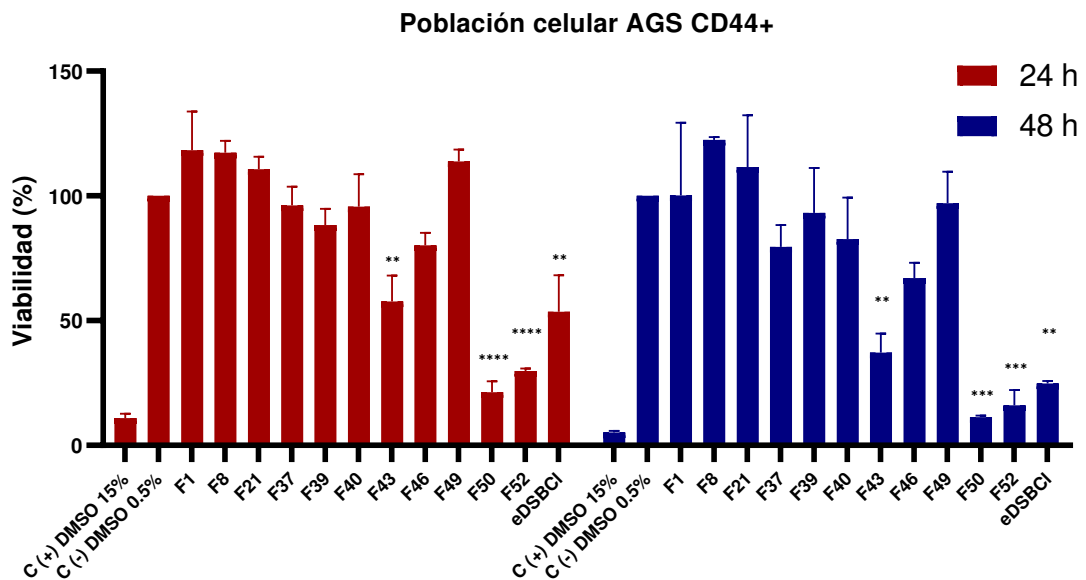


Figura 5. Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre células **AGS CD44+** a las 24 h y 48 h de exposición. C (+), control positivo; C (-), control negativo; F, fracción cromatográfica; eDSBCI, extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ comparado con su respectivo C (-).

5.4.3 Efecto citotóxico de las fracciones cromatográficas del eDSBCI en la línea celular no cancerosa 293T

De la evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre las células 293T, se observó que a las 24 h de exposición hubo una disminución significativa de la viabilidad celular en los grupos tratados con las fracciones F37, F39, F40, F43 y F46 con respecto al control negativo (40.4 ± 4.6 , 36.1 ± 4.6 , 38.4 ± 13.8 , 47.2 ± 23.8 , 40.6 ± 0.7 %, respectivamente); mientras que a las 48 h de exposición se observó que sólo la fracción F46 mantuvo el efecto citotóxico con un porcentaje de viabilidad de 14.9 ± 0.2 % (Figura 6 y tabla 2). Además, estas mismas fracciones tuvieron un efecto superior al del eDSBCI, el cual redujo la viabilidad celular a 50.5 ± 10.4 y 39.5 ± 19.7 % para las 24 h y 48 h de exposición, respectivamente.

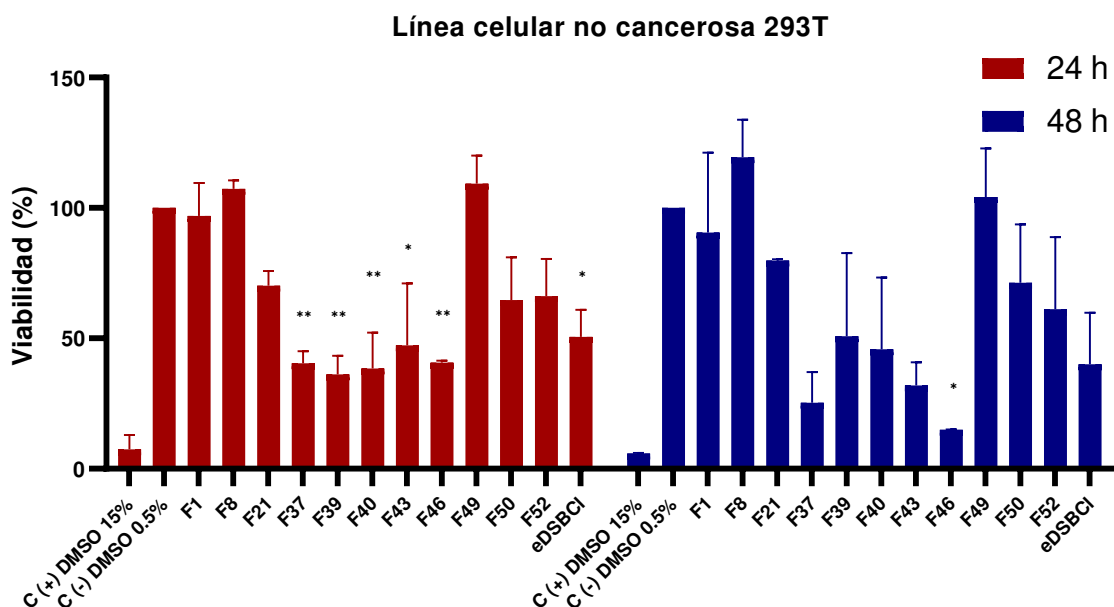


Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a 100 µg/mL sobre la **línea celular no cancerosa 293T** a las 24 h y 48 h de exposición. C (+), control positivo; C (-), control negativo; F, fracción cromatográfica; eDSBCI, extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ comparado con su respectivo C (-).

Tabla 2. Citotoxicidad de las fracciones cromatográficas a concentración de 100 µg/mL expresados en porcentajes de viabilidad.

PORCENTAJE DE VIABILIDAD

Fracciones a 100 µg/mL	AGS parental		AGS CD44+		293T	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
F1	90.8 ± 5.5	93.1 ± 21.0	118.3 ± 15.5	100.1 ± 29.2	96.9 ± 12.6	90.5 ± 30.7
F8	106.3 ± 2.9	102.8 ± 6.0	117.3 ± 4.8	122.4 ± 1.2	107.3 ± 3.3	119.5 ± 14.3
F21	91.1 ± 16.7	89.6 ± 1.6	110.7 ± 5.0	111.6 ± 20.7	70.1 ± 5.7	79.8 ± 0.5
F37	78.4 ± 9.1	71.3 ± 10.8	96.2 ± 7.5	79.6 ± 8.0	40.4 ± 4.6	25.3 ± 11.7
F39	75.3 ± 14.3	91.6 ± 6.2	88.3 ± 6.5	93.2 ± 18.0	36.1 ± 7.1	50.8 ± 31.8
F40	68.7 ± 8.5	79.9 ± 2.7	95.6 ± 13.1	82.7 ± 16.6	38.4 ± 13.8	45.8 ± 27.6
F43	40.5 ± 12.3	40.9 ± 6.3	57.7 ± 10.3	37.2 ± 7.6	47.2 ± 23.8	32.0 ± 8.9
F46	58 ± 0.4	75.6 ± 1.9	80.2 ± 4.9	67.1 ± 6.1	40.6 ± 0.7	14.9 ± 0.2
F49	84.5 ± 1.8	95.9 ± 2.2	113.9 ± 4.7	97.1 ± 12.6	109.3 ± 10.8	97.5 ± 18.7
F50	12.6 ± 2.0	14.3 ± 7.0	21.3 ± 4.4	11.3 ± 0.6	64.6 ± 16.3	68.4 ± 22.3
F52	17.4 ± 2.2	18.1 ± 7.6	29.8 ± 0.9	16.1 ± 6.1	66.1 ± 14.2	59.8 ± 27.7
eDSBCI	31.9 ± 5.2	22.5 ± 4.3	53.6 ± 14.6	24.8 ± 1.0	50.5 ± 10.4	39.5 ± 19.7
C (+) DMSO 15%	10 ± 0.5	3.5 ± 1.2	12.1 ± 1.9	5.3 ± 0.6	6.9 ± 5.5	5.9 ± 0.2
C (-) DMSO 0.5%	100 ± 1.7	100.1 ± 3.8	100 ± 0.7	100 ± 0.9	100 ± 5.3	100 ± 11.7

5.4.4 Comparación de la citotoxicidad de las fracciones F50, F52 y eDSBCI a 100 µg/mL

Las fracciones con mayor efecto citotóxico comparable al del eDSBCI fueron las F50 y F52 (Figura 7). Con ambas fracciones probadas en la línea celular AGS parental hubo mayor efecto citotóxico con diferencia significativa que el eDSBCI a las 24 h, sin embargo, esto no ocurrió a las 48 h (Figura 7A). Cuando se probó en células AGS CD44+ solo la F50 presentó significativa reducción de la viabilidad celular tanto a 24 h como a 48 h en comparación con el eDSBCI (Figura 7B).

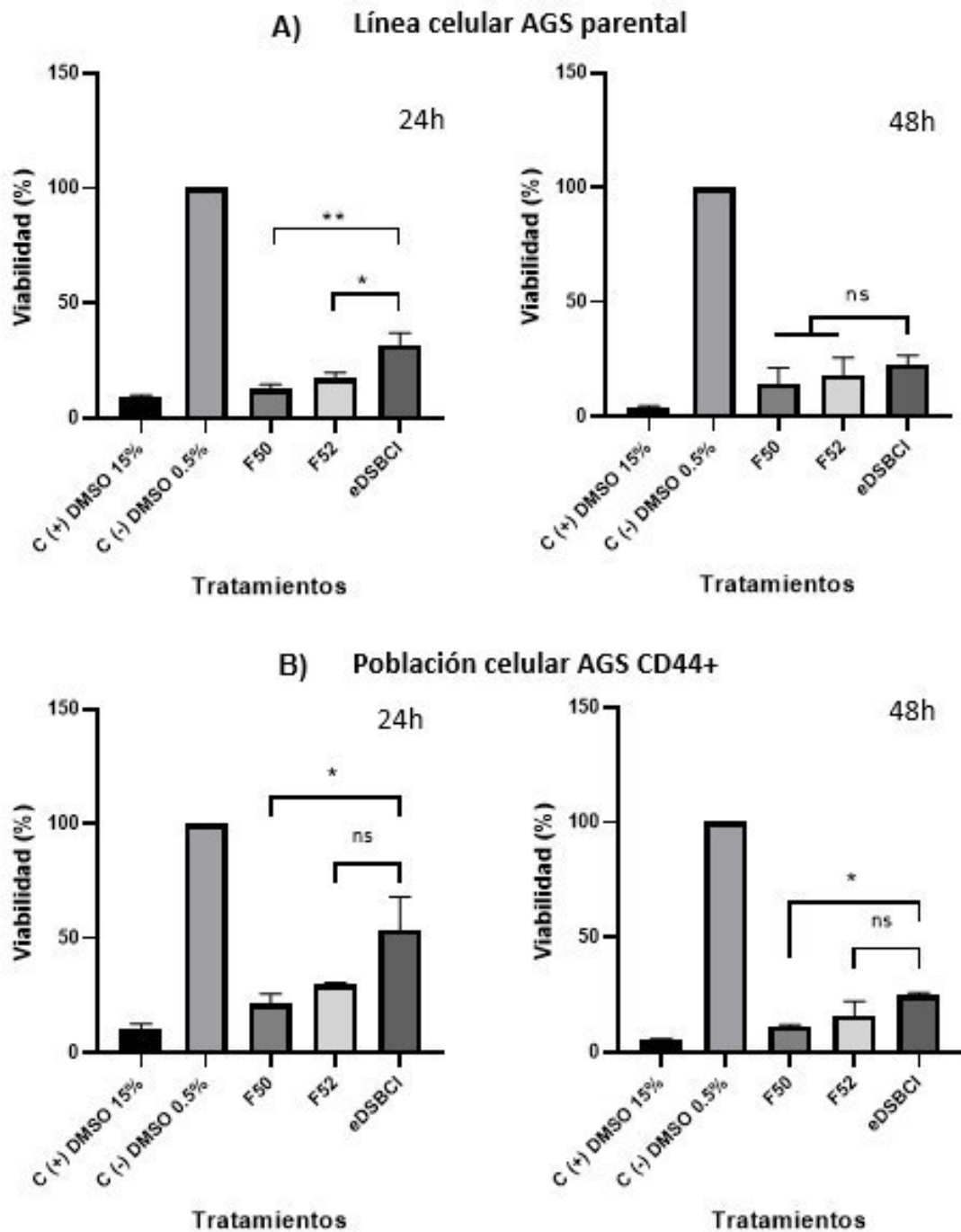


Figura 7. Comparación de la citotoxicidad de las fracciones F50 y F52 a 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre células **AGS parental (A)** y **AGS CD44+ (B)** a las 24 h y 48 h. C (+), control positivo; C (-), control negativo; F, fracción cromatográfica; eDSBCl, extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum*; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ comparado con el eDSBCl; ns, diferencia no significativa.

5.5 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de las fracciones F50 y F52 sobre la línea celular AGS parental

Se tomaron en cuenta las fracciones cromatográficas F50 y F52 para el cálculo del IC50 porque tuvieron mayor efecto citotóxico a 100 µg/mL sobre células AGS parental y AGS CD44+. La IC50 de las fracciones F50 y F52 probadas sobre la línea celular AGS parental fue de 29.37 ± 6.9 y 34.12 ± 8.0 µg/mL a las 24 h, respectivamente (Figura 8).

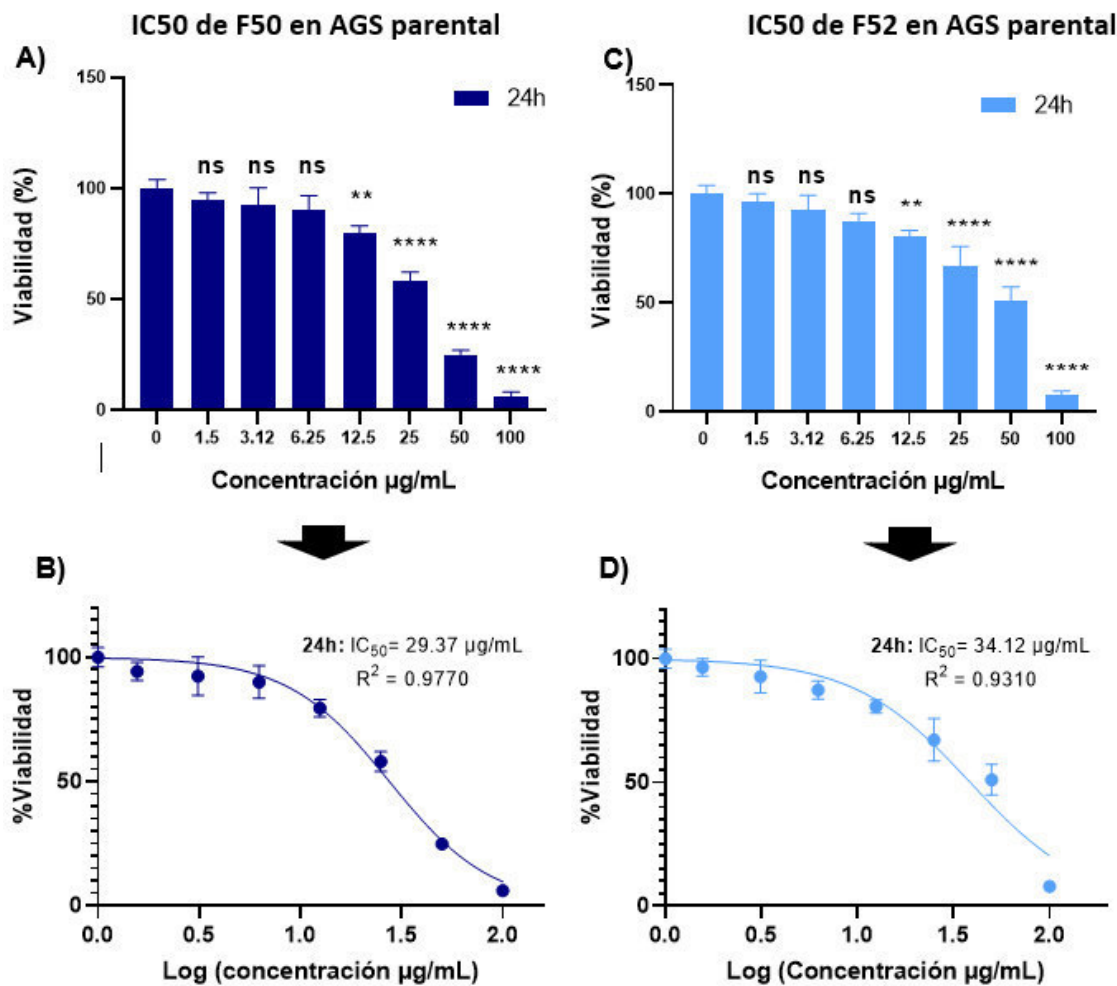


Figura 8. Efecto de las fracciones cromatográficas F50 y F52 del eDSBCI sobre la viabilidad celular de **AGS parental**. Se muestran gráficos de IC50, que son curvas log10 de viabilidad celular (%) dependientes de la concentración de las fracciones (µg/mL). En la parte superior derecha de cada curva, se muestran los valores de IC 50 a las 24h de exposición. **A.** Variación del porcentaje de viabilidad con F50 **B.** IC50 de la fracción F50. **C.** Variación del porcentaje de viabilidad con diferentes concentraciones de F52 **D.** IC50 de la fracción F52. **p<0.01, ****p<0.0001, comparado con la concentración de 0 µg/mL; ns: diferencia no significativa.

5.6 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de las fracciones F50 y F52 sobre células AGS CD44+

Cuando se utilizó las AGS CD44+, la IC50 de las fracciones F50 y F52 a las 24h fue de 25.96 ± 3.0 y 33.54 ± 8.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 9).

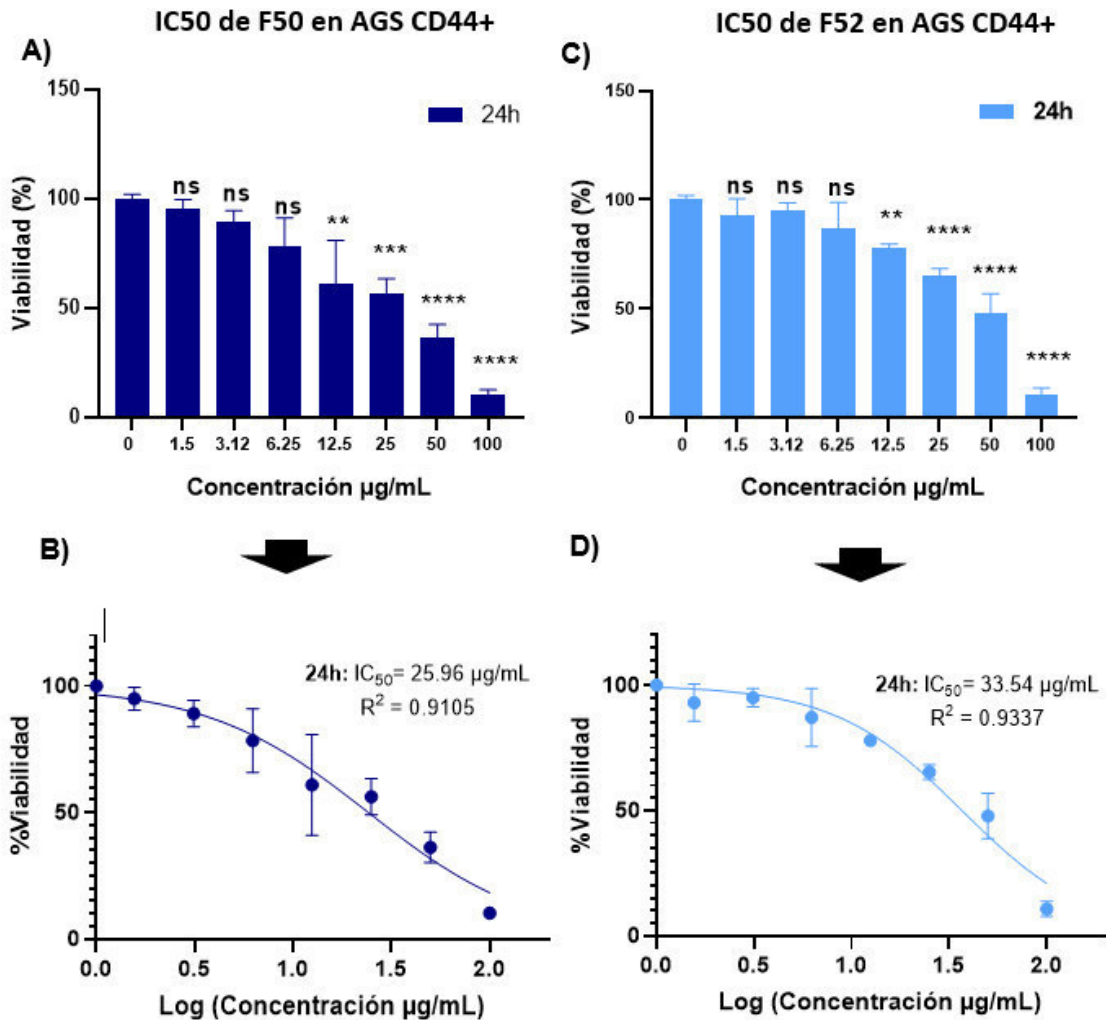


Figura 9. Efecto de las fracciones cromatográficas F50 y F52 del extracto de eDSBCI sobre la viabilidad celular de **AGS CD44+**. Se muestran gráficos de IC50, que son curvas log10 de viabilidad celular (%) dependientes de la concentración de las fracciones ($\mu\text{g/mL}$). En la parte superior derecha de cada curva, se muestran los valores de IC 50 a las 24 h de exposición. **A.** Variación del porcentaje de viabilidad con diferentes concentraciones de F50 **B.** IC50 de la fracción F50. **C.** Variación del porcentaje de viabilidad con diferentes concentraciones de F52 **D.** IC50 de la fracción F52. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, comparado con la concentración de 0 $\mu\text{g/mL}$; ns: diferencia no significativa.

5.7 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de las fracciones F50 y F52 sobre la línea celular no cancerosa 293T

En cuanto a línea celular no cancerosa 293T la IC50 de las fracciones F50 y F52 a las 24 h fue de 74.76 ± 29.9 y 87.94 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$; respectivamente (Figura 10).

Todos los valores de IC50 obtenidos se resumen en la tabla 3.

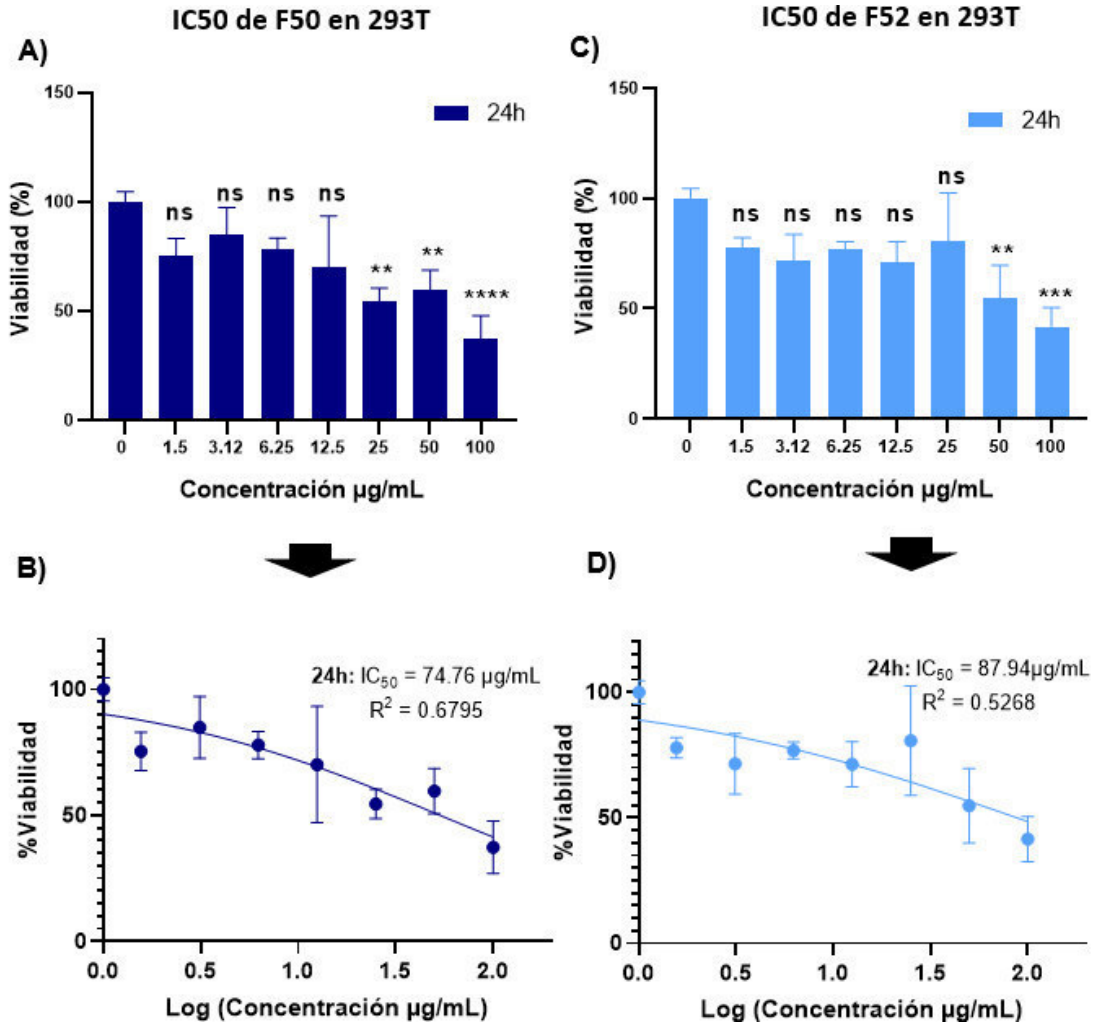


Figura 10. Efecto de las fracciones cromatográficas F50 y F52 del extracto de eDSBCI sobre la viabilidad de células no cancerosas **293T**. Se muestran gráficos de IC50, que son curvas log10 de viabilidad celular (%) dependientes de la concentración de las fracciones ($\mu\text{g/mL}$). En la parte superior derecha de cada curva, se muestran los valores de IC 50 a las 24 h de exposición. **A**. Variación del porcentaje de viabilidad con diferentes concentraciones de la F50 **B**. IC50 de la fracción F50. **C**. Variación del porcentaje de viabilidad con diferentes concentraciones de la F52 **D**. IC50 de la fracción F52. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, comparado con la concentración de 0 $\mu\text{g/mL}$; ns: diferencia no significativa.

Tabla 3. Valores de IC50 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) de las fracciones cromatográficas

Fracción	Tiempo (h)	Línea celular		
		AGS	AGS CD44+	293T
F50	24	29.37 \pm 6.9	25.96 \pm 3.0	74.76 \pm 29.9
F52	24	34.12 \pm 8.0	33.54 \pm 8.8	87.94 \pm 0.5

Los datos se presentan como la media \pm DS de IC50 ($\mu\text{g} / \text{ml}$) de tres experimentos independientes

5.8 Comparación de los valores de IC50 de las fracciones F50 y F52 sobre células AGS parental, AGS CD44+ y las no cancerosas, 293T

El efecto citotóxico de las fracciones F50 y F52 sobre las células cancerosas AGS y AGS CD44+ fue significativamente mayor al ser comparado con la actividad sobre células no cancerosas 293T; sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre el efecto de las fracciones sobre GCSC AGS CD44+ y las AGS parental (Figura 11).

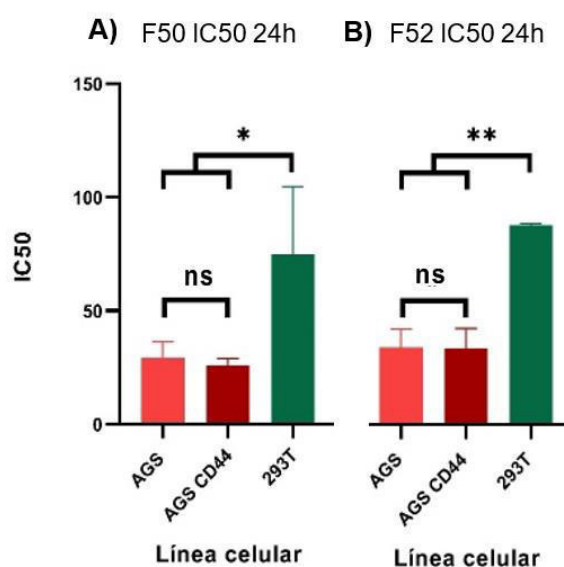


Figura 11. Comparación de valores de IC50 para cada línea celular. **A** comparación de las IC50 de la fracción F50 a las 24 h de exposición. **B** comparación de las IC50 de la fracción F52 a las 24 h de exposición. ns: diferencia no significativa; * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparado con la línea celular no cancerosa 293T.

6. DISCUSIÓN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto citotóxico de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* sobre células madre cancerosas de la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS.

En este estudio se preparó un extracto clorofórmico para la mayor retención de compuestos de polaridad baja y media. Además, cabe resaltar que cuando se utiliza cloroformo para la preparación de extracto de plantas se obtiene principalmente compuesto de polaridad intermedia y baja como los terpenoides y flavonoides (Pandey *et al.*, 2014).

De las 11 fracciones cromatográficas obtenidas del eDSBCI, las fracciones 50 y 52 al ser las últimas que se eluyeron de la columna cromatográfica contienen los compuestos de mayor polaridad de los metabolitos presentes en el eDSBCI; lo que se ve reflejado en la poca migración en la CCF, además del uso de una mezcla de solventes más polares utilizados como fase móvil (Figura 2). Por otro lado, el revelado con cloruro de antimonio III (SbCl_3) muestra que los compuestos presentes podrían ser esteroides, glucósidos esteroides, terpenoides o esteroides (Sherma y Fried, 2003). Estudios realizados sobre la composición química del bulbo de *D. spruceanum* reportan la presencia de metabolitos secundarios como: flavonoides, alcaloides, esteroides, catequinas y saponinas (Bocanegra, 2007), triterpenos y taninos (Rivera-Parada, 2013), adicionalmente quinonas y lactonas (Miranda, 2019).

Del análisis por citometría de flujo se observó que la línea celular AGS parental tuvo un 63.29% de células que expresaron el marcador CD44. Este valor está por encima de lo obtenido por Takaishi *et al.*, (2009) que fue entre 10% a 50%. En otro estudio la

expresión de este marcador de membrana fue de 29,06% (Castro, 2010). Esta diferencia de resultados entre estudios utilizando la misma línea celular en diferentes medios de cultivos podría deberse a la propia heterogeneidad genómica del cáncer producida por procesos mutacionales e inestabilidad cromosómica (Hynds *et al.*, 2018).

El aislamiento de las células AGS CD44+ utilizando MACS dio como resultado una población celular con el 92.28% de células expresando el marcador CD44. Esto contrasta con los resultados de Dragu *et al.*, (2019) que realizó dos rondas sucesivas de selección utilizando MACS, obteniendo 58,5% en la primera y 94,3% en la segunda. Si bien el método de selección de células activadas magnéticamente obtiene un alto grado de pureza, otras técnicas como la de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) podrían elevar el porcentaje de células CD44+. Kerényi *et al.*, (2016) comparó el uso de ambas técnicas para el aislamiento de células madre de pulpa dental y obtuvo que la efectividad de la selección por MACS y FACS son similares, mientras que la combinación fue significativamente mayor (MACS 79,53 ± 5,78%, FACS 88,27 ± 3,70%, MACS-FACS 98,43 ± 0,67%). De Wynter *et al.*, (1995) comparó la pureza y enriquecimiento de células CD34+ de médula ósea, cordón umbilical y sangre periférica utilizando MACS, FACS y otras técnicas; y encuentra que los métodos de purificación más fiables fueron la selección mediante FACS y MACS que produjeron de forma constante purezas mayores al 70%.

Existen pocos estudios sobre la citotoxicidad de *Dracontium spruceanum* en células de cáncer gástrico. Miranda (2019) encontró que el IC50 de la fracción clorofórmica del extracto metanólico del bulbo de *Dracontium spruceanum* probado en AGS parental fue de 82.59 µg/mL a las 24 h y de 25.5 µg/mL a las 48 h; además, un reciente estudio obtuvo un IC50 de 43.23 µg/mL a las 24h y de 34.09 µg/mL a las 48 h evaluado en células madre AGS CD44+ (Tapia, 2022).

En referencia al ensayo de citotoxicidad, de las 11 fracciones cromatográficas, solo dos tuvieron un efecto citotóxico (F50 y F52); además, no se evidenció un efecto significativo sobre células no cancerosas 293T lo que es conveniente por ser la línea celular utilizada como control de citotoxicidad. De manera similar, Momtazi-Borojeni *et al.*, (2013) reportaron que de la obtención de 14 fracciones cromatográficas de *Avicennia marina*, solo una tuvo efecto citotóxico en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y menor actividad en células de riñón embrionario humano HEK. Otro estudio utilizó fracciones del extracto metanólico de *Aegle marmelos* y encontró que tres de las cinco fracciones obtenidas mostraron una inhibición significativa en la línea celular de leucemia THP-1 con IC50 de 12,5, 86,2 y >100 µg/mL (Bhatti *et al.*, 2013).

El IC50 de las fracciones F50 y F52 probadas en AGS parental y AGS CD44+ estuvo por debajo de los 35 µg/mL a las 24 h (Tabla 3). Esto es favorable para estudios posteriores debido a que estas fracciones serían consideradas como moderadamente citotóxicas de acuerdo a los criterios establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos el cual clasifica el efecto de las plantas medicinales como altamente citotóxico cuando el IC50 es menor o igual a 20 µg/mL, moderadamente citotóxico, cuando el IC50 está entre 21 y 200 µg/mL, débilmente citotóxico cuando esta entre 201 y 500 µg/mL, y sin citotoxicidad cuando el IC50 es mayor a 501 µg/mL (Boik, 2001; Nguyen *et al.*, 2020). Por otro lado, los valores de IC50 de F50 y F52 no mostraron diferencia significativa entre los obtenidos para la línea AGS parental y las células madre cancerosas gástricas, AGS CD44+, lo que significaría que la elevada presencia del marcador CD44+ no le proporcionaría a la línea celular AGS una ventaja de supervivencia ante el efecto citotóxico de estas fracciones. Este resultado es consistente con lo obtenido por Castro, (2010) donde evaluó el efecto del cisplatino y 5-FU sobre células AGS CD44+ seleccionadas con *microbeads* magnéticos y resulta no haber diferencia significativa entre el efecto sobre las células seleccionadas y la parental, es decir no habría diferencia en la capacidad de quimiorresistencia. No obstante, otro

estudio con líneas celulares de diferentes tipos de cáncer, muestra que por lo general las CSC son resistentes a las quimioterapias (Nguyen *et al.*, 2017). Delman *et al.* (2019) determinaron que las CSC EpCAM+/CD133+ (IC₅₀ = 2,5 mM) de carcinoma hepatocelular eran más resistentes contra (R) -4'-metilklavuzon a las 48 h de cultivo en comparación con las células parentales HuH-7 (IC₅₀ = 1,25 mM), sin embargo, a las 24 h y 72 h el IC₅₀ tuvo el mismo valor en ambos tipos celulares, 10 mM y 1,25 mM respectivamente. Otro autor utilizó quercetina y encontró que las células parentales de cáncer gástrico MGC803 eran más sensibles que las GCSC, lo que refleja la quimiorresistencia relativamente más fuerte de las GCSC en comparación con las células parentales (Shen *et al.*, 2016). En contraste, Choi *et al.* (2016) probaron la citotoxicidad de nanopartículas de plata sobre CSC de ovario (fenotipo ALDH+/CD133+) derivadas de la línea celular A2780 y encontró que el IC₅₀ en esta población y en la parental fue aproximadamente 1000 ng/mL.

Finalmente, de la identificación de las fracciones cromatográficas de eDSBCI, las F50 y F52 fueron las que tuvieron mayor efecto citotóxico significativo GCSC AGS CD44+ lo que implica la realización de posteriores estudios químicos de evaluación de presencia de compuestos y la identificación de los mismos mediante técnicas especializadas. Según la literatura, se han aislado metabolitos de extractos de *Dracontium spruceanum* obteniéndose una variedad de compuestos como el sitosterol y estigmasterol, entre otros (Collantes *et al.*, 2011). Estos compuestos aislados de otras plantas han sido probados contra líneas celulares AGS y SNU-1 de cáncer gástrico evidenciando efecto citotóxico (Li *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2021). Por su naturaleza química, se sugiere que estos metabolitos podrían estar presentes en las fracciones F50 y F52 utilizadas en el presente estudio.

7. CONCLUSIONES

- Las fracciones cromatográficas F50 y F52 del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* (Zhu,1996) tuvieron el mayor efecto citotóxico a 100 $\mu\text{g/mL}$ tanto en células madre cancerosas gástricas CD44+ aisladas de la línea celular AGS como en línea AGS parental.
- Las IC50 de las fracciones F50 y F52 en las células madre cancerosas gástricas CD44+ aisladas de la línea celular AGS fue de $25.96 \pm 3.0 \mu\text{g/mL}$ y $33.54 \pm 8.8 \mu\text{g/mL}$ a las 24h de exposición, respectivamente. Por lo tanto, la fracción cromatográfica F50 tuvo menor IC50 que la F52, además en estas concentraciones no tienen un efecto citotóxico significativo sobre las células no cancerosas 293T.

8. RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar estudios de expresión génica para evaluar las vías de señalización implicadas en la citotoxicidad producida por las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum*.
- Debido a la heterogeneidad propia del cáncer, se recomienda evaluar el efecto de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico del bulbo de *Dracontium spruceanum* en otras líneas celulares.
- Los resultados del efecto citotóxico del presente estudio denotan inhibición de la proliferación celular de CSC, por ello se recomienda evaluar el porcentaje de CSC mediante citometría de flujo posterior al efecto citotóxico.
- Se sugiere caracterizar las estructuras químicas de las fracciones F50 y F52 para determinar el o los fitoquímicos con el efecto citotóxico sobre las CSC.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbaszadegan, M. R., Bagheri, V., Razavi, M. S., Momtazi, A. A., Sahebkar, A., & Gholamin, M. (2017). Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 232(8), 2008–2018. <https://doi.org/10.1002/JCP.25759>.
- Addeo, M., Di Paola, G., Verma, H. K., Laurino, S., Russi, S., Zoppoli, P., Falco, G., & Mazzone, P. (2021). Gastric Cancer Stem Cells: A Glimpse on Metabolic Reprogramming. *Frontiers in Oncology*, 11, 2308. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.698394/BIBTEX>.
- Barranco, S. C., Townsend, C. M., Gasarteli, C., Macik, B. G., Burger, N. L., Boerwinkle, W. R., & Gourley, W. K. (1983). Establishment and Characterization of an in Vitro Model System for Human Adenocarcinoma of the Stomach¹. *Cancer research*, 43, 1703–1709. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/43/4/1703/2415330/cr0430041703.pdf>.
- Bekaii-Saab, T., & El-Rayes, B. (2017). Identifying and targeting cancer stem cells in the treatment of gastric cancer. *Cancer*, 123(8), 1303. <https://doi.org/10.1002/CNCR.30538>.
- Berg, K. C. G., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Johannessen, B., Bruun, J., Danielsen, S. A., Bjørnslett, M., Meza-Zepeda, L. A., Eknæs, M., Lind, G. E., Myklebost, O., Skotheim, R. I., Sveen, A., & Lothe, R. A. (2017). Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Molecular Cancer*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12943-017-0691-Y/FIGURES/6>.
- Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236–242. <https://doi.org/10.1002/CYTO.10080>.
- Bernas, T., & Dobrucki, J. W. (2000). The role of plasma membrane in bioreduction of

- two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 380(1), 108–116. <https://doi.org/10.1006/ABBI.2000.1907>.
- Bhatti, R., Singh, J., Saxena, A. K., Suri, N., & Ishar, M. P. S. (2013). Pharmacognostic standardisation and antiproliferative activity of *Aegle marmelos* (L.) Correa leaves in various human cancer cell lines. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(6), 628. [/pmc/articles/PMC3928725/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23928725/).
- Bocanegra Linares, M. R. (2007). “Estudio preliminar de la composición fitoquímica en extractos de cormos de la especie Jergón Sacha (*Dracontium lorentense* Krause) y su variación según su Ubicación Geográfica” [Universidad Nacional de San Martín]. [Http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/96](http://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/96).
- Boik, J. (2001). *Natural Compounds in Cancer Therapy*. [Www.ompres.com](http://www.ompres.com).
- Bonnet, D., & Dick, J. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730–737. <https://doi.org/10.1038/NM0797-730>.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J., & Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, 5(2), 89. <https://doi.org/10.1186/BCR577>
- Castro, J. I. M. C. V. De. (2010). Characterization of the involvement of cancer stem cells in gastric cancer resistance to chemotherapy. Universidade de Coimbra.
- Chan, M. M., Chen, R., & Fong, D. (2018). Targeting cancer stem cells with dietary phytochemical - Repositioned drug combinations. *Cancer Letters*, 433, 53. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2018.06.034>.
- Chan, W. L., Lam, K. O., So, T. H., Lee, V. H. Fun, & Kwong, L. Wan D. (2019). Third-line systemic treatment in advanced/metastatic gastric cancer: a comprehensive review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11. <https://doi.org/10.1177/1758835919859990>.
- Chen, X.-L., Chen, X.-Z., Wang, Y.-G., He, D., Lu, Z.-H., Liu, K., Zhang, W.-H., Wang, W., Li, C.-C., Xue, L., Zhao, L.-Y., Yang, K., Liu, J.-P., Zhou, Z.-G., Hu, J.-K., Mo,

- X.-M., Chen, X.-L., Chen, X.-Z., Wang, Y.-G., ... Mo, X.-M. (2016). Clinical significance of putative markers of cancer stem cells in gastric cancer: A retrospective cohort study. *Oncotarget*, 7(38), 62049–62069. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11384>.
- Choi, Y. J., Park, J. H., Han, J. W., Kim, E., Jae-Wook, O., Lee, S. Y., Kim, J. H., & Gurunathan, S. (2016). Differential Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles in Human Ovarian Cancer Cells and Ovarian Cancer Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, Vol. 17, Page 2077, 17(12), 2077. <https://doi.org/10.3390/IJMS17122077>.
- Choudhari, A. S., Mandave, P. C., Deshpande, M., Ranjekar, P., & Prakash, O. (2020). Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Frontiers in Pharmacology*, 0, 1614. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.01614>.
- Cianciosi, D., Varela-Lopez, A., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparini, M., Afrin, S., Reboledo-Rodriguez, P., Zhang, J. J., Quiles, J. L., Nabavi, S. F., Battino, M., & Giampieri, F. (2018). Targeting molecular pathways in cancer stem cells by natural bioactive compounds. *Pharmacological Research*, 135, 150–165. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2018.08.006>.
- Collantes Días, I. E. (2002). Alguns constituintes químicos de *dracontium lorentense krause*. universidade de sao paulo.
- Collantes Díaz, I. E., Gonçalves, E. G., & Yoshida, M. (2011). CONSTITUYENTES QUÍMICOS DEL TÚBERO DE *Dracontium spruceanum* (Schott) G.Zhu ex *Dracontium lorentense* Krause (Araceae). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 77(2), 117–126.
- Dawood, S., Austinm, L., & Cristofanilli, M. (2014). Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 28(12).
- De Wynter, E. A., Coutinho, L. H., Pei, X., Marsh, J. C. W., Hows, J., Luft, T., & Testa, N. G. (1995). Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five

- separation systems. *STEM CELLS*, 13(5), 524–532.
<https://doi.org/10.1002/STEM.5530130510>.
- Delman, M., Avci, S. T., Akçok, İ., Kanbur, T., Erdal, E., & Çağır, A. (2019). Antiproliferative activity of (R)-4'-methylklavuzon on hepatocellular carcinoma cells and epcam+/CD133+ cancer stem cells via SIRT1 and Exportin-1 (CRM1) inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 180, 224–237.
<https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.07.024>.
- Desmarchelier, C., Gurni, A., Ciccia, G., & Giulietti, A. M. (1996). Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Peril). *Journal of Ethnopharmacology*, 52, 45–51.
- Dragu, D. L., Chivu-Economescu, M., Bleotu, C., Necula, L. G., Matei, L., Stoian, M., & Diaconu, C. C. (2019). Establishing a mouse disease model for future studies regarding gastric anti-cancer therapies. *Romanian Biotechnological Letters*, x.
- Fan, P., Fan, S., Wang, H., Mao, J., Shi, Y., Ibrahim, M. M., Ma, W., Yu, X., Hou, Z., Wang, B., & Li, L. (2013). Genistein decreases the breast cancer stem-like cell population through Hedgehog pathway. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(6), 1–10. <https://doi.org/10.1186/SCRT357/FIGURES/5>.
- Ferrari, M., Fornasiero, M. C., & Isetta, A. M. (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 131(2), 165–172. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90187-Z](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90187-Z).
- Ferreira, D., Adegas, F., & Chaves, R. (2013). The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methylation Analysis and Anticancer Drugs Testing. *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*. <https://doi.org/10.5772/53110>.
- Fu, Y., Du, P., Zhao, J., Hu, C., Qin, Y., & Huang, G. (2018). Gastric Cancer Stem Cells: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Yonsei Medical Journal*, 59(10), 1150. <https://doi.org/10.3349/YMJ.2018.59.10.1150>.
- Fu, Z., Han, X., Du, J., Han, X., Liu, W., Shao, S., & Liu, X. (2018). *Euphorbia lunulata*

- extract acts on multidrug resistant gastric cancer cells to inhibit cell proliferation, migration and invasion, arrest cell cycle progression, and induce apoptosis. *Journal of Ethnopharmacology*, 212, 8–17. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2017.08.014>.
- Garcia-Oliveira, P., Otero, P., Pereira, A. G., Chamorro, F., Carpena, M., Echave, J., Fraga-Corral, M., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Status and Challenges of Plant-Anticancer Compounds in Cancer Treatment. *Pharmaceuticals*, 14(2), 1–28. <https://doi.org/10.3390/PH14020157>.
- Gazdar, A. F., Girard, L., Lockwood, W. W., Lam, W. L., & Minna, J. D. (2010). Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(17), 1310–1321. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJQ279>.
- Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J. R. W., Meredith, J., Stacey, G. N., Thraves, P., & Vias, M. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer* 2014 111:6, 111(6), 1021–1046. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>.
- He, Q. Y., Wang, R., & Sun, X. C. (2017). Cytotoxicity of methanolic extract of *Swertia petiolata* against gastric cancer cell line SNU-5 is via induction of apoptosis. *South African Journal of Botany*, 109, 196–202. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2017.01.004>.
- Hsu, A., & Raufi, A. G. (2021). Advances in Systemic Therapy for Gastric Cancer. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 31(3), 607–623. <https://doi.org/10.1016/J.GIEC.2021.03.009>.
- Hu, B., Hajj, N. El, Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 251. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2078-6891.2012.021>.
- Huang, Y., Liu, Y., Zheng, C., & Shen, C. (2017). Investigation of Cross-Contamination

- and Misidentification of 278 Widely Used Tumor Cell Lines. *Plos ONE*, 12(1).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0170384>.
- Hynds, R. E., Vladimirov, E., & Janes, S. M. (2018). The secret lives of cancer cell lines. *Disease Models & Mechanisms*, 11(11). <https://doi.org/10.1242/DMM.037366>.
- Jurado Teixeira, B. (1993). Contribución al estudio farmacognóstico de *Dracontium lorentense krause* (jergón sachá) [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. In *Repositorio de Tesis - UNMSM*.
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/6300>.
- Kerényi, F., Tarapcsák, S., Hrubí, E., Baráthne, S. Á., Hegedüs, V., Balogh, S., Bágyi, K., Varga, G., & Hegedüs, C. (2016). Comparison of sorting of fluorescently and magnetically labelled dental pulp stem cells. *Fogorvosi Szemle*, 109(1), 29–33.
<https://doi.org/10.33891/fsz.109.1.29-33>.
- Khan, A. W., Farooq, M., Haseeb, M., & Choi, S. (2022). Role of Plant-Derived Active Constituents in Cancer Treatment and Their Mechanisms of Action. *Cells* 2022, Vol. 11, Page 1326, 11(8), 1326. <https://doi.org/10.3390/CELLS11081326>.
- Kumar, S., Paul, S., Walia, Y. K., Kumar, A., & Singhal, P. (2015). Therapeutic Potential of Medicinal Plants: A Review. *J. Biol. Chem. Chron*, 2015(1), 46–54.
<https://www.researchgate.net/publication/282333144>.
- Lauren, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 64, 31–49.
<https://doi.org/10.1111/APM.1965.64.1.31>.
- Lee, T. K., Lee, D., Lee, S. R., Ko, Y. J., Sung Kang, K., Chung, S. J., & Kim, K. H. (2019). Sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria* rhizomes and their cytotoxicity against human gastric cancer AGS cells. *Bioorganic Chemistry*, 87, 117–122.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2019.03.015>.
- Li, K., Yuan, D., Yan, R., Meng, L., Zhang, Y., & Zhu, K. (2018). Stigmasterol exhibits potent antitumor effects in human gastric cancer cells mediated via inhibition of cell

- migration, cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of JAK/STAT signalling pathway. *JBUON*, 23(5), 1420–1425.
- Masters, J. R. W. (2000). Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(3), 233–236. <https://doi.org/10.1038/35043102>.
- Mccauley, J., Zivanovic, A., & Skropeta, D. (2013). Bioassays for anticancer activities. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1055, 191–205. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4_14.
- Miranda García, V. (2019). Evaluación de la actividad antiproliferativa, antioxidante y antiinflamatoria in vitro del extracto metanólico de hojas de *Piper aduncum*, *Buddleja incana* y *Dracontium spruceanum* (Vol. 447, Issue May).
- Miyoshi, N., Haraguchi, N., Mizushima, T., Ishii, H., Yamamoto, H., & Mori, M. (2021). Targeting cancer stem cells in refractory cancer. *Regenerative Therapy*, 17, 13. <https://doi.org/10.1016/J.RETH.2021.01.002>.
- Momtazi-Borojeni, A. A., Behbahani, M., & Sadeghi-Aliabadi, H. (2013). Antiproliferative Activity and Apoptosis Induction of Crude Extract and Fractions of *Avicennia Marina*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(11), 1203. [/pmc/articles/PMC3909633/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24811113/).
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Newman, D., & Cragg, G. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.5B01055>.
- Nguyen, N. H., Hoai Ta, Q. T., Pham, Q. T., Han Luong, T. N., Phung, V. T., Duong, T. H., & Vo, V. G. (2020). Anticancer Activity of Novel Plant Extracts and Compounds from *Adenosma bracteosum* (Bonati) in Human Lung and Liver Cancer Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25122912>.

- Nguyen, P. H., Giraud, J., Chambonnier, L., Dubus, P., Wittkop, L., Belleannée, G., Collet, D., Soubeyran, I., Evrard, S., Rousseau, B., Senant-Dugot, N., Mégraud, F., Mazurier, F., & Varon, C. (2017). Characterization of Biomarkers of Tumorigenic and Chemoresistant Cancer Stem Cells in Human Gastric Carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(6), 1586–1597. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2157>.
- Niepel, M., Hafner, M., Mills, C. E., Subramanian, K., Williams, E. H., Chung, M., Gaudio, B., Barrette, A. M., Stern, A. D., Hu, B., Korkola, J. E., Shamu, C. E., Jayaraman, G., Azeloglu, E. U., Iyengar, R., Sobie, E. A., Mills, G. B., Liby, T., Jaffe, J. D., ... Sorger, P. K. (2019). A Multi-center Study on the Reproducibility of Drug-Response Assays in Mammalian Cell Lines. *Cell Systems*, 9(1), 35-48.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELS.2019.06.005>.
- Ogbonna, J., Kenechukwu, F., Attama, A. A., Salome Amarachi, C., Dike Nwabueze Ogbonna, J., Chimaobi Kenechukwu, F., Amaechi Attama, A., & Amarachi Chime, S. (2012). Different approaches to formulation of herbal extracts /phytopharmaceuticals /bioactive phytoconstituents-a review Production, characterization and application of multiple modified maize starches in the formulation of oral solid dosage of gentamicin sulph. Article in *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 16(1), 1–8. www.globalresearchonline.net.
- Oh, J., Hlatky, L., Jeong, Y. S., & Kim, D. (2016). Therapeutic Effectiveness of Anticancer Phytochemicals on Cancer Stem Cells. *Toxins*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/TOXINS8070199>.
- Organización Panamericana de la Salud. (2018). Situación de las plantas medicinales en Perú. Informe de reunión del grupo de expertos en plantas medicinales.
- Pandey, A., and, S. T.-J. Of P., & 2014, undefined. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Researchgate.Net*, 2(5), 115–119. <https://www.researchgate.net/profile/Alok->

Nahata/post/Is_there_any_criteria_for_the_selection_of_solvent_system_in_TLC_and_column_chromatography/attachment/59d6457cc49f478072eadd3/AS%3A273825252478988%401442296435645/download/Standardization.pdf.

Peng, L., & Jiang, D. (2018). Resveratrol eliminates cancer stem cells of osteosarcoma by STAT3 pathway inhibition. *PLOS ONE*, 13(10), e0205918. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0205918>.

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>.

Qin, R., Shen, H., Cao, Y., Fang, Y., Li, H., Chen, Q., & Xu, W. (2013). Tetrandrine Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Gastric Cancer BGC-823 Cells. *PLOS ONE*, 8(10), e76486. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076486>.

Razmi, M., Ghods, R., Vafaei, S., Sahlolbei, M., Zanjani, L. S., & Madjd, Z. (2021). Clinical and prognostic significances of cancer stem cell markers in gastric cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell International*, 21(1), 139. <https://doi.org/10.1186/S12935-021-01840-Z>.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). *Assay Guidance Manual*.

Rivera-Parada, L. L. (2013). Caracterización fitoquímica, farmacéutica y alimenticia de Papa culebrera india (*Dracontium spruceanum* (Schott) G.H.Zhu, Araceae) y Sande (*Brosimum utile* (Kunth) Oken, Moraceae) del Jardín Botánico de Plantas Medicinales del CEA de CORPOAMAZONIA, Mocoa, P.

Rossi, F., Noren, H., Jove, R., Beljanski, V., & Grinnemo, K. H. (2020). Differences and similarities between cancer and somatic stem cells: therapeutic implications. *Stem Cell Research & Therapy* 2020 11:1, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13287-020-02018-6>.

Schütte, K., Schulz, C., & Middelberg-Bisping, K. (2021). Impact of gastric cancer treatment on quality of life of patients. *Best Practice & Research. Clinical*

- Gastroenterology, 50–51. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2021.101727>.
- Shen, L., Xu, J. Ming, Feng, F. Yi, Jiao, S. Chang, Wang, L. Wei, Li, J., Guan, Z. Z., Qin, S. Kui, Wang, J. Jun, Yu, S. Ying, Wang, Y. Jie, Jin, Y. Ning, Tao, M., Zheng, L. Zhen, & Pan, L. Xi. (2013). [Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for first-line treatment of HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer: a Phase III, multi-center, randomized controlled trial, Chinese subreport]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese Journal of Oncology]*, 35(4), 295–300. <https://doi.org/10.3760/CMA.J.ISSN.0253-3766.2013.04.012>.
- Shen, X., Si, Y., Wang, Z., Wang, J., Guo, Y., & Zhang, X. (2016). Quercetin inhibits the growth of human gastric cancer stem cells by inducing mitochondrial-dependent apoptosis through the inhibition of PI3K/Akt signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(2), 619–626. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2016.2625/HTML>.
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. 1016.
- Shin, E. J., Choi, H. K., Sung, M. J., Park, J. H., Chung, M. Y., Chung, S., & Hwang, J. T. (2018). Anti-tumour effects of beta-sitosterol are mediated by AMPK/PTEN/HSP90 axis in AGS human gastric adenocarcinoma cells and xenograft mouse models. *Biochemical Pharmacology*, 152, 60–70. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2018.03.010>.
- Shrestha, S., Song, Y. W., Kim, H., Lee, D. S., & Cho, S. K. (2016). Sageone, a diterpene from *Rosmarinus officinalis*, synergizes with cisplatin cytotoxicity in SNU-1 human gastric cancer cells. *Phytomedicine*, 23(13), 1671–1679. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2016.09.008>.
- Singh, S., Sharma, B., Kanwar, S. S., & Kumar, A. (2016). Lead phytochemicals for anticancer drug development. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue November 2016, p. 1667). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01667>.
- Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G. J. A., Maciejewski, R., & Polkowski,

- W. P. (2018). Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Management and Research*, 10, 239. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619>.
- Song, Z., Yue, W., Wei, B., Wang, N., Li, T., Guan, L., Shi, S., Zeng, Q., Pei, X., & Chen, L. (2011). Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Plos One*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017687>.
- Stewart, P., Boonsiri, P., Puthong, S., & Rojpiulsthit, P. (2013). Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-60/FIGURES/4>.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(5), 1199–1209. <https://doi.org/10.1007/S11101-019-09629-9>.
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S., Shimada, Y., & Wang, T. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(5), 1006–1020. <https://doi.org/10.1002/STEM.30>.
- TAPIA, S. (2022). Evaluación del efecto de la fracción clorofórmica de *Dracontium spruceanum* sobre marcadores asociados a la tumorigénesis, quimioresistencia y metástasis de células madre del cáncer gástrico de las líneas celulares AGS y KATO III [Universidad nacional mayor de san marcos]. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/18134/Tapia_rs_Resumen.pdf?Sequence=4&isallowed=y.

- Tello-Ceron, G., Flores Pimentel, M., & Gómez Galarza, V. (2019). Uso de las plantas medicinales del distrito de Quero, Jauja, Región Junín, Perú. *Ecología Aplicada*, 18(1), 11–20. <https://doi.org/10.21704/REA.V18I1.1301>.
- Thorne, R. F., Wang, Y., Zhang, Y., Jing, X., Zhang, X. D., de Bock, C. E., & Oliveira, C. S. (2020). Evaluating nuclear translocation of surface receptors: recommendations arising from analysis of CD44. *Histochemistry and Cell Biology*, 153(2), 77–87. <https://doi.org/10.1007/S00418-019-01835-Y>.
- Tolentino, C. A., & Ojeda, D. V. (2015). Sobrevida de pacientes con cáncer gástrico en el Perú, 2009-2010. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 37(3), 133–139.
- Tomlinson, G. E., Chen, T. T.-L., Stastny, V. A., Virmani, A. K., Spillman, M. A., Tonk, V., Blum, J. L., Schneider, N. R., Wistuba, I. I., Shay, J. W., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (1998). Characterization of a Breast Cancer Cell Line Derived from a Germ-Line BRCA1 Mutation Carrier. *Cancer Research*, 58(15).
- Van Staveren, W. C. G., Solís, D. Y. W., Hébrant, A., Detours, V., Dumont, J. E., & Maenhaut, C. (2009). Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1795(2), 92–103. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2008.12.004>.
- Vargo-Gogola, T., & Rosen, J. M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews*, 7(9), 659–672.
- Venugopal, K., Ahmad, H., Manikandan, E., Thanigai Arul, K., Kavitha, K., Moodley, M. K., Rajagopal, K., Balabhaskar, R., & Bhaskar, M. (2017). The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-nps) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 173, 99–107. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2017.05.031>.
- Wagner, A. D., Syn, N. L. X., Moehler, M., Grothe, W., Yong, W. P., Tai, B. C., Ho, J., & Unverzagt, S. (2017). Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane*

https://doi.org/10.1002/14651858.CD004064.PUB4/MEDIA/CDSR/CD004064/IMAGE_N/CD004064-CMP-010-06.PNG.

- Wakamatsu, Y., Sakamoto, N., Oo, H. Z., Naito, Y., Uraoka, N., Anami, K., Sentani, K., Oue, N., & Yasui, W. (2012). Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathology International*, 62(2), 112–119. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1827.2011.02760.X>.
- Wang, H., Tao, L., Ni, T., Gu, H., Jin, F., Dai, X., Feng, J., Ding, Y., Xiao, W., Guo, S., Hisamitsu, T., Qian, Y., & Liu, Y. (2017). Anticancer efficacy of the ethyl acetate extract from the traditional Chinese medicine herb *Celastrus orbiculatus* against human gastric cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 205, 147–157. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2017.04.030>.
- Yoon, C., Park, D. J., Schmidt, B., Thomas, N. J., Lee, H. J., Kim, T. S., Janjigian, Y. Y., Cohen, D. J., & Yoon, S. S. (2014). CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which Hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(15), 3974–3988. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0011>.
- Zhang, C., Li, C., He, F., Cai, Y., & Yang, H. (2011). Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2011 137:11, 137(11), 1679–1686. <https://doi.org/10.1007/S00432-011-1038-5>.
- Zhang, L., Guo, X., Zhang, D., Fan, Y., Qin, L., Dong, S., & Zhang, L. (2017). Upregulated mir-132 in Lgr5 + gastric cancer stem cell-like cells contributes to cisplatin-resistance via SIRT1/CREB/ABCG2 signaling pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 56(9), 2022–2034. <https://doi.org/10.1002/MC.22656>.
- Zhang, T., Chen, W., Jiang, X., Liu, L., Wei, K., Du, H., Wang, H., & Li, J. (2019). Anticancer effects and underlying mechanism of Colchicine on human gastric cancer

- cell lines in vitro and in vivo. *Bioscience Reports*, 20181802. <https://doi.org/10.1042/BSR20181802>.
- Zhao, H., Zhang, X., Wang, M., Lin, Y., & Zhou, S. (2021). Stigmasterol Simultaneously Induces Apoptosis and Protective Autophagy by Inhibiting Akt/mTOR Pathway in Gastric Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 11, 43. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.629008/BIBTEX>.
- Zhou, W., Cao, A., Wang, L., & Wu, D. (2015). Kurarinone Synergizes TRAIL-Induced Apoptosis in Gastric Cancer Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(1), 241–249. <https://doi.org/10.1007/S12013-014-0444-0>.
- Zhu, G., & Croat, T. B. (2004). Revision of *dracontium* (araceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 593–667.
- Zhu, J., Jiang, Y., Yang, X., Wang, S., Xie, C., Li, X., Li, Y., Chen, Y., Wang, X., Meng, Y., Zhu, M., Wu, R., Huang, C., Ma, X., Geng, S., Wu, J., & Zhong, C. (2017). Wnt/ β -catenin pathway mediates (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibition of lung cancer stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.11.038>.

ANEXO 1

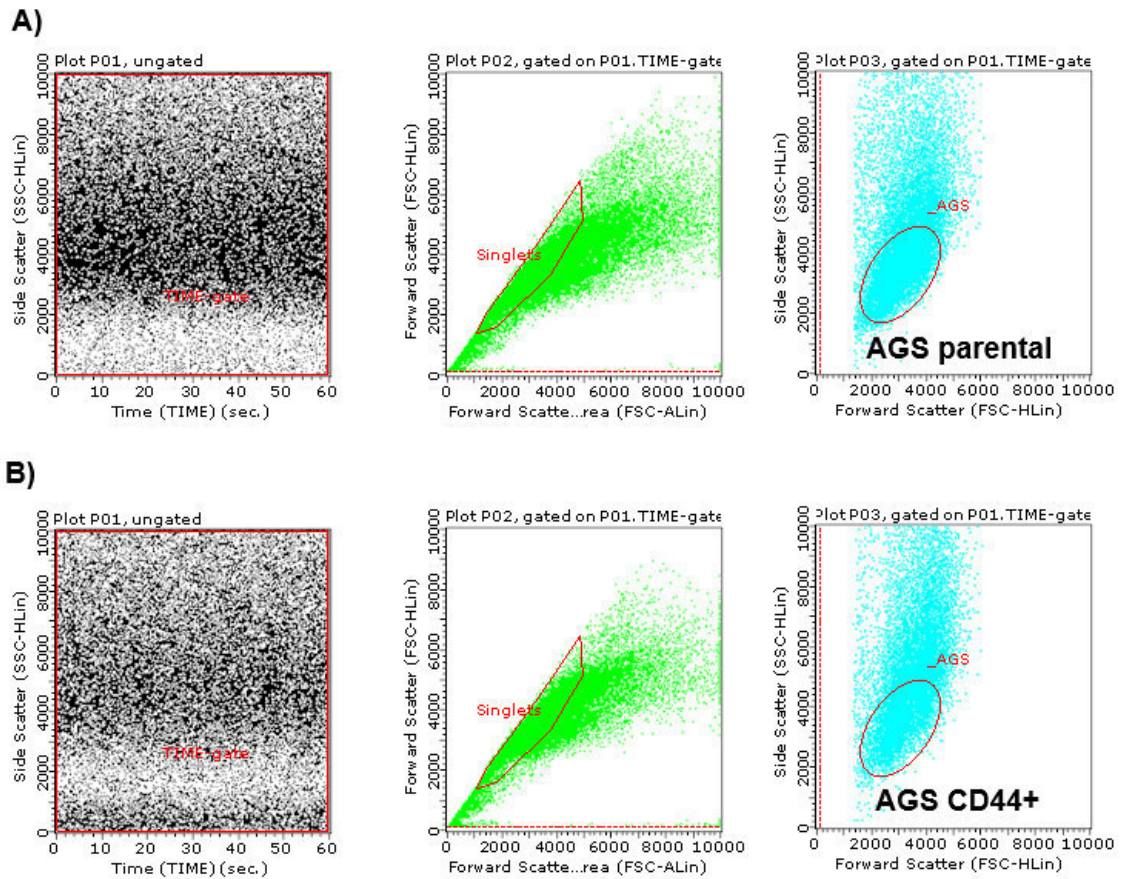


Figura 12. Estrategia de *Gating* para el análisis de citometría de flujo de la línea celular AGS parental y las AGS CD44+ **A)** y las CSC **B)**. Ambas poblaciones celulares se sometieron al mismo *gating* para la posterior evaluación con el anticuerpo anti CD44

ANEXO 2



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N° 190-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rizoma y hojas), recibida de UNIVERSIDAD CIENTIFICA DEL SUR S.A.C., ha sido estudiada y clasificada como: ***Dracontium aff. spruceanum (Schott) G.H. Zhu***, tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: LILIOPSIDA

SUB CLASE: ARECIDAE

ORDEN: ARALES

FAMILIA: ARACEAE

GENERO: *Dracontium*

ESPECIE: *Dracontium aff. spruceanum (Schott) G.H. Zhu*

Nombre vulgar: "Jergon sachá"

Determinada por: Blgo. José Campos de la Cruz

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 30 de mayo de 2018



Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb