

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Alternanthera mexicana* EN LAS LÍNEAS CELULARES 3T3 Y HUTU 80

Coico León, Amparo Ysabel^{1,2}; Juárez Pimentel, Allison Eliana Yanire^{1,2}; Laurente Sánchez, Daniela Isabel^{1,2}; Mantari Ochante, Fabiola Esther¹; Alvarado Novoa, Alfredo Celso^{1,2}; Gonzales Palomino, Michael¹

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo

Recibido: 29-04-16

Aprobado: 27-06-16

Autor corresponsal

Amparo Ysabel Coico León
amparo.coico@gmail.com
 +51 940137579

Financiamiento

Departamento de Biología y
 Filosofía – Universidad Peruana
 Cayetano Heredia

Conflictos de interés

Ninguno de los autores presenta
 conflictos de interés con el
 presente trabajo.

Citar como

Coico León AY, Juárez Pimentel
 AEY, Laurente Sánchez DI, Mantari
 Ochante FE, Alvarado Novoa AC,
 Gonzales Palomino M. Actividad
 citotóxica del extracto etanólico
 de *Alternanthera mexicana* en
 las líneas celulares 3T3 y HUTU
 80. Revista Peruana de Medicina
 Integrativa.2016;1(2):5-11.

RESUMEN

Objetivos. Evaluar la actividad citotóxica del extracto etanólico de *Alternanthera mexicana* sobre las líneas celulares 3T3 y HUTU80. **Materiales y métodos.** Estudio experimental. Se empleó líneas celulares embrionarias de fibroblastos de ratón 3T3 y células de adenocarcinoma gástrico humano HUTU80. Para evaluar la citotoxicidad del extracto etanólico de *Alternanthera mexicana* se utilizó el método colorímetro SRB, y para establecer la concentración inhibitoria 50 (CI50) se realizó un análisis de regresión lineal. Se comparó el efecto del extracto etanólico de *Alternanthera mexicana* frente al 5-fluorouracilo (5FU). **Resultados.** La línea 3T3 que recibió *Alternanthera mexicana* creció ligeramente con un CI50 mayor de 500 mg/mL mientras que la que recibió 5-FU mostró una CI50 menor a 0,1 ug/mL. En la línea HUTU80, el CI50 del 5-FU y *Alternanthera mexicana* fue de 0,32 ug/mL y 87,1 ug/mL, respectivamente. *Alternanthera mexicana* mostró un índice de selectividad >5,74 evidenciando mayor citotoxicidad en la línea celular tumoral (HUTU80), mientras que el 5-FU con un índice de selectividad menor que 0,31 nos indica que es más tóxico para las líneas normales. **Conclusiones.** Los resultados sugieren que el extracto etanólico de *Alternanthera mexicana* podría ser citotóxico en la línea celular HUTU80 más no en la 3T3.

Palabras clave: Células 3T3; Extractos Vegetales/toxicidad; Supervivencia Celular/efectos de drogas; Modelos Animales (Fuente: DeCS)

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ALTERNANTHERA MEXICANA'S ETHANOLIC EXTRACT ON 3T3 AND HUTU 80 CELL LINES

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the cytotoxic activity of *Alternanthera mexicana*'s ethanolic extract on 3T3 and HUTU80 cell lines. **Materials and methods:** Experimental study. Embryonic mouse fibroblastic cells line 3T3 and human gastric adenocarcinoma cell line HUTU80 were used. The cytotoxicity of *Alternanthera mexicana*'s ethanolic extract was evaluated with a colorimeter SRB method. Linear regression analysis was performed to establish the inhibitory concentration 50 (IC50). The effect of the ethanolic extract was compared to the 5-fluorouracil (5FU) effect on cell lines. **Results:** The 3T3 line that received *Alternanthera mexicana*'s ethanolic extract grew slightly. The 3T3 line that received 5-FU has shown an IC50 less than 0.1 ug / mL. In the HUTU80 line, the IC50 of 5-FU and *Alternanthera mexicana*'s ethanolic extract was 0.32 ug / mL and 87.1 ug / mL respectively. The ethanolic extract has shown a selectivity index of > 5.74. This means a greater cytotoxicity in tumor cell line (HUTU80). The 5-FU with a selectivity index of less than 0.31 indicates that it's more toxic in normal lines. **Conclusions:** The results suggest that the *Alternanthera mexicana*'s ethanolic extract could be cytotoxic on HUTU80 cell line but not on 3T3 cell lines.

Keywords: 3T3 Cells; Plant Extracts/toxicity; Cell Survival/drug effects; Models, Animal. (Source: MeSH)

¹ Estudiante de la Escuela de Medicina Humana-UNMSM

² Miembro de Sociedad Científica San Fernando – SCSF

INTRODUCCIÓN

Una de las plantas de uso en la medicina tradicional es la *Alternanthera mexicana* conocida comúnmente como *picuro sachá*, *borrachera*, *chicha*, *pijisuk*, *picurullu quina*, *escancel* o *descanse*, motivo de estudio del presente trabajo, la cual ha sido posicionada taxonómicamente por el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural. Se cuenta con información sobre sus usos tradicionales; sin embargo, la bibliografía es escasa en cuanto a estudios realizados con esta planta.

En el Perú se encuentra distribuida en regiones de la Amazonia y de la sierra entre 500 y 3000 m de altitud, en bosques, orillas de ríos y áreas intervenidas ⁽¹⁾; además, crece en bosques húmedos en las localizaciones del Caribe, en los matorrales secos y húmedos de la vertiente del Pacífico y, en general, se la puede hallar en América desde México a Bolivia ⁽²⁾. Así también, *Alternanthera Mexicana* posee sinonimia científica, siendo el de mayor difusión *Alternanthera lanceolata* ⁽³⁾.

En el año 2013, Monigatti encontró que la *Alternanthera mexicana* es usada en La Libertad (*Uchumarcapusac*) en enfermedades del corazón, dolor de cabeza, ira y nerviosismo ⁽⁴⁾. Así mismo, el Instituto de Investigaciones de la Amazonía manifestó su uso en Amazonas, Cajamarca, Loreto, Ayacucho, Cusco, San Martín, Junín, como remedio natural para el asma, malestar estomacal, purgante y para sarna ⁽⁵⁾.

Según Carlos Agudelo, en Colombia se le atribuyen efectos terapéuticos, especialmente en enfermedades cancerígenas, respiratorias y cardíacas; en Putumayo la usan como purgante; en Santander como diurético y febrífugo, y en Amazonas y Quindío para tratar la anemia, la presión arterial, el ácido úrico y la hepatitis ⁽⁶⁾. Así mismo, López & Giraldo le atribuyen efectos anestésicos, antiespasmódicos e hipotensores y, debido a la presencia de compuestos glucósidos cianogénicos, ayuda en el tratamiento de quemaduras y heridas en la piel, debido a la presencia de taninos, que forman una capa protectora antiséptica donde tiene lugar la regeneración de los tejidos ⁽⁶⁾.

Hoy en día, se ha reportado toxicidad de la *Alternanthera repens*, la cual es familia de la *Alternanthera mexicana*, debido al contenido de ácido hidrocianico que proviene de la conversión de los glucósidos cianogénicos mediante cianogénesis; las plantas con altos contenidos de glucósidos cianogénicos pueden ser tóxicas para el cuerpo humano, debido a que se forma cianuro y se une a la hemoglobina bloqueando la capacidad de transportar oxígeno, justamente los glucósidos cianogénicos son compuestos de presencia moderada de nuestra planta en estudio ⁽⁷⁾. El contenido de glucósidos cianogénicos de los alimentos suele indicarse como

mg/kg de CNH en el alimento. Esto refleja el contenido "total de ácido hidrocianico" del alimento, que suele determinarse midiendo el CNH emitido después de la hidrólisis enzimática o ácida del glucósido cianogénico y cianohidrinadas relacionadas. Algunos textos se refieren a "total de ácido hidrocianico" como el "potencial cianogénico" de un alimento o como "ligado", o también como ácido hidrocianico "libre y combinado" ⁽⁸⁾.

La *Alternanthera mexicana* registra usos artesanales en muchas localidades, por lo descrito anteriormente, y debido a la presencia de los glucósidos hidrocianicos se plantea la hipótesis de toxicidad de la *Alternanthera mexicana*.

El objetivo de este estudio es comparar el efecto citotóxico de la *Alternanthera mexicana* sobre las líneas celulares 3T3 y HUTU80.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de tipo experimental. Se realizó en el mes de mayo de 2015 en los ambientes del Departamento de Microbiología, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Telleri, Universidad Peruana Cayetano Heredia. La población y muestra comprendió las líneas celulares embrionarias de fibroblastos de ratón 3T3 y las células de adenocarcinoma gástrico humano HUTU 80. Los criterios de inclusión fueron los cultivos celulares de la línea 3T3 (fibroblastos normales de ratón) y HUTU80 (células de cáncer duodenal humano); los criterios de exclusión fueron las líneas celulares que no se encontraron en adecuado ambiente de mantenimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Número y concentración de células por pozo

Línea celular	N.º de células/ pozo	N.º de células/19 mL
3T3	4000	475 000
HUTU80	4000	475 000

La variable independiente fue la concentración del extracto etanólico de *Alternanthera mexicana*, que fue la sustancia obtenida de la planta luego de un proceso de extracción etanólico. La variable dependiente fue la citotoxicidad, definida como el porcentaje de células muertas evaluado con una lectora de microplacas. Se optó usar el ensayo SRB siguiendo el protocolo de Vichai y Kirtikara (2006) que cuenta con instrumentos de mediciones y técnicas validadas y estandarizadas ⁽⁹⁾.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

La recolección de la planta *Alternanthera mexicana* fue realizada en el departamento de San Martín por el grupo de investigación, luego se realizó la validación de la

planta en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La preparación del extracto se realizó en la Sección de Farmacología de la Facultad de Medicina (UNMSM). Se seleccionó y se lavó 500 g de las hojas de la *Alternanthera mexicana*; luego, estas fueron licuadas con 2 L de alcohol etílico de 96°. La mezcla obtenida se dejó reposar por 5 días y, pasado este tiempo, se procedió a filtrarlo. El filtrado fue llevado a secar a 40 °C por 3 días. Obteniendo así el concentrado del extracto. Finalmente, el extracto concentrado fue diluido en el medio de cultivo de las células (Tabla 2).

Tabla 2. Diluciones del extracto etanólico de *Alternanthera mexicana* y 5-FU

Diluciones	<i>Alternanthera</i> (µg/ mL)	5-FU (µg/mL)
A	500,0	9,8
B	250,0	4,9
C	125,0	2,4
D	62,5	1,2
E	31,3	0,6
F	15,6	0,3
G	7,8	0,2
H	3,9	0,1

BIOENSAYO DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Preparación de las placas. Con una multipipeta se extrajo la cantidad calculada de microlitros para obtener 4000 células en cada pocillo. La placa experimental se dividió en dos grupos con sus respectivas columnas: 2 controles, 3 *Alternanthera*, y 1 de 5-FU. La placa control contó con tres columnas: blanco, con el medio de cultivo; células 3T3, y células HUTU 80. Se mandó a incubar (tiempo 0). Luego de 24 h se agregó ácido tricloroacético (TCA) a la placa control, de esta manera se obtuvo el tiempo 1. La placa experimental recibió el contenido de la placa extracto en sus respectivos pocillos, se agregó el 5-FU en su respectivo pocillo y se incubó. Luego de 48 h se detuvo el crecimiento celular agregando TCA en toda la placa; así, obtuvimos el tiempo 2 (48 h después del tiempo 1); (Gráfico 1). Se lavó con SRB en ácido acético 1%, luego se agregó el *buffer* TRIS a pH 10,5 y las absorbancias fueron leídas a 510 nm en una lectora de microplacas.

En la determinación de los valores no se utilizó un paquete estadístico, en reemplazo a ello se usó EXCEL 2010, valiéndonos de ciertas fórmulas que las explicaremos a continuación. Para determinar la masa celular que permanece viable después de la exposición al extracto, utilizando la tinción con SRB, es necesario verificar la linealidad entre absorbancia y número de células, además de establecer si el rango de densidad celular (número de células en cada pocillo) se cumplía para cada línea celular ⁽¹⁰⁾. Para ello, se realizó un análisis de regresión lineal para establecer la C150 ⁽¹¹⁾. Esta evaluación estadística fue realizada por los autores.

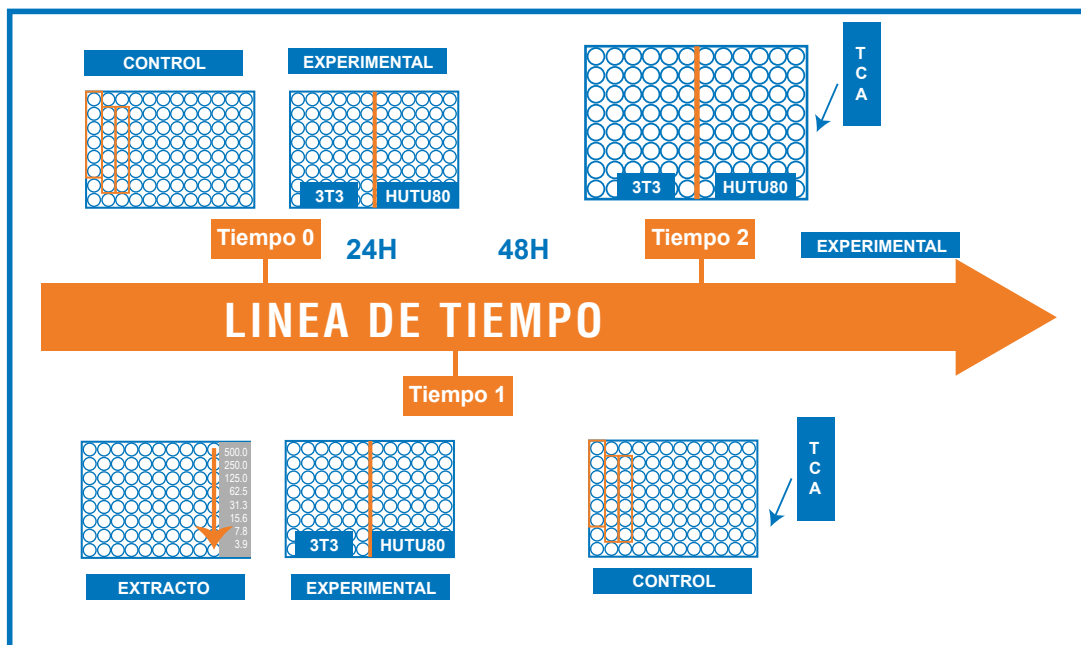


Gráfico 1. Línea de tiempo

Adicionalmente, se utilizó el índice de selectividad con el fin de determinar la selectividad citotóxica del extracto. Para hallar ese índice se utilizó la siguiente fórmula: CI50 línea normal/ CI50 línea tumoral. Si el índice es mayor que uno, el extracto es más citotóxico para las células tumorales que para las células normales; si el índice es menor que uno, es más citotóxico para células normales que para tumorales ⁽¹²⁾.

RESULTADOS

La línea celular 3T3 que recibió el extracto de *Alternanthera mexicana* evidenció un ligero aumento del porcentaje de crecimiento obteniendo un CI50 mayor de 500 ug/mL, esto significa que la concentración a la cual el extracto de

Alternanthera mexicana inhibirá el crecimiento del 50% de la línea celular es mayor a 500 ug/mL, la concentración máxima que administramos. Por otro lado, en el grupo 3T3 que recibió 5FU se obtuvo un CI50 menor a 0,1 ug/mL, esto significa que para inhibir el 50% del crecimiento, se requiere menos de 0,1 ug/mL, evidenciando una gran citotoxicidad (Gráfico 2).

En la línea celular HUTU80, el grupo que recibió 5-FU evidenció una elevada citotoxicidad con un CI50 de 0,32 ug/mL, pero menor comparada con la línea celular 3T3. Mientras que el grupo que recibió extracto de *Alternanthera mexicana* también evidenció una disminución del porcentaje de crecimiento con un CI50 de 87,1 ug/mL (Gráfico 3).

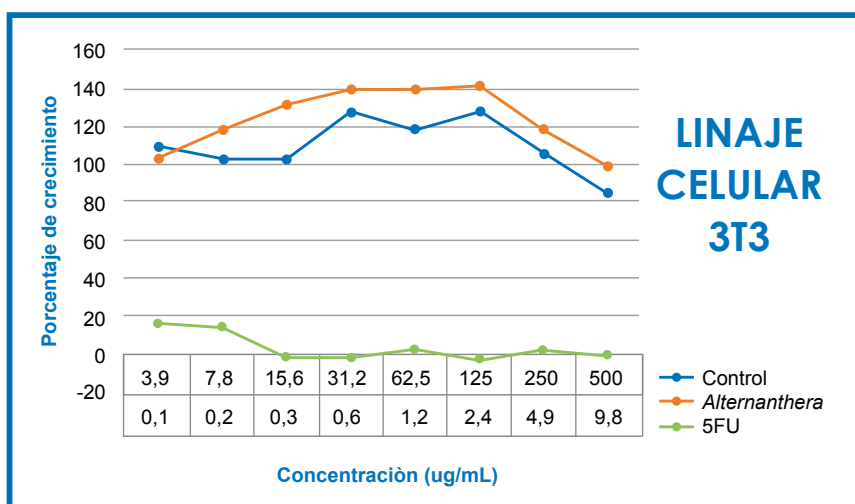


Gráfico 2. Porcentajes de crecimiento de la línea celular 3T3

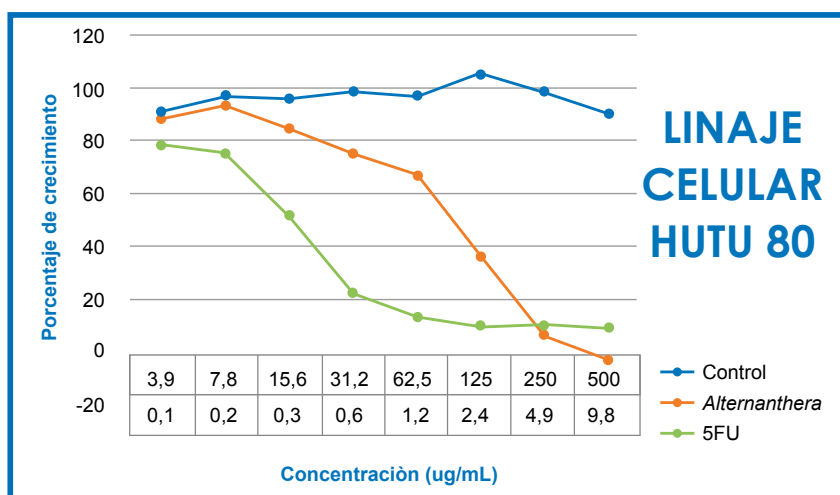


Gráfico 3. Porcentajes de crecimiento de la línea celular HUTU80

Tabla 3. Coeficientes de correlación múltiple para las líneas celulares tumorales y controles

Sustancia	Línea celular HUTU80	Línea celular 3T3
<i>Alternanthera mexicana</i>	0,94416368	0,866073695
5FU	0,9723571	0,952216581

El índice de selectividad encontrado en el extracto de *Alternanthera* (>5,74) evidencia que hay mayor citotoxicidad en la línea celular tumoral, mientras que en

el 5-FU, con un índice de selectividad menor que 0,31, nos indica que es más tóxico para las líneas normales que para las tumorales (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración inhibitoria de crecimiento 50 (CI50) e índice de selectividad del extracto de *A. mexicana* y de 5-FU

Sustancias	CI50 (ug/mL)		Índice de selectividad
	3T3	HUTU80	
Extracto <i>Alternanthera</i>	>500	87,1	>5,74
5-fluorouracilo	<0.1	0,32	<0,31

DISCUSIONES

En el presente trabajo no se encontró una verdadera correlación lineal entre las diluciones del extracto y el porcentaje de crecimiento, lo que llevó a utilizar tres extractos que estaban cerca al 50% de crecimiento; este artificio es válido cuando se trabaja con extractos, debido a que estos contienen una variedad de compuestos químicos⁽¹²⁾; además, para fines del trabajo, el obtener el CI50 aproximado es suficiente para determinar si el extracto es interesante para un posterior análisis.

El uso de las líneas celulares se ha venido trabajando en el contexto del Banco de Líneas Celulares (BNLC) por la orden SCO/393/2006. Debido a las controversias en el uso de las células, según su origen y de dónde son extraídas, se mantienen ciertas normas y condiciones referidas a la investigación médica⁽¹³⁾.

Según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, se considera potencialmente activos aquellos extractos alcohólicos con CI50 inferiores a 100 µg/mL⁽¹⁴⁾. Según estas cifras, el extracto de *Alternanthera mexicana* cuenta con un indicador de citotoxicidad para las líneas celulares HUTU80 CI= 87,1 µg/mL.

El valor de CI50 obtenido en este estudio para la línea celular HUTU80 refleja una citotoxicidad importante para esta línea celular. Este resultado señalaría un posible efecto citotóxico en otras líneas celulares. Sin embargo, se requiere otras evaluaciones, debido a las diferencias bioquímicas y de sensibilidad entre las distintas líneas. Estudios previos han utilizado un reducido panel de líneas celulares altamente sensibles como tamizaje en los ensayos de citotoxicidad, y solo han evaluado con el panel amplio los extractos que muestren una actividad citotóxica interesante⁽¹⁵⁾.

No hemos identificado estudios similares realizados con la misma especie, es por ello que los resultados obtenidos en este estudio se han comparado con estudios hechos en el género de *Alternanthera* de diferentes especies.

Es así que en el estudio realizado por Pavan *et al.* se demostró la actividad citotóxica *in vitro* de la *Alternanthera brasiliensis* aplicado en carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC), la cual posee una CI50 de 33,54 – 33,69 µg/mL, frente a un CI50 de 87,1 µg/mL de la *Alternanthera mexicana*, aplicado en HUTU80 en nuestro estudio, ambos usando al 5-FU como el grupo control. Concluyendo que la *Alternanthera mexicana* tendría un menor grado de actividad citotóxica que su congénere brasileña⁽¹⁶⁾.

En el estudio realizado por Lucinda *et al.* se halló citotoxicidad de 17 plantas, en base a los extractos etanólicos, entre ellas de la *Alternanthera sessilis*, en células cancerígenas HELA (tipo de tumor); posteriormente, se escoge a los extractos con mayores efectos tóxicos y se hace una segunda prueba en células MCF-7 siendo la *Sapium ellipticum* la más tóxica, con valores de CI50 de 88,60 ± 0,03 y 93,03 ± 0,03 µg/mL contra HeLa y MCF-7, respectivamente; valores muy similares a la *Alternanthera mexicana* en las líneas tumorales HUTU, probablemente con un mayor efecto citotóxico de la *Alternanthera sessilis*⁽¹⁷⁾.

En el estudio realizado por Dhanya *et al.* se evalúa la concentración inhibitoria (CI 50) de diferentes extractos etanólicos, entre ellos de la *Alternanthera dentata*, en líneas celulares de HELA y MCF-7, presentando valores de 801,77 y 775,38 respectivamente⁽¹⁸⁾. Las cuales son cifras por encima del valor CI50>100 µg/mL, sin actividad tóxica

para células tumorales a diferencia de la *Alternanthera mexicana*.

La investigación de Akcland Leigh, cuyo objetivo fue analizar la inhibición de crecimiento de células HUTU80 a base del sinergismo de los extractos etanólicos de los polifenoles, quercitina y kaempferol, nos muestra que estos fueron inhibidos en un 34% luego de 4 días de tratamiento utilizando 5 uM de extracto, en comparación con nuestro experimento en el que se logró inhibir en 3 días el 50% de la población celular de HUTU80 utilizando 87,1 ug/mL de extracto de *Alternanthera mexicana* ⁽¹⁹⁾.

Estudios avalan que compuestos como la vitamina B17, que tienen cianuro en su contenido molecular, resultan tóxicas para las células cancerosas. El cianuro que se encuentra en la estructura molecular del compuesto B-17 y de la *Alternanthera mexicana*, es desdoblado en el ambiente de las células cancerosas por la enzima beta-glucosaminidasa, estas enzimas son producidas en mayor cantidad por las células cancerígenas (miles de veces en mayor cantidad que células sanas), y en mínimas cantidades por el resto del organismo. Además de ello, se cuenta con otra enzima: rodanasa (tiosulfato de transulfurasa), que es una enzima que detoxifica al cianuro en subproductos inoocuos, estas enzimas se hallan en menor cantidad en las células cancerígenas ⁽²⁰⁾.

A partir de nuestros resultados podemos preguntarnos si es posible que estos puedan tener el mismo efecto en un sistema complejo como el humano en la que cada función estimula acción y reacción de su organización, para ello se debe continuar con los estudios en la fase

preclínica *in vivo*, demostrar su efectividad y seguridad para llevarlo a la fase clínica.

Consideramos una de nuestras limitaciones el no haber trabajado con líneas celulares humanas de manera completa y extrapolar los resultados en ellas. Además, estos resultados no necesariamente podrían ser reflejados en un estudio *in vivo*, por ello, se sugiere que se continúen los estudios con animales de experimentación. Las comparaciones de citotoxicidad se realizaron con otras especies, ya que no hay estudios de la *Alternanthera mexicana*, por lo que se reitera la investigación en esta especie para reconfirmar los datos que se ha conseguido en este trabajo.

Finalmente, se concluye que el extracto de *Alternanthera mexicana* es citotóxico para la línea celular HUTU80 con un CI50 de 87,1ug/mL; sin embargo, esto no ocurre con la línea celular 3T3. Por otro lado, el extracto de *Alternanthera mexicana* posee un mejor índice de selectividad en contraste con el 5-FU dirigiendo su actividad citotóxica principalmente a las células neoplásicas.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Abraham Vaisberg por la colaboración en este trabajo proporcionando las líneas celulares y el ambiente de trabajo. Agradecemos a los universitarios Víctor Manuel Luján Guerreros, Marcelo Julián Granados, Nora Evangelista Peña y Angie Pérez Lopez por su colaboración en la fase experimental del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Herb. Andcan I-III: Disturbed arcas, forests, riversides. 500 – 3000 m.
- Universidad de Panamá. Herbario - Universidad de Panamá [Internet]. [citado el 23 de junio de 2016]. Disponible en: <http://herbario.up.ac.pa/Herbario/>
- Brako L, Zarucchi JL. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri: Missouri Botanical Garden; 1993. 1286 p.
- Monigatti M, Bussmann RW, Weckerle CS. Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(2):450–64.
- Agudelo-H CA. *Amaranthaceae*. Flora de Colombia N.º 23. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia; 2008.
- Aguilar TG. Manejo ambiental educativo de la etnobotánica con fines fitoterapéuticos y agroindustriales ecosostenibles en el emplazamiento rural de San Antonio de Anaconia - municipio de Neiva [Tesis Magistral]. [Manizales]: Universidad de Manizales; 2013.
- Torres LO, Pérez MET, Contreras AA. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona: Edicions Universitat Barcelona; 2005. 177 p.
- Grupo de trabajo por medios electrónicos., Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de la Salud. Documento de debate sobre los glucósidos cianogénicos. (Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del codex sobre contaminantes de los alimentos). Rotterdam: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; 2008 p. 23.
- Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112–6.
- Camacho CPC, Gutierrez FAA. Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *RevColombBiotecnol*. 2011;4(1):100–6.

11. Callacondo-Riva D, Quispe-Mauricio A, Lindo-Gamarra S, Vaisberg AJ. Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* "keto keto" en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008;25(4):380–5.
12. Quispe A, Zavala D, Posso M, Rojas J, Vaisberg A. Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanábana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *CIMEL*. 2007;12(1):19–22.
13. Gómez-Salvago Sánchez C. Sobre la aplicación extensiva de las funciones del Banco Nacional de Líneas Celulares Embrionarias y Adultas a las Líneas Celulares IPS: una interpretación a la luz del art. 3.1 del Código Civil. *Rev Bioét Derecho*. 2014;(30):3–20.
14. Díaz García A, Rodríguez Sánchez H, Scull Lizama R. Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549. *Rev Cuba Farm*. 2011;45(1):101–8.
15. León CJ, Gómez SM, Morantes SJ, Cordero CP, Ancízar F. Sensitivity profile of a panel of cell lines designed for the evaluation of in vitro cytotoxicity. *Biomédica*. marzo de 2006;26(1):161–8.
16. Samudrala PK, Augustine BB, Kasala ER, Bodduluru LN, Barua C, Lahkar M. Evaluation of antitumor activity and antioxidant status of *Alternanthera brasiliana* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Pharmacogn Res*. 2015;7(1):66–73.
17. Baatjies L. In vitro cytotoxic effects of selected Nigerian medicinal plant extracts on cancer cell lines [TesisMagistral]. [Port Elizabeth]: Nelson Mandela Metropolitan University; 2012.
18. Ackland ML, van de Waarsenburg S, Jones R. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *Vivo Athens Greece*. 2005;19(1):69–76.
19. Dhanya S, Kumar A, Nayak AS, Raj S, Prabhu D. Cytotoxicity studies of microwave assisted natural product extracts in HeLa and MCF-7 cell lines. *Int J Med Arom Plants*. 3(1):27–31.
20. Milazzo S, Horneber M. Laetrile treatment for cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(4):CD005476.