

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UNA FRACCIÓN ACUOSA
OBTENIDA DEL LÁTEX DE BROSIMUM UTILE, TRADICIONALMENTE
UTILIZADO EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER POR LA COMUNIDAD
INDÍGENA CAMENTSA.**

LILY YANET CHINDOY LUNA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ 2013**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

TABLA DE CONTENIDO

1	JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
2	MARCO TEÓRICO.....	10
2.1	Generalidades del Cáncer	10
2.2	Leucemia	11
2.2.1	Tratamientos contra las leucemias	12
2.2.2	Fármacos para el tratamiento de la leucemia en la quimioterapia	13
2.2.3	Efectos adversos de la quimioterapia	14
2.3	Antecedentes y estudios realizados del uso de la medicina natural como tratamiento natural para leucemias	15
2.4	Medicina Tradicional Indígena.....	17
2.5	Uso del látex de la Corteza de <i>Brosimum utile</i> (Sande) en la Medicina Tradicional Indígena para el Cáncer	19
2.5.1	Descripción general y su distribución geográfica <i>Brosimum utile</i>	19
2.5.2	Fitoquímica	20
2.6	Estudios reportados sobre la actividad antitumoral de <i>Brosimum utile</i>	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	<i>Objetivo General</i>	21
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	21
4	MATERIALES y METODOS	21
4.1	Obtención del látex de <i>Brosimum utile</i>	21
4.2	Obtención de la fracción protéica a partir del látex de <i>BrosimumUtile</i>	22
4.3	Caracterización preliminar del látex y su contenido protéico	22
4.4	Evaluación del efecto citotóxico in vitro de las fracciones proteicas obtenidas de látex, sobre células K562 (leucemia mieloide humana)	23
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1	Fracción acuosa del látex de <i>Brosimumutile</i> con alto contenido proteico.....	25
5.2	Perfil proteico parcialmente purificado	26
5.3	La fracción proteica del látex solo tiene actividad citotóxica sin dializar.	28
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
7	BIBLIOGRAFÍA	32

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRAFICAS

Tabla 1. Efectos adversos a corto y largo plazo del tratamiento con quimioterapia	155
Tabla 2 .Principales instituciones que realizan investigaciones a partir de plantas medicinales para obtener posibles productos para el tratamiento del cáncer y la cantidad de registros sanitarios con que cuentan	166
Tabla 3. Muestra obtenidas para posteriores experimentos.....	2222
Tabla 4. Concentración proteica de las muestra con diálisis y sin diálisis.....	255
Figura 1. Electroforesis en gel de proliacrilamida (SDS-PAGE) de las muestras..	26
Graficas 1 y 2. Efecto citotóxico de las muestras sobre células K562.....	28

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad de alta mortalidad a nivel mundial, tanto por la agresividad de la misma como por la de los métodos terapéuticos utilizados, motivo que lleva a la industria farmacéutica investigar fármacos derivados de productos naturales como alternativas terapéuticas efectivas y menos agresivas. En este contexto, el presente estudio pretende evaluar la actividad citotóxica de una fracción acuosa rica en proteínas obtenida del látex de *Brosimum utile* sobre la línea celular leucémica K562. Este látex ha sido utilizado por la comunidad indígena Camëntsa para tratamiento de varias enfermedades entre estas diversos tipos de cáncer. La presencia de proteínas contenidas en este látex con actividad citotóxica frente en células tumorales constituye un aporte para dar inicio a la validación científica de un conocimiento tradicional de la comunidad Cämentsa, apoyando la posibilidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas que puedan impactar en la recuperación y preservación de esta especie.

INTRODUCCIÓN

Es indudable que el cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte en el mundo, y por lo tanto ha pasado a ser una preocupación central en las políticas globales sobre salud, situándolo en una prioridad de investigación en busca de una cura, o al menos para el mejoramiento de la calidad de vida de quienes lo padecen. Hasta ahora dichas investigaciones han avanzado rápidamente gracias a las nuevas tecnologías, dando como resultados tratamientos cada vez más eficaces pero muchos de ellos agresivos, como en el caso de la quimioterapia.

En esa búsqueda de nuevos tratamientos, algunos investigadores han volcado su mirada hacia nuevos horizontes de investigación, y uno de ellos ha sido el de la medicina tradicional (MT), practicada por pueblos como el Hindú, el Chino, Árabe e Indígenas. Esta práctica fue relegada por mucho tiempo por el conocimiento científico, acusándola de supersticiosa y sin fundamento racional, pero con los aportes de la etnobotánica, la antropología y la misma filosofía posmoderna llevaron a colocar en duda planteamientos de la ciencia, interrogando por la efectividad de dicha medicina en algunos tratamientos de enfermedades.

En ese contexto esta investigación indaga el uso del látex del árbol *Brosimum utile* denominado popularmente leche de Sande para el tratamiento del cáncer, de la medicina tradicional de la comunidad indígena Camentsa del departamento del Putumayo (col), que también, dentro de su sistema de salud de la misma, han venido investigando y adelantando tratamientos menos agresivos para este tipo de enfermedades.

En ese orden de ideas, esta investigación reconociendo los usos y manejo de dicha planta por parte de la comunidad indígena, se investiga la actividad citotóxica de una fracción proteica aislada del látex sobre la línea celular K562 (Leucemia mieloide crónica).

1 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, los científicos menos ortodoxos, han ido integrando nuevos elementos que han dado luces a muchos vacíos del conocimiento racional-científico en pro y beneficio de la humanidad y de su entorno. En el campo de la medicina por ejemplo, se ha dado paso a la investigación en áreas que hoy se denominan alternativas, en las cuales se integra la medicina de culturas ancestrales como: la china, la hindú o la de indígenas de América, con la medicina occidental (1).

Estas nuevas áreas alternativas que son recientes en nuestro país, son poco reconocidas dentro de las prácticas médicas convencionales, dado que hasta hace poco eran catalogadas como creencias populares o creencias tradicionales sin validez científica (1). En la medida que la ciencia se ha visto interrogada con resultados no esperados en la medicina alternativa, son cada vez más las personas que se inclinan a investigar y buscar nuevas posibilidades de tratamiento de enfermedades, las cuales han sido catalogados como alternativas o complementarias (2).

La comunidad indígena Camëtsa localizada a lo largo del departamento del Putumayo han logrado preservar conocimientos originados desde el alto andino hasta el bajo amazonas. Por cientos de años estas comunidades han practicado su medicina a pesar de la poca validez que tiene a nivel social y han desarrollado una serie de conocimientos terapéuticos para varias enfermedades. Estos conocimientos médicos ancestrales son nuevas alternativas a pacientes a los cuales la medicina convencional no les brinda una cura a su enfermedad y que por el contrario impacta negativamente su calidad de vida.

Dentro de las comunidades indígenas del Putumayo encontramos la comunidad Camëntsá, en donde los médicos tradicionales han venido tratando pacientes con diferentes tipos de cáncer utilizando el extracto (látex) de el árbol llamado en su contexto Sande (*Brosimum utile*), con unos “supuestos” resultados satisfactorios, como por ejemplo la recuperación de su calidad de vida, ya que disminuye los efectos secundarios de la quimioterapia a la que han sido sometidos en la

medicina convencional. Este árbol crece en bosques húmedos tropicales en zonas de terrazas bajas o suelos periódicamente inundados de la región del Putumayo (3).

Este conocimiento tradicional sobre el uso del látex, no cuenta por ahora con validación científica, sin embargo antecedentes sobre la familia Moraceae a la cual pertenece el árbol *Brosimum utile*, muestran que existen metabolitos presentes en semillas y frutos de estas plantas que poseen actividad citotóxica como por ejemplo, la especie *Artocarpus lakoocha* que ha sido objeto de estudios químicos en los cuales se han aislado aglutininas de la semilla que muestran una actividad antiproliferativa sobre células leucémicas (4). Dentro de las publicaciones que muestran la actividad *Brosimum utile* encontramos el trabajo de Ferrari y col hecho sobre la “corteza” de este árbol, en el que se aisló una nueva isoflavona y se observó capacidad citotóxica contra líneas celulares humanas de carcinoma de seno y de próstata. Sin embargo, el estudio no es muy contundente y no proporciona mucha información sobre su caracterización química, ni actividad biológica sobre esas células (5).

El estudio de la actividad citotóxica del látex utilizado actualmente por el médico tradicional de la comunidad Camëntsó permitirá comenzar a validar el conocimiento tradicional de la misma, lo cual además de proporcionar nuevo conocimiento científico redundará en beneficio del conocimiento tradicional en general y específicamente en beneficio de la comunidad quien podría aprovechar de una forma más dirigida sus recursos naturales.

De forma complementaria, este trabajo de investigación podría en el mediano plazo validar científicamente un conocimiento tradicional lo que aportaría en la construcción de programas de recuperación y preservación de esta especie que se encuentra hoy disminuida en la región.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracterizan por la alteración en el crecimiento y diferenciación celular, propiedades que adquiere una célula normal por alteraciones en el genoma que la llevan a evolucionar progresivamente a un estado neoplásico (crecimiento nuevo anormal)(6). En la última década se han identificado ocho capacidades biológicas (proliferación sostenida, evasión de supresores del crecimiento, invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, angiogénesis sostenida, resistencia a la muerte celular, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la respuesta inmune) que adquieren las células cancerígenas, necesarias para dar inicio y continuidad al proceso neoplásico, lo que a su vez beneficia el desequilibrio de la población celular a favor de las células tumorales y posteriormente la invasión del tejido y la generación de metástasis (6).

Las neoplasias (masa anormal o tumor) se denominan benignas o malignas y se clasifican según el tejido afectado. Las benignas se caracterizan por un crecimiento celular lento pero progresivo que puede cesar o revertirse, tiene una modalidad de crecimiento expansiva y es incapaz de generar metástasis. Las neoplasias malignas tienen un crecimiento celular rápido y se diseminan por vía sanguínea y linfática a varios órganos. Estas últimas se dividen en dos categorías: la de tumores sólidos quienes son los que están confinados en un tejido u órgano específico y a medida que crecen desprende células que pasan a circulación e invaden otro órgano; y la de los tumores del tejido hematopoyético que se diseminan por circulación sanguínea y linfática, y en su mayoría constituyen las leucemias (7, 8).

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Según los datos estadísticos de Globalcan en el 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total) ocurridas a nivel mundial (9, 10). A nivel nacional de acuerdo con la estimación de incidencia durante el periodo del 2002-2006 se estimaron 70.877 nuevos casos anuales y el 2009 se reportaron

32.815 defunciones por cáncer. Estos eventos llevaron a considerar el cáncer como un problema de salud pública creciente para las instituciones de Salud en Colombia (11).

2.2 Leucemia

La leucemia es una enfermedad que resulta de alteraciones en algunos precursores celulares del tejido hematopoyéticos, sobre todo en los más primitivos, así la producción de las células sanguíneas puede verse modificada y los niveles de las células transformadas o blastos en circulación puede aumentar, generando la disminución de las otras poblaciones celulares (12).

Las leucemias son un grupo heterogéneo de neoplasias que difieren respecto a su agresividad, célula de origen (precursor celular que adquiere la alteración genética), clínica y respuesta al tratamiento. En base a las primeras características se clasifican en: leucemia mieloide aguda (LMA)(8), leucemia mieloide crónica (LMC) (13), leucemia linfocítica aguda (LLA) (14, 15) y leucemias linfocíticas crónicas (LLC) (16). A su vez estas se clasifican en subtipos en base a criterios morfológicos, citoquímicos, inmunológicos y citogenéticos de las células malignas por ejemplo las leucemias agudas (leucemias de crecimiento rápido) pueden ser: mieloblástica, promielocítica, monocítica, mielomonocítica, eritrocítica, megacariocítica, linfocítica T, linfocítica B, de línea celular mixta indiferenciada y célula asesina natural mieloide y las leucemias crónicas (leucemias de crecimiento lento); mielocítica, mielomonocítica, linfocítica, plasmocítica (mieloma múltiple), células peludas, prolinfocítica y linfocitosis de células grandes granulares. La clasificación de las leucemias en el diagnóstico va de acuerdo con la línea celular predominante (recuento celular en medula ósea y sangre periférica) y es útil para direccionar el tratamiento adecuado del paciente (17).

Para entender la fisiopatología de las leucemias algunos expertos consideran la leucemia mieloide crónica como modelo para los tumores malignos que evoluciona a través de un proceso patogénico de múltiples pasos (13).

El inicio del proceso patológico de la leucemia mieloide crónica (LMC) se asocia con el defecto genético del cromosoma filadelfia (cromosoma Ph) el cual es generado por una translocación recíproca que involucra el brazo largo del cromosoma 9 y el 22 $t(9:22)(q34;q11)$, fusionando los genes BCR y ABL, produciendo el gen híbrido BCR-ABL responsable de codificar la proteína tirosina quinasa necesaria y suficiente para dar inicio a la transformación de la célula y la adquisición de las características biológicas (bloquear la diferenciación y la apoptosis celular). (13).

La leucemia mieloide crónica evoluciona en tres distintas fases clínicas: la fase crónica, acelerada y la crisis blástica. La fase crónica se caracteriza por acumulación de precursores mieloides y células maduras en la médula ósea, sangre periférica y sitios extramedulares. La fase acelerada dura de 6 a 4 meses y se caracteriza por aumento de la carga de la enfermedad y la presencia de células precursoras más que de células bien diferenciadas. La fase de crisis blástica dura solo pocos meses y se caracteriza por la expansión de células inmaduras indiferenciadas. Los mecanismos responsables de la transición de la fase crónica a crisis blástica son poco entendidos, sin embargo se sabe que la actividad del oncogén BCL-ABL en las células madre y progenitoras mieloides, determinan el progreso inicial de la enfermedad y a medida que va avanzando este va aumentando su expresión concomitantemente con la expresión de cambios genéticos secundarios en las células que se encuentran en la fase de crisis blástica (18).

Las drogas en gran parte están diseñadas para la fase crónica de la enfermedad, y si el tratamiento no es efectivo en esta fase la leucemia mieloide crónica (LMC) evoluciona a crisis blásticas (13), la cual no tiene terapia alguna y finaliza con la muerte del paciente (18).

2.2.1 Tratamientos contra las leucemias

Los tratamientos para leucemias son: el trasplante de médula ósea, la radioterapia, inmunoterapia y la quimioterapia. Sin embargo el tratamiento de elección es la quimioterapia.

Radioterapia: Utiliza rayos x de alta energía que destruye las células cancerígenas, e inhiben su proliferación (19).

Trasplante de médula ósea: Método que administra la radioterapia y quimioterapia y posteriormente reemplaza las células anormales muertas por medio del suministro de células madres de médula ósea de un donante sano que crecen y restauran los elementos celulares del tejido hematopoyético (19).

Inmunoterapia: Se basa en el uso de anticuerpos o células del sistema inmune que participen en la eliminación de las células tumorales. Los inmunomoduladores, pueden favorecer esta respuesta inmune activandola y mejorando la respuesta antitumoral (20).

Quimioterapia: Es un tratamiento que involucra el uso de medicamentos con capacidad de controlar o erradicar la enfermedad, mediante la eliminación de las células malignas dentro de la médula ósea para darle paso a la repoblación con precursores hematopoyéticos normales. El fin de la quimioterapia es inducir la muerte de las células cancerígenas y evitar su proliferación induciendo apoptosis (muerte celular programada), necrosis (ruptura de la membrana plasmática que provoca la liberación de la los organelos celulares), o autofagia (proceso catabólico, en el cual el citoplasma, y el exceso de orgánulos o aquellos deteriorados o aberrantes, son secuestrados en vesículas de doble membrana y liberados dentro del lisosoma o vacuola para su descomposición). Generalmente se elige una terapia combinada en la cual incluye diferentes tipos y dosis de fármacos y puede variar dependiendo de la edad, pronóstico y diagnóstico de la enfermedad (21).

2.2.2 Fármacos para el tratamiento de la leucemia en la quimioterapia

La mayoría de fármacos para tratar la leucemia se incluyen tres grupos: antimetabolitos, agentes alquilantes y antibióticos.

Antimetabolitos: Antagonistas de la purina y la pirimidina los cuales inhiben la síntesis del ADN, matan a la célula en ciclo celular y afectan a cualquier célula en

rápida división como por ejemplo el arabinósido de citosina el cual es un antimetabolito de pirimidina.

Alquilantes: Compuestos químicos que contiene grupos alquilo, no son específico para las células en ciclo, pero matan la célula tanto en reposo con las que están proliferando. Estos medicamento se enlaza con moléculas del ADN para interferir con su síntesis como ejemplo tenemos la ciclofosfamida.

Antibióticos: Estos se enlazan con moléculas tanto de ADN como ARN, e interfiere con la replicación celular. Ejemplo la doxorubicina (antibiótico antraciclina) (17).

2.2.3 Efectos adversos de la quimioterapia

Luego de la erradicación de la enfermedad, el objetivo de la selección de una combinación terapéutica de los fármacos adecuados, es disminuir la aparición de los efectos secundarios de estos y la resistencia por parte de las células (21). Sin embargo los fármacos además de matar a las células cancerígenas a través de mecanismos no siempre muy específicos, y basados en la mayor parte de los casos en la destrucción de células que se dividen activamente, pueden afectar tanto a las células cancerígenas como a las normales. Las células normales como las que revisten los intestinos, la médula espinal y los folículos capilares se “dividen constantemente” y eso las hace propensas a destruirse y/o alterarse por efecto de la quimioterapia (22).

En cuanto a los diferentes grupos de fármacos utilizados para la quimioterapia, sus efectos son:

Los antimetabolitos y alquilantes concomitante a la destrucción de las células malignas, también destruyen las células que recubren el intestino, el epitelio germinal de los folículos pilosos y las células hematopoyéticas normales, lo cual causa complicaciones gastrointestinales, pérdida de pelo y citopenias, en cuanto a los antibióticos causan mielosupresión, estomatitis, náuseas y vómito (17).

Por otra parte los efectos secundarios que se producen dependen de muchos factores, por ejemplo: los agentes utilizados, la combinación de fármacos, la dosis, el tiempo del tratamiento, el estado de salud general del paciente y el historial de quimioterapia aplicado con anterioridad. La siguiente tabla (tabla 1) resume los efectos adversos de la quimioterapia a corto y o a largo plazo después de dar inicio al tratamiento (22).

Tabla 1 Efectos adversos a corto y largo plazo del tratamiento con quimioterapia

Efectos Adversos de la Quimioterapia	
A corto plazo	A largo plazo
Anorexia	Infertilidad
Inflamación de la vejiga	Supresión continua de las células de la médula ósea
Supresión medular	Fatiga continua
Confusión y disfunción de la memoria a corto plazo	Cánceres secundarios
Diarrea	
Fatiga	
Alopecia	
Infecciones	
Dolor muscular	
Náuseas	
Irritación nerviosa	

2.3 Antecedentes y estudios realizados del uso de la medicina natural como tratamiento natural para leucemias

Existen medidas naturales que pueden reducir la toxicidad de la quimioterapia y se han producido avances en investigaciones de tratamientos menos tóxicos y más tolerantes que años atrás, a base de productos naturales utilizados por la medicina natural (22).

Las plantas hacen parte de la historia en el tratamiento del cáncer y la necesidad de nuevas terapias explica en parte el auge en la investigación en plantas medicinales con actividad antitumoral. Ejemplos de fármacos que provienen de las plantas, son los alcaloides de la (vinblastina y vincristina) aislados de la planta *Catharantas roseus* de la familia Apocynaceae la cual se utilizaba por culturas ancestrales para la diabetes y actualmente sirve como insumo para la obtención de la vinca utilizada en el tratamiento de leucemias agudas, igualmente, se

encuentra el etoposido y el teniposido agentes sintéticos derivados de la epipodofilotoxina (inhibe la topoisomerasa II) que se extrae de las hojas de varias especies del genero *Podophyllum* de la familia Berberidaceae cual era de uso tradicional en la medicina de las culturas americanas y asiáticas para el tratamiento de cáncer de la piel y actualmente tiene uso clínico en leucemia linfocítica aguda(23).

En un periodo de 21 años (1981-2002) el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos en USA observó que en los países subdesarrollados no se habla de investigaciones fuertes en productos naturales para el tratamiento contra el cáncer, contrario a lo sucedido en los países desarrollados (ver tabla 2), adicional a esto de clara al Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos como el mayor país con investigaciones en este tipo de tema (23).

Tabla 2 Principales instituciones que realizan investigaciones a partir de plantas medicinales en busca obtener productos para el tratamiento del cáncer y la cantidad de registros sanitarios con que cuentan

Institución	País	Cantidad de registros sanitarios
Mario Negri Institute for Pharmacological Research	Italia	25
Laboratoire d'immunologie Hôpital Sainte-Margente.	Francia	12
Department of Food Science and Human Nutrition, University East Lausing.	Estados Unidos	15
National Cancer Institute.	Estados Unidos	125
Midwestern University.	Estados Unidos	25
Wayne State University.	Estados Unidos	56
Aichi Cancer Center.	Japón	34
Institut Fuit Pathologie.	Alemania	18
University of Utah.	Estados Unidos	12
Yokohama University.	Japón	16
Boehringer Mannheim GmbH.	Alemania	15
German Cancer Research Center.	Alemania	10
University of California	Estados Unidos	23
University of Auckland School of Medicine.	Nueva Zelanda	14
Yale University School	Estados Unidos	42
University of Michigan.	Estados Unidos	26
Roswell Park Cancer Institute.	Estados Unidos	13
Alkermes, Inc.	Estados Unidos	16
Hôpital Bichat-Claude Bernard.	Francia	13

Fuente: Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales.

(Loaces et al,2003.)

En los últimos años en Colombia se han hecho estudios basados en plantas medicinales los cuales han generado nuevas perspectivas terapéuticas menos agresivas contra el cáncer. Un ejemplo de ello tenemos el estudio realizado por

Castañeda et. al,2012., en el cual se logró recuperar una fracción enriquecida en polifenoles hidrolizables (P2ET) a partir de *Caesalpinia spinosa*, mostrando que ésta en combinación con la quimioterapia convencional puede aumentar la eficacia terapéutica de esta última en células leucémicas, por su actividad como adyuvante. Cuando se suministró la fracción P2Et en combinación con los quimioterapéuticos en concentraciones sub letales en la línea celular K562 (Leucemia mieloide crónica humana), redujo la concentración inhibitoria (IC50) de la doxorrubicina lo cual sugiere que esta fracción podría actuar como adyuvante de la doxorrubicina aumentando su potencial citotóxico a más bajas concentraciones (24).

Otro ejemplos de estudios elaborados en Latinoamérica, al que podemos referirnos es el trabajo ejecutado por Oliveira et.al. en el 2007 en Brasil, en cual demostró que una fracción proteica extraída del látex de *Calotropis procera* (planta medicinal) de la familia Apocynaceae poseía actividad citotóxica sobre células la línea celular HL-60 (Leucemia promielocítica humana) y otras líneas celulares. Los resultados de este estudio sugieren que las proteínas del látex inducen apoptosis en la líneas celulares tumorales (25), posterior a este estudio lo autores logran demostrar que las proteína tiene actividad farmacológicas inhibiendo el crecimiento de sarcoma 180 in vivo (26).

La medicina indígena hace unos años ha recuperado una gran posición social, a pesar, de que en años pasados era discriminada por la gente y por la ciencia (1), los antropólogos y sociólogos han sido los primeros en darnos a comprender que la medicina indígena bajo cierta racionalidad tiene una compleja lógica que puede hacer muy efectivos sus métodos, basados siempre en el conocimiento de plantas y del manejo y uso de su entorno (2).

2.4 Medicina Tradicional Indígena

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la medicina tradicional elude una definición o descripción precisa (27), por lo cual cuenta con diversas, e incluso conflictivas posturas por parte de las disciplinas que la han abordado. Pero si es claro en la bibliografía que existen claras diferencias entre las denominadas

medicinas alternativas y complementarias de la medicina tradicional, pues las dos primeras hacen referencia a un grupo heterogéneo de sistemas, prácticas y productos médicos y para el cuidado de la salud, que no forman actualmente parte de la medicina occidental convencional, y que toman sus características (alternativa- complementaria) de acuerdo al lugar que se las utilice; mientras que la medicina tradicional sus conceptos y prácticas se encuentran entrelazados en la cultura y en las costumbres de sus respectivos pueblos desde hace mucho tiempo (2).

Anteriormente muchos tratados se remitían a la medicina tradicional solo como un cumulo arbolario usado empíricamente con fines curativos (10), pero con el tiempo este concepto se ha ido ampliando gracias a los avances y conocimientos que se ha adquirido de otras sociedades no occidentales, específicamente de sociedades como la árabe, hindú, china o los diferentes pueblos indígenas americanos(28).

En esa ampliación algunas instituciones como la Organización mundial de la Salud, define la medicina tradicional como “el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales” (28).

Esta investigación, sumado al concepto de medicina tradicional usado por la OMS, toma específicamente el concepto de la medicina tradicional indígena fundamentalmente porque está ligada a un modelo holístico de salud (circunscribe a la salud dentro de un triángulo, siendo sus extremos las dimensiones físicas, mentales y sociales), asumiendo que ésta se comprende como el “completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades” (29). Y también ratifica el hecho de que la medicina tradicional indígena es un sistema complejo, del cual disecciona desde el conocimiento científico, una pequeña parte que es la utilización de una planta de uso ancestral (leche de sande), pero se hace necesario profundizar sobre su contexto cultural como por ejemplo la cosmovisión de la población en el cual se desenvuelve dicho

uso de la planta, logrando así un dialogo entre el conocimiento científico y el conocimiento y manejo tradicional.

2.5 Uso del Látex de la Corteza de *Brosimum utile* (Sande) en la Medicina Tradicional Indígena para el Cáncer

El *Brosimum utile* fue descrito por primera vez en el libro de botánica "Allgemeine Naturgeschichte" de Lorenz Oken, publicado en 1839 y editado en 1843. En Colombia se lo conoce popularmente como árbol lechero, sande, sandi, guaimaro o árbol de vaca, y es utilizado especialmente en la industria maderera (3).

En algunas regiones especialmente del norte de Ecuador y sur de Colombia el látex de dicho árbol ha sido utilizado dentro de la medicina tradicional, fundamentalmente en el tratamiento de gastritis (3), pero no existe en la bibliografía consultada mayor información o sistematización antropológica o biológica de dichas prácticas y sus reales beneficios en el tratamiento de las enfermedades para lo cual es utilizado, solo se encuentran la narración oral de médicos tradicionales de estas regiones y sus pacientes .

En el caso de la comunidad indígena Camëntsa localizada a lo largo del departamento del Putumayo, el látex de este árbol ha sido utilizado en diversos tratamientos de enfermedades, entre las cuales se encuentra el cáncer hematológico (leucemia) con un presunto éxito (se logra mejorar la calidad de vida de los pacientes previamente tratados con quimioterapia y/o la erradicación de la enfermedad), según narraciones de uno de los médicos ancestral de dicha comunidad, razón por la cual se dio inicio esta investigación, al preguntarse sobre su efectividad en dichos tratamientos. Sin embargo en la bibliografía consultada (libros, artículos y/o información electrónica) no se encuentra información.

2.5.1 Descripción general y su distribución geográfica *Brosimum utile*

Brosimum utile (Kunth) Pittier, una especie de la familia Moraceae(30), mide 35 metros de altura y 1.5 metros de diámetro, pose raíces bien desarrolladas, tronco recto y cilíndrico, la corteza externa es delgada y de color gris verdoso (al hacer incisiones fluye un látex blanquecino y pegajoso), contextura lisa, la corteza

interna es color anaranjado, las hojas son simples alternas coriáceas y con espículas, flores color blanco y fruto tipo drupa. Crece en bosques húmedos tropicales en zonas de terrazas bajas o suelos periódicamente inundados (3).

Su distribuye geográficamente desde Costa rica, Brasil, Venezuela, Ecuador hasta Péru y en Colombia se localiza en Choco, Bajo calima, Putumayo, Tumaco, zona de Urabá , Magdalena medio, Amazonas y en Cundinamarca(3)

2.5.2 Fitoquímica

El látex de *Brosimum utile* básicamente presenta taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides y terpenoides, que le dan las propiedades antioxidantes (31), en adición a esta información la literatura reporta que el látex es una mezcla compleja y que también está conformado por goma y proteínas (proteasa, lipasas, fosfatasas, glutaminilciclase, glicoproteínas, e inhibidores de proteasa etc.) (32).

2.6 Estudios reportados sobre la actividad antitumoral de *Brosimum utile*

Como se dijo anteriormente *Brosimum utile* pertenece a la familia Moraceae la cual encuentra integrada por diversos géneros (pueden ser árboles, arbustos o plantas herbáceas) (30), y aunque son escasos los reportes de la actividad antitumoral de los compuestos de este árbol algunos géneros de la familia Moraceae han sido objeto de estudio, por ejemplo el trabajo de Chatterjee et.al, en el cual se aislaron aglutininas de las semilla de los frutos de *Artocarpus lakoocha* y se mostró la actividad antiproliferativa de esta molécula sobre células leucémicas (4).

Al igual que el ejemplo anterior, se han hecho reportes de varios géneros y especies de esta familia con actividad biológica antitumoral y en este momento en la literatura relacionada directamente con *Brosimum utile*, se encuentra el trabajo de Ferrari et.al, estudio en el cual logró aislar una nueva isoflavona de la corteza de la raíz del árbol y evaluó su actividad citotóxica en diferentes líneas celulares, obteniendo resultados en los cuales se observó alta toxicidad contra los carcinomas de seno y próstata humanos (5).

El estudio de la actividad citotóxica del látex de *Brosimum utile* utilizado actualmente por el médico tradicional de comunidad Camëntsá permitiría

comenzar a validar el conocimiento tradicional de la misma, lo cual además de proporcionar nuevo conocimiento científico, la posibilidad de nuevas alternativas terapéuticas, redundaría en beneficio del conocimiento tradicional en general y específicamente en beneficio de la comunidad quien podría aprovechar de una forma más dirigida sus recursos naturales y la recuperación de los mismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad biológica de una fracción acuosa obtenida del látex de *Brosimum utile*, y determinar su potencial citotóxico en cultivos de células tumorales leucémicas in vitro.

3.2 Objetivos Específicos

1. Obtener la fracción proteica (Acuosa) parcialmente purificada, aislada del látex de *Brosimum utile*.
2. Determinar la actividad citotóxica de estas proteínas, sobre células K562 (leucemia mieloide humana).

4 MATERIALES y METODOS

4.1 Obtención del Látex de *Brosimum utile*

El material fue recolectado (extracto de Látex) de la corteza del árbol de *Brosimumutile*, ubicado en la región del Putumayo (sur de Colombia). Para el proceso de extracción de látex, se realizó incisiones en la corteza del tallo utilizando un machete de acero inoxidable. El látex se recolecto en un frasco de vidrio con agua destilada (proporción 1:1), para evitar la coagulación natural de la muestra se agitó suavemente. La muestra se almaceno a -4C° y se transportó al laboratorio.

4.2 Obtención de la fracción protéica a partir del látex de *BrosimumUtile*

La muestra de látex diluida en agua destilada, se centrifugó a 3000 g, por 20 min a 4°C de temperatura, para obtener la fracción acuosa rica en proteínas. El sedimento fue resuspendido en agua destilada hasta completar 25 ml de solución y se sometió a una hora de agitación. Posteriormente, se centrifugó usando las mismas condiciones descritas arriba, repitiendo el procedimiento 4 veces y obteniendo un sedimento libre de proteínas. La fracción acuosa fue purificada mediante diálisis (proceso que separa moléculas en una solución por la diferencia en sus índices de difusión o presión osmótica a través de una membrana semi permeable) en agitación contra PBS 1X a 4°C utilizando membranas de 7000 Da de exclusión y renovando el PBS cada 4h durante 3 días, para obtener una muestra libre de iones, sales y otros metabolitos orgánicos pequeños. Al término de los 3 días la muestra parcialmente purificada se centrifugó según lo descrito anteriormente. Todos los procedimientos se realizaron manteniendo siempre la muestra en frío. El método utilizado no hace parte del uso tradicional.

Tabla 3. Muestras obtenidas para posteriores experimentos

Muestras sin Diálisis	Muestras con Diálisis
Muestra Inicial(látex+H ₂ O) (Mxi)	Muestra Inicial(látex+H ₂ O) (Mxi-d)
Sobrenadante (Sob)	Sobrenadante (Sob-d)
Sedimento (Sed)	Sedimento (Sed-d)

4.3 Caracterización preliminar del látex y su contenido protéico

La caracterización parcial de las muestras obtenidas fue evaluada por el ensayo colorimétrico de Bradford (25),(26),(33),. Este ensayo colorimétrico es utilizado para determinar la concentración protéica de una solución. Se basa en la unión del colorante(Azul Brillante de Coomasie G-250)a los aminoácidos de la proteína en un medio ácido y su concomitante cambio de absorbancia de 465 a 595 nm.

Para llevar a cabo el procedimiento se realizó la curva de calibración realizando diluciones seriadas (250, 125, 62,5 y 31,25 µg/ml) a partir del stock (5mg/ml de albumina). Se realizaron diluciones seriadas con factor de dilución 1/10, 1/20 y 1/40 de cada una de las muestras a evaluar. El colorante de Bradford se preparó

siguiendo el protocolo sugerido (ver anexos). Posteriormente en una placa de 96 pozos fondo plano se colocó en cada pocillo 10µl de la muestra y el patrón (stock) por triplicado. Posteriormente se adiciono 200µl del colorante y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Como blanco se uso agua destilada (H₂O_d). Pasado los 5 min se dio lectura en el espectrofotómetro (Multiskan) a 595 nm. Finamente se determinó la concentración de proteínas extrapolando las absorbancias obtenidas de las muestras en la curva de calibración utilizando el Microsoft Excel.

Para descartar cualquier presencia de interferencia por cationes tanto de sodio como de potasio y carbohidratos, con el azul coomasie y determinar el perfil de proteínas se hizo electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodesil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (25),(26),(33), Para realizar el procedimiento se utilizó el gel de corrido de poliacrilamida al 12,5%, y el gel concentrador al 4%. Para preparar las muestras se tomó 15µg de proteína de cada una (total de muestras 6). El patrón de peso molecular usado fue SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range. Catalog Number 161-0317. Posteriormente se sembraron en el primer pozo del gel de poliacrilamida 5µl del patrón de peso molecular, seguido de las 6 muestras y de las cuales se sembró 20 µl/pozo c/u y se colocó en cámara de corrido con buffer de corrido. El corrido se realizó a 100v/10min y 200v hasta que termino el corrido de las muestras. El gel se sometió a solución fijadora (etanol: ácido fosfórico: agua MilliQ), pasada 12h se lavó con agua MilliQ y se colocó en solución de tinción (sulfato de amonio: ácido fosfórico: etanol: coomassiebrilliant Blue 6-250), 5h después se eliminaron los residuos del colorante con agua MilliQ. Finalmente después de un vigoroso lavado se escaneo el gel y se hicieron los respectivos análisis.

4.4 Evaluación del efecto citotóxico in vitro de las fracciones proteicas obtenidas de látex, sobre células K562 (leucemia mieloide humana)

Para determinar la actividad citotóxicas de las fracciones se realizo el ensayo del MTT. Este ensayo colorimétrico mide la viabilidad y la proliferación celular. Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato

deshidrogenasa a formazan (compuesto coloreado azul), permite así evaluar la función mitocondrial y la viabilidad de las células (34). Considerando que cada fracción de proteínas, podía contener propiedades físicas y biológicas diferentes se evaluó la actividad citotóxica de cada una de las fracciones obtenidas en el proceso.

Para llevar a cabo el ensayo se uso la línea celular K562 (leucemia mieloide crónica humana) obtenida en American Type Culture Collection (ATCC, MD, U.S.A.). Las células se mantienen en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% final en nitrógeno a -196°C. Las células se descongelaron y se mantuvieron en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10%,estreptomycinapenicilina 1%, glutamina 1%, piruvato 1% y buffer 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES). Como control negativo se usó el diluyente de las muestras, agua destilada (H₂O d) y como control positivo Doxorubicina (fármaco utilizado para en el tratamiento de cáncer) 5µg/ml. Para el experimento las células se colocaron en placa de 96 pozos fondo u (0.5 x 10⁵ células/pozo). Posteriormente se trataron con concentraciones decrecientes de las muestras (0.02-25.0µg/ml) por 72 horas en incubación a 37°C con 5% de CO₂ (25), después del tratamiento se retiró el medio y se agregaron 100µl de medio suplementado RPMI 1640 sin rojo fenol y se adiciono 50µl del stock de MTT (1mg/ml). Después de 4h se retiró el medio y se agregó 100 µl de DMSO y se mezcló por pipeteo con el fin de disolver los cristales de formazan. Finalmente se dejó por 20 min en oscuridad y se dio lectura de absorbancia a 540nm en el espectrofotómetro (Multieskan).

Para la interpretación de resultados se calculó el porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Abs de células en tratamiento}}{\text{Abs de células del control negativo}} \times 100$$

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Fracción acuosa del látex de *Brosimumutile* con alto contenido proteico

Al inicio del estudio se sometió el látex diluido en agua destilada (1:1)(Mxi), por un proceso de purificación con el fin de obtener una fracción acuosa rica en proteínas como lo reporta la literatura (33),(25). Como resultado se obtuvo una fracción acuosa (Sob) con una concentración proteica de 1696ug/ml ver en la tabla 4:

Tabla 4. Concentración proteica de las muestra con diálisis y sin diálisis

Muestra	Sin diálisis ug/ml	Con diálisis ug/ml
Muestra látex +agua destilada (1:1)	3932,2	3876,6
Sobrenadante	1696,1	812,7
Sedimento	7823,8	6721,1

Al inicio del experimento se obtuvieron tres muestras las cuales se sometieron al proceso de purificación por diálisis, sin embargo para tener un panorama más amplio y crítico del contenido proteico del látex se decidió separar alícuotas de cada una de las muestras previo al proceso de diálisis. Todas las muestras se sometieron al ensayo colorimétrico Bradford.

Las muestras mostraron un alto contenido proteico en el látex como se reporta en estudios previos. Aunque la literatura no muestra estudios específicos que reflejen el contenido proteico del látex de *Brosimumutile*, se tomó como referencia los estudios realizados en el látex de *Calotropis procera* que refleja un contenido proteico de 8.85 mg/ml en la fracción acuosa (33), lo que refleja similitud con la concentración de proteínas del sobrenadante dializado (Sob-d) del presente estudio. Por otro lado cabe señalar que las muestras después del proceso de diálisis pierden contenido proteico como se muestra en la tabla 4.

Es relevante resaltar la alta concentración proteica que refleja el sedimento, es un panorama de controversia ya que después de una vigorosa extracción de proteínas por medio de centrifugación, se debe suponer que el sedimento con o

sin diálisis (Sed y Sed-d) carece de contenido proteico, sin embargo los resultados muestran lo contrario. Por otro lado se reporta que el método colorimétrico bradford tiene interferencias por cationes como el sodio, potasio y carbohidrato, y se refleja en concentraciones proteicas falsas. Este sesgo sugiere que la elevada concentración de proteínas en el sedimento puede deberse a carbohidratos, sodio y potasio contenidos en la muestra. Sin embargo se piensa que después de un proceso de diálisis la cantidad de moléculas pequeñas e iones disminuyen, evento que no se ve reflejado en nuestros resultados ya que el sedimento después del proceso de diálisis muestra menos concentración pero aun sigue estando por encima de la concentración superior de la curva de calibración (500µg/ml).

5.2 Perfil proteico parcialmente purificado

Cuando se realizó la cuantificación de proteínas, se generó un sesgo por interferencias por moléculas presente en las muestras sedimento sin diálisis y con diálisis (Sed y Sed-d), por lo cual se vio la necesidad de realizar una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodesil sulfato de sodio (SDS-PAGE), con el objetivo de corroborar la interferencia por compuestos del sedimento con el reactivo de Bradford y descartar la concentración proteica elevada. Por otro lado se determinó el perfil de proteínas de la fracción acuosa (Sob).

Electroforesis en gel de proliacrilamida (SDS-PAGE) de las muestras

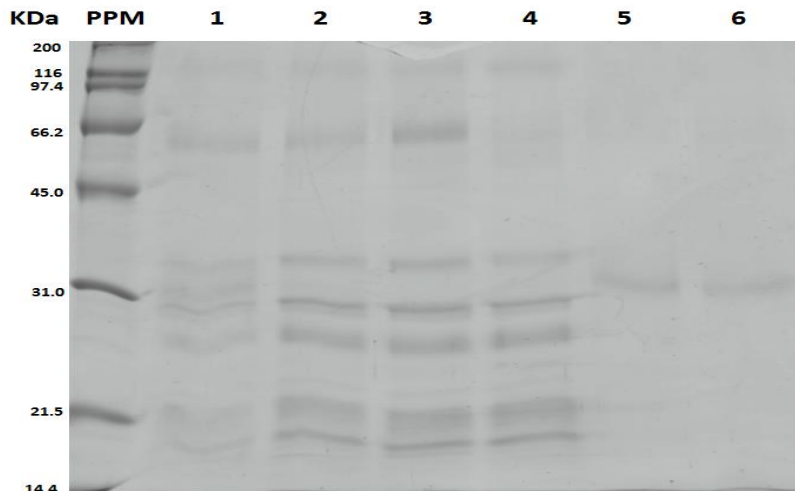


Figura 1: Electroforesis en gel de poliacrilamida (12.5 %).
 1 Mxi: Muestra inicial (látex + agua destilada)(1:1) sin diálisis
 2 Mxi-d: Muestra inicial (látex + agua destilada)(1:1) con diálisis
 3 Sob: Sobrenadante sin diálisis
 4 Sob-d: Sobrenadante con diálisis
 5 Sed: Sedimento sin diálisis
 6 Sed: Sedimento con diálisis

Fuente: esta investigación

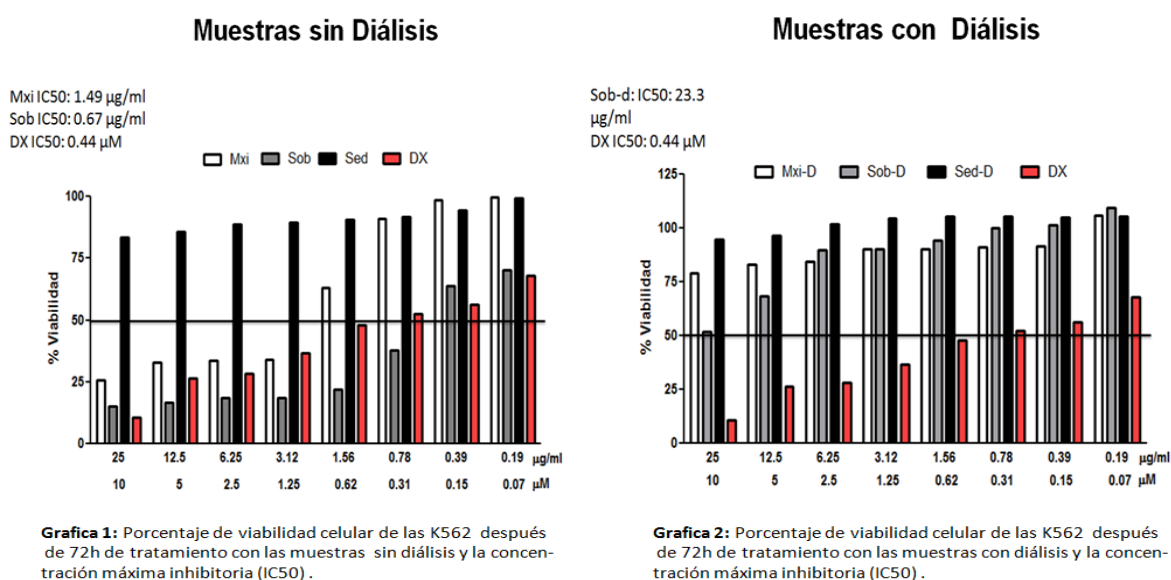
En primera instancia el gel reveló que el sedimento carecía de proteínas, ya que no hubo presencia de bandas en los carriles del sedimento sin y con diálisis (Sed y Sed-d) excepto por una banda apenas visible de proteínas de 31.0 Kda ausente en las otras muestras, lo cual sugiere que son proteínas insolubles y por tal motivo lleva a pensar que durante el proceso de centrifugación por sus propiedades apolares no se pudieron aislar en el sobrenadante.

Por otro lado se muestra que durante el proceso de diálisis se perdieron proteínas, ya que en el carril de las muestras sin dializar se visualizaron bandas que estaban ausentes, en las muestras después de la diálisis ver figura 1.

5.3 La fracción proteica del látex solo tiene actividad citotóxica sin dializar.

Para este experimento se evaluaron seis muestras a concentración 0.19-25.0 µg/ml de proteína, de las cuales solo tres (Mxi sin diálisis, Sob con y sin diálisis) mostraron actividad citotóxica sobre la línea celular K562. En las graficas 1 se muestran los resultados de la evaluación de las muestras sin dializar a concentraciones 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 y 0.19. En la gráfica 2 se muestra los resultados de las muestras después de la diálisis a las mismas concentraciones.

Efecto citotóxico de las muestras sobre células K562



Fuente: esta investigación

Se observó una significativa supresión de crecimiento celular dada por las proteínas contenidas en el látex de *B. utile*, solo antes de la diálisis y de manera dosis dependiente. Los valores de IC₅₀ después de 72h de tratamiento se encuentran en la grafica 1 y 2. Esto podría sugerir que además de las proteínas, podrían existir otros metabolitos secundarios de peso molecular inferior a 7000

daltons que presentan actividad citotóxica y que se pierden con el proceso de la diálisis.

Este resultado genera controversia con los resultados mostrados por Oliveira et.al, donde nos muestran una fracción acuosa rica en proteína (LP) del látex de *Calotropis procera* sucesivamente dializada por 3 días presenta alta citotoxicidad sobre la línea celular HL-60 dosis dependiente con IC₅₀ 0.86µg/ml (24). En el presente estudio se mostró que la fracción acuosa con diálisis (Sob-d) pierde su concentración proteica durante el proceso (datos mostrados en la tabla 4 y figura 1 y además posiblemente otros metabolitos, lo que con lleva a una disminución de la actividad citotóxica (datos mostrados en la gráfica 2). Estos resultados sugieren que las proteínas de alto peso molecular posiblemente no presentan actividad citotóxica en células K562, y resta a evaluar cuál es la naturaleza química de los compuestos de bajo peso molecular que se pierden durante el proceso de extracción los cuales podrían ser alcaloides, taninos o flavonoides.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Una vez realizado este estudio para la obtención de una fracción acuosa rica en proteínas del látex de *Brosimum utile* con actividad citotóxica en la línea celular K562 (Leucemia mieloide crónica), obtenidos y analizados los resultados se concluye lo siguiente:

- El látex de *Brosimum utile* especie de la familia Moraceae, tiene proteínas que se cuantificaron por el método de Bradford y se identificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% (SDS-P), al igual que lo que ha sido reportado en la especie *Calotropis procera* de la familia Apocináceas donde identificaron un alto contenido proteico en el látex.
- Las muestras dializadas y sin dializar obtenidas a partir del látex de *Brosimum utile* presentan actividad detectable, siendo la fracción sin dializar la que presenta mayor actividad. Estos resultados son contrarios a los

encontrados por Oliveira et al, quien describe que las muestras dializadas presentan actividad citotóxica.

- La muestra de látex diluido en agua destilada (1:1) sin dializar (Mxi), mostro alta actividad citotóxica sobre las K562, lo cual nos lleva a pensar que éste contiene metabolitos secundarios de bajo peso molecular con alta citotoxicidad en esta línea celular, pero se pierden con el proceso de diálisis.

Teniendo en cuenta los datos arrojados en este estudio a futuro se recomienda:

- Evaluar las moléculas de bajo peso molecular extraíbles en agua y además evaluar los metabolitos secundarios extraíbles en solventes orgánicos que pueden estar presentes en el látex.
- Se debe continuar con la caracterización de estas proteínas, y realizar un estudio detallado a nivel molecular de la actividad biológica que ejecutan sobre las células K562 para generar citotoxicidad.
- Los hallazgos de este estudio pueden considerarse como línea de base para dar inicio a estudios sobre la fitoquímica (metabolitos primarios y secundarios) del látex de *Brosimum utile*, los cuales pueden tener actividad biológica sobre células tumorales de varios tipos de cáncer, y a largo plazo lograr identificar diversas moléculas con actividad antitumoral que podrían ser una alternativa terapéutica para diversos cáncer menos agresivos y aportar nuevos conocimientos.
- De forma complementaria no solo se debe considerar el estudio como aporte al conocimiento científico, o como posible alternativa terapéutica, si no, también el rescate tanto del conocimiento ancestral de las comunidades indígenas, como la de esta especie "*Brosimum utile*" la cual se encuentra en riesgo extinción, en Colombia.

- Finalmente, este estudio abre paso a la investigación interdisciplinaria e incluso intercultural, en el campo de la medicina, llevando a un dialogo de saberes entre el sistema de salud de la medicina tradicional indígena con la academia y el paradigma de investigación occidental. En un marco de respeto a la diversidad de saberes, pero también en el marco de un verdadero aprovechamiento de ellos para el mejoramiento de calidad de vida de la humanidad.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Peña A, Paco O. Medicina alternativa: intento de análisis. An Fac med. 2007;68(1):87-96.
2. Waisman I. Medicinas alternativas: entre el entusiasmo acrítico y el escepticismo desinformado. Archivos argentinos de pediatría. 2009;107(4):293-5.
3. Colombia UNd. Sande. Available from: <http://www.mademaz.com/files/sande.pdf>.
4. Chatterjee U, Bose PP, Dey S, Singh TP, Chatterjee BP. Antiproliferative effect of T/Tn specific Artocarpus lakoocha agglutinin (ALA) on human leukemic cells (Jurkat, U937, K562) and their imaging by QD-ALA nanoconjugate. Glycoconjugate journal. 2008;25(8):741-52.
5. Ferrari F, Monache FD, Suárez AI, Arvelo F, Compagnone RS. New cytotoxic isoflavone from the root bark of Brosimum utile. Natural Product Research. 2005;19(4):331-5.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
7. Mattson PC. Fisiopatología, Salud- enfermedad :un enfoque conceptual. 7ª, editor.
8. Leukemia AM. Acute myeloid leukemia. platelets. 2010;50:20.
9. Cáncer [Internet]. 2013. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
10. Balam G. Acerca de la medicina tradicional 1982 [18]. Available from: <http://www.juridicas.unam.mx/publica/librev/rev/nuant/cont/19/cnt/cnt9.pdf>.
11. Ministerio de Salud y Protección Social INdCEy. Plan Nacional para el Control del Cáncer en Colombia2012 [cited 2013:[1-85 pp.].
12. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos J, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyesis. Cancerologia. 2007;2:95-107.
13. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. Nature Reviews Cancer. 2007;7(6):441-53.
14. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. Hematology/oncology clinics of North America. 2009;23(4):655-74.

15. Szczepański T, Harrison CJ, van Dongen JJ. Genetic aberrations in paediatric acute leukaemias and implications for management of patients. *The lancet oncology*. 2010;11(9):880-9.
16. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(8):804-15.
17. McKenzie SB. *Hematología clínica*. 2ª ed. Mexico 2000.
18. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood*. 2004;103(11):4010-22.
19. Leucemia mieloide aguda en adultos: Tratamiento [Internet]. 2013. Available from: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/leucemia-mieloide-adultos/Patient/page1>.
20. Fernández-Távora L, García D. Inmunoterapia Cluster con extractos de pólenes: estudios de tolerancia, cambios inmunológicos y eficacia clínica. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*. 1991;6(suppl 1):69-74.
21. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(1):59-73.
22. Michael Murray TB, Joseph E. Pizzorno y Paul Reilly. La curación del cáncer: Métodos naturales. In: Book R, editor. 2004. p. 229-30.
23. Laza Loaces D, Rodríguez Luis I, Sardiña Cabrera G. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2003;8(3):0-.
24. Castañeda DM, Pombo LM, Urueña CP, Hernandez JF, Fiorentino S. A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12(1):38.
25. Soares de Oliveira J, Pereira Bezerra D, Teixeira de Freitas CD, Delano Barreto Marinho Filho J, Odorico de Moraes M, Pessoa C, et al. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Toxicology in vitro*. 2007;21(8):1563-73.
26. Oliveira JS, Costa-Lotuf LV, Bezerra DP, Alencar NM, Marinho-Filho JDB, Figueiredo IST, et al. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins

from *Calotropis procera*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2010;382(2):139-49.

27. Salud OMdl. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Organización Mundial de la Salud Ginebra; 2002.

28. Salud OMdl. Definición medicina tradicional 2013. Available from: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.

29. Salud OPd. Medicina indígena tradicional y medicina convencional 2006. Available from: <http://www.bvsde.paho.org/bvsapi/e/proyectreg2/paises/costarica/medicina.pdf>.

30. Carvajal S. Moraceae. 2007.

31. Rivera-Parada LL. Caracterización fitoquímica, farmacéutica y alimenticia de Papa culebrera india (*Dracontium spruceanum* (Schott) GH Zhu, Araceae) y Sande (*Brosimum utile* (Kunth) Oken, Moraceae) del Jardín Botánico de Plantas Medicinales del CEA de CORPOAMAZONIA, Mocoa, Putumayo”.

32. Agrawal AA, Konno K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2009;40:311-31.

33. Freitas CDT, Oliveira JS, Miranda MRA, Macedo NMR, Sales MP, Villas-Boas LA, et al. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2007;45(10):781-9.

34. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry.* 1997;69(2):581-93.

ANEXOS

Preparación de reactivos

Electroforesis en Gel de Poli(acrilamida con Dodesil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)			
Reactivos	Preparación	Reactivos	Preparación
Acrilamida Bis 30%	Acrilamida 29,1g	Buffer de Cor	Buffer de corrido 5X 80ml
	Bisacrilamida 1g		Agua MilliQ 320 ml
	Agua MilliQ 100 ml	Patrón de Pe	Buffer laemli 950 ul
Buffer Tris HCL 1,5 M pH 6.8	Tris base 3g		B- mercapto 50 ul
	Agua MilliQ 40 ml	Solución Fija	Etanol 31.25 ml
Buffer Tris HCL 1,5 M pH 8.8	Tris base 9.075g		Agua MilliQ 30ml
	Agua MilliQ 40 ml	Solución Tinc	Sulfato de amonio 10.625g
Dodecilsulfato Sódico (SDS)	Dodecilsulfato sódico 2.5g		Agua MilliQ 41.25 ml
	Agua MilliQ 25 ml		Acido fosforico 1.875 ml
Buffer de Corrido 5X pH 8.3	Tris base 15.1g		Etanol 20.6 ml
	Glicina 72 g	Colorante Az	Azul Brillante Coomassie G-2
	SDS 2.5 g		Etanol 0.8 ml
Persulfato de Amonio 10%	Persulfato NH4 0.05g		
	Agua MilliQ 500 ul		
Buffer Carga Reductor	Tris 6.8 0.5M 7 ml		
	Glicerol 3 ml		
	SDS 1.028g		
	Azul bromofenol 1.2mg		
	Ditiotreititol (DTT) 0.465 g		
Gel de Corrido 12.5%	Agua MilliQ 1.44 ml		
	Acrilamida Bis 30% 2.07 ml		
	Tris 8.8 1.25 ml		
	SDS 10% 50 ul		
	Persulfato de amonio 25ul		
Gel de Concentrador 4%	Agua MilliQ 1.7 ml		
	Acrilamida 415 ul		
	Tris 6.8 315%		
	SDS 10% 25ul		
	Persulfato de amonio 25ul		
	Temed 5 ul		

Método de Bradford	
Reactivos	Preparación
Colorante de Bradford	Azul Brillante de Coomassie G-250 3 ml
	Agua destilada (H2O _d) 12 ml
Ensayo por MTT	
Reactivos	Preparación
Doxorrubicina	Doxorrubicina 5 ug/ml
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) 1mg/ml