

Actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* del extracto acuoso de *Phyllanthus comosus*

In vitro cytotoxic and antiproliferative activity of an aqueous extract from *Phyllanthus comosus*

Gloria del Carmen del Barrio Alonso^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-5758-8595>

Luis F. Morier Díaz¹ <https://orcid.org/0000-0002-9502-347X>

Raúl Jorge Marrero¹ <https://orcid.org/0000-0001-9641-3376>

¹Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Departamento de Microbiología y Virología. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: gbarrio@fbio.uh.cu

RESUMEN

Introducción: Desde los inicios de la medicina antigua, las plantas han sido utilizadas como tratamiento en diversas enfermedades incluyendo las de naturaleza infecto-contagiosa y el cáncer. Son numerosos los informes sobre las propiedades biológicas del género *Phyllanthus*.

Objetivo: Evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa de un extracto acuoso de *Phyllanthus comosus* en tres líneas celulares, dos de origen tumoral (SiHa y HeLa) y una no tumoral (Vero).

Métodos: La actividad citotóxica se evaluó mediante el método del MTT y la capacidad antiproliferativa mediante el ensayo de detección de inhibición de colonias o clonogénico. Se tuvieron en cuenta valores como la concentración citotóxica media (CC₅₀), índice selectivo y porcentaje de disminución de la proliferación celular.

Resultados: En el ensayo de citotoxicidad se obtuvieron CC₅₀ similares para ambas líneas tumorales; mientras que el valor para la línea Vero resultó tres veces menos tóxico, con valores de índice de selectividad mayor que tres. El ensayo clonogénico demostró inhibición de la proliferación en las líneas tumorales,

mientras que en células Vero no se observó inhibición de la capacidad de formación de colonias.

Conclusiones: El extracto de *P. comosus* es más citotóxico para las líneas tumorales SiHa y HeLa que para las células Vero, no tumorales. Además, la inhibición de la formación de clones celulares en ambas líneas tumorales evidencia su acción antiproliferativa y selectiva, lo que argumenta su potencialidad antitumoral *in vitro*

Palabras clave: antiproliferativo; antitumoral; citotoxicidad; ensayo clonogenico; *Phyllanthus comosus*.

ABSTRACT

Introduction: Ever since the onset of ancient medical practice, plants have been used to treat a variety of conditions, including infectious communicable diseases and cancer. A large number of reports are available about the biological properties of the genus *Phyllanthus*.

Objective: Evaluate the cytotoxic and antiproliferative activity of an aqueous extract of *Phyllanthus comosus* on three cell lines: two of tumoral origin (SiHa and HeLa) and one of non-tumoral origin (Vero).

Methods: Cytotoxic activity was evaluated by the MTT method, and antiproliferative capacity by colony inhibition detection or clonogenic assay. Mean cytotoxic concentration (CC₅₀), selective index and cell proliferation reduction percentage were some of the values taken into account.

Results: The cytotoxicity assay obtained similar CC₅₀ values for both tumor cell lines, whereas the value for the Vero line was three times less toxic, with a selectivity index above three. The clonogenic assay revealed proliferation inhibition in the tumor cell lines, whereas no inhibition of colony forming capacity was observed in Vero cells.

Conclusions: The *P. comosus* extract is more cytotoxic for tumoral cell lines SiHa and HeLa than for non-tumor Vero cells. Additionally, inhibition of the formation of cell clones in both tumor cell lines is evidence of its antiproliferative and selective action, substantiating its *in vitro* antitumor potential.

Keywords: antiproliferativo; antitumor; citotoxicidad; ensayo clonogenico; *Phyllanthus comosus*.

Recibido: 29/01/2021

Aprobado: 04/05/2021

Introducción

La medicina tradicional de los pueblos ha acumulado un vasto conocimiento acerca de los beneficios que representa para la salud humana el empleo de productos naturales de diversos orígenes en la cura de numerosas enfermedades incluyendo las de naturaleza infecto-contagiosa y el cáncer; tanto es así que más del 60 % de los fármacos disponibles para la terapia del cáncer se derivan de productos naturales o se encuentran relacionados con ellos.⁽¹⁾

El cáncer cérvico-uterino es uno de los más importantes problemas para la salud mundial, constituyendo la cuarta causa más común de cáncer en las mujeres. En 2018, fueron reportados 570 000 nuevos casos y alrededor de 311000 muertes relacionadas a este; afectando fundamentalmente a mujeres entre los 50 y 60 años de edad.⁽²⁾ Este tipo de cáncer es provocado en muchas ocasiones por *Papillomavirus* tipo 16 o tipo 18.⁽³⁾ Cada día son más numerosos los informes del empleo de extractos naturales en ensayos de citotoxicidad y de ensayos antiproliferativos con extractos de plantas medicinales y macroalgas que han tenido resultados relevantes sobre líneas celulares transfectadas con genes de *Papillomavirus* tipo 18 y 16, respectivamente, como HeLa (ATCC-CCL-2) y SiHa (ATCC HTB-35).^(4,5,6)

Se han descrito numerosas propiedades biológicas para el género *Phyllanthus* en el cual hay gran número de especies endémicas de Cuba. Algunas de estas han sido estudiadas en busca de propiedades anticancerígenas.⁽⁷⁾ En este sentido el presente trabajo tuvo el objetivo de evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa de un extracto acuoso de en tres líneas celulares, dos de origen tumoral (SiHa y HeLa) y una no tumoral (Vero).

Métodos

Colecta y preparación del extracto acuoso de *P. comosus*

Las plantas (hojas) de la especie *P. comosus* fueron colectadas en la zona de Yamanigüey, municipio de Moa, Holguín, Cuba, en abril del 2015. Se procedió a la identificación taxonómica por la doctora *Banessa Falcón*, especialista del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana y a su homologación con la especie depositada en la colección Vaucher del Jardín Botánico Nacional de Cuba con el número de herbario 1651.

El extracto acuoso se preparó y liofilizó como fue descrito previamente por del *Barrio y Parra*.⁽⁷⁾ Brevemente, las hojas fueron secadas a 50 °C durante tres días y posteriormente molidas (molino de aspa de 8 pulgadas, marca Christy & Norris

LTD, con malla 2 mm.). A partir de dicho material seco y molido (100g) se realizó una extracción acuosa 1:10 (P/V) en agua destilada y agitada durante 4h en baño María a 70 °C. La suspensión resultante se filtró y centrifugó a 10 000 r.p.m. durante 20 min en centrífuga Beckman J21B con el rotor JA21. El sobrenadante fue liofilizado (Liofilizadora EdwardsHigh Vacuum B.O.C.Crawley England) y se conservó a temperatura ambiente hasta su uso.

Líneas celulares y medios de cultivo

Las líneas celulares utilizadas para este estudio fueron: línea celular de cáncer de cérvix uterino humano SiHa (ATCC® HTB-35™) la cual tiene integrada una o dos copias del genoma de Papillomavirus-16 (HPV-16); línea celular de cáncer de cérvix uterino humano HeLa (ATCC® CCL-2™) la cual tiene integrado una o dos copias del genoma de Papillomavirus-18 (HPV-18), línea continua de riñón de mono verde africano adulto Vero (ATCC® CCL- 81™). Las células fueron cultivadas en medio Medio Mínimo Esencial con 1 % de solución de aminoácidos no esenciales y 2 mM glutamina (Gibco™) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino inactivado por calor (SFBI) (Gibco™). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmosfera de CO₂ al 5 %.

Ensayo de citotoxicidad

Las tres líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Costar) a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/mL e incubadas a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 48-72 h. Cuando las células alcanzaron un 90 % de confluencia, el medio se eliminó y se añadieron 100 µL del extracto acuoso de *P. comosus* disuelto en medio de cultivo sin suplementar, a diferentes concentraciones (5 000; 2 500; 1 250; 625; 300; 150; 75 y 37,5 µg/mL). Se incluyeron como controles negativos del ensayo 6 pocillos a los cuales se adicionó medio sin extracto. Como control positivo se empleo Cisplatino (Sigma-Aldrich). Tras 48 h de incubación a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂, se añadió la solución de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5 diphenyltetrazoliumbromide (MTT) a una concentración final de 0,5 mg/mL, incubándose durante 4 h para la producción de formazán. El precipitado sólido se disolvió con dimetilsulfóxido (Sigma) y se determinó la absorbancia a 544 nm en un espectrofotómetro lector de placas multipozos Fluostar OPTIMA®) con el programa integrado Dynex Revelation 4.02.

La proporción de células sobrevivientes se calculó como la (absorbancia de las células tratadas/la absorbancia del control) x 100. Se construyeron curvas dosis-respuesta para obtener los valores de CC₅₀.

Índice selectivo

Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica en las líneas celulares cancerígenas o de origen tumoral se calculó el Índice selectivo utilizando la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{CC50 \text{ células no cancerígenas}}{CC50 \text{ células cancerígenas}}$$

Se consideró IS mayor que 1, indicativo que la sustancia es más citotóxica para las células cancerígenas que para las células no cancerígenas, menor a 1 cuando el efecto antiproliferativo para las células no cancerígenas supera al efecto en células tumorales.⁽⁸⁾

Ensayo clonogenicidad

Para evaluar la actividad antiproliferativa del extracto de *P. comosus*, se utilizó el ensayo clonogénico descrito por Piloto- Ferrer con algunas modificaciones.⁽⁹⁾ Para ello se sembraron 3×10^3 células/mL de las tres líneas celulares en placas (Costar) de 12 pocillos en medio Medio Mínimo Esencial con 1 % de solución de aminoácidos no esenciales y 2 mM glutamina (Gibco™) suplementado con 10 % de SFBI (Gibco™) y fueron incubadas a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 6 h. Tras la adhesión de las células se adicionaron 1,5 mL de extracto a tres concentraciones no citotóxicas, 150; 75 y 37,5 µg/mL (2 pocillos para cada concentración). Fueron incluidos controles celulares a los que se les adicionó medio sin extracto. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂. El experimento se realizó dos veces por duplicado.

Tras este período se procedió a fijar y teñir las células con una solución al 1 % de cristal violeta en paraformaldehído al 4 % durante 30 min. Las placas se lavaron con agua corriente y se dejaron secar. Luego se procedió al conteo de los clones celulares empleando un microscopio invertido Miotic®. Se consideraron solo aquellos clones o colonias con más de 50 células.⁽¹⁰⁾

Procesamiento estadístico

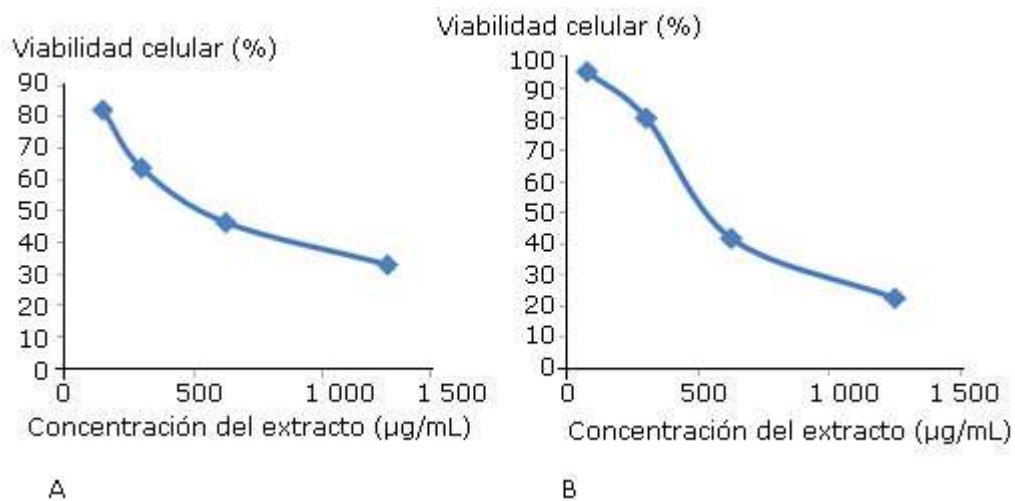
Se determinó el valor de la CC₅₀ mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis- porcentaje de viabilidad celular generada a partir de los datos experimentales. Para ello se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2013 y se consideró un valor de coeficiente de regresión

(R^2) mayor que 0,85.⁽¹¹⁾ El ensayo de citotoxicidad fue realizado 2 veces en sextuplicados.

Para comparar el efecto del extracto acuoso de *P. comosus* sobre las líneas tumorales (SiHa y HeLa) se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significación de $p = 0,0075$

Resultados

En el presente trabajo la evaluación de la citotoxicidad del extracto acuoso de *P. comosus* en las dos líneas celulares tumorales (HeLa, SiHa) se realizó mediante el ensayo de diferentes concentraciones (entre 37,5 y 5 000 $\mu\text{g/mL}$). El análisis de regresión lineal de las curvas dosis respuesta mostró para la línea celular HeLa un valor promedio de CC_{50} igual a $739,54 \pm 26,7 \mu\text{g/mL}$ y para la línea celular SiHa dicho valor fue de $741,13 \pm 12,3 \mu\text{g/mL}$ (de dos experimentos independientes). En la figura 1 se muestran los valores de uno de los dos experimentos independiente realizado por sextuplicado

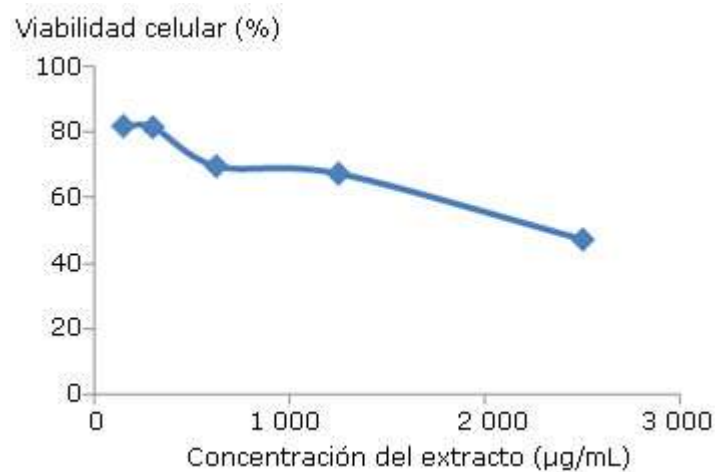


A: Línea celular SiHa. B: HeLa, determinada mediante el método del MTT. Cada valor representa la media \pm la desviación estándar de 6 pocillos por concentración. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control celular no tratado (100 % viabilidad).

Fig. 1 - Efecto citotóxico de concentraciones crecientes del extracto acuoso de *P. comosus*.

El análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas en el comportamiento citotóxico entre ambas líneas celulares para un *test* de Kruskal-Wallis $p = 0,0075$ y el valor de comparación entre estas dos líneas fue de 1.

Con la finalidad de evaluar la posible selectividad en la acción de *P. comosus* en modelos de cultivos celulares se estudió su efecto sobre la línea celular Vero, de origen no tumoral. Para ello se evaluaron las mismas concentraciones que para las líneas tumorales (37,5-5 000 µg/mL) El ensayo citotóxico mostró un valor de CC₅₀ igual a 2314,8 µg/mL el cual resultó tres veces menos tóxico que para las líneas tumorales aquí en estudio. Se aprecia que la viabilidad celular se mantiene por encima del 100 % o muy cercano a este para concentraciones que fueron tóxicas en las líneas tumorales estudiadas, incluida la concentración de 300 µg/mL. El comportamiento de la viabilidad en las células Vero se muestra en la figura 2



Cada valor representa la media ± la desviación estándar de 6 pocillos por concentración. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control celular no tratado (100 % viabilidad).

Fig. 2 - Efecto citotóxico de concentraciones crecientes del extracto acuoso de *P. comosus* en la línea celular Vero determinada mediante el método del MTT.

Los valores de IS obtenidos al comparar el efecto citotóxico del extracto en estudio en líneas tumorales (HeLa y SiHa) con respecto a las células Vero, no tumoral, fueron 3,1 para ambas (Tabla 1).

Tabla 1 - Actividad citotóxica (CC₅₀ ± desviación estándar) e índice de selectividad (IS) del extracto acuoso de *P. comosus* en las líneas tumorales (SiHa y HeLa)

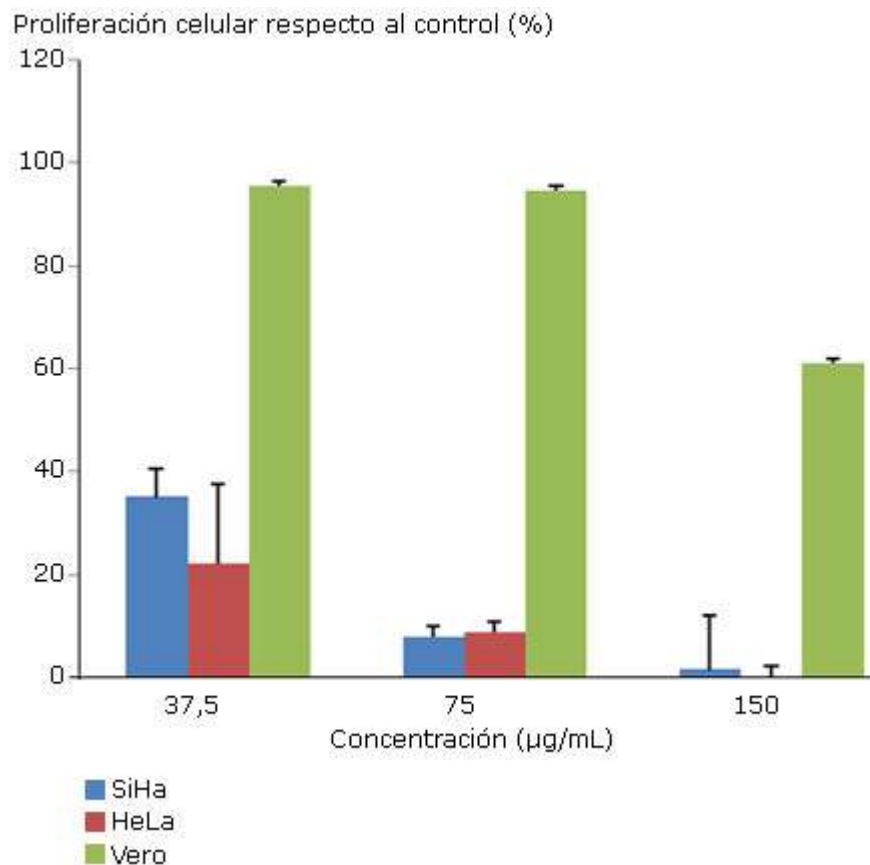
Línea celular	CC ₅₀ (µg/mL)	IS = $\frac{\text{CC}_{50} \text{ células no cancerígenas}}{\text{CC}_{50} \text{ células cancerígenas}}$
SiHa	741,13 ± 12,3	3,1
HeLa	739,54 ± 26,7	3,1
Vero	2 314,8	-

Los valores de CC_{50} del cisplatino en las células HeLa y Vero fueron de $18,8 \pm 1,2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de $20,8 \pm 0,9$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. El cisplatino utilizado como control positivo en este estudio mostró el valor más bajo de CC_{50} , lo que evidencia un efecto citotóxico, similarmente alto para ambas líneas tumorales y no tumorales.

Efecto del extracto acuoso de *P. comosus* en la inhibición de la proliferación celular mediante ensayo clonogénico

Con el objetivo de determinar si este extracto presenta potencial antiproliferativo se utilizaron diferentes concentraciones de *P. comosus* (37,5; 75; 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Después de 7 días de tratamiento, el extracto de *P. comosus* provocó en todas las concentraciones una disminución del número de colonias presentes en los pocillos correspondientes a células SiHa y HeLa, con respecto a las no tratadas o controles, como se muestra en la figura 3.



Los valores expresados en la figura representan el porcentaje de colonias presentes en cada una de las concentraciones con respecto al tratamiento control (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm desviación estándar (DE).

Fig. 3 - Efecto antiproliferativo de tres concentraciones no citotóxicas del extracto acuoso de *P. comosus* en la línea celular SiHa, HeLa y Vero.

Esta disminución fue dependiente de la concentración. Así, en la línea SiHa el efecto inhibitorio de la proliferación celular fue de 60,32 % para la concentración de 37,5 µg/mL; de 91,15 % para 75 µg/mL y de 98,39 % para 150 µg/mL. De modo similar el efecto inhibitorio o antiproliferativo en la línea HeLa fue de 77,9%; 91,3% y 100% para las concentraciones de 37 µg/mL, 75 µg/mL y 150 µg/mL, respectivamente. Sin embargo, en la línea celular Vero los porcentos de proliferación celular fueron similares al control celular no tratado. Así, un 95,49 % y 94,67 % de proliferación en las concentraciones 37, 5 µg/mL y 75 µg/mL incluso la concentración de 150 µg/mL muestra una proliferación de un 60 %.

Discusión

Desde los inicios de la medicina antigua las plantas han sido utilizadas como tratamiento por muchas culturas en diversas enfermedades, incluido el cáncer, porque son seguros, tienen menos efectos secundarios, están más disponibles y son más baratos.^(12,13) Hasta 1990, el 80 % de los medicamentos químicos aceptados eran de plantas o sus derivados.^(6,14)

La investigación sobre nuevas drogas contra el cáncer con un menor efecto colateral es una de las principales acometidas de la investigación mundial. El género *Phyllanthus* tiene una larga historia de uso popular para el tratamiento de numerosas enfermedades, y han sido utilizadas como remedios antitumorales.⁽¹⁵⁾ *P. amarus* ha sido utilizado en sistemas de medicación en China.⁽¹⁶⁾ En este contexto, el presente trabajo se dirigió a la evaluación de las propiedades citotóxicas y antiproliferativas de *P. comosus*, planta endémica cuyo género está ampliamente representado en Cuba y para el cual se han demostrado diversas actividades biológicas.^(17,18,19,20)

Los resultados aquí obtenidos demuestran que el extracto acuoso de *P. comosus* ejerce mayor citotoxicidad en líneas celulares de origen de tumor cervico uterino que poseen integrados genes de VPH 16 y 18, tales como SiHa y HeLa, con respecto a la línea Vero de origen no tumoral, evidenciado ello por los valores de CC₅₀ y el IS.

Efectos inhibitorios han sido descritos por Sumalatha y colaboradores en células humanas HT-29 con la especie *P. emblica*.⁽²¹⁾

Si bien criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, un extracto es considerado activo si tiene una CC₅₀ ≤ 30 µg/mL sobre células tumorales, también indican que un IS de 2 o más es importante ya que el compuesto es dos veces más citotóxico en líneas de células tumorales comparado

con la línea celular no tumoral,⁽²²⁾ lo cual indica selectividad en su acción y se considera de valor potencial.⁽²³⁾

Valores de Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) del cisplatino sobre los linfocitos humanos y en la línea K562 (ATCC CCL-243™) de células provenientes de una leucemia mieloide fueron de 212,81 y de 347 µg/mL, respectivamente. El índice de selectividad (IS) fue de 0,61 siendo este resultado menor que 1. Este compuesto se emplea como anticancerígeno no selectivo en la terapia del cáncer.⁽⁸⁾

Igualmente, *Purnamasari* y otros han informado valores de IC₅₀ > 653 µg/mL para el extracto de hojas de *Ficus carica* afirmando que podría inhibir el crecimiento de células cancerosas.⁽²⁴⁾

Por otro lado, en el ensayo de clonogenicidad (método de elección para determinar la muerte celular reproductiva después del tratamiento con agentes citotóxicos), se obtuvieron porcentajes significativos de inhibición de la proliferación celular en ambas líneas tumorales, SiHa y HeLa. Esta disminución fue dependiente de la concentración. Dichos valores igualmente están alejados de los obtenidos para la línea no tumoral Vero; de esta manera, se corrobora la especificidad o selectividad de dicho extracto y su importancia como posible antitumoral.⁽⁶⁾

Este es el primer estudio en el que se analiza la actividad o efecto del extracto acuoso de *P. comosus* sobre el crecimiento de células tumorales de origen cérvico-uterino.

Los resultados del presente trabajo sustentan la necesidad de ulteriores estudios para aislar la posible droga con citotoxicidad específica o selectiva, y su acción sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 en células transformadas por el Virus del Papiloma Humano (VPH). Asimismo apoya o confirma las propiedades antitumorales de las plantas medicinales y en particular las bondades del género *Phyllanthus* con propiedades biológicas de interés en medicina.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Banessa Falcón por su aporte con el material vegetal y su clasificación, para la realización de este estudio.

Referencias bibliográficas

1. Cragg GM, Pezzuto JM. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Med Princ Pract*. [Internet]. 2016 Jul [acceso: 28/05/2021];25(Suppl. 2):1-19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5588531/>
2. Nunes-Rosa M, Feijó-Evangelista A, Ferro-Leal L, Mendes de Oliveira C, Oliveira-Silva VA, Munari CC, et al. Establishment molecular and biological characterization of HCB-514: a novel human cervical cancer cell line. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Feb. 13 [acceso: 28/05/2021];9(1913):[aprox. 38 p]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-38315-7#Abs1>
3. Carter J, Saunders V. *Virology: Principles and Applications*. In: Carter J, Saunders V. *Viruses and Cancer*. Cap. 23,. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd; 2007. p. 289.
4. Lin J, Chen L, Qiu X, Zhang N, Gui Q, Wang Y, et al. Traditional Chinese medicine for human papillomavirus (HPV). *BioScience Trends* [Internet]. 2017 [acceso: 28/05/2021];11(3):267-73. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bst/11/3/11_2017.01056/_article
5. Moo-Puc R, Robledo D, Freile-Pelegrín Y. Actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de macroalgas marinas de Yucatán, México. *Cienc Mar* [Internet]. 2009 [acceso: 28/05/2021];35(4):189-98. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ciemar/v35n4/v35n4a3.pdf>
6. Yuzmazura Z, Lim WY, Nik-Fakhuruddin NH. Anticancer effects of *Clinacanthus nutans* extract toward human cervical cancer cell line, HeLa. *J Biomed & Clin Sci* [internet] 2017 jun. [acceso: 28/05/2021];2(1):11-9. Disponible en: <https://bit.ly/3JQYDPo>
7. del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(1-2):317-22.
8. Churampi D. Evaluación de la acción antiproliferativa del extracto acuoso de *Physalis peruviana L.* (Aguaymanto) en cultivos celulares de linfocitos humanos y leucemia mieloide crónica (K562). [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas E.A.P. de Genética y Biotecnología; 2016.
9. Piloto-Ferrer J, Sánchez-Lamar A, Francisco M, González ML, Merino N, Aparicio G, et al. Xanthium strumarium's xanthatins induces mitotic arrest and apoptosis in CT26WT colon carcinoma cells. *Phytomedicine*. 2019;57:236-44.
10. Li Y, Liu X, Yin A, Wei Y, Yang Q, Kong B. Huaier aqueous extract inhibits cervical cancer cell proliferation via JNK/p38 pathway. *Inter J Oncol* [Internet]. 2015 [acceso: 28/05/2021];47:1054-60. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/ijo/47/3/1054>
11. Chiang LC, Chiang W, Liu MC, Lin CC. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2003

- [acceso: 28/05/2021];52:194-8. Disponible en: <https://academic.oup.com/jac/article/52/2/194/719677?login=true>
12. Mondal S, Bandyopadhyay S, Ghosh MK, Mukhopadhyay S, Roy S, Mandal C. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. *Anti-Cancer Agents Med Chem* [Internet]. 2012 [acceso: 28/05/2021];12(1):49-75. Disponible en: <https://bit.ly/3F4ndbP>
13. Pratheeshkumar P, Son YO, Korangath P, Manu KA, Siveen KS. Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. *BioMed Res Int* [Internet]. 2015 [acceso: 28/05/2021];1-2. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/324021/>
14. Tantengco OAG, Jacinto SD. Cytotoxic activity of crude extracts and fractions from *Premnaodorata* (Blanco), *Artocarpus camansi* (Blanco) and *Gliricidia sepium* (Jacq.) against selected human cancer cell lines. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2015 [acceso: 28/05/2021];5(12):1037-41. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115002233>
15. Zheng ZZ, Chen LH, Liu SS, Deng Y, Zheng GH, Gu Y. et al. Bioguided fraction and isolation of the antitumor components from *Phyllanthus niruri* L. *Biomed Res Int*. 2016 [acceso: 28/05/2021];1-7. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/9729275/>
16. Nguyen VT, Sakoff JA, Scarlett CJ. Physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activities of crude extracts and fractions from *Phyllanthus amarus*. *Medicines* [Internet]. 2017 [acceso: 28/05/2021];4(42):2-15. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2305-6320/4/2/42>
17. Falcón-Hidalgo B, Gómez-Hechevarría JL, Fuentes Bazan S. *Phyllanthus phialanthoides* (*Phyllanthaceae*), a new species from northeastern Cuba. *Rev Jard Bot Nac* [Internet]. 2017 [acceso: 28/05/2021];38:1-6. Disponible en: <http://www.rjbn.uh.cu/index.php/RJBN/article/view/400/pdf>
18. del Barrio G, Parra F. Antiviral Activities of *Phyllanthus orbicularis*, an Endemic Cuban Species. In: Kuttan R, Harikumar Km, editors. *Phyllanthus Species: Scientific Evaluation and Medicinal Applications*. Boca Ratón: CRC Press; 2011. p. 219-33.
19. Barrio-Alonso G, Roque-Quintero A, Kouri-Cardella V, Morier-Díaz L. *Phyllanthus orbicularis* Kunth: una especie endémica cubana con potencial para la obtención de drogas antivirales. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* [Internet]. 2014 [acceso: 28/05/2021];4(2):1-8. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/139/139>
20. Valdés S, del Barrio G, Gutiérrez Y, Morier L. Evaluación preliminar de la actividad antiviral del extracto acuoso de *Phyllanthus orbicularis* frente al virus VHS-1. *Rev Cubana Med Trop*. 2003;55(3):169-73
21. Sumalatha D. Antioxidant and Antitumor activity of *Phyllanthus emblica* in colon cancer cell lines. *Int J Curr Microbiol App Sci* [Internet]. 2013 [acceso: 28/05/2021];2(5):189-95. Disponible en: <https://www.ijcmas.com/Archives/vol-2-5/D.%20Sumalatha%20et%20al.pdf>

22. Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. *Meths. Plant Biochem. Assays Bioact.* 1990;6:71-133.
23. Patel S, Gheewala N, Suthar A, Shah A. *In-vitro* cytotoxicity activity of solanum nigrum extract against HELA cell line and VERO cell line. *Intern J Pharm Pharmaceutical Sci* [Internet]. 2009 [acceso: 28/05/2021]; 1(Suppl1):38-46. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/228492173_In-Vitro_cytotoxicity_activity_of_Solanum_Nigrum_extract_against_Hela_cell_line_and_Vero_cell_line
24. Purnamasari R, Winarni D, Permanasari AA, Agustina E, Hayaza S, Darmanto W. Anticancer Activity of Methanol Extract of *Ficus carica* Leaves and Fruits Against Proliferation, Apoptosis, and Necrosis in Huh7it Cells. *Cancer Informatics* [Internet]. 2019 [acceso: 28/05/2021];18:1-7. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/332526146_Anticancer_Activity_of_Methanol_Extract_of_Ficus_carica_Leaves_and_Fruits_Against_Proliferation_Apoptosis_and_Necrosis_in_Huh7it_Cells

Conflicto de intereses

No se declara conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Gloria del Carmen del Barrio Alonso: Realizó la proyección o concepción de la investigación, elaboró el diseño experimental, dirigió la ejecución, interpretación de los resultados y discusión, y realizó la redacción del manuscrito.

Luis F. Morier Díaz: Contribuyó con el asesoramiento del manejo de cultivos celulares. Participó en el montaje y la realización experimental de diferentes ensayos evaluativos y en la interpretación de los resultados y discusión, así como en la redacción y revisión del manuscrito.

Raúl Jorge Marrero: Realizó ensayos citotóxicos y de determinación de proliferación celular, y el tratamiento estadístico. Participó en la interpretación de los resultados y discusión.