



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

***Hibiscus Sabdariffa* L. en el tratamiento de la  
leucemia**

Autor: Alejandra Sánchez García

Fecha: Julio 2020

Tutor: Karla Verónica Slowing Barillas

## INDICE

1. RESUMEN .....	3
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1 Cáncer .....	3
2.1.1 Leucemia .....	4
2.1.2 Epidemiología .....	6
2.2 <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. ....	6
2.3 Componentes del cáliz del hibisco (Roselle o Flor de Jamaica) .....	7
3. OBJETIVOS .....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
5.1 Actividad anticáncer .....	9
5.1.1 VÍA INTRÍNSECA .....	9
5.1.2 VÍA EXTRÍNSECA .....	10
5.1.3 VÍA MAPK.....	10
5.2 Estudios realizados .....	11
5.2.1 <i>Un extracto rico en antocianinas de Hibiscus sabdariffa L. inhibe la leucemia inducida por N-nitrosometilurea en ratas. (In vivo)</i> .....	11
5.2.2 <i>Extractos ricos en antocianinas de hibisco que inducen la muerte celular apoptótica en células de leucemia promielocítica humana. (In vitro HL-60)</i> .....	12
5.2.3 <i>Las antocianinas del extracto de Roselle detienen la transición de fase del ciclo celular G2/M a través de células de leucemia HL-60 deficientes en p53. (In vitro HL-60)</i> .....	13
5.2.4 <i>Delphinidin 3-sambubioside, una antocianina de Hibiscus, induce la apoptosis en las células de leucemia humana a través de la vía mitocondrial mediada por especies reactivas de oxígeno. (In vitro HL-60)</i> .....	15
5.2.5 <i>Inducción de apoptosis por el ácido protocatecuico del Hibisco en células de leucemia humana mediante la reducción de la fosforilación del retinoblastoma (RB) y la expresión de Bcl-2. (In vitro HL-60)</i> .....	15
5.2.6 <i>Síntesis de nanopartículas de oro conjugadas con extracto de flor de Hibiscus sabdariffa con efecto anti-leucemia mieloide aguda en comparación con la daunorrubicina en modelos leucémicos de roedores 2019. (In vivo)</i> .....	16

## ABREVIATURAS

- PA principio activo
- WBC white blood cells, glóbulos blancos
- HAs Hibiscus anthocyanins, antocianinas del hibisco
  
- NMU N-nitrosometilurea
- ALT alanina aminotransferasa
- AST o SGOT aspartato aminotransferasa
- RBC red blood control, control de glóbulos rojos
- Hb hemoglobina
- ROS Especies Reactivas del Oxígeno
- PARP poli(ADP)ribosa polimerasa
  
- PCV presión venosa central
- MCV volumen corpuscular medio
- MCH Hemoglobina Corpuscular Media
- MCHC concentración de hemoglobina corpuscular media
  
- MAPK mitogen-activated protein kinase
- JNK Jun N-Terminal Kinase
- ERK extracellular signal-regulated kinases
  
- ATM telangiectasis-mutated kinase, quinasa mutada por telangiectasia
- Chk cellular checkpoint kinases, quinasas de punto de control celular
- Cdc cell division cycle, ciclo de división celular
- Cdk cyclin dependent kinase, quinasa dependiente de ciclina
- CKIs cyclin-dependent kinase inhibitors, inhibidores de la quinasa dependientes de ciclina
  
- CDC2 = CDK1
- BTH Butil hidroxi tolueno

## 1. RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado la búsqueda de productos naturales y diversos PA de origen vegetal para poner en evidencia su gran potencial medicinal. Gran cantidad de plantas son estudiadas por ser potentes agentes fitoquímicos, útiles en tratamientos terapéuticos de distintas enfermedades como el cáncer a causa de su bioactividad, su gran seguridad y tolerabilidad. Estos estudios se deben, en parte, a que muchos de los fármacos de origen semi o sintético usados actualmente tienen indeseables efectos secundarios, toxicidad y farmacorresistencia.

Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado las múltiples propiedades que poseen los extractos de la planta *Hibiscus sabdariffa* L., sobre todo a nivel anticancerígeno en las leucemias. Esto se debe a la composición química de Roselle con antocianinas como el delphinidina-3-sambubiósido (Dp3-Sam) y compuestos fenólicos tipo ácido protocatecuico (PAC). Además se ha descrito el mecanismo de las diferentes vías moleculares de muerte celular o apoptosis.

Sin embargo hacen falta ensayos clínicos para poder asegurar su eficacia terapéutica en humanos y así seguir desarrollando posibles agentes quimioterápicos.

Palabras claves: *Hibiscus sabdariffa* L.; Roselle; antocianinas; polifenoles; cáncer; leucemia; apoptosis; *in vivo*; *in vitro*.

### ABSTRACT

In recent years, searches for natural products and various plant-based PAs have increased in order to prove their medicinal potential. Plants are being studied for being powerful phytochemical agents, useful in therapeutic treatments of diseases such as cancer due to their bioactivity, their great safety and tolerability. These studies are due, in part, to many of the drugs used that have side effects, toxicity, and drug resistance.

*In vivo* and *in vitro* studies have detected multiple properties of *Hibiscus sabdariffa*'s extract, especially anticancer activity in leukemias. This is thanks to Roselle's chemical composition of anthocyanins as delphinidin-3-sambubioside (Dp3-Sam) and phenolic compounds as protocatechuic acid (PAC). In addition, the mechanism of the different molecular pathways of cell death or apoptosis has been described.

However, clinical trials are needed to guarantee its therapeutic efficacy in humans and thus to follow possible chemotherapeutic agents.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L.; Roselle; anthocyanins; polyphenolic compounds; cancer; leukemia; *in vivo*; *in vitro*.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Cáncer

El cuerpo está formado por millones de células las cuales se dividen, formando los tejidos y los órganos. Cuando las células se dañan o simplemente envejecen, mueren y son reemplazadas por otras nuevas. La manera en que cada célula crece y se divide viene dado por el ADN contenido en ellas.

En algunas ocasiones, este proceso puede descontrolarse; si se produce una mutación en el ADN, se ven alterados el crecimiento y la división celular sin producirse su muerte.

Así, las células no mueren cuando deberían morir y se crean células nuevas que el cuerpo no necesita. Estas células en exceso forman el tumor que se libra de los mecanismos de defensa del sistema inmunológico. (1)

Por lo tanto el **cáncer** es una enfermedad genética que es causado por cambios en los genes que controlan la forma de cómo funcionan nuestras células, resultando en la proliferación anormal de células. (2)

Actualmente el cáncer es la **segunda causa de muerte** en el mundo con casi 9 millones de defunciones lo que se traduce en que casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad. (3)

### 2.1.1 Leucemia

La leucemia es un grupo de enfermedades malignas de la sangre, es decir, es un tipo de cáncer que afecta a las células de la sangre. Produciéndose una proliferación descontrolada de células blancas de la sangre (WBC) inmaduras. Comúnmente producido por mutaciones genéticas.

La palabra “leucemia” deriva de los términos griegos leukos – que significa blanco – y haima – que significa sangre.

Como se ve en la **Ilustración 1** Evolución de la célula sanguínea (4), en una persona sana las células madre se desarrollan y se especializan para formar las células de la sangre. Cuando en los glóbulos blancos producidos por la médula ósea aparecen defectos en el material genético, la división celular se ve alterada y no son capaces de llevar a cabo su función de manera correcta. Estas células denominadas “**células blásticas leucémicas**” se reproducen y proliferan de manera incontrolada, pero no mueren por lo que acaban invadiendo la médula ósea y desplazando a las células normales lo que impide el desarrollo normal de las células progenitoras de la sangre, y consecuentemente falta de glóbulos rojos y plaquetas; como se ve en la **Ilustración 2** (5). En ese momento hablamos de leucemia. (6)(7)

Por lo tanto dentro de la leucemia que es un cáncer de la sangre donde se afecta a los leucocitos, según la **célula comprometida** (mieloide o linfoide) se clasifica la leucemia respectivamente como mieloide o linfocítica; y en función de la **rapidez** con la que avance la enfermedad hablamos de leucemia aguda y de leucemia crónica.

Los tipos de leucemia son:

- **Leucemias agudas** donde las células son inmaduras e indiferenciadas. Manteniéndose en forma de ‘blasto’. Apareciendo la enfermedad de forma brusca y teniendo una evolución **rápida**.

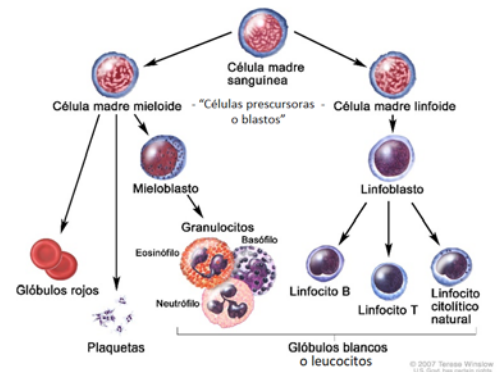


Ilustración 1 Evolución de la célula sanguínea (4)

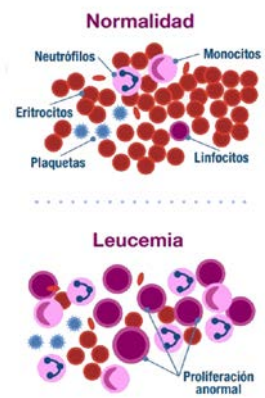


Ilustración 2 Cáncer hematológico (5)

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) y Leucemia mieloblástica aguda (LMA): en ambos tipos de leucemia aguda, la enfermedad aparece de forma brusca en la médula causando un aumento excesivo de células inmaduras e indiferenciadas “blastos” (**linfoblastos y mieloblastos**, respectivamente) que serán incapaces de cumplir con su función, aunque mantienen su capacidad de multiplicarse. Su número desorbitado desplaza a las células normales de la médula ósea ocasionando una disminución de los niveles celulares sanguíneos de: **glóbulos rojos** que causa **anemia**; **glóbulos blancos** de tipo granulocito relacionado con **neutropenia**, lo que dificulta las funciones inmunitarias quedando el paciente expuesto a infecciones u otras enfermedades; y descenso de **plaquetas** también denominado **trombocitopenia** que causará dificultades en la coagulación de la sangre. Además habrá un número elevado de células leucémicas llamadas blastos. Por lo tanto se manifiesta inicialmente en la médula ósea y se extienden rápidamente a través de la sangre.

La LLA: supone un 5% de las leucemias y en el 80% de las ocasiones afecta a las células B. Se diagnostican cada año unos 5 casos por cada 100.000 habitantes y a pesar de ser una enfermedad poco frecuente, afecta a **niños** menores de 20 años (sobre todo entre los 2 y los 10 años).

En el caso de LMA: esta enfermedad constituye el 25% de las leucemias. Se diagnostican 3-4 casos nuevos cada año por cada 100.000 habitantes. La mediana de edad en el diagnóstico es de **65 años**, por lo que su incidencia aumenta con la edad y es propia de la vejez. (1)

- Leucemias crónicas: las células sanguíneas afectadas son más maduras que en las leucemias agudas pero siguen siendo leucocitos inmaduros, que se multiplican y se acumulan más **lentamente**, pero carecen de funcionalidad, a pesar de parecerse a las células normales. (38)

Leucemia linfocítica crónica (LLC): Es una proliferación de linfocitos maduros, funcionalmente incompetentes y con la vida media alargada, que se van acumulando progresivamente (comúnmente se origina en los linfocitos B). Esto produce el desplazamiento de las células normales de la médula. A pesar de que el paciente presenta una gran cantidad de estos linfocitos, clínicamente se caracteriza por inmunodeficiencia humoral.

Supone el 40% de las leucemias y es la leucemia más común en adultos. La tasa de incidencia en el mundo occidental es de 4 casos al año por cada 100.000 personas. Y afecta sobre todo en países occidentales a personas con una edad media de **60-70 años**.

Leucemia mieloide crónica (LMC): es una enfermedad de las células madre hematopoyéticas que provoca una producción descontrolada de glóbulos blancos, que no obstante, mantienen el proceso normal de maduración, lo que hace que la enfermedad avance lentamente. Por lo tanto las células normales de la médula ósea son sustituidas por otras procedentes de una célula madre hematopoyética anormal en la que se han producido alteraciones genéticas que desencadenan su comportamiento tumoral. Y las células que proceden de esta célula madre anormal se reproducen sin control.

Esta constituye el 15% de las leucemias. Se suelen diagnosticar 1-2 casos cada año por cada 100.000 habitantes. Y la edad media de presentación es de unos **50 años**. (8)

### 2.1.2 Epidemiología

En todo el mundo en 2018 la incidencia del cáncer según los datos del SEOM era de 18.078.957 personas. Entre el total de tumores diagnosticados, la leucemia supone un 2,4% lo que significan que 437.033 la padecen. Suponiendo un 3,2% del número de fallecimientos por tumores en el mundo. (3,8)

Como se ve resumido en la **Tabla 1**, la LLA a pesar de que supone el 5% de las leucemias, afecta fundamentalmente a niños; mientras que el resto se suele diagnosticar en adultos.

Tipo de leucemia	% incidencia entre leucemias		Edad media	Casos/100.000 habitantes/año
LLA	5%		< 20 años (2-10 años)	5
LMA	25%		65 años	3-4
LLC	40%		60-70 años	4
LMC	10-15%		50 años	1-2

Tabla 1 Resumen tipos de leucemia, incidencia y su gráfico, edad media y casos

### 2.2 *Hibiscus sabdariffa* L.

*Hibiscus sabdariffa* L. familia **Malvaceae**.

Nativa de Asia (desde India a Malasia) y llevado en una fecha temprana al África tropical. (16) Sin embargo es ampliamente cultivado en muchos países en desarrollo puesto que es considerada una de las plantas medicinales más depurativas que existen.

Generalmente es conocida como **Roselle** (USA), pero también posee múltiples nombres en función del lugar como Bissap en Senegal, **Flor de Jamaica** o **Hibisco** en Guatemala y México, Congo en Francia, Wonjo en Gambia, Zobo en Nigeria, Karkade en Egipto, Saudi Arabia y Sudan, etc. (9,10)

Se cultivan dos variedades: *H. sabdariffa* var. *Altissima* “cáñamo roselli” para la obtención de fibra similar al yute. Y otra que es *H. sabdariffa* var. *Sabdariffa* que es un arbusto herbáceo anual que crece hasta los 2 m de altura. Posee hojas verdes tri o pentalobuladas, siendo las inferiores lanceoladas y las superiores palmadas; además son serradas y algunas de margen continuo, con nerviaciones de color rojizo que se disponen alternativamente en los tallos rojos cilíndricos.

Las flores son solitarias, de tallo corto, de gran tamaño (12 cm) y situadas en las axilas de las hojas; poseen pétalos amarillos o rojizos con base de color púrpura y un cáliz rojo concrecente en su mitad inferior, carnoso, con forma de copa, constituido por 5 sépalos grandes. El epicáliz está formado por 8 a 12 pequeñas brácteas delgadas y puntiagudas, adheridas a la base del caliz. (11,12)

[Ilustración 3 Roselle en estado de floración \(13\)](#)

En la Real Farmacopea Española se incluye la droga *Hibisci sabdariffae flos*: “cáliz o cálculo desecados, enteros o fragmentados de *Hibiscus sabdariffa* L. recolectados durante el periodo de fructificación”. Debe contener como **mínimo un 13,5% de ácidos** expresado como ácido cítrico (droga desecada). Se utilizan por tanto las flores (cáliz y epicáliz), aunque en ocasiones se emplean las hojas y otras partes de la planta. (11)





Variando el contenido total de antocianos entre 0,3% y un 2,4% en función de la zona de cultivo. Ver **Tabla 2** (17)

Cancer cell line	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) <sub>b</sub>						Dox.
	Leaves			Calyces			
	Poultry litter	Organo <sup>c</sup>	Control	Poultry litter	Organo <sup>c</sup>	Control	
Leukemia (K-562)	43.20	nd	49.9	1.16	0.12	2.24	0.06

Tabla 2 Comparativa del IC<sub>50</sub> del extracto metanólico de *H.Sabdariffa* L. en hojas y en cálices contra líneas celulares cancerígenas humanas (17)

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. contienen proteínas, grasas, carbohidratos, ácidos, minerales, vitaminas, fitosteroles, aceite esencial, flavonoides, etc. (10)

Pero son usados en medicina tradicional por ser ricos en principios activos cuya composición química destaca su contenido en:

- Un 15-30% de **ácidos orgánicos**: ácidos cítrico, málico, tartárico, ácido hibísico. En cuanto a los **ácidos fenólicos** son el ácido protocatéquico (PAC), o-coumárico, etc.
- Un 1,5% de **antocianos**: 70-85% de delfinidina-3-sambubiósido (Dp3-Sam, hibiscina), 29% de cianidin-3-sambubiósido y otros componentes minoritarios. Responsables del color rojo característico y de la actividad antioxidante de la droga. La importancia del cáliz de roselle reside principalmente en su contenido de antocianinas (2.52 g/100 g).
- Se encuentran otros polifenoles como **flavonoides** (quercetina, miricetina, hibiscetina, etc), **polisacáridos** mucilaginosos y pectinas, trazas de aceite esencial, fitosteroles y sales minerales. (11–13)

La eficacia terapéutica reside en sus componentes bioactivos: antocianinas (HAs), polifenoles (flavonoides) y ácidos fenólicos (PCA). Antocianos como el Dp3-Sam y el ácido protocatéquico (PAC) han mostrado actividad antipromotora tumoral e inductora de apoptosis en células leucémicas humanas.

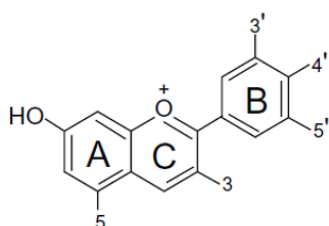


Ilustración 4 Estructura química de un antociano y sus tipos

	3'	4'	5'	3	5
<b>Anthocyanin</b>					
Cyanidin-3-sambubioside	OH	OH	H	2-O-β-D-xylosyl-D-glucose	OH
Cyanidin-3-glucoside	OH	OH	H	Glucosyl	OH
Delphinidin-3-sambubioside	OH	OH	OH	2-O-β-D-xylosyl-D-glucose	OH
Delphinidin-3-glucoside	OH	OH	OH	Glucosyl	OH
Cyanin	OH	OH	H	Glucosyl	Glucosyl
Malvin	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Glucosyl	Glucosyl
<b>Anthocyanidin</b>					
Delphinidin	OH	OH	OH	OH	OH

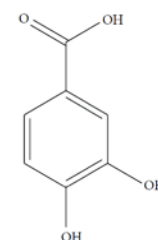


Ilustración 5 Estructura química de Ácido protocatéquico (PAC)

### 3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es recabar información para demostrar que los **extractos** de la planta medicinal *Hibiscus sabdariffa* L. podrían ser un potente agente quimioterápico en el tratamiento de la leucemia por su efectividad y seguridad, cuya propiedad anticancerígena ha sido demostrada en múltiples estudios *in vivo* e *in vitro*. Además de elucidar los principales **mecanismos moleculares** que dan lugar a la apoptosis de las células cancerígenas. Con todo ello, deberían ser evidencias considerables para plantearse la realización de **ensayos clínicos** en humanos.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo es reflejo de una revisión bibliográfica realizada, principalmente, a través de la búsqueda de artículos en: Elsevier, PubMed, SciELO, Google Scholar; mediante palabras clave principalmente en lengua inglesa y prevaleciendo los artículos con fechas más actuales. Se usaron gran cantidad de artículos científicos además de otras webs de información como la del Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y otras asociaciones como aecc y aeal.

#### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 5.1 Actividad anticáncer

La apoptosis juega un papel fundamental en la eliminación de células seriamente dañadas o de células tumorales a través de agentes antitumorales y quimiopreventivo.

Las células apoptóticas revelaron características como la contracción celular, la condensación de cromatina, la fragmentación del ADN formando una escalera, la formación de ampollas en la membrana plasmática, la formación de cuerpos apoptóticos y la activación de caspasas. (18)

Las principales vías de muerte involucradas en la apoptosis son:

##### 5.1.1 VÍA INTRÍNSECA (18–22)

La **vía de muerte mitocondrial** o vía intrínseca está controlada por los miembros de la familia Bcl-2: con actividad **antiapoptótica** encontramos a **Bcl-2** y los **proapoptóticos** que serían las proteínas **Bax** y **Bid**. La función clave de los miembros de la familia de Bcl-2 es regular la liberación de factores proapoptóticos desde el compartimento intermembranal de la mitocondria (IMS) hasta el citosol, en particular el citocromo c.

Las señales pro y antiapoptóticas convergen en las membranas mitocondriales y cuando predominan las señales de muerte, los miembros pro-apoptóticos de **Bax** se unen a un complejo multiproteico conocido como “*permeability transition pore complex*” (**PTPC**) que regula la permeabilización de la membrana mitocondrial, formando por lo tanto **poros** en la membrana mitocondrial interna (IM) causando así la **permeabilización** de la membrana externa “**MOMP**” (*mitochondrial outer membrana permeabilization*) que lleva a la **disipación del potencial de membrana** y con ello al cese de la síntesis mitocondrial de ATP, a la inhibición de la cadena respiratoria agravando la sobreproducción de ROS y a la liberación al citosol de proteínas como Cyt C o el factor inductor de apoptosis (AIF) desde el espacio intermembrana mitocondrial (IMS).

Entonces se forma el **apoptosoma** cuyos componentes son: el Cyt c junto con APAF1 (proteína adaptadora citoplasmática) y dATP. Lo cual desencadena la cascada proteolítica activando la **caspa-9** y posteriormente la **caspa-3**. (Ilustración 6)

Uno de los sustratos específicos de la caspa-3 es la poli(ADP)ribosa polimerasa (**PARP-1**), cuya función es reparar el daño del ADN. La caspa 3 promueve la escisión de PARP-1 que resulta en la formación de dos fragmentos concretos que inducirán a la muerte celular o **apoptosis**.

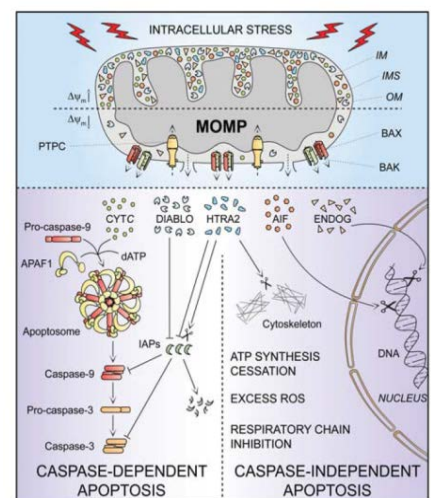


Ilustración 6 Vía intrínseca (20)

### 5.1.2 VÍA EXTRÍNSECA

La **vía del receptor de muerte apoptótico** o vía extrínseca es inducida por miembros de la familia de los receptores de muerte como es **FAS** (CD95) que en ausencia de su ligando FASL, las subunidades se ensamblan formando trímeros que se estabilizan mediante un cambio conformacional cuando se une **FASL**, lo que permite la formación de un complejo de proteínas en el citosol a través del "dominio de muerte" (*Death domain*, DD) del receptor. Entre las proteínas reclutadas en el DD de FAS se encuentran: la proteína FAS asociada a DD (*Fas-associated death domain*, FADD) y la **procaspasa 8** que constituyen ese complejo supramolecular "**complejo de señalización inductor de muerte**" (*Death-inducing signalling complex*, **DISC**) que controla la activación de la **caspasa 8** mediante la escisión proteolítica de la procaspasa 8. Entonces esta forma activa, activará a la procaspasa 3 resultando en **caspasa 3** "caspasa efectora", finalizando así con la muerte celular o **apoptosis**. (**Ilustración 7**) (18,20,22)

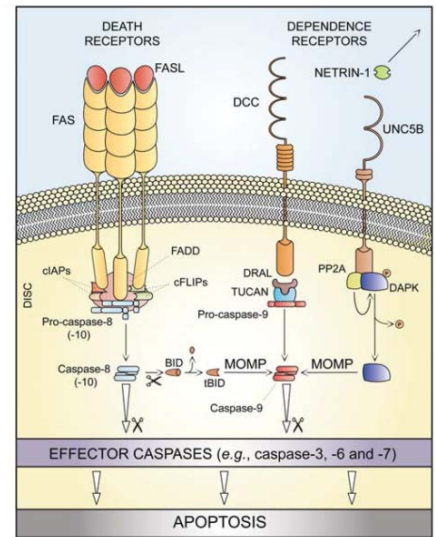


Ilustración 7 Vía extrínseca (20)

La vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial, como hemos observado, convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. El solapamiento y la integración de las dos vías se debe a **Bid**, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2.

La **caspasa-8** media la ruptura de Bid dando lugar a **tBid**, incrementando la actividad proapoptótica (**Bax**) que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del **citocromo c**.

Hay que tener en cuenta que en la mayoría de las condiciones, este solapamiento es mínimo, y las dos vías operan de manera independiente. (20)

### 5.1.3 VÍA MAPK

Además de las caspasas, también se ha comprobado que las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) median la apoptosis.

Los estímulos extracelulares son los que activan a la familia MAPK serina/treonina quinasa la cual está involucrada en cascadas de transducción de señales que regulan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. (2)

Existen 3 tipos de MAP quinasas: (2)

- Quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2)
- c-Jun quinasa N-terminal (JNK)
- quinasas activada por mitógenos p38 (p38 MAPK).

HAs induce el aumento de **p38 MAPKinasa** y la fosforilación de la proteína diana **C-Jun** que activa aún más las cascadas de proteínas apoptóticas que contienen la señalización mediada por Fas (Fas/Caspasa-8/tBid módulo de señalización), puesto que la función de c-Jun es regular la **transcripción de Fas y FasL**, esto resulta en la liberación de citocromo c de las mitocondrias que conduce a la escisión de caspasa-3 y posterior apoptosis.

Además de la **no fosforilación de ERK1/2** puesto que esta quinasa juega un papel fundamental en la vía de supervivencia y diferenciación y crecimiento celular. (13,18)

## 5.2 Estudios realizados

### 5.2.1 Un extracto rico en antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L. inhibe la leucemia inducida por N-nitrosometilurea en ratas. (In vivo) (15, 13)

Este ensayo fue el primer informe en demostrar que la administración secuencial de HAs tras la administración de NMU resulta en una actividad *in vivo* antileucémica.

Las antocianinas mostraron una actividad anticancerígena significativa en células de leucemia promielocítica humana.

Para evidenciar ese efecto antitumoral de la antocianina y por tanto su efecto protector en la leucemia, se realizó un ensayo con **ratas macho Sprague-Dawley** a las que se les indujo la leucemia con la sustancia química N-nitrosometilurea (**NMU**). En ese ensayo existía un grupo control tratados únicamente con NMU y dos grupos que tras la inyección de NMU, recibieron distintas dosis de extracto de antocianina de roselle (HA 0.1% y 0.2%) diariamente y por vía oral como suplementación en la dieta.

Tras 220 días se realiza la comprobación de los siguientes aspectos:

- a. Peso de órganos viscerales: el hígado y el bazo de las ratas expuestas a NMU estaba anormalmente agrandado, mientras que tras la administración de HAs ambos órganos aparecieron casi **normal**. Se puede observar el efecto en la **Ilustración 8** donde las flechas indican la invasión de células cancerosas en el tejido hepático. (15)
- b. Análisis bioquímicos en suero: hay que tener en cuenta que altos niveles de las enzimas **ALT y AST** liberadas en el torrente sanguíneo es un signo de daño hepático, cáncer u otras enfermedades. Por lo tanto tras la administración de NMU se incrementaron los niveles de ALT y AST; los cuales disminuyeron significativamente por el el tratamiento con HAs (0,2%). Además se examinaron los niveles de **ácido úrico** sérico puesto que es útil en la detección de hiperuricemia y en el diagnóstico de leucemia. El tratamiento de HA provocó una disminución significativa en los niveles de ácido úrico en ratas expuestas a NMU.
- c. Aspectos relacionados con la leucemia: como leucocitosis (o neutropenia), anemia o trombocitopenia. En las ratas tratadas con NMU se observó la tendencia a **anemia** por un descenso de RBC y Hb; a **trombocitopenia** por el bajo nivel de plaquetas en la sangre; así como **leucocitosis** por el incremento de los niveles de WBC. En cambio en las ratas tratadas con HAs (0,2%) se produjo el **aumento de RBC, Hb y PLT** así como el **descenso** significativo de los niveles de **WBC** entre un 30–70% de una manera dosis dependiente.
- d. Morfología citológica: en ratas tratadas con NMU se observaron células leucémicas equivalentes a glóbulos blancos inmaduros anormales; tras la administración de HAs el número y la forma de las **células sanguíneas eran normales**.
- e. Características histopatológicas: Además de agrandarse el hígado y el bazo en el grupo NMU, también se observó **infiltración de células leucémicas**; la cual fue derogada en el grupo HAs (especialmente a la dosis alta de 0.2%) por lo que el tratamiento con HA redujo la lesión tisular hepática y del bazo inducida por NMU de una manera dependiente de la dosis.









Tratamiento	Órgano	
	Hígado	Bazo
Control		
Sólo NMU		
NMU + HAs 0,1%		
NMU + HAs 0,2%		

Ilustración 8 Efecto en órganos según grupo de tratamiento (15)

De forma resumida los resultados serían: Ver **Tabla 3**

Prueba que se realiza	Resultados en rata NMU control	Resultados en rata NMU + HAs
Peso de órganos viscerales	Agrandado	Casi normal
Análisis bqcós en suero	↑ALT y AST, ↑ácido úrico	↓ALT y AST, ↓ácido úrico
Leucemia	Anemia (↓RBC, Hb) Trombocitopenia (↓PLT) Leucocitosis (↑WBC)	↑ RBC, Hb ↑ PLT ↓WBC
Morfología citológica	Células leucémicas equivalentes a glóbulos blancos inmaduros anormales	Número y forma de células sanguíneas normales
Características histopatológicas	Infiltración de células leucémicas	Sin infiltración de células leucémicas, redujo la lesión tisular

Tabla 3 Resumen de los resultados del estudio de HAs *in vivo*

Como resultado se vio que la **incidencia de leucemia se redujo en 33.3%**, es decir, **HAS 0.2% inhibió la progresión de la leucemia inducida por NMU**. A esto se le añade que la **tasa de mortalidad** de las ratas que recibieron una alta dosis de HA (0,2%) varió del 50% en el grupo NMU a un **8,3%** en el grupo tratado con HAs.

El efecto inhibitor anticancerígeno de los extractos de roselle sobre la carcinogénesis demostró que posee potencial como **agente quimiopreventivo** contra el cáncer contra la evasión de la apoptosis, la insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, la invasión de tejidos y la metástasis.

### 5.2.2 Extractos ricos en antocianinas de hibisco que inducen la muerte celular apoptótica en células de leucemia promielocítica humana. (In vitro HL-60) (18,15,13)

Las antocianinas son fitoquímicos bioactivos que poseen capacidad antioxidante (*in vivo* e *in vitro*) y funciones fisiológicas relacionadas con la supresión del cáncer.

Para comprobar el efecto antitumoral sobre el crecimiento celular se aisló antocianinas de hibisco (HAs) de la flor seca de *H. sabdariffa* L. y se utilizaron como células diana las células de leucemia promielocítica humana (HL-60) donde la citotoxicidad por HAs que sufrieron era más fuerte que la de las células normales u otras líneas celulares cuyos resultados mostraron una menor citotoxicidad.

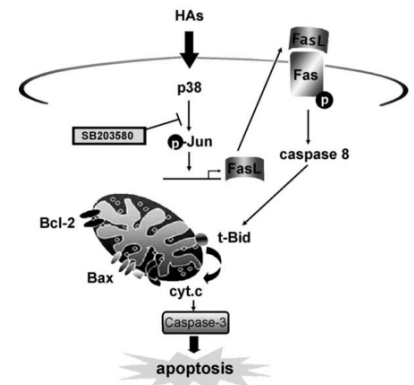


Ilustración 9 Vía mediada por HAs que induce la apoptosis en células HL-60. (15)

Estudios recientes han demostrado la vía molecular de la quimiopreención del cáncer por las antocianinas son: (i) antioxidación, (ii) mecanismos moleculares relacionados con la anticarcinogénesis y (iii) mecanismos moleculares implicados en la inducción de apoptosis en células tumorales (**Ilustración 9**), donde la activación de señales de p38 están relacionadas con la alteración de la membrana mitocondrial que resulta en la liberación de citocromo c y la activación de caspasas.

Las antocianinas inducen apoptosis en células HL-60 mediante dos principales vías de muerte celular: vía intrínseca (vía de muerte mitocondrial) y vía extrínseca (vía del receptor de muerte apoptótico). Además de la cascada de caspasas, la apoptosis estará mediada por la vía MAPK cuyo resultado es una mayor activación de la cascada de proteínas apoptóticas. (Para el desarrollo de la vía molecular, ver el apartado 5.1) (13)

El ensayo demostró que la concentración de HAs que inhibía el 50% de la viabilidad de las células HL-60, osea, **IC50 era 2,49 mg/ml**. Y si se trataban con HAs 3mg/ml durante 48 horas se conseguía un descenso del 75% en el número de células, las cuales mostraban características típicas de apoptosis. (13) Ver **Figura 1**.

Por lo tanto podemos concluir que HAs:

- Induce la apoptosis en células HL-60 de manera dependiente del tiempo y la concentración.
- Induce la activación de caspasas que lleva a la muerte celular de HL-60
- Induce la apoptosis usando mecanismos que involucran la liberación del citocromo c
- Induce la muerte en HL-60 con la activación de p38 MAPK que lleva a la inducción upstream de la activación de caspasas

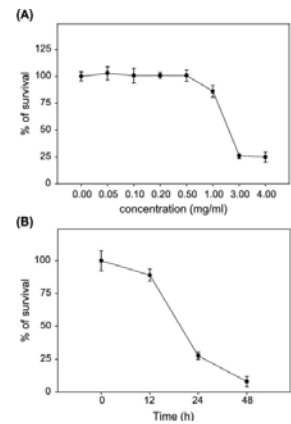


Figura 1 Inducción de la muerte celular por HAs. Células HL-60 fueron tratadas con varias concentraciones de HAs durante 24h (A) o tratadas con 3mg/ml de HAs durante los tiempos indicados (B) (18)

En resumen, HAs inhibe el crecimiento de células cancerígenas a través de la inducción de apoptosis. Demostrando una gran potencia citotóxica frente a células HL-60. (18)

### 5.2.3 Las antocianinas del extracto de Roselle detienen la transición de fase del ciclo celular G2/M a través de células de leucemia HL-60 deficientes en p53. (In vitro HL-60) (14,23)

El ciclo celular de células eucarióticas se divide en: fase M (mitosis), fase S (síntesis DNA), y las fases G1 y G2. Durante el ciclo celular, el crecimiento de las células está regulado por múltiples puntos de control, pero principalmente por un sistema de 3 proteínas:

- Ciclinas
- Ciclina dependiente de quinasas (Cdk)
- Inhibidores de la quinasas dependientes de ciclina (CKIs)

En este estudio se investigó el efecto inhibitorio de HAs sobre células humanas leucémicas HL-60 *in vitro* y sus mecanismos moleculares. (Ilustración 10)

Puesto que la inhibición de la regulación de un ciclo celular descontrolado podía ser una diana potencial para el tratamiento del cáncer donde existe un crecimiento anormal de las células.

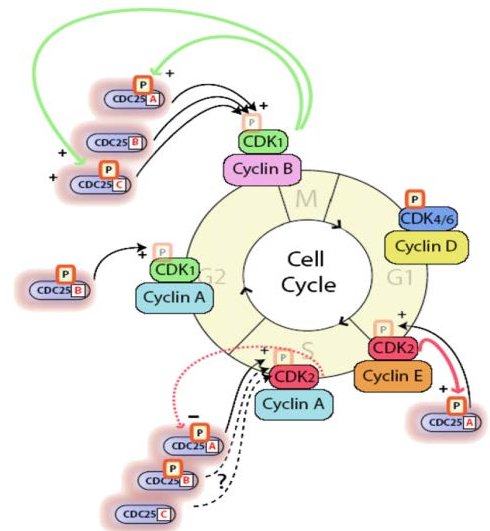


Ilustración 10 La activación de CDKs por las fosfatasa CDC25 en fases específicas del ciclo celular. CDC25 está a su vez fosforiladas y reguladas por CKs (círculos rojos y verdes) (23)

Se descubrió que HAs promueve la **detención del ciclo celular G2/M** mediante la inhibición del complejo Ciclina B1/CDK a través de la vía ATM, Chk1/2 y Cdc25C o la activación de p53 independiente de p21 y p27.

#### A. Inhibición del complejo de Ciclina B1/CDK a través de la vía ATM, Chk1/2 Y Cdc25C

- HAs incrementa la activación de **ATM/ATR** seguido de la fosforilación de la serina 139 de **H2A.X**, como parte del mecanismo que induce la detención de la fase G2/M, en respuesta al daño del ADN. Por lo que ATM/ATR fosforilan y por tanto activan a **Chk1/Chk2**, que inactivarán la actividad fosfatasa de **Cdc25C** mediante fosforilación en Ser216; este es un mecanismo regulador usado por las células para bloquear la entrada mitótica, fosforilando e inactivando la proteína CDK1. Además se produce la unión entre p-Cdc25C y la **proteína 14-3-3** que evita su localización nuclear y se translocará al citoplasma en la forma inactiva.
- HAs también induce la expresión de las proteínas **CKIs (p21 y p27)** que inhiben la actividad del complejo **ciclina B1/CDK**, cuya función es regular la transición de la fase G2 a M, manteniendo la forma inactiva por la fosforilación de residuos de CDK.

En una situación normal la transición G2/M tendría lugar mediante la eliminación del fosfato de Tyr15 por la fosfatasa Cdc25C, lo que activaría a CDK. Pero cuando se trata a la célula con HAs, se aumenta la expresión de p-CDK en las células HL-60 lo que lleva a disminuir la actividad fosfatasa de Cdc25c.

Como resultado, HAs induce la **detención de la transición de fases G2/M** de células leucémicas humanas HL-60, es decir, que aumenta la proporción de células en esta fase, con el correspondiente descenso de las células en fase G1/S. Concluyendo en la disminución de la viabilidad celular.

#### B. Activación de P53 independiente de p21 así como p27.

El supresor tumoral p53 también es la proteína clave en las vías de control, cuya activación puede conducir a la detención del crecimiento en las fases G1 y G2/M en células cancerosas.

En numerosos estudios, el efecto anticancerígeno de HAs se atribuye al aumento de la expresión de **p21** en células HL-60 (que carecen de p53). Por lo que la detención del crecimiento en la fase G2/M es mediada a través de una **vía independiente de p53**. Lo que quiere decir que la ausencia de p53 es suficiente para inducir la detención de G2/M pasando de un mecanismo **p21-dependiente a Chk-dependiente**.

**Chk2** activada puede inducir directamente la transcripción de **p21** en ausencia de la expresión de p53 y esto contribuye al **retraso del ciclo celular G2/M**.

Por otro lado, el ATM/ATR activado también induce la expresión de p21 de manera independiente de p53 a través de las proteínas **MAPK ERK**.

Ilustración 11 Modelo de los efectos anticancerígenos de HAS en células HL-60. (14)

#### 5.2.4 *Delphinidin 3-sambubioside, una antocianina de Hibiscus, induce la apoptosis en las células de leucemia humana a través de la vía mitocondrial mediada por especies reactivas de oxígeno. (In vitro HL-60) (19)*

La delphinidina 3-sambubiósido (Dp3-Sam) induce la apoptosis de manera dosis dependiente en las células de leucemia promielocítica humana (HL-60) a través de la **vía de disfunción mitocondrial** mediada por **ROS** y de la vía **p38-FasL y Bid**. (13,24)

La vía de disfunción mitocondrial se caracteriza por la morfología celular, la fragmentación del ADN, la activación de caspasa -8, -9 (iniciadoras de apoptosis) y -3 (ejecutadora), que producen finalmente la inactivación de la poli(ADP)ribosa polimerasa (PARP). (Vía desarrollada en el punto 5.1)

Además la activación de la cascada de caspasas por Dp3-Sam produce el aumento intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células HL-60. ROS actúa sobre las mitocondrias, causando la interrupción del potencial de membrana y la liberación de citocromo c, que se une a Apaf-1 y se convierte en un apoptosoma en el citosol. El apoptosoma es el que inicia la cascada de caspasas activando caspasa-9.

Un modelo alternativo implica la regulación al alza del sistema Fas/FasL, que conduce a la activación de caspasa-8 y posteriormente al resto de la cascada.

Como se ve en la **Figura 2**, Dp3-Sam inhibe la proliferación celular con un **IC50** (concentración a la que se inhibe el 50%) de valor de **75 microM** a las 24 h de tratamiento.

En diversos estudios se comprobó que la concentración efectiva de Dp3-Sam para la inducción de apoptosis parece mayor que la concentración fisiológica posible porque la concentración plasmática de antocianina es, en general, baja.

Sin embargo, también observamos la inducción de apoptosis por Dp3-Sam a 40 micras durante 12 h puede usarse para la inducción de apoptosis.

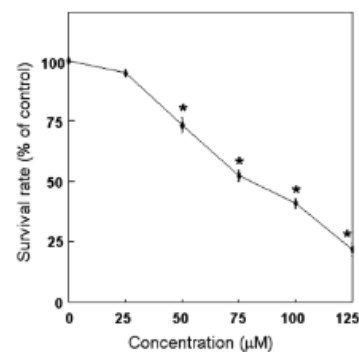


Figura 2 Dp3-Sam inhibe la proliferación de células HL-60. (19)

#### 5.2.5 *Inducción de apoptosis por el ácido protocatecuico del Hibisco en células de leucemia humana mediante la reducción de la fosforilación del retinoblastoma (RB) y la expresión de Bcl-2. (In vitro HL-60) (25)*

Hibiscus ácido protocatecuico (PCA) es un ácido fenólico que ha demostrado inhibir la acción cancerígena de varios químicos en diferentes tejidos a partir de sus potentes efectos antioxidantes y antitumorales (potencial anticancerígeno y quimioprevención).

En este estudio se comprobó que la proliferación celular, diferenciación y senescencia eran mediadas mediante la fosforilación de la proteína retinoblastoma (**RB**) cuyo estado de fosforilación varía en función del evento del ciclo celular y proliferación.

En condiciones normales la proteína RB se **hiperfosforila** transitoriamente en la fase S temprana que produce la liberación del factor de transcripción **E2F**, resultando en la transcripción de numerosos genes involucrados en la **progresión** del ciclo celular.



En células leucémicas humanas, HL-60, el tratamiento con PCA del Hibiscus induce la disminución de la hiperfosforilación de RB e incrementa su estado **hipofosforilado** que inactiva al factor E2F contribuyendo al **arresto en la fase G1**, así previene la entrada de las células HL-60 en la fase S. **Ilustración 12.**

Además recientes investigaciones han comprobado que seguida a esta defosforilación, se produce la **escisión** de RB por proteasas tipo ICE lo que conduce a la **apoptosis** en líneas celulares independientes de p53 como las células leucémicas humanas HL-60.

Como hemos visto anteriormente, la familia de genes Bcl-2 muestra una red compleja que regula la apoptosis. En estudios actuales se observó que PCA **reduce** la expresión de la proteína **Bcl-2** (anti-apoptótica) al 47% y **umenta** la expresión de la proteína **Bax** (pro-apoptótica) al 181%. Lo que contribuye a la letalidad celular.

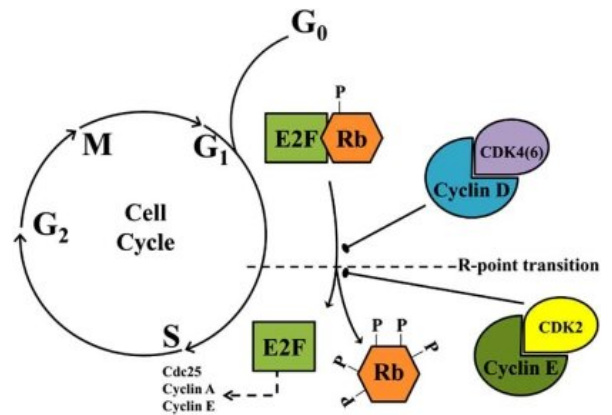


Ilustración 12 La vía RbE2F-fosforilación secuencial por complejos de quinasa Ciclina D-Cdk (26)

Por lo tanto los efectos antiproliferativos de PCA en células HL-60 mediante la apoptosis está asociado a la reducción de la fosforilación de la proteína RB y a la supresión de la expresión de Bcl-2 (prooncogen).

En cuanto a su citotoxicidad, PCA presentó un efecto inhibitorio dependiente de la concentración sobre el crecimiento de las células HL-60 así como la expresión de características típicas de apoptosis observadas mediante un examen morfológico en las células tratadas con PCA. Entonces se comprobó que a dosis **superiores de 0,2 mM**, PCA posee efectos citotóxicos asociados con la inducción de apoptosis en células leucémicas (**Figura 3**).

Figura 3 Efecto del PCA del hibiscus en la proliferación de células HL-60 (25)

### 5.2.6 Síntesis de nanopartículas de oro conjugadas con extracto de flor de Hibiscus sabdariffa con efecto anti-leucemia mieloide aguda en comparación con la daunorrubicina en modelos leucémicos de roedores 2019. (In vivo) (24)

En la actualidad el uso de las plantas para la síntesis de nanopartículas está en auge debido a su biocompatibilidad y no-toxicidad. Este estudio investigó el potencial del **extracto acuoso de flores de H. sabdariffa L. en la biosíntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)** por sus propiedades anticancerígenas, en este caso sobre la leucemia mieloide aguda en un modelo de ratón leucémico. Siendo relevante la comparación con el fármaco de quimioterapia, la daunorrubicina.

En este estudio *in vivo* se subdividió en 6 grupos a los ratones tratados con DMBA (12-dimetilbenz[za]antraceno): H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> (ácido cloroáurico), *H. sabdariffa* L., AuNPs, daunorrubicina, no tratados y control.

En el experimento reciente:

A) En el grupo tratado con DMBA se le indujo correctamente la leucemia mieloide aguda debido a los siguientes hallazgos:

- ☞ Disminuyó significativamente ( $P \leq 0.01$ ) el recuento de RBC (eritrocitos), plaquetas y linfocitos y otros parámetros (Hb, PCV, MCV, MCH, MCHC).
- ☞ Aumentó el número total del recuento de WBC, blastos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y nRBC.
- ☞ Se redujeron significativamente las citocinas antiinflamatorias (IFN $\alpha$ , IL4, IL5, IL10 e IL13). Y aumentaron significativamente las citocinas proinflamatorias que incluyen IFNY, TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IL12 e IL18.

B) En los grupos tratados con H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, *H. sabdariffa* L., AuNPs y daunorubicina, cuyas propiedades antioxidantes pueden estar asociadas a su actividad anti-hemolítica, se observó:

- ☞ La mejora significativa del recuento de glóbulos rojos, plaquetas, linfocitos y otros parámetros en comparación con el grupo no tratado.
- ☞ Se redujo el número de WBC, blastos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, y nRBC
- ☞ Mejoraron significativamente las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en comparación con el grupo no tratado.

En caso de líneas celulares de leucemia mieloide aguda disminuyeron la viabilidad celular en presencia de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, *H. sabdariffa* L., AuNPs y daunorubicina de manera dosis dependiente (**Figura 4**). Además AuNPs producía una viabilidad celular baja similar a la daunorubicina contra Murine C1498 y Human HL-60/vcr.

Siendo IC<sub>50</sub> de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, *H. sabdariffa* L., AuNPs y daunorubicina contra la línea celular Murine C1498 respectivamente 761, 397, 185, and 163  $\mu\text{g/ml}$ . Y contra la línea celular humana HL-60 fue 803, 587, 189, and 178  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Al final del estudio se comprobó que los mejores resultados correspondieron al grupo tratado con AuNPs. El cual expresaba una similitud a la daunorubicina significativa ( $P \leq 0.05$ ) Por lo tanto las nanopartículas de oro conjugadas con extracto de flor de *Hibiscus sabdariffa* L. pueden usarse para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda como un fármaco quimioterapéutico en un ensayo clínico.

A todo esto se le suma que *in vitro* mediante el test DPPH se reveló que la daunorubicina y las nanopartículas de oro con extracto de hibisco (AuNPs) tenían un **potencial antioxidante** similar contra radicales libres como DPPH y sin ninguna actividad citotóxica en líneas celulares humanas normales. Se observó una excelente prevención a dosis de **1000  $\mu\text{g/ml}$** . Siendo los IC<sub>50</sub> de BHT, *H. sabdariffa* L., AuNPs y daunorubicina 414, 328, 199, and 168  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (**Figura 5**).

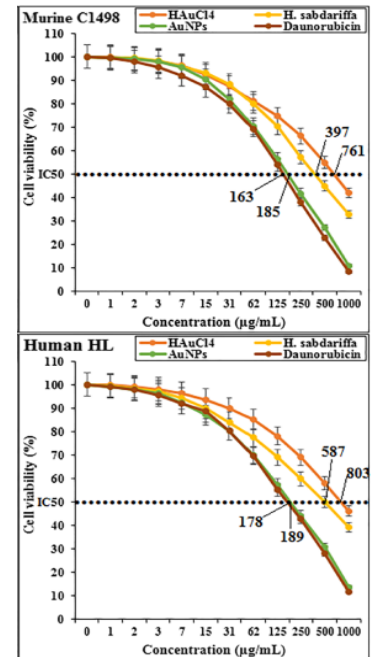


Figura 4. Viabilidad de líneas celulares % (Murine C1498, Human HL-60/vcr) tras tratarlos con H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, *H. sabdariffa* L., AuNPs y daunorubicina (24)

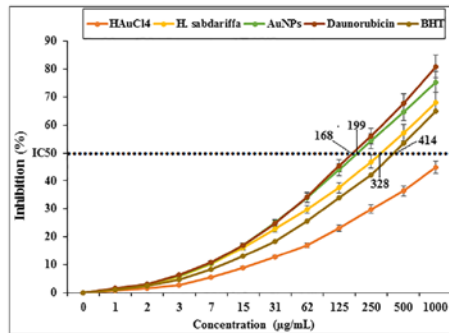


Figura 5 Actividad antioxidante de HAuCl<sub>4</sub>, *H. sabdariffa* L., AuNPs, daunorrubicina y BHT (24)

## 6.CONCLUSIONES

Existen evidencias suficientes de las **propiedades anticancerígenas** de los **extractos** de la planta medicinal *Hibiscus sabdariffa* L. Esto es gracias a sus compuestos **bioactivos**, que proveen de efectos beneficiosos a la salud, principalmente antocianinas (Dp3-Sam) y compuestos fenólicos (PCA) siendo compuestos antimutagénicos con potencial en propiedades quimiopreventivas evitando la carcinogénesis.

El efecto anticancerígeno de los extractos de antocianina de roselle (HAS 0,2%) sobre la carcinogénesis, evidencia su potencial como **agente quimiopreventivo** contra la evasión de la apoptosis, la insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, la invasión de tejidos y la metástasis. Por lo tanto, es necesario un ensayo en humanos del efecto protector del extracto de antocianina de roselle sobre la leucemia pues podría ser una fuente para el descubrimiento de fármacos o terapia alternativa. Además de prevenir la proliferación celular y causar la apoptosis en células promielocíticas humanas (HL-60).

Concretamente se demostró que la concentración de HAS que inhibía el 50% de la viabilidad celular (**IC50**) en HL-60 era de 2,49 mg/ml las cuales mostraban características típicas de apoptosis. Y que los antocianos del hibisco promueven la **detención del ciclo celular G2/M**.

Así como resultados relevantes de estudios *in vivo* donde HAS 0.2% redujo la **incidencia de leucemia en un 33.3%**, e **inhibió la progresión de esta enfermedad inducida por NMU**. A esto se le añade que la **tasa de mortalidad** de las ratas que recibieron una alta dosis de HA (0,2%) varió del 50% en el grupo NMU a un **8,3%** del grupo HAS.

También cabe destacar la evidencia de que PCA a dosis superiores de 0,2 mM, posee efectos citotóxicos asociados con la inducción de apoptosis en células leucémicas.

Resultados de las investigaciones realizadas nos permiten plantearnos los extractos del hibisco como una **alternativa** para elaborar tratamientos coadyuvantes para el tratamiento de la leucemia. Puesto que son conocidos sus mecanismos moleculares que causan la muerte celular o apoptosis de las células leucémicas mediante la vía intrínseca y extrínseca junto con la vía MAPK y la influencia del aumento de ROS sobre la cascada de caspasas.

Por lo tanto es evidente el potencial de esta planta medicinal y la necesidad de realizar **ensayos clínicos** en humanos para poder determinar así su eficacia y establecer científicamente unas dosis recomendadas para ser utilizado contra la leucemia.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Asociación de pacientes de Linfoma, Mieloma L y SM. 2. La leucemia | AEAL [Internet]. [cited 2020 Apr 22]. Available from: <http://www.aeal.es/leucemia-mieloide-aguda-espana/2-la-leucemia/>
2. ¿Qué es el cáncer? - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
3. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2020 Hombres. Soc Española Oncol Médica. 2020;36.
4. Winslow T. Medical and Scientific Illustration [Internet]. [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://www.teresewinslow.com/#/circulatory/>
5. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Cáncer Hematológico. 2017;40.
6. García L, Cabrero M, del Cañizo C. Leucemias agudas. Med. 2016;12(21):1201–12.
7. Colditz GA. Leukemia & Lymphoma Society. SAGE Encycl Cancer Soc. 2015;
8. Leucemia: Todo Lo que Necesitas Saber | AECC [Internet]. [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/leucemias>
9. Guardiola S, Mach N. Therapeutic potential of Hibiscus sabdariffa: A review of the scientific evidence. Endocrinol y Nutr (English Ed. 2014;61(5):274–95.
10. Khare CP. Hibiscus sabdariffa Linn. Indian Med Plants. 2007;8(1):1–1.
11. Carretero M, Ortega T. Propiedades terapéuticas del Hibisco. Panor actual del Medicam ISSN 0210-1394, Vol 40, N° 399, 2016, págs 1172-1176 [Internet]. 1977;40(399):1172–6. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5777988>
12. Cañigueral S. Plantas medicinales y drogas vegetales: Hibisco. OFFARM. 2003;22:185–6.
13. Riaz G, Chopra R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. Biomed Pharmacother [Internet]. 2018;102(March):575–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023>
14. Tsai TC, Huang HP, Chang KT, Wang CJ, Chang YC. Anthocyanins from roselle extract arrest cell cycle G2/M phase transition via ATM/Chk pathway in p53-deficient leukemia HL-60 cells. Environ Toxicol. 2017;32(4):1290–304.
15. Tsai TC, Huang HP, Chang YC, Wang CJ. An anthocyanin-rich extract from hibiscus sabdariffa linnaeus inhibits N-nitrosomethylurea-induced leukemia in rats. J Agric Food Chem. 2014;62(7):1572–80.
16. Cáncer [Internet]. [cited 2020 Apr 22]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
17. Formagio A, Ramos D, Vieira M, Ramalho S, Silva M, Zárte N, et al. Phenolic compounds of Hibiscus sabdariffa and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. Brazilian J Biol. 2015;75(1):69–76.
18. Chang YC, Huang HP, Hsu JD, Yang SF, Wang CJ. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;205(3):201–12.
19. Hou DX, Tong X, Terahara N, Luo D, Fujii M. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. Arch Biochem Biophys. 2005;440(1):101–9.
20. Pérez AH. Vías de inducción de apoptosis [Internet]. 2013 [cited 2020 Apr 22]. p. 4046. Available from: <http://www3.uah.es/daviddiaz/Apoptosis/vias.htm>
21. Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-

- death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2010;8(1):31. Available from: <http://www.biosignaling.com/content/8/1/31>
22. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V., et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):107–20.
  23. Contour-Galcerá MO, Sidhu A, Prévost G, Bigg D, Ducommun B. What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2007;115(1):1–12.
  24. Zangeneh MM, Zangeneh A. Novel green synthesis of Hibiscus sabdariffa flower extract conjugated gold nanoparticles with excellent anti-acute myeloid leukemia effect in comparison to daunorubicin in a leukemic rodent model. *Appl Organomet Chem* [Internet]. 2020;34(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1002/aoc.5271>
  25. Tseng TH, Kao TW, Chu CY, Chou FP, Lin WL, Wang CJ. Induction of apoptosis by Hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(3):307–15.
  26. Biggar K, Storey K. Perspectives in Cell Cycle Regulation: Lessons from an Anoxic Vertebrate. *Curr Genomics*. 2009 Sep 29;10(8):573–84.