



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

TEMA:

**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS
EN LÍNEA CELULAR MCF-7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE
LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y
Croton lechleri”.**

LINEA DE INVESTIGACIÓN: Biología Molecular, Toxicología y Medicina Ancestral

Proyecto de Investigación previo al título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

Autora: Canseco Arrunategui Maritza Angelica

Tutor: PhD. Bustillos Ortiz Alcides Alberto

AMBATO – ECUADOR

Octubre 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el tema: **“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF-7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*”** de Maritza Angelica Canseco Arrunategui, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a la evaluación del jurado examinador designado por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, 14 de Octubre del 2019

EL TUTOR

.....
Ing. PhD. Bustillos Ortiz, Alcides Alberto

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Informe de Investigación “**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF-7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri***” como también las ideas, análisis, resultados y conclusiones son de mi exclusiva responsabilidad, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, 14 de Octubre del 2019

LA AUTORA

.....

Canseco Arrunategui, Maritza Angelica

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de esta tesis o parte de ella un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación. Cedo los derechos en línea patrimonial de mi tesis con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de esta tesis, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.

Ambato, 14 de Octubre del 2019

LA AUTORA

.....

Canseco Arrunategui, Maritza Angelica

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación sobre el tema: **“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF-7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*** de Maritza Angelica Canseco Arrunategui, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, 14 de Octubre del 2019

Para constancia firman

.....

PRESIDENTE/A

.....

1ER VOCAL

.....

2DO VOCAL

DEDICATORIA

A Dios, por ayudarme en cada paso de mi vida y darme la fortaleza necesaria para afrontar cada desafío impuesto en mi camino, además de haber puesto en mi camino personas que han sido mi soporte y compañía durante todo mi periodo de estudio. En especial quiero dedicar este logro, de la manera más cariñosa y enfática a mis padres, pilar fundamental de mi vida, quienes han estado conmigo en mis mejores y peores momentos, demostrándome que con lucha y perseverancia todo es posible, a mis hermanas Erika y Tannia por siempre estar pendientes de mi vida académica y ser el motor que me dan energía para seguir cada día. A mi abuelita Elvia y mi Tía Paty por apoyarme incondicionalmente desde pequeña y siempre mimarme. A David, quien me acompañó durante todo mi periodo universitario con sus palabras de aliento e inmenso amor y finalmente a mis amigos José, Oscar, Kevin, Gabo, Eve y Gaby que siempre estuvieron ahí para ayudarme, con sus consejos y brindándome una amistad desinteresada.

Con amor, Maritza

AGRADECIMIENTO

Mi profundo agradecimiento a la Lcda. Mg. Elizabeth Proaño, por hacerme parte de este macroproyecto y haber confiado en mis habilidades para desarrollarlas, también a mi tutor de tesis, PhD Alberto Bustillos, quien con paciencia y constancia me ayudo a desarrollar mis habilidades en el ámbito de la biología molecular, además de enseñarme todos los métodos utilizados en la investigación.

Al Dr. Carlos Yauli por enseñarme el amor por la investigación y darme las bases para aprender sobre biología molecular.

A la Dra. Yenddy Carrero, quien me demostró que la gente buena es más y gracias a su ayuda y recomendaciones este proyecto pudo salir a flote, además de siempre estar pendiente de cada paso dado en el laboratorio y enseñarnos el manejo de los equipos utilizados.

A la Ing. Andrea Zurita, mi gratitud más sincera por apoyarme en cada reto impuesto en esta pesquisa y darme fortaleza para culminar la tesis de la mejor manera.

Al Dr. Marco Gudiño, quien es responsable de enseñarme que con paciencia y dedicación todo sale bien y ser una excelente persona que siempre estuvo pendiente de la investigación.

Gracias infinitas a todas las personas que conforman el Grupo de Investigación, Desarrollo e Innovación Biomédica de la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Lic. Pamelita Bustos y Ing. Dianita quienes siempre nos recibieron en el laboratorio con una cálida sonrisa y un buen consejo académico. Gracias a mis compañeros de trabajo Juank Cortez y Edgar Borja, por estar conmigo en todo este camino de aprendizaje y por compartir este tiempo juntos.

¡Al final quiero decir a todos los implicados en mi desarrollo académico un Dios le pague y espero seguir compartiendo muchos logros juntos!!!

Maritza Angelica Canseco Arrunategui

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Antecedentes Investigativos	5
1.2. Objetivos	10
1.2.1. Objetivo General	10
1.2.2. Objetivos Específicos	10
CAPÍTULO II	11
METODOLOGÍA	11
2.1. Materiales	11
2.1.1. Dsecación, maceración y liofilización del material vegetal	11
2.1.2. Cultivos celulares	12
2.1.3. Extracción de RNA	12
2.1.4. qRT-PCR.....	13

2.2. Métodos	13
2.2.1. Método de desecación de material vegetal.....	13
2.2.2. Maceración en Etanol 96% y Liofilización.....	14
2.2.3. Cultivos celulares	14
2.2.4. Descongelación de línea celular MCF-7	14
2.2.5. Pases de cultivos celulares	15
2.2.6. Exposición del cultivo celular a los extractos de las plantas: <i>Ilex guayusa</i> , <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Croton lechleri</i> (TRATAMIENTO)	15
2.2.7. Extracción y cuantificación de RNA.....	15
2.2.8. Diseño de los cebadores para qRT-PCR	17
2.2.9. Determinación de la expresión Genética de Bcl2 y Bax mediante qRT- PCR	17
2.2.9. Análisis de la expresión Genética de Bcl2 y Bax.....	18
2.2.10. Diseño experimental.....	18
CAPÍTULO III	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Análisis y discusión de los resultados	19
3.1.1. Análisis e Interpretación de resultados.....	19
3.1.1. Discusión	29
3.2. Hipótesis	32
3.2.1. Hipótesis nula.....	32
3.2.2. Hipótesis alternativa	32
3.2.3. Verificación de hipótesis	32
CAPÍTULO IV	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
4.1 Conclusiones	35
4.2. Recomendaciones	36

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
--	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	1
Incidencia del cáncer en el Ecuador según localización topográfica por sexo	1
Tabla 2.....	11
Materiales, equipos y reactivos usados para la desecación, maceración y liofilización del material vegetal	11
Tabla 3.....	12
Materiales, equipos y reactivos usados para los cultivos celulares.....	12
Tabla 4.....	12
Materiales, equipos y reactivos usados para la Extracción de RNA.....	12
Tabla 5.....	13
Materiales, equipos y reactivos usados para qRT-PCR	13
Tabla 6.....	17
Secuencia de los Primers utilizados	17
Tabla 7.....	19
Volumen de los extractos vegetales procesados	19
Tabla 8.....	21
Efecto de los extractos sobre Cultivos celulares MCF-7	21
Tabla 9.....	24
Cuantificación de RNA en el equipo Nanadrop (Thermo Scientific).....	24
Tabla 10.....	25
“Ct obtenidos a partir de las diferentes diluciones del ARN extraído de las células tratadas”.....	25
Tabla 11.....	26
Ct obtenidos en la qRT-PCR para el gen Bax.....	26

Tabla N 15. Cálculo de las medidas de tendencia central para el gen Bax usando la fórmula de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	33
Tabla N 16. Análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA) para el gen Bax y test de Tukey-Kramer	33
Tabla N 17. Cálculo de las medidas de tendencia central para el gen Bcl-2 usando la fórmula de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	34
Tabla N 18. Análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA) para el gen Bcl-2 y test de Tukey-Kramer	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Temperaturas de reacción para la amplificación de Bax y Bcl-2: <i>Software</i> BioRad CFX96 Real time.	17
Figura 2. Media del Volumen de los extractos. Maceración: Volumen disuelto, Filtración: Volumen filtrado, Liofilización: Volumen concentrado.	19
Figura 3. Diluciones de los extractos <i>Ilex guayusa</i> , <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Croton lechleri</i>	20
Figura 4. Efecto de los tratamientos con una concentración de 3ug/uL por frasca en células MCF-7.....	21
Figura 5. Validación del gen GAPDH mediante el análisis ANOVA y el test de Tukey-Kramer.....	25
Figura 6. Expresión del gen pro-apoptótico Bax con el método de cuantificación relativa $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ y el test de Tukey-Kramer	27
Figura 7. Expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2 con el método de cuantificación relativa $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ y el test de Tukey-Kramer	28

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Resolución del macro proyecto de investigación “RESOLUCIÓN: 0249-CU-P-2017	42
--	----

ANEXO 2. Resolución y aprobación del tema de investigación, resolución CD-P-2018-3249	43
ANEXO 3. Resolución de cambio del tema de investigación, resolución CD-P-2019-0860.....	44
ANEXO 4. Permiso del Ministerio del Ambiente del Ecuador. (Grupal).....	45
ANEXO 5. Permiso del Ministerio del Ambiente del Ecuador. (Individual).....	47
ANEXO 6. Guía de movilización de extractos de plantas emitido por el Ministerio del Ambiente del Ecuador.....	49
ANEXO 7. Consentimiento de recolección de material vegetal	50
ANEXO 8. Certificado de haber entregado el material vegetal al “Herbario Misael Acosta Solís” de la Universidad Técnica de Ambato.	52
ANEXO 9. Certificado por parte de responsable del laboratorio de investigación FCS-UTA.....	53
ANEXO 10. Cuantificación relativa.....	54
ANEXO 11. FOTOGRAFÍAS.....	55

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF-7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*”.

Autora: Canseco Arrunategui, Maritza Angelica

Tutor: PhD. Bustillos Ortiz, Alcides Alberto

Fecha: Ambato, 14 de Octubre del 2019

RESUMEN

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres alrededor del mundo, a pesar de los avances en medicamentos y terapias, sigue siendo un problema de salud pública, por este motivo todavía es necesario investigar sobre nuevos compuestos activos que podrían constituirse en candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos. En este contexto, el Ecuador es un país megadiverso que cuenta con una cantidad significativa de plantas de uso ancestral a las cuales, las comunidades indígenas les atribuyen propiedades anti-proliferativas y anti-carcinogénicas. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto sobre la expresión de los genes Bax y Bcl-2 por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) de los extractos de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* en la línea celular de cáncer de mama MCF7. Los extractos se obtuvieron mediante maceración en etanol al 96%, liofilización y fueron resuspendidos en PBS 1X. La línea celular MCF-7 fueron tratados con los diversos extractos a una concentración de 3ug/uL durante 24 horas. A continuación, se extrajo el RNA total de las células tratadas y se determinó su concentración. Entonces se sintetizó el cDNA y se evaluó la expresión de los genes Bax y Bcl-2 mediante una PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto etanólico de *Croton lechleri* aumentó la expresión del gen Bax ($p < 0.05$) y disminuyó la expresión de Bcl-2 ($p < 0.001$) con relación a las células MCF7 no tratadas con el extracto. Los otros dos extractos fueron no concluyentes. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) además de un análisis post-hoc Tukey. La significancia para Bax fue < 0.0002 y < 0.0001 para Bcl-2 entre los tratamientos, razón por la cual se aceptó la hipótesis alterna.

PALABRAS CLAVES: MCF-7, CÁNCER DE MAMA, BAX, BCL-2, APOPTOSIS, ILEX GUAYUSA, UNCARIA TOMENTOSA, CROTON LECHLERI, EXTRACTOS DE PLANTAS, MEDICINA ANCESTRAL.

AMBATO TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
CAREER IN CLINICAL LABORATORY

“STUDY OF THE EXPRESSION OF APOPTOSIS INDUCTORS GENES IN MCF-7 CELL LINE IN RESPONSE TO THE TREATMENT OF PLANT EXTRACTS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* and *Croton lechleri*”.

Author: Canseco Arrunategui, Maritza Angelica

Tutor: PhD. Bustillos Ortiz, Alcides Alberto

Date: October 14, 2019

SUMMARY

Breast cancer is the second leading cause of death in women around the world, despite advances in medicines and therapies, it remains a public health problem, for this reason it is still necessary to investigate new active compounds that could become candidates for the development of new drugs. In this context, Ecuador is a highly diversified country with a significant number of ancestral plants to which indigenous communities attribute anti-proliferative and anti-carcinogenic properties. The objective of the research was to evaluate the effect on the expression of the Bax and bcl-2 genes by polymerase chain reaction in real time (qrt-PCR) extracts of *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* and *Croton lechleri* in the MCF7 breast cancer cell line. The extracts were obtained by maceration in ethanol at 96%, lyophilization and were resuspended in PBS 1X. The MFC-7 cell line was treated with the various extracts at a concentration of 3ug/ul for 24 hours. The total RNA was then extracted from the treated cells and its concentration was determined. cDNA was then synthesized and the expression of the Bax and bcl-2 genes was evaluated using a real time PCR. The obtained results showed that the ethanolic extract of *Croton lechleri* increased the expression of the Bax gene ($p<0.05$) and decreased the expression of bcl-2 ($p<0.001$) in relation to MCF7 cells not treated with the extract. The other two excerpts were inconclusive. The results were analyzed using variance analysis (ANOVA) in addition to a post-hoc Tukey analysis. The significance for Bax was <0.0002 and <0.0001 for bcl-2 between treatments, which is why the alternate hypothesis was accepted.

KEY WORDS: MCF-7, BREAST CANCER, BAX, BCL-2, APOPTOSIS, *ILEX GUAYUSA*, *UNCARIA TOMENTOSA*, *CROTON LECHLERI*, PLANT EXTRACTS, ANCESTRAL MEDICINE.

INTRODUCCIÓN

El cáncer, término señalado por primera vez en Grecia por el médico Hipócrates en el año 460-370 A.C., representa un problema de salud pública alarmante, siendo en el 2015, la segunda causa de muerte en todo el mundo después de las enfermedades cardiovasculares (1). Entre las neoplasias con mayor mortalidad se encuentran el cáncer de pulmón, hepático, colorrectal, gástrico y de mama, los cuales en el mismo año produjeron 8.8 millones de muertes alrededor del mundo. En el Ecuador las cifras de incidencia y mortalidad de cáncer se encuentran en aumento. En la ciudad de Quito durante el 2012 se diagnosticaron 23.360 nuevos casos de cáncer, de los cuales 12.370 se detectaron en mujeres y 10.990 en hombres y se estima que para el año 2020 existirá un incremento aproximado de 31.420 personas con cáncer (2)(3).

Según el Registro Nacional de Tumores (RNT) el cáncer con mayor incidencia en ambos sexos es el cáncer gástrico, seguido del cáncer de próstata y pulmón en los hombres, mientras que en las mujeres el cáncer de cuello uterino y de mama tienen una mayor incidencia. **Tabla 1** (3).

Tabla 1 Incidencia del cáncer en el Ecuador según localización topográfica por sexo

HOMBRES	%	MUJERES	%
Próstata	66,7	Mama	41
Piel	40,7	Tiroides	40,6
Estómago	20,9	Piel	37,5
Linfomas	17,1	Cuello Uterino	18,5
Colón rectal	13,6	Estómago	14,5

Nota: Tasa de incidencia por cada 100 000 hombres y 100 000 mujeres.

Fuente: SOLCA Informe de labores 2016-2018

Globocan en el 2018, indicó que en el Ecuador se diagnosticaron 28.058 casos nuevos de cáncer de mama, además el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) informó que la neoplasia de mama ocupó en el 2017 el lugar número 11 en la lista de causas generales de muerte femenina (3).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como el crecimiento y diseminación incontrolados de las células (1). Desde el punto de vista biológico el cáncer es un trastorno genético que en la mayoría de los casos se debe a mutaciones o a activaciones anormales de los genes que controlan la reproducción celular, desencadenando un desequilibrio entre la proliferación y la apoptosis celular (4)(5). Los cambios fenotípicos producidos en las células provocan diferencias significativas en las funciones normales, en primer lugar estas células no responden a las limitaciones usuales de crecimiento, también tienen poca adherencia entre ellas, por lo que se transportan por el torrente sanguíneo y sistema linfático e invaden otros lugares del organismo produciendo metástasis, de igual modo algunos de los cánceres son capaces de activar la producción de factores angiogénicos necesarios para la formación de nuevos vasos sanguíneos que brindarán los nutrientes necesarios para el crecimiento del tumor maligno (5)(6).

Dentro de los mecanismos alterados en un proceso tumoral, se encuentra la apoptosis o también denominado muerte celular programada, que es un mecanismo biológico usado por las células en instancias normales para evitar el crecimiento descontrolado y mantener constante la cantidad de células que conforman un organismo mediante cambios bioquímicos y morfológicos. Cuando se produce el cáncer este mecanismo se ve alterado, alargando la supervivencia de las células tumorales y promoviendo el desarrollo de la neoplasia (7).

La apoptosis se puede producir mediante dos vías: la vía extrínseca (receptor de muerte) y la vía intrínseca (mitocondrial). La primera vía de apoptosis se ve desencadenado por la inflamación que activan a los linfocitos T citotóxicos que expresan proteínas inductoras de apoptosis como Fas-ligando (FasL), estas señales externas son captadas por las células dianas (células que van a sufrir el proceso de apoptosis) mediante los receptores Fas (receptores de muerte). FasL y Fas se entrelazan y se unen a proteínas adaptadoras como el dominio de muerte asociado al receptor TNF (TRADD) o al dominio de muerte asociado a Fas (FADD), en la región intracelular estos dominios atraen a la pro-caspasa 8 activada y mediante una proteólisis se separa el predominio generando caspasa 8, una nueva ruptura produce un fragmento pequeño y otra grande, los fragmentos pequeños se unen y forman un tetramero o caspasa 8 activa, estas moléculas conllevan a la muerte celular producto

del procesamiento directo de otras proteasas de la misma familia como las caspasas 3, 6 y 7 produciendo la fragmentación del DNA y la posterior muerte celular (8)(7).

La vía intrínseca o vía mitocondrial es la que se produce en el interior de la célula, aumentando la permeabilidad mitocondrial y liberando moléculas pro-apoptóticas como el citocromo-C hacia el citoplasma. Esta vía se desencadena mediante señales intracelulares de estrés biológico, que produce la activación de proteínas de la familia de Bcl-2 que ejercen su acción sobre la mitocondria. Existen dos grupos principales de proteínas Bcl-2, las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) las que actúan promovieron la liberación de citocromo-C y la activación de la caspasa 9 y las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1) que bloquean la liberación de citocromo-C. La apoptosis no se ve afectada por la cantidad absoluta de las proteínas pro y anti-apoptóticas, sino por la interacción y el balance entre estas dos familias en la membrana de la mitocondria (8). Bcl-2 actúa formando homodímeros Bcl2:Bcl2 y heterodímeros Bax:Bcl2 y cuando existe una sobre expresión de este gen las células tienen mayor supervivencia, a lo contrario cuando existe una cantidad excesiva de Bax se produce homodímeros Bax:Bax y la célula tienen mayor susceptibilidad a la apoptosis, reduciendo su periodo de vida, ambos genes son indispensables para un correcto funcionamiento del proceso fisiológico de la apoptosis (9)(10).

Una vez que el citocromo-C se encuentra en el citosol se une a la proteína Apaf-1 y ATP, forman el complejo llamado apoptosoma. El apoptosoma mediante uno de los dominios de la proteína Apaf-1 se une a la pro-caspasa 9, que mediante una proteólisis se transforma en caspasa 9 activada, esta molécula conlleva a la activación de otras proteasas de la misma familia como las caspasas 3, 6 y 7 (11).

Ambas vías mencionadas terminan en una vía común o vía de activación de las caspasas en especial la caspasa 8 y 9, las cuales encienden su acción degradativa y activan otro tipo de caspasas, denominadas caspasas ejecutoras. Este tipo de caspasas activadas degradan el DNA, las nucleoproteínas, componentes de la matriz nuclear y el citoesqueleto concluyendo con la muerte de la célula (5).

En la mayoría de los cánceres se ha identificado una sobreexpresión de Bcl-2 y una reducción en la expresión de Bax, lo que también se ha asociado a una respuesta

deficiente en el tratamiento con quimioterapia y radioterapia contra el cáncer. Estos dos tratamientos dependen en gran medida de la inducción de apoptosis para su eficacia (7). En la actualidad se están realizando fármacos que interactúen en la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, como es el caso del cáncer de mama donde la expresión de Bcl-2 se asoció al mejoramiento de la supervivencia en pacientes tratadas con Tamoxifeno y fue asociada a una mejor respuesta a la terapia hormonal (12).

El cáncer de mama es un tumor de tipo maligno que se desarrolla a partir de células sanas. Hoy en día existen algunos biomarcadores, como el ER-a (Receptor de estrógeno alfa), PR (Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico) y HER2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano), con relevancia clínica a la hora de elegir el tratamiento idóneo para el paciente (13)(14). Como tratamiento de varios cánceres incluido el cáncer de mama se utilizan varios alcaloides extraídos de plantas, como el paclitaxel (Taxol), etopósido y topotecán, los que ejercen su acción sobre la tubulina, misma que es indispensable para formar microtúbulos y participa en la multiplicación y movimiento de algunas células (15). El paclitaxel es una sustancia derivada del tejo del Pacífico de la familia Taxaceas que fue aislada por primera vez en 1968 por Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani mediante ensayos in vitro, además descubrieron que el Taxol ejerce su acción inhibiendo la formación del huso mitótico en la división celular y bloqueando el proceso de mitosis (16).

Por este motivo en la investigación presente (in vitro) vamos a poner a prueba los extractos de las plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* recolectados en la provincia de Pastaza-Ecuador y su efecto en células MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) que son células derivadas de un derrame pleural de una paciente de 69 años de edad con un tumor primario de tipo carcinoma ductal mamario invasivo que llegó a su etapa de metástasis (17). Dichas células serán tratadas con los extractos antes mencionados, después se realizará una extracción de RNA y al final se cuantificará la expresión de los genes Bcl-2 y Bax por medio de una qRT-PCR.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

Varios estudios se han realizado para determinar la acción terapéutica de las plantas mediante sus extractos y principios activos, utilizados en la medicina tradicional en varias regiones del mundo. Por ejemplo, Jian-guo Wu, *et al.* Un grupo de investigadores de la Academia de Medicina Integrativa de la Universidad de Medicina Tradicional de China en Fujian, en el 2017 realizaron un estudio titulado: **“Anticancer and anti-angiogenic activities of extract from *Actinidia eriantha* Benth root”**. Donde se utilizó la raíz de *Actinidia eriantha*, porque en la medicina tradicional China la usan como tratamiento para el carcinoma gástrico, el carcinoma nasofaríngeo y el carcinoma de mama. El objetivo de esta investigación era comprobar las actividades anticancerígenas y antiangiogénicas de la raíz de *Actinidia eriantha*. Se utilizaron cultivos celulares de las líneas MCF-7 (Cáncer de mama), SGC7901 (Carcinoma gástrico), CNE2 (Carcinoma Nasofaríngeo) y HUVECs (Células Endoteliales de la Vena del Cordón Umbilical), estas últimas para comprobar la actividad antiangiogénica. Para la preparación de los extractos se utilizó el método de maceración en alcohol y se los guardaba a 4°C, después se realizó el ensayo de MTT, para evaluar el efecto inhibitorio de los extractos en los respectivos cultivos celulares, a las células expuestas a los tratamientos por 24 horas se les extrajeron el RNA usando trizol y se les realizó una qRT-PCR para medir la expresión de Bax y Bcl-2. Como resultado de la qRT-PCR se identificó que la raíz de *Actinidia eriantha* tiene un efecto apoptótico en las células SGC7901, CNE2 y HUVECs, ya que la expresión de Bax y las caspasas aumentaron, mientras que la expresión de Bcl-2 se redujo significativamente. También se pudo comprobar que el extracto de raíz de la planta *Actinidia eriantha* inhibió la proliferación de las células HUVEC a través del bloqueo de la progresión de G1 a S del ciclo celular. El efecto inhibitor del extracto no tuvo

efecto sobre células MCF-7, esto se debe a las características de las células y su sensibilidad al extracto. En conclusión, la parte con mayor efectividad en la actividad anticancerígena es la raíz de *Actinidia eriantha*, la cual actúa mediante dos vías, la inhibición del crecimiento de células cancerosas (inducción de apoptosis) y la supresión de la angiogénesis (18).

En el departamento de Biología Médica de la Facultad de Medicina Jessenius-Eslovaquia en el 2017 se realizó la investigación sobre “**Antineoplastic effects of clove buds (*Syzygium aromaticum L.*) in the model of breast carcinoma**”, dirigida por doctor Peter Kubatka y *et al.* El objetivo del proyecto era evaluar los efectos anticancerígenos de los clavos de olor (CLO) en el carcinoma mamario utilizando experimento in vivo (ratas) e in vitro (MCF-7). Para el diseño experimental las células MCF-7 fueron cultivadas durante 24 horas y colocada los extractos en concentraciones de 0.1 y 1% durante 24, 48 y 72 horas antes del análisis. Después estas células se sometieron a ensayos de Citometría de flujo. Para la experimentación en animales se utilizaron ratas hembras de 32 – 36 días de vida, la carcinogénesis mamaria fue inducida por N-nitroso-N-metilurea en una dosis única de 50 mg/kg de peso corporal, cuando las ratas tenían 42 días de vida. Los animales del experimento se dividieron en 3 grupos: Control (Sin tratamiento), CLO 0.1 (Tratamiento con el extracto a una concentración de 0.1%) y CLO 1 (Tratamiento con el extracto a una concentración de 1%), donde el grupo CLO 0.1 consumían dosis diaria de 19.24 mg y CLO 1 consumían dosis diaria 200.5 mg. La última semana del experimento, los animales se decapitaron, se recogió la sangre de cada animal, se extirparon los tumores mamarios y se registró el tamaño del tumor. Como resultado las células de carcinoma en animales mostraron disminución de la expresión de Bcl-2, Ki67, VEGFA, CD24 y CD44 y aumento de la expresión de Bax, caspasa-3 y ALDH1 después de la administración de *Syzygium aromaticum L* en dosis altas. En los cultivos celulares el extracto de etanol de clavo mostró cambios asociados con el aumento de la población de células MCF-7 en la fracción sub-G0/G1 y S, donde se bloquea la progresión del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. Además, se ha detectaron etapas tempranas y tardías de apoptosis o necrosis utilizando tinción con anexina V/PI y también caspasa-7. Finalmente, el estudio in vitro demostró la desactivación del gen anti-apoptótico Bcl-2 y la apoptosis mitocondrial. En conclusión, dicha investigación demostró los efectos antitumorales,

anti-proliferativos y pro-apoptóticos de *Syzygium aromaticum* L (clavo de olor) en cáncer de mama utilizando ensayos en ratas y cultivos celulares de MCF-7 (19).

En el 2016 un grupo de investigadores dirigidos por el doctor Jianming Luo, profesor de la Universidad de Jinan – China, realizaron una investigación titulada: **“Phenolic Fractions from Muscadine Grape “Noble” Pomace can Inhibit Breast Cancer Cell MDA-MB-231 Better than those from European Grape “Cabernet Sauvignon” and Induce S-Phase Arrest and Apoptosis”** donde el objetivo de la investigación fue analizar polifenoles con bioactividad presentes en otras fracciones de la uva de Muscadine, ya que existe muchos estudios que han demostrado su actividad apoptótica en células de cáncer de mama, pero en esos estudios solo se tomó en cuenta la piel de la uva, dejando a un lado las semillas y otras fracciones del fruto. Para la preparación de los extractos de compuestos fenólicos se separaron las pieles y semillas, se liofilizo y redujo a polvo los compuestos, después se realizó la extracción de los fenoles con maceración en alcohol utilizando la técnica expuesta por Yi y otros (2005). Para este ensayo se utilizaron células MCF-7 y MDA-MB-231, las cuales fueron expuestas durante 24 horas a los fenoles extraídos de la uva con una concentración mínima inhibitoria del 80%, después se analizó las células tratadas con técnicas de citometría de flujo, qRT-PCR y un Western Blot. Como resultado de la expresión de mRNA se detectó que la expresión de proteínas del gen relacionado con la apoptosis, Bcl-2 disminuyó significativamente mientras que Bax aumentó en relación a las células control que no tenían ningún tratamiento, en las células tratadas con los fenoles de la piel y semillas de la uva. Como conclusión los efectos de la fracción del orujo “Noble” induce a la parada en fase S y apoptosis, siendo un producto beneficioso para la salud, además de ser un excelente agente contra el cáncer dirigido a MDA-MB-231 y MCF-7 (20).

En la Universidad Federal de Alfenas – Brasil, el Dr. Sabino A.P.L. at *et al.* En el 2017 realizaron una investigación sobre: **“Stryphnodendron adstringens (BBarbatimão[^]) Leaf Fraction: Chemical Characterization, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Towards Human Breast Cancer Cell Lines”**, este estudio fue diseñado para investigar la composición de *Stryphnodendron adstringens* y sus actividades antioxidantes y citotóxicas en humanos. La corteza de este árbol en la medicina tradicional de Brasil se le atribuye factores antiinflamatorios,

antiulcerogénicos, antiviral, antiprotozoo, antimicrobiano y actividad antioxidante, así que se decidió comprobar si las hojas descendientes del mismo ejemplar poseen similares características antioxidante y citotóxica. Para la preparación del extracto se utilizaron las hojas con la técnica de maceración en alcohol acuoso. Para este estudio se utilizó dos tipos celulares de cáncer de mama humano (MCF-7 y MDA-MB-435) y un cultivo celular de control normal (médula ósea de rata). Antes de realizar los tratamientos en las células se evaluó la viabilidad celular mediante el colorante azul tripán. Las células fueron cultivadas durante 24 horas en cajas Petri, pasado este tiempo se colocó diluciones variadas (5, 10, 20, 40, 80 y 160 µg/ml) o 550 µg/ml del tratamiento estéril extraído de la planta *Stryphnodendron adstringens* (ciclofosfamida). Para la investigación de la actividad apoptótica se realizó un Western Blot de los cultivos y una electroforesis utilizando geles de SDS-PAGE al 12%, a las membranas del resultado se les colocaron cebadores específicos para Bax, Bcl-2, caspasas-9, 3 y 8, caspasa 3 activa, pro-caspasa 8, LC-3, beclin-1 y β-actina. Como resultado que el tratamiento utilizado indujo la apoptosis, el mismo que se confirmó aún más por el aumento de la expresión de las proteínas proapoptóticas como Bax, caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-3 activa y la disminución de la expresión de Bcl2, caspasa-3 y pro-caspasa-8. En conclusión, el mesurando extraído del árbol *Stryphnodendron adstringens* está compuesta por ácido gálico, dímero de procianidina B1 y ECG y se ha confirmado actividades antioxidantes y citotóxicas, además de inducir la apoptosis líneas celulares en MCF-7 y MDA-MB-435 de cáncer de mama humano (21).

En el Departamento de Bioquímica del Instituto Indio de Ciencia la dra. Gini Kuriakose et al realizaron una investigación sobre: **“Extract of *Penicillium sclerotiorum* an endophytic fungus isolated from *Cassia fistula* L. induces cell cycle arrest leading to apoptosis through mitochondrial membrane depolarization in human cervical cancer cells”**, el objetivo de esta investigación era encontrar efectos apoptótico y anti-proliferativos en células HeLa (Cáncer de cérvico-uterino) a partir del hongo endofítico *Penicillium sclerotiorum*, obtenido en el árbol *Cassia fistula* L., puesto que los hongos de este tipo han adquirido la capacidad de producir compuestos iguales o similares a sus propias plantas huésped. Para el aislamiento del hongo *Penicillium sclerotiorum* se recolectaron las hojas frescas, sanas y no infectadas, tallos y corteza del árbol, se esterilizo las muestras, se cortaron en

cuadrados pequeños y se colocaron en placas Petri con penicilina para evitar contaminación bacteriana, las placas se sellaron utilizando Parafilm e incubado a 25 ° C en la oscuridad. Cuando los micelios de los hongos comenzaron a crecer se los transfirieron a placas estériles. Para la formación del extracto a partir del hongo se utilizó la técnica de maceración en acetato de etilo. Se utilizaron líneas celulares humanas HeLa (carcinoma cervical), la evaluación de la viabilidad del extracto fúngico se realizó mediante ensayos de viabilidad celular MTT (compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio) en microplacas de 96 y fueron leídos en un lector a 570 nm. A los cultivos se los colocó los extractos fúngicos y se realizó la citometría de flujo para cuantificar los ciclos celulares. Se evaluó la apoptosis celular mediante un kit comercial y se tiñó las células con Anexina V y Western blotting se realizó en las células HeLa tratadas con el extracto a la concentración de 5 y 10 µM / ml (disuelto en DMSO (0,1%) se utilizaron para analizar la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis. Como resultado se obtuvo que el extracto del hongo *Penicillium sclerotiorum* afectó la viabilidad de las células HeLa de una manera dependiente de la dosis. Además, la actividad de la progresión del ciclo celular y la inducción apoptótica se detuvo en la fase S y G2/M del ciclo celular en una dosis dependiente. La Anexina V mostró que el extracto es una potente sustancia apoptótica, esto fue apoyado por la disminución de la proteína proapoptótica BCL-2 y aumento de la expresión de Bax, p53 y Apaf-1. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial y un patrón distinto de fragmentación del DNA sugiere que el tratamiento induce la activación de la apoptosis por medio de la vía apoptótica mitocondrial. En conclusión el extracto obtenido por medio de los hongos endofíticos puede servir como fuentes potenciales de sustancias anticancerígenos (22).

Milena Deljanin et al en el 2016 realizaron un estudio sobre: “***Chelidonium majus* crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines**” el objetivo del estudio fue investigar los efectos citotóxicos y los efectos antitumorales del extracto etanólico de *Chelidonium majus* contra células tumorales humanas A549, H460, HCT 116, SW480, MDA-MB 231 y MCF-7 y células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos. Los 6 cultivos celulares se sometieron a ensayos de MTT para validar su citotoxicidad, la evaluación de la apoptosis se realizó mediante citometría de flujo después de colocado el tratamiento según las CI50 y haber transcurrido 24 horas, después se coloreó con Anexina V/FITC,

como resultado de este protocolo se determinó células apoptóticas, apoptóticas tardías y necróticas usando el software Flowing. El resultado de esta investigación demostró que el tratamiento con *Chelidonium majus* en los 6 tipos de células tratadas, presentaron una disminución de la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, mientras que la proteína proapoptótica Bax aumentó. Como conclusión el extracto de *Chelidonium majus* puede ser utilizado en la terapia antitumoral, mediante el efecto citotóxico, la prevención de metástasis o como terapia adyuvante (21).

El grupo de investigación de la Universidad Técnica de Ambato, realizó una investigación sobre “**Actividad citotóxica de extractos de *uncaria tomentosa* y *mansoa alliacea* en líneas celulares de cáncer de mama**”, dicha investigación fue realizada por la licenciada Pamela Bustos (2018) teniendo como objetivo determinar la actividad citotóxica de extractos de *Uncaria tomentosa* y *Mansoa alliacea* en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), mediante ensayos de MTT. Los resultados obtenidos mediante el método de viabilidad de MTT para *Uncaria tomentosa* fue una IC50 de 0.0903µg/mL, mientras que para *Mansoa alliacea* fue de 0.2205µg/mL (23).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Identificar los extractos que presentan mayor eficacia en el tratamiento anti-apoptótico y pro-apoptótico de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de las plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* con métodos de maceración y liofilización.
- Analizar el efecto del tratamiento con extractos sobre la expresión del gen pro-apoptóticos: *Bax*, en la línea celular MCF7.
- Determinar el efecto del tratamiento con extractos sobre la expresión de los genes anti-apoptótico Bcl2, en la línea celular MCF7.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Una vez definidos el problema de investigación y los objetivos a alcanzar, se establecieron los procedimientos metodológicos que permitieron ejecutar la investigación. Esto implicó, la selección de la población correcta de estudio, las técnicas, procedimientos y el instrumento de recolección de resultados implementados para la investigación.

2.1. Materiales

2.1.1. Deseccación, maceración y liofilización del material vegetal

Tabla 2 Materiales, equipos y reactivos usados para la deseccación, maceración y liofilización del material vegetal

Materiales	Equipos	Reactivos
Botellas color ámbar	Estufa	Agua destilada
Papel filtro Whatman #1	Balanza (mod: EQ-510)	Alcohol al 96°
Probeta	Filtrador al vacío (WELCH)	PBS 1X
Vaso de precipitación	Rotavapor (ELEYA N-1100 Series)	
Matraz aforado	pHmetro (Thermo Scientific)	
Recipiente de boca ancha	Liofilizador (Virtis <i>Sp</i>)	
Papel Aluminio		

Autora: Maritza Angelica Canseco Arrunategui

Fuente: Protocolo preestablecido por el grupo de investigación

Preparación de PBS 1X (Solución salina tamponada con fosfato): Para preparar 500mL se coloca 450mL de Agua destilada con 50mL de PBS líquido y se coloca en la autoclave durante 45 minutos para esterilizar y evitar contaminación.

2.1.2. Cultivos celulares

Tabla 3 Materiales, equipos y reactivos usados para los cultivos celulares

Materiales	Equipos	Reactivos
Frascas Roux 75 cc	Baño María Eléctrico	DMEN (Dulbecco Modified Eagle Medium)
Multiplacas de 2x3	Centrifuga (Sigma Zentrifugen)	Suero Fetal Bovino (FBS)
Pipetas automáticas	Cabina de Bioseguridad clase II	Glutamina
Pipetas Graduadas (5-10-25 mL)	Microscopio Invertido de contraste	Penicilina/Estreptomicina
Puntas (blancas, amarillas, azul)	Incubadora	Tripsina-EDTA 0,25%
Tubos tipo Falcon (15 - 50 mL)		PBS 1X
Tubos Eppendorf (1,5 - 2,5 mL)		Células MCF-7
Equipo de protección personal		

Autora: Maritza Angelica Canseco Arrunategui

Fuente: Protocolo del Cultivos celulares (24)

2.1.3. Extracción de RNA

Tabla 4 Materiales, equipos y reactivos usados para la Extracción de RNA

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos tipo Falcon (15 - 50 mL)	Vortex	PureLink® RNA Mini Kit
Tubos Eppendorf (1,5 - 2,5 mL)	Centrifuga (Sigma Zentrifugen)	Buffer de lisis
Pipetas automáticas	Cabina de Flujo laminar vertical	Buffer de lavado I
Puntas (blancas, amarillas, azul)	Nanodrop (Thermo Scientific)	Buffer de lavado II
Cartucho giratorio		RNase-Free Water
Tubos de recolección		PBS 1X
Tubos de recuperación		2-mercaptoetanol
Jeringuillas calibre 18-21 mm		Etanol al 70%

Autora: Maritza Angelica Canseco Arrunategui

Fuente: Protocolo del Inserto PureLink® RNA Mini Kit (25)

Preparación del Buffer de lisis: Añadir 10µL de 2-mercaptoetanol en 1mL de tampón de lisis (PureLink® RNA Mini Kit)

2.1.4. qRT-PCR

Tabla 5 Materiales, equipos y reactivos usados para qRT-PCR

Materiales	Equipos	Reactivos
Pipetas automáticas	Vortex	SuperScript III
Puntas (blancas, amarillas)	Cabina de Flujo laminar vertical	Primer Forward
Placas para RT-PCR (96)	Termal Cycler (CFX96** Real-time System)	Primer Reverse
	Centrifuga para Eppendorfs	2X SYBR green
		RNase-Free Water
		RNA Template

Autora: Maritza Angelica Canseco Arrunategui

Fuente: Protocolo del Inserto SuperScript III RT/Platinum® *Taq* Mix (26)

2.2. Métodos

2.2.1. Método de desecación de material vegetal

Para la desecación del material vegetal se utilizó el procedimiento estandarizado por el grupo de investigación de la UTA, donde primero se obtuvo el material vegetal bajo las recomendaciones del Ministerio del Ambiente (**Anexo 4**) de: *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* en la provincia de Pastaza, respaldado por el Ministerio del Ambiente del Puyo (**Anexo 5**), además las muestras extraídas contaron con los permisos respectivos de los dueños de las locaciones, donde se recolectó el material vegetal sin realizar ningún daño a la naturaleza (**Anexo 7**), mismas muestras fueron evaluadas e identificadas por personal especializado del Herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato (**Anexo 8**), tomando en cuenta que no presentarán alteraciones organolépticas. Se seleccionó las hojas frescas de *Ilex guayusa*, corteza de *Uncaria tomentosa* y látex rojo de *Croton lechleri*, posteriormente se transportó hasta el Laboratorio de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos (FCIAL), donde se lavó con agua destilada y se colocó en la estufa para el desecado durante 24 horas con una ventilación de 30% y una temperatura de 40°C para deshidratar el material vegetal. Transcurrido este periodo de tiempo se trituró todo el material vegetal y se pesó en la balanza mod:EQ-510, después se realizó un cálculo 1:15 (Peso/Volumen), donde el material vegetal correspondía al soluto (peso – g.) y el etanol al 96% representó el disolvente (Volumen – mL) (23)(27)(28).

En el caso de sangre de drago (*Croton lechleri*) por ser un extracto de consistencia

liquida se realizó directamente la liofilización, luego se resuspendió en PBS1X y por último se esterilizó por el método de filtración (filtro de 0.22mm).

2.2.2. Maceración en Etanol 96% y Liofilización

Las hojas de *Ilex guayusa* y la corteza de *Uncaria Tomentosa* se trituraron y colocaron en un recipiente de color ámbar con etanol al 96% y se los dejó reposar a temperatura ambiente durante 7 días en un lugar privado de la luz. Después se realizó la filtración al vacío en el Equipo WELCH, empleando papel filtro Whatman #1, por dos ocasiones para obtener todos los principios activos del material vegetal. Luego se procedió a colorar la materia prima en el rotavapor ELEYA N-1100 Series, con una presión reducida de 61 heptoPascal (hPa) y a una temperatura de 40°C, tras la evaporación del disolvente (etanol al 96°) se midió el pH de cada extracto utilizando el pHmetro *Thermo Scientific*, se almacenó los extractos en recipientes estériles de boca ancha envueltos en papel aluminio.

Al momento de liofilizar se colocó los extractos en congelación (-80°C) en el Liofilizador Virtis Sp, a una presión de 500 miliTorr (mT) y -42°C durante 24 horas, en este tiempo se produce una separación del agua por sublimación. Este paso ayuda a preservar los principios activos de las plantas, volviendo al material vegetal de estado líquido a polvo (23)(27)(28).

Para utilizar los extractos liofilizados se resuspendieron en PBS1X (Buffer fosfato salino), y se realizó una esterilización por filtración a través de un filtro de 0,22 micras (Millipore, USA). Se almacenó a -80°C.

2.2.3. Cultivos celulares

En el presente estudio se trabajó con líneas celulares humanas de cáncer de mama (MCF-7), estas líneas celulares se cultivaron en DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), como inhibidores del crecimiento de contaminantes se utilizó: penicilina (100 U/mL) / estreptomina (100 µg/mL) y como aditivo 1% de Glutamina (13)(24).

2.2.4. Descongelación de línea celular MCF-7

Para preservar líneas celulares MCF-7 se necesita de una atmósfera de nitrógeno líquido (-196°C), para descongelar las células se incubaron en baño María por 1 minuto, después se transfirió las MCF-7 del criovial a un falcón de 15mL con

5mL de DMEN para inhibir el DMSO (Dimetilsulfóxido). Posteriormente se centrifugó a 500 gravedades por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, mientras que el precipitado es resuspendido con 500µL de medio de cultivo y se pasa a una frasca (frascos de Roux) que contenía 10mL de medio de cultivo suplementado. Se incubó durante 24 horas a 37°C y una atmosfera de 5% de CO₂ (13)(29).

2.2.5. Pases de cultivos celulares

Los cultivos celulares con un crecimiento y adherencia del 80% - 100% (confluencia) se lavaron con 10ml de PBS1X a 37°C. Posteriormente se colocó 1ml de tripsina/EDTA al 0,25% a 37°C para despegar las células, se dispersó la solución por toda la frasca y se incubó a 37°C y 5%CO₂ durante 5 minutos, la actividad de la enzima tripsina se inhibió por la adición de 5ml de medio suplementado con 10% de FBS. La suspensión celular se centrifugó a 500 gravedades por 5 minutos y el sedimento se lo resuspendió en 1ml de medio de cultivo suplementado. Previamente se colocó tres frascas de cultivo celular con 10ml de medio DMEN se adiciono 300µl del resuspendido a cada frasca y se incubó a 37 °C, 5% de CO₂, durante 24 horas (13).

2.2.6. Exposición del cultivo celular a los extractos de las plantas: *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* (TRATAMIENTO)

Se colocó 100ml de los extractos filtrados y diluidos en PBS1X (Dilución 1/10) en los cultivos celulares con confluencia al 80% - 100% en frascas Roux, se incubó a 37°C a una atmosfera de 5%CO₂, durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se observó el efecto del tratamiento en el microscopio invertido. Luego se procedió a extraer las células tratadas, primero se desecha el DMEN + EXTRACTOS y se realizó un lavado con 10ml de PBS1X, se añadió 1ml de tripsina/EDTA y se incubó a 37°C con una atmosfera de 5% CO₂ durante 5 minutos, transcurrido este tiempo se neutralizó con 2ml de DMEN y se colocó en un falcón de 15ml para centrifugar durante 5 minutos a 500 gravedades, para finalizar se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet en congelación (-80°C) (18).

2.2.7. Extracción y cuantificación de RNA

Para la extracción de RNA, se usó el kit comercial (PureLink® RNA Mini Kit, Thermo Fisher Scientific). Se utilizó el concentrado de células MCF-7 con tratamiento de los extractos de las plantas durante 24 horas.

Lisis Celular: Se resuspendió el pellet extraído en el paso anterior con 1 ml de PBS1X frío y se transfirió a un eppendorf libre de ARNasas, después se centrifugó a 2.000 xg

durante 5 minutos a 4 °C para sedimentar. Posteriormente se descartó el PBS y se añadió 300 µl de tampón de lisis preparado con 2-mercaptoetanol a la muestra, después se colocó en un vortex a alta velocidad hasta que el sedimento celular este completamente dispersos y las células aparezcan lisadas (2 minutos aprox.), luego se pasó el lisado 7 veces a través de una aguja de calibre 18-21 unido a una jeringuilla.

Homogenización: Al producto obtenido se agregó 300 µl de etanol al 70% y se agitó en el vórtex para mezclar bien y disolver cualquier precipitado visible que pueda formarse después de agregar etanol

Purificación: Se transfirió 700 µl de la muestra a la columna con el tubo de recolección y se centrifugó a 12,000 xg durante 15 segundos a temperatura ambiente, se desechó el líquido que atraviesa la columna, y se volvió a insertar el cartucho giratorio en el mismo tubo de recolección, posteriormente se agregó 700 µl de tampón de lavado I a la columna y se centrifugó a 12,000 xg durante 15 segundos a temperatura ambiente, se descartó el flujo y el tubo de recogida. Después se colocó el cartucho giratorio en un nuevo tubo de recolección y se añadió 500 µl de tampón de lavado II con etanol al cartucho giratorio, se centrifugó a 12,000 xg durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se desechó el líquido obtenido y se insertó el cartucho giratorio en el mismo tubo de recolección.

Se centrifugó el cartucho giratorio a 12,000 xg durante 1-2 minutos para secar la membrana con el ARN unido. Se desechó el tubo de recolección y se insertó el cartucho giratorio en un tubo de recuperación, para finalizar se agregó 30µl de agua libre de RNAsa, en el centro del cartucho giratorio, se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto, se volvió a centrifugar el cartucho giratorio durante 2 minutos a $\geq 12,000 \times g$ a temperatura ambiente para eluir el ARN de la membrana en el tubo de recuperación y se almacenó el ARN purificado (-80°C) o se procede a analizar el ARN, cuantificar y determinar su pureza.(25)

Cuantificación y Determinación de la Pureza del RNA extraído: Para cuantificar el RNA se colocó 1 µl del producto obtenido en el nanodrop (Thermo Scientific) y se leyó la curva con las diferentes absorbancias y su respectiva cuantificación. La determinación de la pureza se realizó utilizando las absorbancias 260nm y 280nm, el cociente obtenido hace referencia a la cantidad de proteínas, un resultado < 2.00 es indicativo de un RNA

puro.

2.2.8. Diseño de los cebadores para qRT-PCR

Para realizar la qRT-PCR se diseñó los primer utilizando el software de Primer3Imput y se comprobó la eficiencia de los cebadores utilizando In silico PCR.

Tabla 6 Secuencia de los Primers utilizados

Gen	Cebadores de sentido (5' – 3')	Cebadores antisentido (5' – 3')
	Primer Forward	Primer Reverse
GAPDH	GAG TCA ACG GAT TTT GGT CGT	TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG
BCL2	CAG CTG CAC CTG ACG CCC TT	GCC TCC GTT ATC CTG GAT CC
BAX	GTC ACT GAA GCG ACT GAT GT	AAA ACA CAG TCC AAG GCA GC

Autora: Maritza Angelica Canseco Arrunategui

Fuente: Invitrogen

2.2.9. Determinación de la expresión Genética de Bcl2 y Bax mediante qRT-PCR

Para realizar la qRT-PCR se colocó 25µL de 2X SYBR Green Reaction Mix, 1 µL de SuperScript III RT/Platinum® *Taq* Mix, 1 µL del primer Forward (10 µM) y 1 µL del primer Reverse (10 µM), 500 ng/µL de RNA (1 µL) y se completó con agua libre de ARNasa hasta obtener 50µL, esta solución se colocó al vortex durante 5 segundos y a la centrifugadora durante 1 minuto. Todo el procedimiento anterior se realizó en la cabina de flujo laminar sin luz, para evitar la degradación del fluoróforo. Se programó el equipo CFX96** Real- Time System de BIO-RAD (50°C durante 3 minutos, 95°C por 5 minutos y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguido de 60°C durante 30 segundos, para finalizar se coloca 1 minuto a 40°C). **Figura 1.** (26)

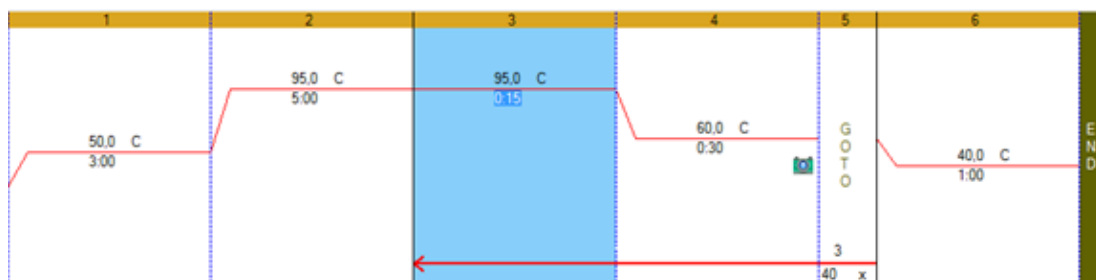


Figura 1. Temperaturas de reacción para la amplificación de Bax y Bcl-2: *Software* BioRad CFX96 Real time.

2.2.9. Análisis de la expresión Genética de Bcl2 y Bax

Los análisis de los resultados obtenidos se realizaron utilizando la cuantificación relativa por el método $\Delta\Delta Ct$ descrito por Livak y Schmittgen en 2001 (13). La fórmula se representa de la siguiente manera:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{Control endógeno})$$

$$\Delta Ct(\text{Calibrador}) = Ct (\text{gen diana control}) - Ct (\text{Control endógeno})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct(\text{calibrador})$$

Usando estas ecuaciones los valores Ct del gen diana y del control endógeno se corrigieron con los Ct del *Housekeeping gene* para eliminar variaciones por errores de pipeteo, degradación parcial del ARN o diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción de RNA a cDNA.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Incremento de expresión del gen diana sobre el calibrador}$$

La ecuación anterior se utilizó para normalizar todos los resultados obtenidos a un valor de 1, con esto la cuantificación de los valores de expresión fueron directamente proporcional a la cantidad absoluta del transcrito, además de conocer si el gen de interés Bax tiene mayor o menor expresión que el gen de interés Bcl-2 (30).

2.2.10. Diseño experimental

Los experimentos realizados en este proyecto de titulación, fueron realizados por triplicado, los resultados obtenidos se analizaron en el programa GraphPad InStat3, mientras que la edición de los gráficos se utilizó GraphPad Prims 8.0 (GraphPad Software). Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA). El test de *post hoc de* Tukey, se utilizó para contrastar los resultados significativos obtenidos con ANOVA. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos para valores de $p < 0.05$.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Análisis e Interpretación de resultados

Tabla 7 Volumen de los extractos vegetales procesados

Nombre de la Planta	Material vegetal seco (g)	Volumen de disolvente (mL)	Volumen filtrado (mL)	Volumen concentrado (mL)	pH
<i>Ilex guayusa</i>	199,2	2.988	1.190	144	5.06
<i>Uncaria Tomentosa</i>	475,61	7.134	6.260	304,6	6.75

Nota: el extracto de *Croton lechleri*** solo requiere liofilización por ser un extracto líquido.

Volumen de los extractos vegetales procesado

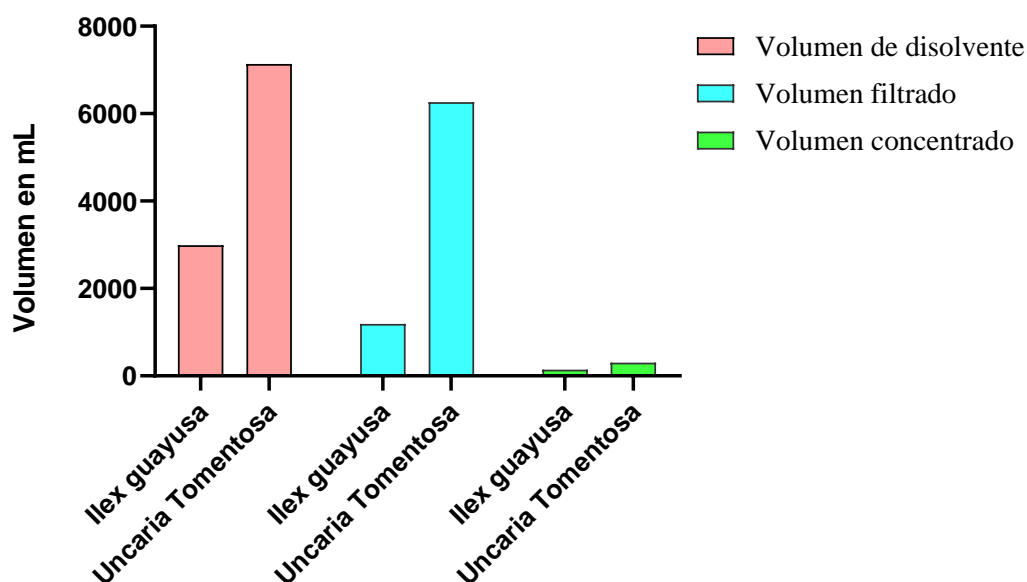


Figura 2. Media del Volumen de los extractos. Maceración: Volumen disuelto, Filtración: Volumen filtrado, Liofilización: Volumen concentrado.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Ecuador es un país megadiverso con una extensión territorial pequeño, pero con una gran riqueza de flora y fauna, por ende, es pertinente indagar las propiedades de cada una de las especies florales presentes en el país y su capacidad farmacéutica. Además de corroborar el uso ancestral de estas especies por comunidades aborígenes de nuestro país, por este motivo hemos elegido las plantas de *Ilex guayusa* (S1°30'35.74054" W78°0'36.057472); *Uncaria Tomentosa* (1°28'S 78°05'O) y *Croton lechleri* (1°28'S 78°05'O) de la provincia de Pastaza para extraer sus principios activos mediante la técnica de maceración en alcohol. En la **Tabla N 7 – Figura 2.** se puede observar la cantidad de material vegetal utilizado para la maceración, en el extracto de *Ilex guayusa* se utilizaron 199,2 g disueltos en 2.988 mL de etanol de 96°, después del filtrado la solución se redujo a 1.190 mL los cuales fueron sometidos al rotavapor para eliminar el etanol y concentrar el extracto obteniendo 144 mL del volumen concentrado. Mientras tanto se utilizaron 471,61g de *Uncaria tomentosa* disueltos en 7.134 mL de etanol al 96°, después del filtrado la solución se redujo a 6.260 mL los cuales al eliminar el etanol y concentrar el extracto se transformaron en 304,6 mL del volumen total concentrado. Para completar el procedimiento se midió el pH de cada extracto teniendo que ambos presentan un pH ácido.

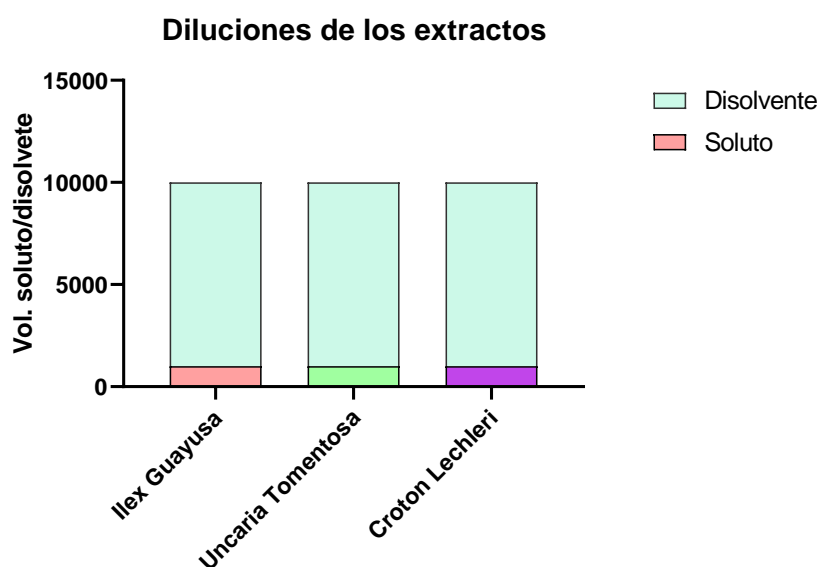


Figura 3. Diluciones de los extractos *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Los extractos fueron diluidos en 1/10 obteniendo la concentración de 3ug/uL de cada tratamiento final para cada frasca, en donde se pesaron 1000 mg de extracto liofilizado en 9000 µL de PBS 1X estéril.

Tabla 8 Efecto de los extractos sobre Cultivos celulares MCF-7

Fecha	Nombre de la planta	Dilución	Horas de tratamiento	Acción
19/12/2018	Control	Sin Tx	24	Sin Efecto
	Ilex Guayusa	1/10	24	Poco Efecto
	Uncaria Tomentosa	1/10	24	Con efecto
	Croton Lechleri	1/10	24	Con efecto
10/1/2019	Control	Sin Tx	24	Sin Efecto
	Ilex Guayusa	1/10	24	Poco Efecto
	Uncaria Tomentosa	1/10	24	Con efecto
	Croton Lechleri	1/10	24	Con efecto
22/1/2019	Control	Sin Tx	24	Sin Efecto
	Ilex Guayusa	1/10	24	Poco Efecto
	Uncaria Tomentosa	1/10	24	Con efecto
	Croton Lechleri	1/10	24	Con efecto

*Tx. Tratamiento

Efecto de los tratamientos (3ug/uL)

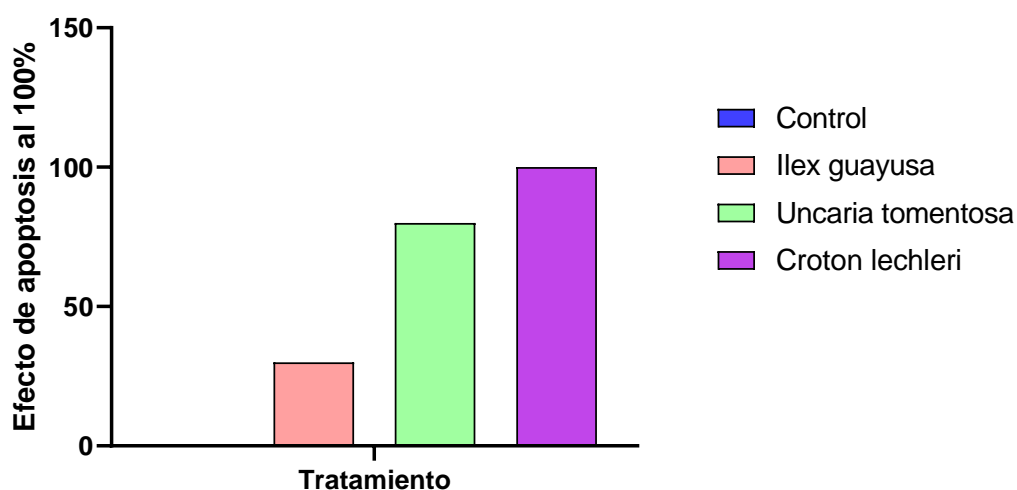
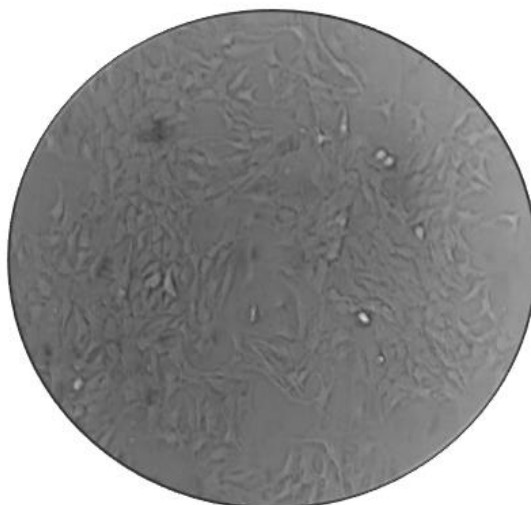


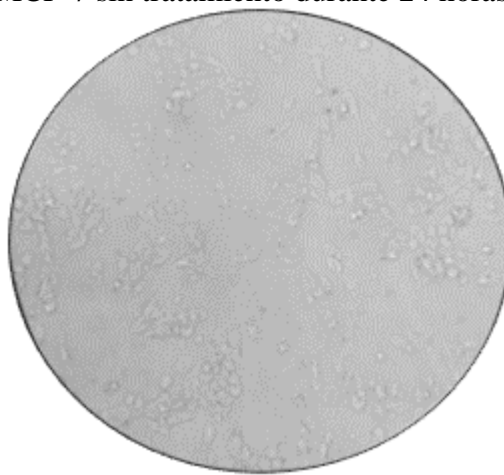
Figura 4. Efecto de los tratamientos con una concentración de 3ug/uL por frasca en células MCF-7.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

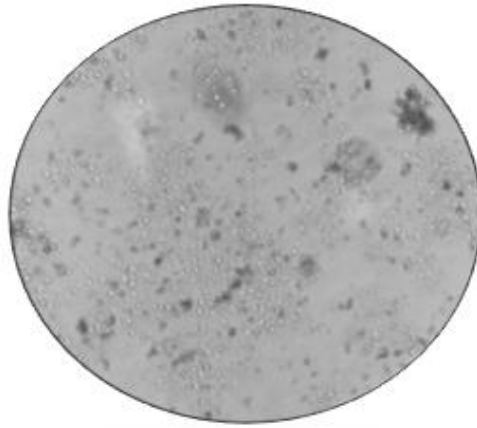
En la **Tabla 8** y **Figura 4**, se observa como los extractos de *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* tienen una acción apoptótica en los cultivos de líneas celulares MCF-7 logrando su efecto máximo a las 24 horas. También se puede apreciar que *Ilex guayusa* presenta una actividad apoptótica menor. Para evaluar el efecto del tratamiento se colocó la misma cantidad de células en cada frasca, para el conteo celular se utilizó una cámara de Neubauer, se incubó durante 24 horas para que las células se enganchen en la placa y posteriormente se colocó los 300 ul del tratamiento a una dilución de 1/10 y se incubó de nuevo durante 24 horas. Los cultivos se valoraron usando el microscopio óptico invertido y para calcular el porcentaje de las células se usó el programa *ImageJ software*.



Fotografía 1. Células MCF-7 sin tratamiento durante 24 horas.



Fotografía 2. Células MCF-7 con extracto de *Ilex guayusa* durante 24 horas.



Fotografía 3. Células MCF-7 con extracto de *Uncaria tomentosa* durante 24 horas.



Fotografía 4. Células MCF-7 con extracto de *Croton lechleri* durante 24 horas.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la **Fotografía 1.** Se puede apreciar como las células MCF-7 sin tratamiento conservan sus características típicas, adherencia a la frasca y su confluencia llega a ser de un 80% - 90%; en la **Fotografía 2.** Donde se expuso las células al extracto de *Ilex guayusa* se observa que el cultivo celular tiene una confluencia parecida a el control, pero se observa pocas células flotantes; **Fotografía 3.** Y **Fotografía 4.** los extractos de *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* a diferencia del anterior se aprecia que las células perdieron sus características fenotípicas y la mayoría se ven deformadas, además las células perdieron su adherencia y no existe proliferación. El tratamiento se realizó en el cultivo o pase número 5, ya que las células MCF-7 aparecen como

agrupaciones tridimensionales unidas de forma flexible con algunas células flotantes en los primeros días de cultivos. Después del 4° día, las células adjuntas comienzan a extenderse para formar una monocapa aplanada y al 5° día la mayoría de las células aparecen como una monocapa aplanada y con un 70% de confluencia aproximadamente.

Tabla 9 Cuantificación de RNA en el equipo Nanadrop (Thermo Scientific)

#	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280
1	Blanco	-0,3	ng/μl	-0,008	-0,01	0,78
2	Control Positivo	526,2	ng/μl	13,154	6,432	2,04
3	<i>Ilex guayusa</i>	274,5	ng/μl	6,864	3,271	2,10
4	<i>Croton lechleri</i>	170,7	ng/μl	4,268	2,056	2,08
5	<i>Uncaria tomentosa</i>	4,3	ng/μl	0,107	0,044	2,43
1	Blanco	-0,3	ng/μl	-0,008	-0,01	0,78
2	Control Positivo	1630,3	ng/μl	40,759	19,508	2,09
3	<i>Croton lechleri</i>	38,8	ng/μl	0,969	0,511	1,90
4	<i>Ilex guayusa</i>	1997,4	ng/μl	49,935	24,008	2,08
5	<i>Uncaria tomentosa</i>	336,6	ng/μl	8,416	4,051	2,08
1	Blanco	-1,2	ng/μl	-0,031	-0,021	1,46
2	Control	504,0	ng/μl	12,601	6,132	2,05
3	<i>Ilex guayusa</i>	681,4	ng/μl	17,038	8,26	2,06
4	<i>Uncaria tomentosa</i>	105,6	ng/μl	2,64	1,248	2,12
5	<i>Croton lechleri</i>	524,3	ng/μl	13,107	6,411	2,04

Nota: La pureza del RNA fue determinada por la relación 260/280 que debe ser 2.00

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la **Tabla 9** se puede apreciar concentraciones de RNA que varían entre 4,3 a 1997,4 ng/ul de las células con tratamiento y sus respectivos controles. La extracción de RNA se realizó utilizando la técnica de cromatografía de absorción (Membranas de sílica gel), esta metodología se basa en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en membranas de sílice, en presencia de Trizol (sal caotrópica) más detallado en la metodología. La cuantificación se realiza por medio de espectrofotometría en el nanodrop de (*Thermo Scientific*). Para la valoración de la pureza de los RNAs se lee a diferentes absorbancias. La absorbancia a 260 nm se utiliza para detectar específicamente el componente de ácido nucleico de la solución, mientras que la absorbancia a 280 nm se utiliza para detectar la presencia de proteínas, al relacionar

estas dos medidas se obtiene la pureza del RNA que debe ser aproximadamente 2,00, confirmando que nuestro RNA es óptimo para continuar con la investigación.

Tabla 10 “Ct obtenidos a partir de las diferentes diluciones del ARN extraído de las células tratadas”

Tratamiento	Ct			Promedio
Control	17,01	16,96	16,91	16,96
<i>Ilex guayusa</i>	16,38	16,39	16,39	16,39
<i>Uncaria Tomentosa</i>	16,47	16,25	16,82	16,51
<i>Croton Lechleri</i>	17,05	16,95	16,49	16,83

Validación de gen de control endógeno (GAPDH) mediante validación de Ct.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Como se observa en la **Tabla 10** el gen de control endógeno GAPDH no se ve afectado por el uso de tratamientos de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*. Los promedios de los Ct obtenidos en la qRT-PCR no tienen variaciones significativas utilizando el análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA), la cual para el grupo nos dio una $p > 0.05$ (**Figura 4**) lo que valida a GAPDH.

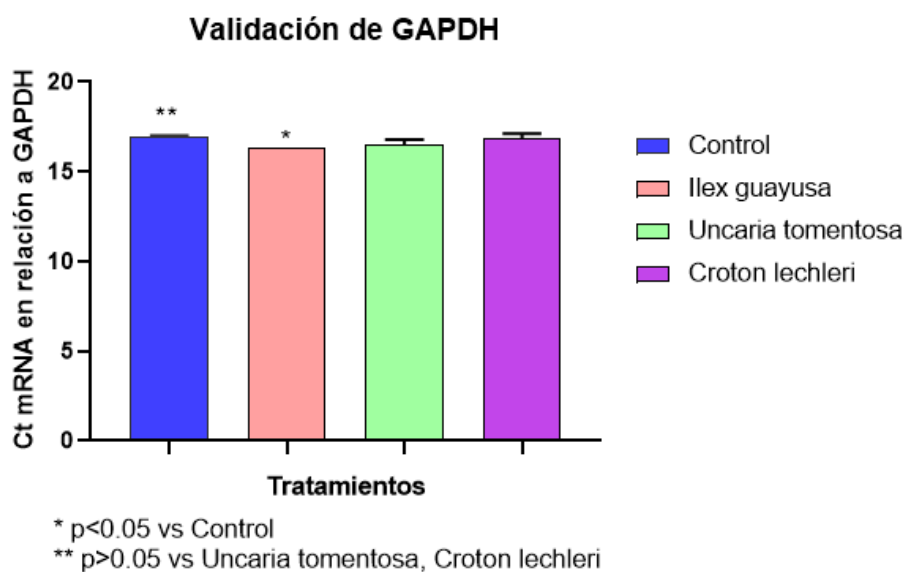


Figura 5. Validación del gen GAPDH mediante el análisis ANOVA y el test de Tukey-Kramer

Tabla 11 Ct obtenidos en la qRT-PCR para el gen Bax

Muestra	Ct			Media
Control	24,01	24,33	24,16	24,17
Ilex guayusa	24,12	24,2	24,36	24,23
Uncaria tomentosa	24,93	25,25	25,37	25,18
Croton lechleri	23,68	24,04	23,84	23,85

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la **Tabla 11** se puede observar las medias de los Ct obtenidos para el gen pro-apoptótico Bax con las diferentes muestras tratadas y sus respectivas replicas, obtenidas en el *Software* Biorad CFX96 Real time

Tabla 12 Ct obtenidos en la qRT-PCR para el gen Bcl-2

Muestra	Ct			Media
Control	21,68	21,43	21,95	21,69
Ilex guayusa	22,00	22,10	22,20	22,10
Uncaria tomentosa	24,13	24,12	24,14	24,13
Croton lechleri	24,18	24,16	24,14	24,16

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la **Tabla 12** se puede observar las medias de los Ct obtenidos para el gen anti-apoptótico Bcl-2 con las diferentes muestras tratadas y sus respectivas réplicas, obtenidas en el *Software* Biorad CFX96 Real time

Partiendo de los valores de Ct crudos para cada gen se cuantifico la expresión relativa utilizando el método descrito por Livak & Schmittgen en el 2001 ($\Delta\Delta Ct$) como se observen en la **Tabla 13** y **Tabla 14**, utilizando como gen de control endógeno los Ct. de GAPDH del control (muestra sin tratamiento) y sus respectivos controles de los genes Bax y Bcl-2 (**Anexo 10**). Una vez que los valores de ΔCt fueron calculados, se hizo una corrección logarítmica para minimizar la varianza de los valores, por la naturaleza exponencial de la curva de qPCR.

Tabla 13 Niveles de expresión relativa con el método $\Delta\Delta C_T$ para el gen Bax

Muestra	Ct SD 3 rep	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$	SD
Control	0,161	0,000	1,000	0,053
<i>Ilex Guayusa</i>	0,118	0,059	0,960	0,036
<i>Uncaria tomentosa</i>	0,232	1,017	0,494	0,071
<i>Croton Lechleri</i>	0,184	-0,313	1,242	0,098

Nota: Los valores de $\Delta\Delta C_T$ Fueron normalizados con GAPDH control y Bax control (**Anexo 10**)

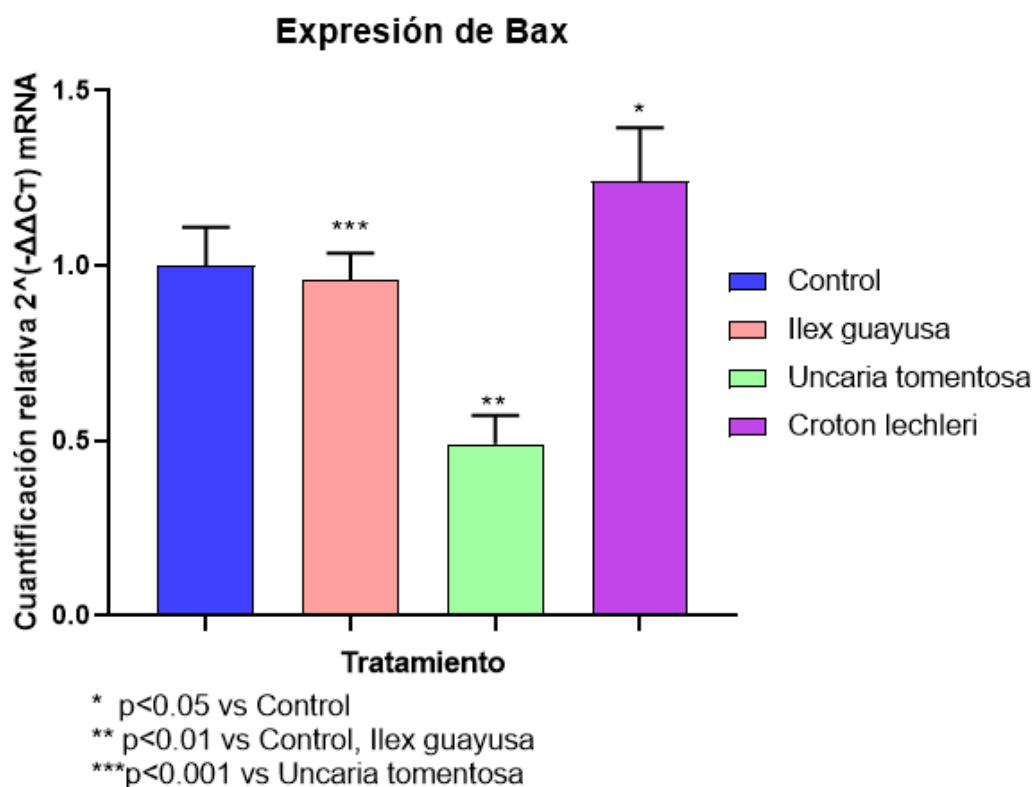


Figura 6. Expresión del gen pro-apoptótico Bax con el método de cuantificación relativa $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ y el test de Tukey-Kramer

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la **Tabla 13** y la **Figura 6**. Se puede apreciar la expresión relativa del gen Bax en relación al control teniendo que no existe un resultado significativo $p>0.05$ entre la muestra control y el tratamiento con *Ilex guayusa*. Para los resultados de *Uncaria tomentosa* en relación al control e *Ilex guayusa*, se calculó una $p<0.01$ lo que significa que en relación al control se encontró una diferencia significativa en la

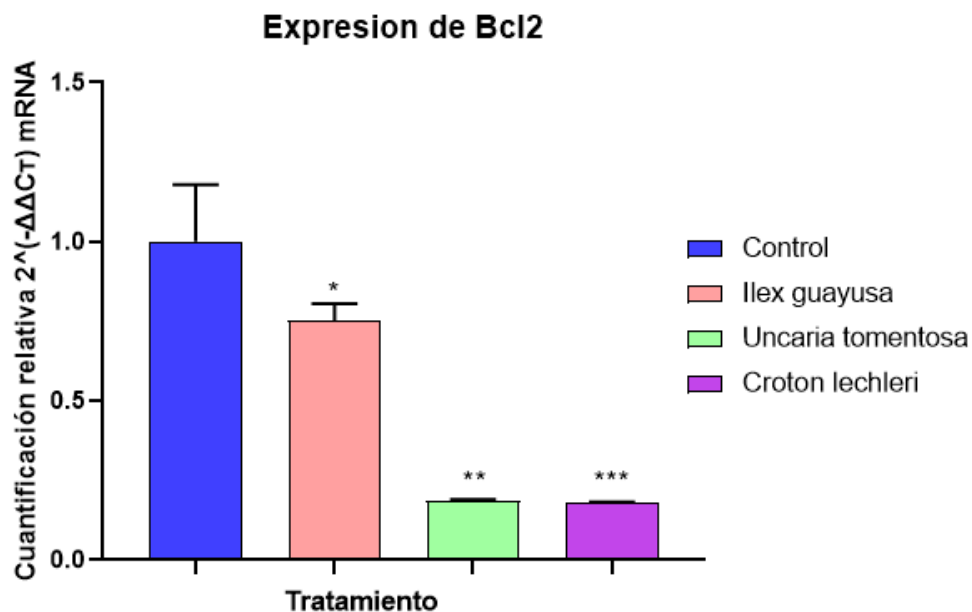
expresión de Bax y la relación de *Croton lechleri* en relación al control existe una diferencia significativa de $p < 0.05$. En esta relación se puede decir que el tratamiento de *Croton lechleri* produce un aumento de la expresión del gen pro-apoptótico Bax a diferencia del tratamiento de *Ilex guayusa* que tiene una expresión similar al control y *Uncaria tomentosa* que disminuyo la expresión del gen de interés.

El valor de p es 0.0002, considerado extremadamente significativo, en relación a la variación entre las medias de las columnas, con una significancia del 95%.

Tabla 14 Niveles de expresión relativa con el método $\Delta\Delta C_T$ para el gen Bcl-2

Muestra	Ct SD 3 rep	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$	SD
Control	0,257	0,000	1,000	0,080
<i>Guayusa</i>	0,142	0,409	0,753	0,043
<i>Uncaria tomentosa</i>	0,028	2,421	0,187	0,017
<i>Croton Lechleri</i>	0,018	2,475	0,180	0,081

Nota: Los valores de $\Delta\Delta C_T$ Fueron normalizados con GAPDH control y Bcl-2 control (**Anexo 10**)



* $p < 0.05$ vs Control
 ** $p > 0.05$ vs Croton lechleri
 *** $p < 0.001$ vs Ilex guayusa, Control

Figura 7. Expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2 con el método de cuantificación relativa $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ y el test de Tukey-Kramer

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la **Tabla 14** y **Figura 7**. Se aprecia una diferencia significativa entre el control y el tratamiento con *Ilex guayusa* de $p < 0.05$ y en relación del control con *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* $p < 0.001$. Además, entre *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* no existe una diferencia $p > 0.05$ ya que los dos ejercen un efecto similar en el comportamiento del gen Bcl-2. En conclusión, el tratamiento con *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* produce una disminución en la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2, mientras que *Ilex guayusa* produce una disminución del mismo gen, pero en instancias mucho menores.

El valor de p es 0.0001 para la variación entre las medias de las columnas, lo que se considera extremadamente significativo.

3.1.1. Discusión

Desde la antigüedad las comunidades y pueblos ancestrales encontraron en la tierra una “farmacia” natural, la misma que se utilizó para tratar diferentes dolencias. En la actualidad, cada vez es más importante conocer sobre los beneficios y bondades de las plantas, además de sus principios activos y método de acción. El Ecuador cuenta con una riqueza inmensa de flora y muchas de estas plantas son utilizadas por los curanderos y chamanes de las comunidades alejadas para tratar diversas enfermedades. Según Jorge Vargas, chaman de la comunidad Indichuris, las plantas de *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*, son utilizadas para formar un remedio usado en enfermedades tumorales. Partiendo de este antecedente se decidió investigar las cualidades de las plantas usadas y comprobar lo expuesto por el conocimiento empírico y creencias del chaman de la comunidad.

Después de conocer las plantas con las que se iba a trabajar, se procedió a elegir las células cancerígenas apropiadas para la investigación, siendo el linaje de células MCF-7 las elegidas. Se experimento en estas células por la incidencia tan alta de cáncer de mama en el Ecuador y ser la causa más frecuente de cáncer en el sexo femenino (2)(3).

A partir todos los hallazgos encontrados, se aceptó la hipótesis alternativa que establece que al menos uno de los extractos de: *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y

Croton lechleri presentan actividad en la expresión de genes inductores de apoptosis en la línea celular MCF-7.

Se utilizó las hojas frescas de *Ilex guayusa* con la finalidad de determinar algún tipo de actividad apoptótica en células MCF-7 en experimentos *in vitro*. En Ecuador la guayusa se ha considerado como un producto energético por su alto contenido de cafeína, además, un estudio realizado por García-Ruiz *et al.* (2017) demostró que las hojas de *Ilex guayusa* tiene propiedades antioxidantes con una gran carga de compuestos como las metilxantinas (cafeína, teobromina, teofilina), fenoles (ácido clorogénico), carotenoides (β -caroteno, α - caroteno, violaxantina, neoxantina y luteína), taninos, azúcares reductores, esteroides, terpenos, flavonoides (quercetina-3-Ohexosa) y quinonas. Se ha demostrado que los principios activos fenólicos y carotenoides mejoran la respuesta inmune y reducen el riesgo de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y la formación de cataratas (31). Los resultados obtenidos en la parte experimental de la investigación demostraron que el extracto etanólico de *Ilex guayusa* no presenta una activada eficiente al momento de inducir apoptosis en las células MCF-7. Con respecto al comportamiento de los genes, el gen Bax (pro-apoptótico) disminuyó su expresión con un nivel de significancia ($p > 0.05$) con referencia al control (MCF-7 sin tratamiento), mientras que el gen Bcl-2 (anti-apoptótico) disminuyó en referencia al control ($p < 0.05$), esto significa que el tratamiento no es muy eficaz al momento de inducir apoptosis, pero la bibliografía expuesta por José Villacis (2017) indica que el consumo regular de guayusa puede prevenir la proliferación de células cancerígenas por su gran cantidad de componentes antioxidantes (32).

La planta *Uncaria tomentosa* es una liana trepadora que alcanza hasta los 20 m. de altura y también es conocida como uña de gato, la corteza presenta dos grupos de alcaloides, los alcaloides indólicos (gambirtanina, dihidrogambirtanina, hirsutina) y los alcaloides oxindoles, que se dividen en tetracíclicos (rinchofilina, isorinchofilina) y pentacíclicos (mitrafilina, isomitrafilina, isopteropodina, pteropodina, uncarinas) (33). La gran cantidad de alcaloides que presenta *Uncaria tomentosa* ha demostrado que aumenta la tasa de inmunoglobulina en pacientes con cáncer, además de presentar propiedades antitumorales mediante el mecanismo de inducción selectiva de la apoptosis. *Uncaria tomentosa* también contiene compuestos flavonoides, como la

epicatequina y cuatro procianidinas que ejercen acciones antineoplásicas, que actúan inhibiendo la actividad de la aromatas (CYP19) produciendo efecto antiestrogénico, que juega un papel importante en el cáncer de próstata y de mama (34). Investigadores italianos (2001) reportaron que la uña de gato inhibió de forma directa en un 90% el crecimiento de las células de cáncer de mama humano (MCF-7) (35). En el laboratorio del Instituto Politécnico Nacional (IPN) de México (2017) combinaron la epicatequina con fármacos como el paclitaxel (Taxol) y el tamoxifeno (Tamoxifen) usados en el tratamiento del cáncer y comprobaron que acelera su efecto y disminuye la cantidad requerida de fármacos (36). Otro estudio realizado por Stuppner H, et al. (1992) estudiaron el efecto antiproliferativo de alcaloides oxindol sobre las líneas celulares leucémicas, mediante ensayos de agar clonogénico y colorimetría (36). Relacionando el bioensayo donde se trabajó con extractos etanólicos - liofilizados a una concentración de 50 mg/mL – dilución 1/10 de *Uncaria tomentosa* se puede inferir que el extracto produce una disminución del gen Bax (pro-apoptótico) con un nivel de significancia del $p > 0.05$ (no es significativo la disminución) y una disminución significativa ($p < 0.001$) del gen Bcl-2 (anti-apoptótico) en relación al control, lo que indica que los alcaloides presentes en el tratamiento producen la inducción de apoptosis en las líneas celulares MCF-7 en estudios in vitro sometidos a nuestras condiciones de estudio.

Croton lechleri o también llamada Sangre de Drago es un árbol de 25 m de altura aproximadamente y su diámetro varía entre 40-50 cm, sus hojas tienen forma de corazón y presenta flores de color blanquecino en la época de verano. La parte más utilizada para tratar enfermedades es su savia o látex rojo que es extraído al momento de producir cortaduras a su tallo. Varias investigaciones han demostrado que el látex rojo de *Croton lechleri* contiene un alcaloide llamado taspina, mismo componente que ha sido estudiado sobre diferentes líneas de células cancerígenas humanas (SK23 de melanoma, LoVo, HT29 de cáncer de colon y HeLa de cáncer cérvico-uterino) (37)(38). La investigación realizada por Montopoli Mónica (2012) indica que el látex rojo induce la apoptosis y daño de microtúbulos en células AGS, HT29 y T84 sugiriendo que la sangre de drago es un posible agentes anti-carcinógeno, siendo la taspina el principio activo responsable de los efectos anticancerígenos (38). Los resultados obtenidos en esta investigación indica que el látex rojo de *Croton lechleri* produce un aumento en la expresión en el gen pro-apoptótico Bax ($p < 0.05$) y una

disminución del gen anti-apoptótico Bcl-2 ($p < 0.001$), lo que ratifica el estudio realizado por Jian-guo Wu, *et al.* (2017) donde la expresión del gen Bax aumento, mientras que el gen Bcl-2 disminuyó al ser expuestos al extracto de la raíz de *Actinidia eriantha* (planta rica en alcaloides) sobre células MCF-7 (18). Otro estudio realizado por Zhan *et al.* (2011) informó que la taspina actúa como antagonista del receptor de estrógeno en el tratamiento de cáncer de mama independiente de estrógeno, también se ha identificado que las concentraciones bajas de taspina puede actuar como estimulante del sistema inmunológico (39). En conclusión, el comportamiento de los genes Bax y Bcl-2 respalda el uso empírico del látex rojo como anticancerígeno en las comunidades de nuestro país y Sudamérica.

3.2. Hipótesis

3.2.1. Hipótesis nula

Los extractos de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* no presentan actividad en la expresión de genes inductores de apoptosis en la línea celular MCF-7.

3.2.2. Hipótesis alternativa

Al menos uno de los extractos de: *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* presentan actividad en la expresión de genes inductores de apoptosis en la línea celular MCF-7.

3.2.3. Verificación de hipótesis

Para la verificación de la hipótesis se utilizó el método de análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional para cada gen analizado. Con este método se rechaza la hipótesis nula si el valor de p calculado es igual o menor que el nivel de significación establecido ($< 0,05$) con un grado de confianza del 95%.

Para este análisis se utilizaron los Ct de cada muestra con su respectiva replica y se transforma los Ct crudos usando la fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, ya que los valores de Ct se obtienen a partir de un gráfico representado por el log-lineal de fluorescencia en

representación a los ciclos. Por este motivo es necesario obtener la variación real de los Ct crudos con la formula anterior (30).

Medidas de Tendencia Central para el gen Bax

	Group A	Group B	Group C	Group D
Col. title	Control	Ilex guayusa	Uncaria toment	Croton lechleri
Mean	1.0033333333	0.9633333333	0.4966666667	1.2466666667
Standard deviation (SD)	0.1102	0.07638	0.08327	0.1550
Sample size (N)	3	3	3	3
Std. error of mean(SEM)	0.06360	0.04410	0.04807	0.08950
Lower 95% conf. limit	0.7297	0.7736	0.2898	0.8615
Upper 95% conf. limit	1.277	1.153	0.7035	1.632
Minimum	0.8900	0.8800	0.4300	1.090
Median (50th percentile)	1.010	0.9800	0.4700	1.250
Maximum	1.110	1.030	0.5900	1.400

Tabla N 15. Cálculo de las medidas de tendencia central para el gen Bax usando la fórmula de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Tabla N14; Anexo 10).

Comparison	Mean		
	Difference	q	P value
Control vs Ilex guayusa	0.04000	0.6264	ns P>0.05
Control vs Uncaria toment	0.5067	7.934	** P<0.01
Control vs Croton lechleri	0.2572	4.772	* P<0.05
Ilex guayusa vs Uncaria toment	0.4667	7.308	** P<0.01
Ilex guayusa vs Croton lechleri	-0.2833	4.437	ns P>0.05
Uncaria toment vs Croton lechleri	-0.7500	11.745	*** P<0.001
	Mean	95% Confidence Interval	

Tabla N 16. Análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA) para el gen Bax y test de Tukey-Kramer (Figura N6)

El valor de p es 0.0002, considerado extremadamente significativo, en relación a la variación entre las medias de las columnas, con una significancia del 95%.

Medidas de Tendencia Central para el gen Bcl-2

	Group A	Group B	Group C	Group D
Col. title	Control	<i>Ilex guayusa</i>	<i>Uncaria tomento</i>	<i>Croton lechleri</i>
Mean	1.0106166667	0.75343	0.18679	0.1798766667
Standard deviation (SD)	0.1791	0.05247	0.003613	0.002268
Sample size (N)	3	3	3	3
Std. error of mean(SEM)	0.1034	0.03030	0.002086	0.001310
Lower 95% conf. limit	0.5656	0.6231	0.1778	0.1742
Upper 95% conf. limit	1.456	0.8838	0.1958	0.1855
Minimum	0.8355	0.7024	0.1840	0.1775
Median (50th percentile)	1.003	0.7507	0.1856	0.1800
Maximum	1.194	0.8072	0.1909	0.1821

Tabla N 17. Cálculo de las medidas de tendencia central para el gen Bcl-2 usando la fórmula de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Tabla N15; Anexo 10).

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
Control vs <i>Ilex guayusa</i>	0.2572	4.772	*	P<0.05
Control vs <i>Uncaria tomento</i>	0.8238	15.284	***	P<0.001
Control vs <i>Croton lechleri</i>	0.8307	15.412	***	P<0.001
<i>Ilex guayusa</i> vs <i>Uncaria tomento</i>	0.5666	10.513	***	P<0.001
<i>Ilex guayusa</i> vs <i>Croton lechleri</i>	0.5736	10.641	***	P<0.001
<i>Uncaria tomento</i> vs <i>Croton lechleri</i>	0.006913	0.1283	ns	P>0.05
	Mean	95% Confidence Interval		

Tabla N 18. Análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA) para el gen Bcl-2 y test de Tukey-Kramer (Figura N7)

El valor de p es 0.0001, considerado extremadamente significativo, en relación a la variación entre las medias de las columnas, con una significancia del 95%.

La prueba ANOVA fue diseñada en el programa GraphPad InStat3, los resultados para el gen Bax fue de p 0.0002, mientras que para el gen Bcl-2 fue p 0.0001, por los que se rechaza la hipótesis nula y se afirma la hipótesis alterna, que menciona: Al menos uno de los extractos de: *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* presentan actividad en la expresión de genes inductores de apoptosis en la línea celular MCF-7.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Según los registros estandarizados del Laboratorio de Investigación se ha podido obtener los 3 extractos etanoicos, siguiendo lineamientos del protocolo establecido por Tona *et al.* (27). El material vegetal fue recolectado de la provincia de Pastaza, vía a Tarqui en la latitud -1.509928 (S1°30'35.74054") y longitud -78.010016 (W78°0'36.057472) lugar donde se recolecto las hojas frescas de la planta *Ilex guayusa* (Guayusa), la corteza de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato) y el látex rojo de *Croton lechleri* (Sangre de drago) las cuales fueron recolectados en la comunidad de Indichuiris en la latitud -1.652495 y longitud -77.922170, las plantas fueron transportadas siguiendo los parámetros del Ministerio del Ambiente (MAE). Después de obtenidos el material vegetal se lo desecó por 24 horas y se utilizó la técnica de maceración para obtener el volumen final concentrado de *Ilex guayusa* (144 mL), *Uncaria tomentosa* (304,6 mL) y 75mL netos de *Croton lechleri*, dichos extractos fueron puestos a prueba en cultivos celulares de líneas MCF-7 y obtuvieron resultados significativos, por lo que podemos concluir diciendo que la técnica de desecación y maceración en alcohol establecido son idóneos para la preservación de la mayoría de los principios activos de los extractos utilizados.
- El gen pro-apoptóticos Bax en la línea celular MCF-7 disminuyo su expresión sin un nivel de significancia importante ($p > 0.05$ y $p < 0.01$) con referencia al control (MCF-7 sin tratamiento) con los extractos de *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa*, mientras que la expresión del mismo gen se vio aumentada por acción del extracto de *Croton lechleri* ($p < 0.05$), concluyendo que el extracto

de *Croton lechleri* infiere positivamente en la apoptosis de las células de cáncer de mama en estudios in vitro, sometidas a nuestras condiciones de estudio.

- El gen anti-apoptótico Bcl-2 en la línea celular MCF-7 disminuyó su expresión sin un nivel de significancia importante ($p > 0.05$) con referencia al control (MCF-7 sin tratamiento) con el extracto de *Ilex guayusa*. Los extractos de *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* disminuyeron la expresión de Bcl-2 con un nivel de significancia importante ($p < 0.001$) en relación al control, lo que indica que los extractos de *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* por su gran cantidad de alcaloides y fenoles presentes una actividad apoptótica idónea para células MCF-7
- El extracto que indujo de manera más efectiva la apoptosis es el de *Croton lechleri*, el cual actúa aumentando la expresión de Bax y disminuyendo la expresión de Bcl-2, como lo indica la bibliografía estudiada y que respalda este estudio.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar más estudios sobre la expresión de Bax; Bcl-2 y otros genes implicados en la apoptosis como las caspasas con el extracto de *Uncaria tomentosa*, ya que los resultados obtenidos no fueron concluyentes del todo.
- Realizar investigaciones de Citometría de Flujo y Anexina V para evaluar la apoptosis inducida por *Croton lechleri* en células MCF-7 y corroborar su acción.
- Aislar el alcaloide Taspina de *Croton lechleri* y realizar estudios en la expresión de los genes Bax y Bcl-2 en células MCF-7 para evaluar la eficiencia y el comportamiento de los genes en mención.
- Investigar la actividad anti-proliferativa y anti-metastásica de los extractos *Uncaria tomentosa*, *Croton lechleri* en células MCF-7.
- Al momento de usar reactivos muy volátiles y tóxicos como el 2-mercaptoetanol es necesario el uso de la cabina de extracción de olores, para evitar sobrecargar el ambiente de trabajo con un olor desagradable y peligroso

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2016 Sep [cited 2019 Mar 9];4(9):e609–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X16301437>
2. Corral F, Cueva P, Yépez J, Tarupi W. Tendencias en incidencia y mortalidad por cáncer durante tres décadas en Quito - Ecuador. *Colomb Med* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 17];49(1):7. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/325891798>
3. Espinosa V (MSP). Estrategia Nacional para la Atención Integral del Cáncer en el Ecuador [Internet]. Quito; 2017 [cited 2019 Jul 17]. Available from: https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/ac_0059_2017.pdf
4. Granados Garcia M, Arrieta Rodriguez O, Cantú de León D. Oncología y Cirugía bases y principios. *El Manual*. Mexico DC: ProQuest Ebrary; 2013. 230 p.
5. Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología Médica. 12º Edició. España: Elsevier España S.L.; 2012. 1115 p.
6. Mc Phee SJ. Fisiopatología de la enfermedad Mcphee. 6º. McGraw-Hill, editor. España: McGraw-Hill; 2010. 747 p.
7. Pazo C, Álvares A, Cebollero M, Martínez L, Bernal A, Pérez G, et al. Apoptosis, cáncer & Co. Elsevier Doyma [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 17];1(23–28):6. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-regio-revista-internacional-grupos-investigacion-339-pdf-X225364501243094X>
8. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Patología Estructural y Funcional. 9º. Barcelona - España: Elsevier Masson SAS; 2013. 924 p.
9. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2019 Jul 11];1813(4):521–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488910003368>

10. Paola A, Shubach J, Galindo AM, Mélida R, Mora S. Regulation of the Bcl-2 protein family in cells infected with *Chlamydia trachomatis* [Internet]. [cited 2019 Jul 11]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n24/v13n24a07.pdf>
11. Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2019 Aug 3];9(6):417–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190564>
12. Fresno M, Rodriguez J, Seco M, Madrigal B, Ablanedo P, Herrero A. Expresión de Bcl-2 y su asociación con la respuesta al tratamiento con Tamoxifeno en el carcinoma de mama avanzado. *Elsevier*. 2016;13:4.
13. Cabrera Riofrío DA. Posible papel estrogénico de metales pesados en cultivos de células de cáncer de mama MCF-7. 2017 [cited 2019 Jul 17]; Available from: <http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/26012>
14. Madrigal Ureña A, Brian ;, Rosenkranz M. Breast cancer overview for general practitioner. *REGIO Rev Int Grup en Investig en Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 17];35(1):8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032676/>
15. Almazán JC. Paclitaxel (Taxol), una sustancia anticancerígena [Internet]. 2006 [cited 2019 Mar 9]. Available from: http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/160_cienciorama.pdf
16. Yadav M, Dhagat S, Eswari JS. Structure based drug design and molecular docking studies of anti-cancer molecules paclitaxel, etoposide and topotecan using Novel ligands. *Curr Drug Discov Technol* [Internet]. 2019 Mar 7 [cited 2019 Mar 9];16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30848204>
17. Comsa S, Cimpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jul 11];8. Available from: <http://ar.iiajournals.org/content/35/6/3147.full.pdf>
18. Wu J guo, Ma L, Lin S hua, Wu Y bin, Yi J, Yang B jun, et al. Anticancer and anti-angiogenic activities of extract from *Actinidia eriantha* Benth root. *J*

- Ethnopharmacol. 2017;203(March):1–10.
19. Kubatka P, Uramova S, Kello M, Kajo K, Kruzliak P, Mojzis J, et al. Antineoplastic effects of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) in the model of breast carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2017;21(11):2837–51.
 20. Luo J, Wei Z, Zhang S, Peng X, Huang Y, Zhang Y, et al. Phenolic Fractions from Muscadine Grape “Noble” Pomace can Inhibit Breast Cancer Cell MDA-MB-231 Better than those from European Grape “Cabernet Sauvignon” and Induce S-Phase Arrest and Apoptosis. *J Food Sci*. 2017;82(5):1254–63.
 21. Sabino APL, Eustáquio LMS, Miranda ACF, Biojone C, Mariosa TN, Gouvêa CMCP. *Stryphnodendron adstringens* (“Barbatimão”) Leaf Fraction: Chemical Characterization, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Towards Human Breast Cancer Cell Lines. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018;184(4):1375–89.
 22. Kuriakose GC, Lakshmanan M D, BP A, RS HK, TH AK, Ananthaswamy K, et al. Extract of *Penicillium sclerotiorum* an endophytic fungus isolated from *Cassia fistula* L. induces cell cycle arrest leading to apoptosis through mitochondrial membrane depolarization in human cervical cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2018;105(January):1062–71.
 23. Bustos Ulloa PL. “Actividad citotóxica de extractos de uncaria tomentosa y mansoa alliacea en líneas celulares de cáncer de mama” [Internet]. Universidad Técnica de Ambato; 2018 [cited 2019 Jun 8]. Available from: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/28581>
 24. Vivancos, V.; González-Alvarez, I.; González-Alvarez, M.; Bermejo M. Cultivos celulares. *Metodol Biofarm en el Desarro Medicam*. 2015;
 25. Ambion. PureLink ® RNA Mini Kit [Internet]. 2012 [cited 2019 Mar 13]. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf
 26. Invitrogen. SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase [Internet]. ThermoFisher Scientific; 2012 [cited 2019 Jun 29]. p. 4. Available from: www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html.

27. Espinoza Caiza EP. “ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica* L., *Ilex guayusa* Y *Uncaria tomentosa* EN *Staphylococcus aureus*.” [Internet]. Universidad Técnica de Ambato; 2019 [cited 2019 Jun 8]. Available from: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29295/2/TESIS ANTI-BIOFILM FINAL..pdf>
28. Rueda Castillo YM. “Actividad antimicrobiana de extractos de *Baccharis salicifolia* y *Mansoa alliacea* en *Escherichia coli*” [Internet]. ; 2016 [cited 2019 Jun 8]. Available from: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/27728>
29. Alberto Bustillos Ortiz A. Efectos de la depleción de la histona H1 en células de cáncer de mama: proliferación y respuesta a interferón [Internet]. [Barcelona]: Universitat de Barcelona; 2017 [cited 2019 Jun 8]. Available from: www.tdx.cat
30. Stephenson H F. *Biología Molecular y Biotecnología*. Segunda. Madrid-España: Elsevier Inc.; 2012. 531 p.
31. García-Ruiz A, Baenas N, Benítez-González AM, Stinco CM, Meléndez-Martínez AJ, Moreno DA, et al. *Guayusa (Ilex guayusa L.)* new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2017 Sep [cited 2019 Jul 24];97(12):3929–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.8255>
32. Villacís Chiriboga J. ETNOBOTÁNICA Y SISTEMAS TRADICIONALES DE SALUD EN ECUADOR. ENFOQUE EN LA GUAYUSA (*Ilex guayusa* Loes). *Rev Etnobiología* [Internet]. 2017;15(1665–2703):10. Available from: <file:///C:/Users/usuario/Downloads/Dialnet-EtnobotanicaYSistemasTradicionalesDeSaludEnEcuador-6237980.pdf>
33. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1998 Jan [cited 2019 Jul 25];64(1):23–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874198000968>

34. Vallejo-Zamudio E, Rojas-Velázquez A, Torres-Bugarín O. Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes [Internet]. Vol. 12. México; 2017 [cited 2019 Jul 25]. Available from: www.medigraphic.org.mx
35. Bussmann RW, Douglas S. PLANTAS MEDICINALES DE LOS ANDES Y LA AMAZONIA [Internet]. 1°. Perú: Graficart; 2015 [cited 2019 Jul 25]. 149 p. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/283355334>
36. López Luengo MT. Uña de gato [Internet]. Vol. 25, Offarm. Doyma; 2006 Nov [cited 2019 Jul 25]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-una-gato-13095508>
37. Sandoval M, Okuhama NN, Clark M, Angeles FM, Lao J, Bustamante S, et al. Sangre de grado Croton palanostigma induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. J Ethnopharmacol [Internet]. 2002 May 1 [cited 2019 Jul 25];80(2–3):121–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874102000132>
38. Montopoli M, Bertin R, Chen Z, Bolcato J, Caparrotta L, Frolidi G. Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. J Ethnopharmacol [Internet]. 2012 Dec 18 [cited 2019 Jul 25];144(3):747–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112007234>
39. Zhan Y, Zhang Y, Chen Y, Wang N, Zheng L, He L. Activity of taspine isolated from Radix et Rhizoma Leonticis against estrogen-receptor-positive breast cancer. Fitoterapia [Internet]. 2011 Sep [cited 2019 Jul 25];82(6):896–902. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605638>

ANEXOS

ANEXO 1. Resolución del macro proyecto de investigación RESOLUCIÓN: 0249-CU-P-2017



Universidad Técnica de Ambato Consejo Universitario

Av. Colombia 02-11 y Chile (Cilla. Ingahurco) - Teléfonos: 593 (03) 2521-081 / 2822960 - Fax: 2521-084
Ambato - Ecuador

RESOLUCIÓN: 0249-CU-P-2017

El Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato, en sesión ordinaria efectuada el martes 31 de enero de 2017, vista y analizada la Resolución CONIN-P-017-2017-Res, del 25 de enero de 2017, suscrita por el Doctor Freddy del Pozo, Presidente Encargado del Consejo de Investigación; solicitando se autorice la reforma a la Resolución 1590-CU-P-2016 del 09 de agosto del 2016; por medio del cual se aprueba el Proyecto de Investigación "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE TOXICIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES"; en la parte pertinente al coordinador del proyecto; por lo tanto se designe a la Licenciada María Elizabeth Proaño Pérez, Docente de la Facultad de Ciencias de la Salud, como Coordinadora Principal del Proyecto en mención, en reemplazo del Doctor Julio Portal, quien fue designado Director Académico de la Institución y cede su condición de coordinador; en uso de sus atribuciones contempladas en el Artículo 21 del Estatuto Universitario, y demás normativa legal aplicable para el efecto:

RESUELVE:

1. Bajo estricta responsabilidad del Consejo requirente, reformar la Resolución 1590-CU-P-2016 del 09 de agosto del 2016; por medio del cual se aprueba el Proyecto de Investigación "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE TOXICIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES"; en la parte pertinente al coordinador del proyecto; por lo tanto se designa a la Licenciada María Elizabeth Proaño Pérez, Docente de la Facultad de Ciencias de la Salud, como Coordinadora Principal del Proyecto en mención, en reemplazo del Doctor Julio Portal, cuya designación se deja sin efecto ya que fue designado Director Académico de la Institución y cede su condición de coordinador.
2. La Dirección de Investigación y Desarrollo, será la responsable de tomar todas las acciones que sean necesarias para que esta nueva designación se la ejecute en legal y debida forma para lo cual tomará todas las acciones que sean necesarias en coordinación con las demás Unidades Académicas y Administrativas.
3. En lo no contemplado en la presente Resolución se estará a lo dispuesto en la originaria.

Ambato enero 31, 2017

Ing. MSc. Jorge León Mantilla
PRESIDENTE (E) DEL H. CONSEJO
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

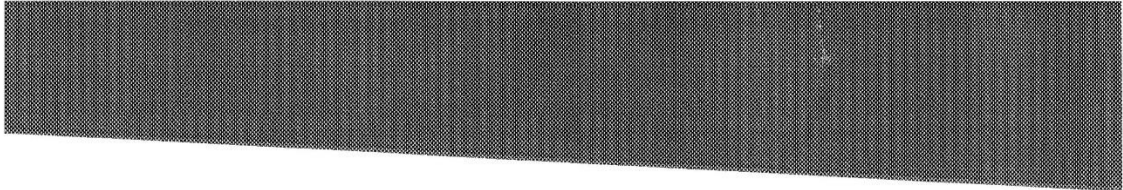
copias: Rectorado, VAC, CONIN, DIBE, DIFIN, FCS, Auditoría Interna

J./RPM

Ab. MSc. José Romo Santana
SECRETARIO GENERAL



ANEXO 2. Resolución y aprobación del tema de investigación, resolución CD-P-2018-3249



CONSEJO DIRECTIVO

F C S

Facultad DE Ciencias
De la Salud

Ambato, 15 de octubre de 2018
Resolución CD-P-2018-3249

Señorita
Canseco Arrunategui Maritza Angélica
ESTUDIANTE
Carrera de Laboratorio Clínico
Facultad de Ciencias de la Salud
Presente.

De mi consideración:

El H. Consejo directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud, en sesión ordinaria del 15 de octubre de 2018, en conocimiento del memorando UTA-UAT-FCS-2018-0787-M, solicitando se apruebe la modalidad de titulación mediante **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**, de la señorita **Canseco Arrunategui Maritza Angélica**, estudiante del ciclo septiembre 2018 – febrero 2019, al respecto.

CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:

- AUTORIZAR A LA SEÑORITA CANSECO ARRUNATEGUI MARITZA ANGÉLICA ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO, DEL CICLO SEPTIEMBRE 2018 – FEBRERO 2019, OPTAR POR LA MODALIDAD DE GRADUACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CON EL TEMA "ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE LA ZONA CENTRAL ANDINA ECUATORIANA ", PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO.
- DESIGNAR COMO TUTOR DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN, AL DOCTOR ALCIDES ALBERTO BUSTILLOS ORTIZ, QUIEN DEBERÁ PRESENTAR UN INFORME BIMENSUAL DE SU AVANCE Y UNO AL FINAL DE CONFORMIDAD CON EL ART. 14 DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO TERMINAL DE TERCER NIVEL DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- AUTORIZAR A LA SEÑORITA ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO LA ELABORACIÓN DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN EN LOS PLAZOS ESTABLECIDOS EN LA DISPOSICIÓN GENERAL DEL ARTÍCULO TERCERO Y CUARTO DEL REGLAMENTO DE RÉGIMEN ACADÉMICO.

Atentamente,

Dr. Mg. Marcelo Ochoa Egas
Presidente



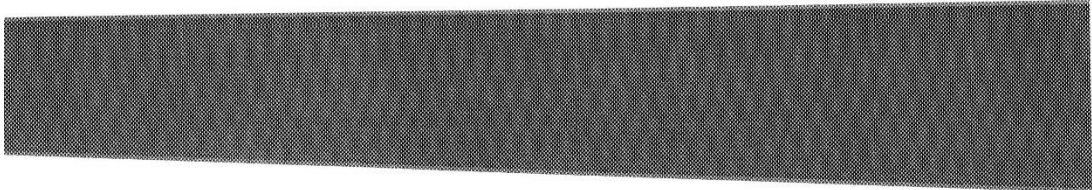
Anexo memorando UTA-UAT-FCS-2017-0787-M, documentación correspondiente
c.c. Carpeta estudiantil
DOCTOR ALCIDES ALBERTO BUSTILLOS ORTIZ, Tutor



UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE AMBATO

Cdla. Ingahurco Teléfono (03) 3 730 268 Ext. 5211

ANEXO 3. Resolución de cambio del tema de investigación, resolución CD-P-2019-0860



CONSEJO DIRECTIVO

FCS
FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD

Ambato, 12 de Marzo de 2019
Resolución CD-P-2019-0860

Canseco Arrunátegui Maritza Angélica
ESTUDIANTE
Carrera de Laboratorio Clínico
Facultad de Ciencias de la Salud
Presente.

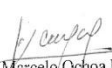
De mi consideración:

El H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud, en Sesión ordinaria del 12 de Marzo de 2019, en conocimiento del memorando UTA-UAT-FCS-2019-0020-M, suscrito por el Dr. Esp. Jesús Chicaiza Tayupanta, Presidente de la Unidad de Titulación, sugiriendo se apruebe El cambio de tema "ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*" de la/el estudiante CANSECO ARRUNATEGUI MARITZA ANGÉLICA de la Carrera de LABORATORIO CLÍNICO, al respecto.

CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:

AUTORIZAR EL CAMBIO DE TEMA DE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE LA ESTUDIANTE CANSECO ARRUNATEGUI MARITZA ANGÉLICA CON EL TEMA "ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS DE LA ZONA CENTRAL ANDINA ECUATORIANA" APROBADO MEDIANTE RESOLUCIÓN: CD-P-2018-3249; POR EL DE "ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*"; RATIFICAR COMO TUTOR AL DOCTOR ALCIDES ALBERTO BUSTILLOS ORTIZ.

Atentamente,


Dr. Mg. Marcelo Ochoa Egas.
Presidente

C.C.

ANEXO

Dr. Alberto Bustillos Ortiz, Tutor del proyecto de investigación
CARPETA ESTUDIANTIL
memorando UTA-UAT-FCS-2019-0020-M (12 hojas)



ANEXO 4. Permiso del Ministerio del Ambiente del Ecuador. (Grupal)



AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

N° 024-2018-IC-FLO-DNB/MAE

FLORA X FAUNA

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere, La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

Investigador/es	C.I/ Pasaporte	Nacionalidad	Actividad
Elizabeth Proaño Pérez	1803000569	Ecuatoriana	Investigador
Marco Esteban Gudíño	1002392882	Ecuatoriana	Investigador
Alberto Bustillos Ortiz	1804001061	Ecuatoriana	Investigador
Mario Vilcacundo Córdova	1802932580	Ecuatoriana	Investigador
Mirari Arancibia Soria	1802142461	Ecuatoriana	Investigador
Julio Portal Pineda	1754710356	Ecuatoriana	Investigador
Yajaira Rueda	1600947624	Ecuatoriana	Tesista
Pamela Bustos	1804288338	Ecuatoriana	Tesista
Espinosa Erika	1501217812	Ecuatoriana	Tesista
Maritza Canseco	1804585741	Ecuatoriana	Tesista
Juan Cortez	1804436291	Ecuatoriana	Tesista
Núñez Erika	1805212154	Ecuatoriana	Tesista
Edgar Borja	0503502999	Ecuatoriana	Tesista

Para que lleven a cabo la investigación científica “ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE TOXICIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES”.

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

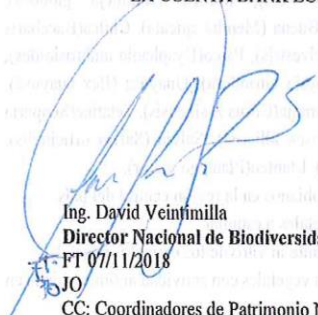
1. Solicitud de: Elizabeth Proaño Pérez- Profesor investigador FCS –UTA.
2. Auspicio de Institución Científica Nacional: Universidad Técnica de Ambato.
3. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Coordinadores de Patrimonio Natural, Responsables de Vida Silvestre de las Direcciones Provinciales y DNB establecidas en la parte inferior de esta Autorización.
4. Inicio y final de investigación: Noviembre 07 de 2018 hasta Noviembre 07 de 2019.
5. Entrega de informe final: 07 de noviembre de 2019.
6. Valoración técnica del proyecto: Fanny Tello
7. Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**. Competencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.
8. Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA/FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin la correspondiente autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad o cada uno de los Centros de Tenencia y Manejo de Flora/Fauna (Herbarios/ Museos de Historia Natural) que cuente con patente vigente emitida por la Autoridad Ambiental.
9. Estas muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de **BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO**, sin la correspondiente Autorización de esta Cartera de Estado.

Complementos autorizados para llevar a cabo la Investigación en campo.

10. Recolecciones de las plantas medicinales se realizarán en senderos vecinos de los cantones de Píllaro, Patate, Quero, Tisaleo, Salcedo, Pujilí, Latacunga, Alausí, Guano, Pallatanga Puyo, Santa Clara, Mera, Chimbo, San Miguel, Guaranda y por ende no habrá afectación al ecosistema. Se recolectará solo las hojas de las plantas medicinales
11. Recolección de tres kilogramos de cada planta medicinal para la obtención de extractos.
12. Análisis organoléptico: Incluyen olor, color, sabor y textura.
13. Extracción sólida – líquido y líquido – líquido: Pulverización
14. Método Kirby-Bauer: Antibiograma

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

- EXPRESADOS EN LA PROPUESTA TÉCNICA TANTO EN TAXONES COMO EN NUMERO DE INDIVIDUOS.
32. PARA EL INGRESO A AREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.
 33. SE PROHÍBE EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES DEL ESTADO ETILICO, PORTANDO ARMAS, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.
 34. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAÍDAS POR EL
 35. INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
 36. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
 37. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE AREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA. Y DEMAS NORMATIVA PERTINENTE.
 38. EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE CODIFICADA, TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÓN.
 39. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA BANK ECUADOR 0010000785, CÓDIGO SUB LÍNEA 190499



Ing. David Veintimilla
Director Nacional de Biodiversidad (Encargado).

FT 07/11/2018

JO

CC: Coordinadores de Patrimonio Natural.
Responsables de Vida Silvestre.

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

ANEXO 5. Permiso del Ministerio del Ambiente del Ecuador. (Individual)

MINISTERIO DEL AMBIENTE



EL GOBIERNO
DE TODOS

DIRECCION PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE FLORA Y FAUNA

AC-FLO-DPAP/MAE-2019-007

El Ministerio del Ambiente, en uso de sus atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a:

Srta. Maritza Angelica Cansecó. C.C. 1804585741.

- Para que lleven a cabo el proyecto de investigación **“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LA LINEA CELULAR MCF-7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*,”**

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

- 1.- Solicitud del** ingresada por Srta. Maritza Angelica Cansecó. C.C. 1804585741.
- 2.- Valoración técnica del proyecto:** Lic. Víctor Curicama, Responsable de Biodiversidad de la DPAP.
- 3.- Institución Científica Extranjera:** Ninguna
- 4.- Institución científica:** UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO.
- 5.- Contraparte del Ministerio del Ambiente:** Dirección Provincial del Ambiente de Pastaza.
 - Director. Ing. Jimmy Guerrero
 - Responsable de Biodiversidad: Lic. Víctor Curicama
- 6.- Complementos autorizados de la Investigación:** NINGUNA.
- 7.- Cantidad de especímenes a colectarse:** Flora *Ilex guayusa* 100 hojas; *Croton lechleri* 100ml; *Uncaria tomentosa*, 500g.
Se realizarán colecciones botánicas.
- 8.- Vigencia:** La vigencia de este permiso de investigación es de un año calendario desde su fecha de expedición que es desde el 27 de junio del 2019 hasta el 27 de junio del 2020.
- 9.- Obligaciones del Investigador:**
 - Entregar tres (3) copias de formato impreso y digital (formato PDF) de los resultados finales del investigador en idioma castellano.
 - Entregar copias de las fotografías (impreso y digital) y/o video que formen parte de la investigación en el trabajo final.
 - Entregar al Ministerio del Ambiente el registro de las especies objeto de su investigación, en formato digital incluyendo la localización exacta de los especímenes observados o muestras colectadas en coordenadas UTM WGS 84 17 SUR.
- 10.- Obligaciones de la Institución Científica Nacional Responsable:**
 - Cumplir con los plazos de entrega de informes finales o parciales.
 - Informar a las dependencias correspondientes del Ministerio del Ambiente sobre irregularidades cometidas por el investigador.

DIRECCION PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA
Dirección: González Suárez y Av. Cárdeno Marín
Pastaza - Ecuador
Código Postal: 080100
Teléfono: (080) 2 2884023 / 2884210
www.ambiente.gub.ec





11.- Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 6, 7, 8, 9, 10, de respetar y hacer cumplir los aspectos legales, administrativos y técnicos a los que el investigador este obligado a ejecutar, se responsabiliza al: Srta. Maritza Angelica Cansecó. C.C. 1804585741

12.- Plazo para la entrega del informe final de investigación: de 13 de junio del 2020.

13.- Estas muestras no podrán ser utilizadas en cualquier actividad de Bioprospección ni Acceso al Recurso Genético sin la correspondiente Autorización del Ministerio del Ambiente del Ecuador.


Ing. Jimmy Ivan Guerrero Naranjo
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE
DE PASTAZA

ANEXO 6. Guía de movilización de extractos de plantas emitido por el Ministerio del Ambiente del Ecuador

MINISTERIO DEL AMBIENTE



EL GOBIERNO DE TODOS

GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE

Nro. DPAP-UPN-VC-2019-040

Fecha de emisión: 1/julio/2019

Fecha de movilización: 03/julio/2019 - 08h00 Válido hasta: 04/julio/2019 - 08h00

La Dirección Provincial de Pastaza, Autoriza a la Srta. Maritza Angelica Canseco Arrunategui. Investigador. La Movilización de muestras florales, Desde la ciudad del Puyo, Provincia Pastaza, Hasta: Universidad Técnica de Ambato, con el siguiente listado.

Lista de muestras colectadas,

Numero	N. Cientifico	Localidad	Cantidad	Coordenadas	
MACA001	<i>Ilex guayusa</i>	Puyo	100 hojas	X -1.509928	Y -78.010016
MACA002	<i>Uncaria tomentosa</i>	Puyo	500g		
MACA003	<i>Croton lechleri</i>	Puyo	100ml		

Observaciones:

Las muestras biológicas serán movilizadas en:

Responsable de la movilización: Srta. Maritza Angelica Canseco con C.C. 180458574-1

Vehículo:

Placas: TGB-2627. Color: Rojo.

Los especímenes van en calidad de:

- Traslado de centro de manejo ()
- Comercio: ()
- Investigación: (X)

“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*”

Blgo. Victor Curipuma
Responsable de Biodiversidad DPAP.
C.I. 1719099028



Srta. Maritza Angelica Canseco
Responsable de la movilización
C.C. 180458574-1

ANEXO 7. Consentimiento de recolección de material vegetal



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

Consentimiento de recolección de material biológico

Yo, **Jorge Custodio Vargas Vargas** con cédula de ciudadanía número **160000287-5** propietario del inmueble ubicado en la comunidad Quichua , Vía a Pomona Km 35 , cerca del Puyo Cantón Pastaza, perteneciente a la provincia de Pastaza autorizo a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Salud y al estudiante de la Carrera de Bioquímica de la Universidad Técnica de Ambato, a que realicen la recolección de muestras de hojas, tallos, corteza de las plantas de: **Sangre de drago, Chuchuhuasi, Uña de gato y Guayusa** que se utilizarán en el proyecto de investigación titulado: "Actividad antimicrobiana y estudios de toxicidad *in vitro* de plantas medicinales" coordinado por el **Doctor Marco Esteban Gudiño Gómezjurado**. Al firmar acepto que el señor no ha causado ningún daño a las plantas y que se me informará sobre los resultados que se obtengan de esa investigación con las especies recolectadas de mi propiedad de los estudiantes


Borja Herrera Edgar Humberto	050350299-9
Cáceres Navas Juan Carlos	180393073-2
Canseco Arrunategui Maritza Angelica	180458574-1
Cortez Pinto Juan Carlos	180443629-1


Para que conste


.....
Dr. Marco Esteban Gudiño


.....
Sr. Edgar Borja Herrera


.....
Sr. Cáceres Juan Carlos


.....
Srta. Canseco Arrunategui Maritza


.....
Sr. Cortez Pinto Juan


.....
Sr. Jorge Custodio Vargas Vargas

En caso de existir alguna duda por favor contactar con el Dr. Marco Gudiño. Carrera de Laboratorio Clínico- Facultad de Ciencias de la Salud (UTA). me.gudino@uta.edu.ec



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

Consentimiento de recolección de material biológico

Yo, **Jorge Martín Pérez Casco** con cédula de ciudadanía número **180163603-4** propietario del inmueble ubicado en la parroquia Tarqui, Vía a Tarqui Km3, Puyo 160150 Cantón Pastaza, perteneciente a la provincia de Pastaza autorizo a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Salud y al estudiante de la Carrera de Bioquímica de la Universidad Técnica de Ambato, a que realicen la recolección de muestras de hojas, tallos, corteza de las plantas de: **Sangre de drago, Chuchuhuasi, Uña de gato y Guayusa** que se utilizarán en el proyecto de investigación titulado: "Actividad antimicrobiana y estudios de toxicidad *in vitro* de plantas medicinales" coordinado por el **Doctor Marco Esteban Gudiño Gómezjurado**. Al firmar acepto que el señor no ha causado ningún daño a las plantas y que se me informará sobre los resultados que se obtengan de esa investigación con las especies recolectadas de mi propiedad de los estudiantes

Borja Herrera Edgar Humberto	050350299-9
Cáceres Navas Juan Carlos	180393073-2
Canseco Arrunategui Maritza Angelica	180458574-1
Cortez Pinto Juan Carlos	180443629-1

Para que conste

		
Dr. Marco Esteban Gudiño	Sr. Edgar Borja Herrera	Sr. Cáceres Juan Carlos

	
Srta. Canseco Arrunategui Maritza	Sr. Cortez Pinto Juan


Sr. Jorge Martín Pérez Casco

En caso de existir alguna duda por favor contactar con el Dr. Marco Gudiño. Carrera de Laboratorio Clínico-Facultad de Ciencias de la Salud (UTA). me.gudino@uta.edu.ec

ANEXO 8. Certificado de haber entregado el material vegetal al “Herbario Misael Acosta Solís” de la Universidad Técnica de Ambato.



Ambato, 10 de julio del 2019

Of. 03-AMAS-2019

Ing.

Diego Bastidas

DIRECTOR PROVINCIAL DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE TUNGURAHUA

Presente.-

De mis consideraciones:

Primeramente permítame saludarle y desearle éxitos en sus funciones que acertadamente desempeña en beneficio del medio ambiente de nuestro país. Por intermedio del presente me permito informar que el Ph.D. Alberto Bustillos Investigador del Proyecto “Estudio de la expresión de genes inductores de apoptosis en la línea celular MCF-7 en respuesta al tratamiento de los extractos de las plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton Lechleri*”. Realiza la entrega a través de su estudiante Srta. Maritza Angélica Canseco Arrunategui integrante de su grupo de investigación de un duplicado de las siguientes colecciones botánicas: *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton Lechleri* al Herbario Ambato Misael Acosta Solís (AMAS) de la Universidad Técnica de Ambato. Material que se mantendrá bajo la custodia de nuestra institución.

Sin otro particular, agradezco y suscribo.

Atentamente,



PhD. José Homero Vargas López
CURADOR HERBARIO (AMAS)



**ANEXO 9. Certificado por parte de responsable del laboratorio de investigación
FCS-UTA.**



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
Facultad de Ciencias de la Salud
Laboratorio de Biología Molecular y Celular
Calle Salvador y México (Calle Imbabura) Teléfono: 2521134 Ext. 114
Ambato – Ecuador

CERTIFICADO

A quien interese:

Yo, Diana Carolina González Palacios con número de cédula de identidad 1802443984, responsable del Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Salud, certifico que la señorita Maritza Angélica Canseco Arruastegui portadora de la cédula de identidad 1804585741, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, carrera de Laboratorio Clínico, realizó la parte experimental del Trabajo de Titulación, bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, con el tema: **“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS: *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*”** en el Grupo de Investigación, desarrollo e innovación biomédica (GIDIB) bajo la supervisión del Dr. Alberto Bustillos, durante el período comprendido desde el 27 de septiembre de 2018 hasta el 11 de julio del presente año, demostrando durante su permanencia responsabilidad, honestidad y dedicación en las labores que le fueron encomendadas.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, pudiendo el interesado hacer uso del presente documento en lo que estimare conveniente.

Ambato, 3 de septiembre de 2019

Atentamente;

Ing. Diana González Palacios



ANEXO 10. Cuantificación relativa.

Target	Sample	Ct	Ct GAPDH	Ct muestra	Ct Calibrador	$\Delta\Delta Ct$	$2(-\Delta\Delta Ct)$	Promedio $2(-\Delta\Delta Ct)$	Desv. Estandar
BAX	CONTROL	24,01	16,96	7,05	7,2070536	-0,16	1,11388	-0,0000	0,1115
BAX	CONTROL	24,33	16,96	7,37	7,2070536	0,17	0,89096		
BAX	CONTROL	24,16	16,96	7,20	7,2070536	-0,01	1,00763		
BAX	GUAYUSA	24,12	16,96	7,16	7,2070536	-0,04	1,02985	0,0586	0,0776
BAX	GUAYUSA	24,20	16,96	7,24	7,2070536	0,03	0,97964		
BAX	GUAYUSA	24,36	16,96	7,40	7,2070536	0,19	0,87755		
BAX	SANGRE DE DRAGO	23,68	16,96	6,72	7,2070536	-0,49	1,40455	-0,3132	0,1578
BAX	SANGRE DE DRAGO	24,04	16,96	7,08	7,2070536	-0,12	1,08908		
BAX	SANGRE DE DRAGO	23,84	16,96	6,88	7,2070536	-0,33	1,25387		
BAX	UÑA DE GATO	24,93	16,96	7,97	7,2070536	0,76	0,59110	1,0169	0,0825
BAX	UÑA DE GATO	25,25	16,96	8,29	7,2070536	1,08	0,47166		
BAX	UÑA DE GATO	25,37	16,96	8,41	7,2070536	1,21	0,43289		
BCL2	CONTROL	21,68	16,96	4,72	4,7262442	-0,00	1,00286	-0,0000	0,1791
BCL2	CONTROL	21,43	16,96	4,47	4,7262442	-0,26	1,19351		
BCL2	CONTROL	21,95	16,96	4,99	4,7262442	0,26	0,83548		
BCL2	GUAYUSA	22,00	16,96	5,04	4,7262442	0,31	0,80723	0,4108	0,0525
BCL2	GUAYUSA	22,10	16,96	5,14	4,7262442	0,41	0,75067		
BCL2	GUAYUSA	22,20	16,96	5,24	4,7262442	0,51	0,70239		
BCL2	SANGRE DE DRAGO	24,18	16,96	7,22	4,7262442	2,49	0,17754	2,4750	0,0023
BCL2	SANGRE DE DRAGO	24,16	16,96	7,20	4,7262442	2,47	0,18002		
BCL2	SANGRE DE DRAGO	24,14	16,96	7,18	4,7262442	2,46	0,18207		
BCL2	UÑA DE GATO	24,13	16,96	7,17	4,7262442	2,44	0,18396	2,4207	0,0036
BCL2	UÑA DE GATO	24,12	16,96	7,16	4,7262442	2,43	0,18555		
BCL2	UÑA DE GATO	24,08	16,96	7,12	4,7262442	2,39	0,19086		

ANEXO 11. FOTOGRAFÍAS

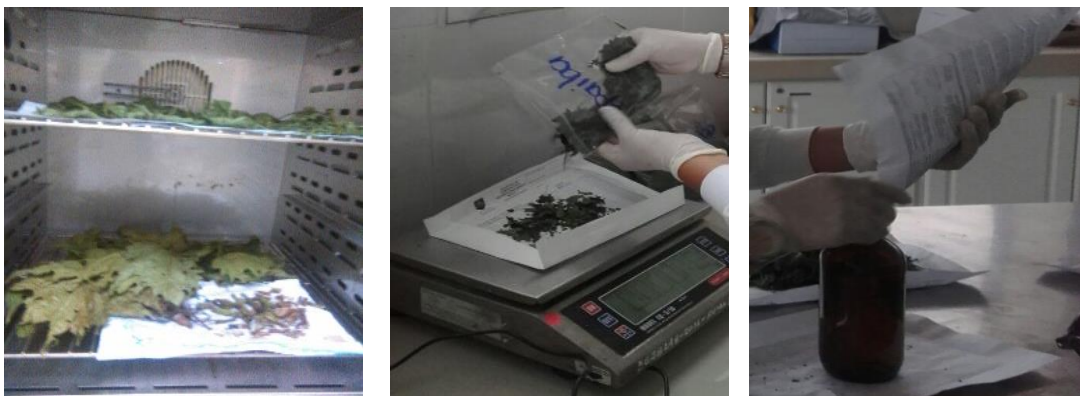
Recolección del material vegetal



Lavado del material vegetal



Secado y Maceración de las plantas



Filtrado al vacío



Rotavapor



Liofilizador y extractos finales



Extracción y cuantificación del RNA



RT-PCR

