



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS Y**

**BIOTECNOLOGIA**

**CARRERA DE INGENIERIA BIOQUIMICA**

---

Efecto in vitro de *Valeriana rígida* y *Valeriana Decussata* en la apoptosis tardía en células cancerígenas

---

Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyectos de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** César Paúl Lizano Guzmán

**Tutor:** PhD. José Homero Vargas López

**Cotutor:** PhD. Yenddy Nayghit Carrero Castillo

**Ambato-Ecuador**

**Enero-2021**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Homero Vargas López

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizó la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 21 de diciembre del 2020

---

PhD. Homero Vargas López

C.I. 180197804-8

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, César Paúl Lizano Guzmán, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



-----  
Sr. César Paúl Lizano Guzmán

C.I. 180517750-6

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que fue elaborado en conformidad a las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para consistencia firman:

-----  
Presidente del tribunal

-----  
PhD. David Andres Terán Mera  
C.I. 171656972-6

-----  
Dra. Lorena De los Ángeles Núñez Villacis  
C.I. 180425690-5

Ambato 11 de enero del 2021

## **DEERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor



-----  
Sr. César Paúl Lizano Guzmán

C.I. 180517750-6

**AUTOR**

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por ser mi fuente de inspiración y darme motivos suficientes en este arduo proceso de la obtención de uno de los objetivos más anhelados de mi vida.

A mis padres Julio y Yolanda, por su infinito amor, trabajo y comprensión en todos estos periodos de estudio, es gracias a ustedes que no he claudicado en este duro aprendizaje y sueño de convertirme en un gran profesional.

A mis tutores el Dr. Homero Vargas y la Dra. Yenddy Carrero por apoyarme con sus conocimientos del manejo de RT-qPCR, manipulación del microscopio fluorescente, manipulación de reactivos, por su paciencia y sobre todo por su gran amistad razones suficientes por las cuales se pudo llevar a cabo el proceso experimental del presente proyecto de investigación.

A mis amigos Jenny, Johnny, Christian, Erika y Jessica por estar presentes en cada paso de mi vida universitaria, como camaradas leales y por ser ese sostén moral que un estudiante necesita en este laborioso camino.

Y, por último, pero igual de importante agradecer a la Facultad por brindarme amistades, conocimientos y experiencias que solo en su seno puede haberlas vivido.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

### PAGINAS PRELIMINARES

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	iv
DEERECHOS DE AUTOR .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
<b>CAPITULO I</b> .....	13
1. Tema de investigación.....	13
1.2 Justificación.....	13
2. Objetivos .....	21
1.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	21
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>CAPITULO II</b> .....	22
METODOLOGÍA .....	22
2.1.1 Material vegetal .....	22
2.1.2 Línea Celular.....	22
2.1.3 Material de laboratorio.....	22
2.1.4. Reactivos.....	23
2.1.5 Recursos tecnológicos.....	23
Obtención Material Vegetal.....	24
Secado y Pulverizado.....	24
Preparación de Extracto .....	24
Cuantificación de solidos.....	25

Cultivo Celular.....	25
Descongelamiento celular.....	26
Pases celulares .....	26
Conteo celular .....	26
Cuantificación de Proteínas .....	27
Ensayos MTT.....	27
qRT PCR P53.....	28
Cuantificación de P53 .....	28
<b>APOPTOSIS TARDIA POR TUNEL EMPLEANDO APO-BrdU™ TUNEL</b>	
Assay Kit.....	28
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>30</b>
3.1. Análisis y Discusión de resultados .....	30
3.1.1. Análisis e interpretación de resultados .....	30
3.2    Discusión .....	39
<b>CAPITULO IV .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
4.1 Conclusiones .....	41
4.2 Recomendaciones .....	41
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>43</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>48</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Concentración diluciones MTT para Rígida Raíz</i> .....	30
<b>Tabla 2</b> <i>Concentración diluciones MTT para Rígida hoja tallo</i> .....	31
<b>Tabla 3</b> <i>Concentración diluciones MTT para Decussata Hoja Tallo</i> .....	32
<b>Tabla 4</b> <i>Concentración diluciones MTT para Decussata Raíz</i> .....	33
<b>TABLA 5</b> CT OBTENIDOS A PARTIR DEL ARN EXTRAÍDO DE LAS DIFERENTES CÉLULAS TRATADAS.....	33
<b>Tabla 6</b> <i>Ct obtenidos en la qRT-PCR para el gen p53</i> .....	35
<b>Tabla 7</b> <i>Niveles de expresión relativa con el método (-<math>\Delta\Delta Ct</math>) para el gen p53</i> .....	35

## Índice de Figuras

<b>FIGURA 1.</b> ENSAYO MTT RÍGIDA RAÍZ .....	30
<b>FIGURA 2</b> ENSAYO MTT RÍGIDA HOJA TALLOS .....	31
<b>FIGURA 3.</b> ENSAYO MTT DECUSSATA HOJA TALLO .....	32
<b>FIGURA 4.</b> ENSAYO MTT DECUSSATA RAÍZ .....	33
<b>FIGURA 5.</b> VALIDACIÓN DEL GEN GAPDH .....	34
<b>FIGURA 6.</b> EXPRESIÓN DEL GEN PRO- APOPTÓTICO P53 CON EL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN RELATIVO $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . .....	36
<b>FIGURA 7.</b> APOPTOSIS TARDÍA DE CÉLULAS MCF-7 CONTROL MAGNIFICACIÓN 630X. LAS CÉLULAS FUERON TEÑIDAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TÚNEL POR APO BDRUÑ LA LECTURA SE REALIZÓ EMPLEANDO LOS FILTROS GFP (475-509 NM) Y DAPI(489-513NM). LAS FLECHAS INDICAN NÚCLEOS DE CÉLULAS AP .....	37
<b>FIGURA 8.</b> MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA APOPTOSIS TUNEL DECUSSATA RAÍZ .....	38

## Índice de Anexos

<b>ANEXO 1. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA .....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO 2. LAVADO DE PLACAS .....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO 3 .TINCIÓN Y FIJACIÓN DE PLACAS.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO 4. CULTIVOS CELULARES.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO 5. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DEL GEN P53 .....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 6.CONCECNTRACION PROTEICA DE LOS TRATAMIENTOS POR EL METODO DE BRADFORD.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 7. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 8. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA: APOPTOSIS TUNEL.....</b>	<b>52</b>

## RESUMEN

El cáncer representa un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente el cáncer de mama, el cual ocupa en el país el primer lugar de incidencia, seguido del de tiroides. Ecuador posee un territorio muy biodiverso con una extensa variedad de plantas medicinales que brindan un posible potencial terapéutico; sin embargo, existen escasos estudios que validen estas propiedades. Razón suficiente para contemplar un sin número de posibilidades en el estudio molecular y bioquímico de diferentes tipos de plantas, en particular de las valerianas. El objetivo del presente proyecto fue evaluar la expresión del gen p53 mediante qRT-PCR de los extractos de *Valeriana rígida* y *Decussata* en la línea celular MCF7, además de apoptosis tardía. Los resultados mostraron que la expresión relativa del gen pro-apoptótico p53 en relación con el control evidenció que los tratamientos; de *Valeriana Decussata* raíz como de *Decussata* hoja tallo producen un aumento de la expresión del gen p53. Por el contrario, para *Valeriana Rígida* raíz y *Rígida* hoja tallo evidencio una expresión menor a la del control. En cuanto a las pruebas de apoptosis tardía mediante APO/bdru Tunel para control se evidencio células cancerígenas MCF7, con núcleos fragmentados. Para el tratamiento con *Valeriana Decussata* Raíz se observaron fragmentos de células y otros fragmentos de ADN que pueden evidenciar el final de la ruta apoptótica, en cuanto *Valeriana Decussata* hoja tallo se observó una sola célula apoptótica, mientras que para *Valeriana rígida* hoja tallo y raíz no se pudo observar indicios de apoptosis tardía.

**PALABRAS CLAVES:** Extractos vegetales, gen p53, apoptosis, alternativas terapéuticas, *valeriana rigida*, *valeria decussata*

## ABSTRACT

Cancer represents a public health problem worldwide, especially breast cancer, which occupies the first place of incidence in the country, followed by thyroid cancer. Ecuador has a very biodiverse territory with an extensive variety of medicinal plants that offer a possible therapeutic potential; however, there are few studies that validate these properties. Reason enough to contemplate a number of possibilities in the molecular and biochemical study of different types of plants, in particular of the valerian ones. The objective of this project was to evaluate the expression of the p53 gene by means of qRT-PCR of the *Valeriana rigid* and *Decussata* extracts in the MCF7 cell line, in addition to late apoptosis. The results showed that the relative expression of the pro-apoptotic gene p53 in relation to the control showed that the treatments; *Valerian Decussata* root and *Decussata* leaf stem produce increased expression of the p53 gene. On the contrary, for *Valerian Rigida* root and *Rigida* leaf stem showed a lower expression than that of the control. Regarding the late apoptosis tests using APO / bdru Tunel for control, MCF7 cancer cells were evidenced, with fragmented nuclei. For the treatment with *Valeriana Decussata* Root, cell fragments and other DNA fragments were observed that may show the end of the apoptotic pathway, as *Valeriana Decussata* leaf stem only one apoptotic cell was observed, while for rigid *Valerian* leaf stem and root no evidence of late apoptosis was observed.

**KEY WORDS:** Plant extracts, p53 gene, apoptosis, therapeutic alternatives, *valerian rigida*, *valeria decussata*

# CAPITULO I

## 1. Tema de investigación

Efecto *in vitro* de *Valeriana rígida* y *Valeriana Decussata* en la apoptosis tardía en células cancerígenas

### 1.2 Justificación

El cáncer se describe como una enfermedad que resulta como consecuencia de cambios celulares que conllevan al crecimiento y la división descontrolada de las mismas. Algunos tipos de cáncer causan un crecimiento celular rápido, mientras que otros provocan que las células crezcan y se dividan a un ritmo más lento (**Ferlay & Mathers, 2013**). Si bien puede parecer algo negativo la muerte celular forma parte de un fenómeno natural y beneficioso denominado apoptosis. Una célula recibe instrucciones de morir para que el organismo pueda reemplazarla con una célula funcional. (**OMS, 2014**).

Las células cancerosas carecen de componentes que señalen la detención del ciclo celular o la apoptosis, los cuales se ven afectados por diversos mecanismos propios de este tipo de células. Obteniendo como resultado que se acumulen en el organismo, utilizando oxígeno y nutrientes que normalmente nutren otras células. Las células cancerosas pueden formar tumores, afectar al sistema inmunitario y causar otros cambios que impiden el funcionamiento regular. Las células cancerosas pueden aparecer en un área específica y luego propagarse a través de los ganglios linfáticos a otras localizaciones (**Ferlay & Mathers, 2013**).

La distribución del cáncer en el mundo es heterogénea. Entre las zonas de alto riesgo se mencionan: América del sur, central y el caribe, en comparación con patrones mundiales. En 2012, se estimó casi el 1.1 millones de nuevos casos de cáncer al año. En los Estados Unidos existen más de 10,000 nuevos casos al año con más de 3,700 muertes por año atribuidas a esta enfermedad. Para el año 2030 se espera un incremento del 66% en los casos de cáncer. (**Bray & Piñeros, 2016**).

En 2018, aproximadamente 22,240 nuevos casos fueron diagnosticados y se registraron 14,070 muertes por cáncer de ovario en los Estados Unidos. El cáncer de ovario representa el 2,5% de todas las neoplasias malignas entre las mujeres, pero el

5% de las muertes por cáncer en mujeres debido a las bajas tasas de supervivencia, impulsadas en gran medida por los diagnósticos en etapa tardía. Aunque el avance del conocimiento sobre el cáncer de ovario se ha visto obstaculizado anteriormente por la heterogeneidad sustancial de la enfermedad y las incertidumbres sobre los tejidos de origen del tumor, la comprensión ha evolucionado rápidamente en los últimos años, especialmente para los tumores epiteliales, que son el tipo más común. **(Torre et al., 2018)**

En Ecuador la incidencia del cáncer es de 157,2 casos por 100.000 habitantes, según reporta la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), departamento perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), que reveló el aumento de los casos de cáncer a nivel mundial en el 2018. Por lo que se estima que un hombre por cada 5 y una mujer por cada 6 en el mundo desarrollarán un cáncer durante toda su vida, mientras que uno de cada 8 hombres y una de cada 14 mujeres morirá de esta enfermedad **(OMS, 2014)**

El cáncer de mama es uno de los principales tipos de neoplasias que afectan a las mujeres a nivel mundial, el Ecuador ocupa el primer lugar, seguido del cáncer de tiroides y de cuello uterino respectivamente. **(Saleh, 2009).**

El cáncer cervicouterino representa un problema de salud pública en el mundo, corresponde al 10% de todos los cánceres, es la tercera neoplasia más diagnosticada. Cada año alrededor de 500,000 casos nuevos son diagnosticados en todo el mundo. Se estima que produce alrededor de 231,000 muertes por año, 80% de las cuales ocurre en países en vías de desarrollo **(Urry & Reece, 2017).**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe dos tipos histológicos principales de cáncer invasivo: Carcinoma de células escamosas, que compone cerca del 75% de todos los casos y el adenocarcinoma que comprende cerca del 15-25% de todos los casos. Otros tipos de carcinoma como el carcinoma adenoescamoso, carcinoma adenoide quístico y carcinoma metastásico constituyen el restante 3-5% de casos. Los métodos de detección oportuna han decaído en mortalidad principalmente debido al carcinoma de células escamosas; sin embargo, la prevalencia del adenocarcinoma no ha tenido un impacto considerado por la realización de Papanicolaou **(OMS, 2014).**

Por lo expuesto anteriormente, a pesar del innegable desarrollo tecnológico y científico, este tipo de patologías aún continúa sin la certeza de cura, adquiriendo el estigma de terminal (**Ferlay & Mathers, 2013**). A través de la literatura se menciona que la quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y cirugía son las formas más promisorias en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, hay conocimiento de otras técnicas de tratamiento, las llamadas prácticas alternativas, caracterizadas por el empleo de métodos no convencionales. (**Sancho, 2004**).

La OMS define como planta medicinal, a aquellas cuya estructura biológica posee sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que sean precursores de fármacos semisintéticos (**Plummer & Franceschi, 2016**). Con el paso de los años se han presentado varios procedimientos clínicos que utilizan las plantas medicinales tradicionales (**Stewart & Wild, 2014**). El uso de plantas medicinales con fines terapéuticos es una práctica antigua, cimentada en el conocimiento del sentido común en un contexto histórico y empírico, representando así parte de la cultura de un pueblo y un conocimiento que es difundido de generación en generación, convirtiéndose de tal forma en una práctica muy utilizada en la salud humana (**Sancho, 2004**).

Ecuador se caracteriza por ser un país muy biodiverso con una extensa variedad de plantas medicinales que brindan beneficios curativos; sin embargo, no existen estudios suficientes que validen tales facultades. Razón por la cual se contemplan las posibilidades ilimitadas en el estudio molecular y químico de diferentes tipos de plantas medicinales, tal es el caso en particular de las valerianas. La valeriana se conoce y utiliza desde la antigüedad. Los médicos griegos y romanos la prescribían como diurético, analgésico y antitusígeno. Tradicionalmente se ha empleado en casos de ansiedad, excitabilidad, insomnio y como antiespasmódico, así mismo; se ha utilizado para combatir el dolor de cabeza, cólicos intestinales, dolores reumáticos, dismenorreas, entre otros (**Alvim & Filho, 2006**).

En cuanto a la composición química de la raíz de valeriana se incluye principalmente sesquiterpenos e iridoides, todos ellos compuestos de naturaleza terpénica (**Revista Saúde 2008**).

Los sesquiterpenos son oxigenados y pueden ser cetonas (valeranona), alcoholes (valerianol, alcohol kesílico), ésteres (éster del valerianol), aldehídos (valerenal) y

ácidos (ácidos valerénico, acetoxivalerénico e hidroxivalerénico). Entre otros productos esta la dipropilacetona, el ácido dipropil-β-oxibutírico, el ácido valproico que contienen propiedades particularmente anticancerígenas. El ácido valproico farmacéuticamente tiene la capacidad de sensibilizar las células cancerosas humanas (cáncer de colon, pulmón, cáncer cervical, leucemia, cáncer de mama). Por lo tanto, el ácido valproico presenta resultados eficaces como posible método no convencional para combatir el cáncer. **(Alvim & Filho, 2006).**

Por lo antes descrito, se busca en el presente proyecto de investigación evidenciar si los extractos de plantas pueden brindar posibles alternativas en el tratamiento del cáncer por medio de un estudio preliminar *in vitro* de dichos principios activos, para combatir la enfermedad y sobre todo optimizar tratamientos para las personas que la padecen, por medio de procesos que provoquen la activación inminente de las vías apoptóticas con la consecuente eliminación de las células cancerígenas de forma no convencional sin perjudicar directamente la integridad del paciente por los efectos colaterales que los tratamientos actuales producen.

## **1.2. Marco Teórico**

### **1.2.1 Antecedentes investigativos**

En los tejidos normales hay un equilibrio entre la generación de nuevas células a través de la división y la pérdida de células a través de la degeneración celular. Las células maduran y pierden estabilidad estructural con el tiempo provocando su eliminación. Esta es una forma esencial de renovación. Del mismo modo que la división celular, la muerte celular también está estrechamente programada con un proceso denominado muerte celular o apoptosis **(Gutiérrez & Fernández, 2007).**

La apoptosis es un proceso minucioso en el cual el genoma de la célula se desordena, la célula se fragmenta en pequeños trozos y los desechos son consumidos por las células fagocíticas que limpian los fragmentos celulares. Además de deshacerse de las células dañadas y potencialmente peligrosas, la apoptosis es crucial para el desarrollo embriológico y la poda neurológica. El término "apoptosis" proviene de las palabras griegas *apo* (de) y *ptosis* (caída) y se utilizó para describir las hojas que caen de un árbol **(Letai, 2010).**

Hay dos fases que se distinguen fácilmente en la apoptosis, la llamada fase de iniciación y la fase de ejecución. La fase de iniciación incluye muchas proteínas diferentes y es bastante complicada. Comienza por varios "esfuerzos" desde fuera (extracelular) o dentro de la célula (intracelular). Entre los ejemplos de señales extracelulares que estas desencadenan incluyen la pérdida de factores de crecimiento, así también niveles bajos de oxígeno y radiación. Las señales intracelulares incluyen daño en el ADN, daño causado por los medicamentos de quimioterapia, el mal funcionamiento de los telómeros y por último la infección por cierto tipo de virus. La fase de ejecución es consecuente de la fase de iniciación. La fase de ejecución comprende la activación de enzimas especializadas (caspasas y entre otras) que reflejadas directamente en la muerte celular **(Wong, 2011)**.

La Fase de iniciación está comprendida por dos vías: la vía extrínseca o mediada por el receptor, donde los miembros de la TNF (tumor necrosis factor) receptor de la superfamilia de proteínas transmembrana controlan la vía. Todos los receptores de TNF, también conocidos como receptores de muerte, comparten una región de 80 aminoácidos llamada "dominio de muerte" **(Urry & Reece, 2017)**. Esta región juega un papel crítico en la transmisión de señales de muerte a través de la membrana celular. Dentro de la célula se activa una cascada de proteínas. Al final de estas vías, el iniciador caspasa-8 se activa y se desencadena la fase de ejecución de la apoptosis **(Letai, 2010)**.

En cambio, en la vía intrínseca o mitocondrial es controlada por el grupo de proteínas Bcl-2. Existen 25 proteínas conocidas en el grupo Bcl-2. Diversos miembros de este grupo funcionan para estimular la apoptosis (proapoptótica) o restringir la apoptosis (antiapoptótica). Existe una delicada brecha de equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas dentro de la célula. Solo las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3" (Bid, Bim, Bad y otras) detectan señales intrínsecas para sufrir apoptosis como, por ejemplo: daño en el ADN. Estas proteínas viajan a la membrana mitocondrial y activan las proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" Bax o Bak o inhiben a las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1 y otras). Cuando se activan, Bax y Bak se unen y causan permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP). **(Wong, 2011)**.

El MOMP provoca una perforación de la membrana mitocondrial e induce la liberación de un factor proapoptótico crucial, el citocromo c, en el citosol. El citocromo c se fusiona a otro factor proapoptótico, APAF1, para crear el complejo "apoptosoma", que a su vez activa una serie de caspasas, que derivan a la destrucción celular. Las proteínas de muerte celular están estrechamente vinculadas por la proteína supresora de tumores p53. **(Letai, 2010).**

El gen p53 es llamado guardián del genoma por ser el encargado de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético **(Hanahan & Weinberg, 2000)**. Este bloqueo lo lleva a cabo deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular, con el objetivo de que se produzca la reparación del ADN antes de que se replique. Este gen mantiene la integridad del genoma ya que estimula la apoptosis en las células en las que el daño en el ADN ha sido sustancial. En diversos tipos celulares incluyendo los linfocitos, la sobreexpresión de p53 conduce directamente a la apoptosis. **(Male, 2012).**

La pérdida de la función normal del gen p53 puede conducir al desarrollo de neoplasias malignas; de hecho, son muy frecuentes las alteraciones en este gen en una variedad de cánceres humanos (más del 50 % de los tumores humanos están asociados a mutaciones en p53). Hay evidencias que hacen pensar que el alto riesgo de la transformación maligna en ausencia de p53 funcional, probablemente origina una oportunidad reducida de reparar el ADN y una incapacidad de eliminar por apoptosis la célula dañada no reparada. Aunque es desconocida la base real de la apoptosis inducida por este gen. **(Sadler, 2009).**

La fase de ejecución es estimulada por las vías extrínsecas e intrínsecas. Durante esta fase, un grupo de enzimas que cortan proteínas llamadas caspasas se dirigen directamente a la muerte celular. Entre las caspasas de ejecución primordiales están: las caspasas 3, 6 y 7. **(Letai, 2010).**

Las caspasas están presentes en dosis letales dentro de cada célula, pero solo se activan a través del proceso de iniciación. Caspasa-3 se considera la más importante de todas las caspasas ya que puede causar daños en el ADN y su cromatina, reestructurar el citoesqueleto u obstaculizar el transporte intracelular, la división celular y la transducción de señales. En el momento que son activadas las caspasas de ejecución

no pueden detenerse, es decir, la muerte celular es segura. Los fragmentos celulares originados en la etapa final de la apoptosis son rápidamente reconocidos, engullidos e inevitablemente digeridos por los macrófagos. **(Letai, 2010).**

La identificación de apoptosis en etapa temprana está representada por los cambios y la pérdida final del potencial de membrana mitocondrial. El potencial de membrana mitocondrial es detectado por JC-1, un tinte que ingresa selectivamente a las mitocondrias. En las mitocondrias funcionales, JC-1 forma agregados que muestran una emisión fluorescente a ~ 590 nm. Con un potencial de membrana reducido, el tinte forma monómeros donde la emisión se desplaza a ~ 530 nm. Este cambio se utiliza para medir el potencial de membrana mitocondrial y la entrada de la célula en la apoptosis en etapa temprana. **(Hengartner, 2000).**

En cuanto a la etapa tardía se puede identificar la apoptosis observando la desfragmentación del ADN. El ensayo APO BRD sirve para medir la apoptosis con alta sensibilidad mediante citometría de flujo de doble color en células de mamíferos. Br-dUTP se incorpora más fácilmente en el genoma de las células apoptóticas que los ligandos más grandes como fluoresceína, biotina, etc. Esta mayor incorporación se combina con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-BrdU marcado con fluoresceína el cual da lugar a una señal más fuerte en citometría de flujo o citoquímica. **(Trapani & Smyth, 2002).**

Por estas razones el avance en el conocimiento de las características de los receptores y de la química combinatoria ha llegado a la síntesis *de novo* de un gran número de fármacos. La biotecnología ha innovado el proceso del descubrimiento de nuevas drogas. Con estas tendencias, se fue olvidando el estudio de extractos de plantas y su gran potencial como fuente de compuestos bioactivos. Sin embargo, actualmente ha surgido el interés por la medicina herbolaria y el desarrollo de fármacos a partir de especies vegetales como se observa en estudios reportados para *Oplopanax horridus*, *Cydonia oblonga*, *Sisymbrium officinale* Scop *Momordica charantia*, entre otras, donde se encuentra que el empleo de extractos vuelve a ser una alternativa para la búsqueda de fármacos con actividad citotóxica en la inhibición del crecimiento tumoral. **(Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010)**

Las plantas han sido una fuente invaluable de compuestos antitumorales selectos en la terapia anticancerosa. A pesar de esto, solo el 10% de más de 250 000 especies de plantas han sido estudiadas por sus facultades farmacológicas. En Cuba, por ejemplo, la población las ha empleado como parte de la medicina ancestral para el tratamiento de diversas molestias y el cáncer. A partir de este conocimiento y teniendo soportes científicos de las potencialidades de algunos extractos de plantas como antitumorales, se seleccionaron 9 especies: *Lepidium virginicum*, *Bidens pilosa*, *Parthenium hysterophorus*, *Bixa orellana*, *Cecropia peltata*, *Melia azedarach*, *Annona glabra*, *Cucurbita maxima*, *Momordica charantia*. Mediante estos se obtuvieron extractos etanólicos para el estudio de su capacidad citotóxica en la línea celular humana de carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549. **(García et al., 2011)**

Se han evidenciado en experimentación con plantas que relacionan el proceso apoptótico en especies como: *valeriana jatamansi*, en un caso exhaustivo *in vitro* e *in vivo* sobre los procesos moleculares del IVHD a exposición, donde se moduló la expresión de varias moléculas implicadas en la progresión del ciclo celular y la apoptosis excluyendo de todo del estado de p53, lo que tuvo como resultado un aumento abrupto de; p21, p53, Rb, p27 y una disminución de: Ciclina B1 y Mdm2. **(Hengartner, 2000).**

Además, se demostró que la relación Bcl-2 / Bax y Bcl-2 / Bad se redujo y mejoró la división de PARP y caspasas. Los resultados obtenidos indicaron que el IVHD-valtrato es un factor terapéutico funcional para el cáncer de ovario, cimentando de tal forma una pauta para el desarrollo del compuesto como un nuevo agente quimioterapéutico.

El presente proyecto empleará la línea celular MCF7 (ATCC® HTB-22™), la cual es un modelo de carcinoma de mama que conserva características del epitelio mamario diferenciado, derivado de un sitio metastásico con derrame pleural. **(Geiger, 1998).**

Esta línea es de gran importancia en la investigación del cáncer debido a que existen varias líneas celulares disponibles para el estudio de cáncer de mama. MCF-7 se le considera de bajo potencial maligno y es la línea celular más extensamente usada para estudiar la biología del cáncer; se obtuvo de un adenocarcinoma de mama, negativa a la expresión del receptor EGF y al receptor PAR1 de la trombina, pero positiva al receptor de estrógeno alfa de gran importancia para esta patología. **(Chu et al, 2014)**

Por lo antes expuesto y tomando en consideración la alta prevalencia de esta patología en la población femenina en edad productiva, surge la necesidad de diseñar estudios que sienten las bases a posibles blancos terapéuticos a futuro que permitan coadyuvar a los tratamientos actuales, los cuales son altamente invasivos y generan en el paciente efectos adversos de importancia que repercute directamente en su calidad de vida.

## **2. Objetivos**

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la capacidad pro- apoptótica *in vitro* de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* en células cancerígenas

### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar la expresión de la proteína p53 *in vitro* en células cancerígenas tratadas con extractos de *Valeriana Rígida* y *Valeriana Decussata*
- 2) Determinar la apoptosis tardía a través de TUNEL en células cancerígenas tratadas con extractos de *Valeriana Rígida* y *Valeriana Decussata*.
- 3) Comparar los hallazgos encontrados y la influencia de los extractos que inducen la apoptosis tardía en las células cancerígenas.

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

El presente estudio formo parte del proyecto de investigación **Estudio etnobotánico y bioensayos de plantas medicinales relacionadas con el tratamiento de cáncer de cérvix en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador, aprobado con resolución: 0904-CU-P-2018**, dirigido por la Dra. Yenddy Carrero. Junto al trabajo conjunto del laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud FCS-UTA (Campus Querochaca) y de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología FCIAB-UTA.

#### 2.1 MATERIALES

##### 2.1.1 Material vegetal

Se emplearon Hojas, Tallos y raíces recolectadas del Cerro Igualata de *Valeriana Decussata* y *Rígida*.

##### 2.1.2 Línea Celular

MCF7 (ATCC® HTB-22™); Línea celular derivada de paciente con cáncer de seno metastásico.

##### 2.1.3 Material de laboratorio

- Material de vidrio (GLASSCO).
- Toallas de papel (Grupo Familia)
- Magnetos. (Golderie Trading)
- Papel Aluminio (Golderie Trading)
- Papel filtro Whatman #1
- Pipetas automáticas
- Pipetas Graduadas (5-10-25 mL)
- Puntas (blancas, amarillas, azul)
- Tubos tipo Falcon (15 - 50 mL)

- Tubos Eppendorf (1,5 - 2,5 mL)
- Placas x 96 pocillos
- Placas x 6 pocillos
- Frascas

#### 2.1.4. Reactivos

- **Tripsina:** Despega las células de la superficie de crecimiento (placas de cultivo) y las mantiene en suspensión.
- **RNA-later solution,** kit de extracción de RNA (NITROGEN), Mercaptoetanol
- **qRT-PCR:** SuperScript III; Primer Forward; Primer Reverse; 2X SYBR green; RNase-Free Water; RNA Template.
- **Medio de Cultivo;** DMEM 1X (Dulbecco Modified Eagle Medium); Suero Fetal Bovino (FBS); Glutamina; Penicilina/Estreptomicina; PBS 1X
- **SDS:** Es un detergente desnaturizante de proteínas.
- **Apoptosis tardía por TÚNEL;** Kit de ensayo APO-BrdU™ TUNEL, Assay Kit
- Alcohol 96%, 70%
- Agua destilada
- PBS

#### 2.1.5 Recursos tecnológicos

- Balanza (mod: EQ-510)
- Centrifuga
- Estufa
- Cabina de Bioseguridad clase II
- Cabina de Flujo laminar vertical
- Incubadora

- Congelador
- Autoclave
- Baño María
- Microscópio de fluorescencia
- RTPCR CFX96 BIORAD

## **2.2 Métodos**

### **Obtención Material Vegetal**

Para la obtención del material vegetal se consideró características físicas y organolépticas, además se seleccionaron partes de la planta como: raíces, hojas y tallos que estuviesen en estado adulto. Después se separaron las muestras por material vegetal (hojas, raíces y tallos), y se guardaron en fundas plásticas negras a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La recolección se realizó en el cerro Igualata que se encuentra ubicado en el cantón Quero perteneciente a la provincia de Tungurahua con la correspondiente autorización para investigación científica, emitida por la DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE TUNGURAHUA N°06-2018-IC-FLO-FAU-DPAT-VS

### **Secado y Pulverizado**

El material vegetal (hojas, tallos y raíces) se descongeló y lavó con agua para eliminar contaminantes, después se pesó y colocó en la estufa durante 24 horas a una temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ . A continuación, las plantas secas se trituraron utilizando un molino manual y finalmente se pesó la cantidad en una balanza analítica.

### **Preparación de Extracto**

Al obtener las muestras pulverizadas fueron resuspendidas en PBS 1X estéril en una relación 1:20. Después, se colocó en un tubo falcón estéril a través de un filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$ , con el fin de eliminar contaminantes. Finalmente, los tubos se sellaron con papel parafilm y se conservaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Cuantificación de solidos**

Una vez obtenido el material vegetal se colocó la muestra en un matraz Erlenmeyer de 2 litros con agua destilada en una proporción 1:20, después se colocó el matraz en la estufa durante 30 min a ebullición. Posteriormente una vez enfriados a temperatura ambiente se envaso los extractos en tubos de 15 ml. Los extractos se filtraron durante un minuto mediante gravedad con papel Whatman y se almaceno en tubos de ensayo a 25°C.

A continuación, se utilizó cápsulas de porcelana que fueron lavadas y secadas en la estufa a una temperatura de 105°C, después se colocó en un desecador para eliminar la humedad durante 2 horas, para ser pesados en una balanza analítica.

Finalmente, se transfirió las capsulas un volumen de 25 ml a las muestras y se colocó en la estufa durante una hora a una temperatura de 95°C; después se aumentó la temperatura a 102 °C durante 12 h, para eliminar todo rastro de humedad, para posteriormente obtener el valor del peso de cada solido de la capsula.

Para obtener el valor de solidos totales se empleó la siguiente formula:

$$St = \frac{(A - B) \times 100}{V}$$

Donde:

St: solidos totales en mg/L

A: peso final de la capsula seco en gramos

B: peso inicial de la capsula en gramos

V: volumen de la muestra desecada en litros

### **Cultivo Celular**

El presente proyecto de investigación utilizó células MCF7 derivadas de adenocarcinoma del pecho (cáncer de mama), las cuales crecieron en un medio DMEM suplementado en suero fetal bovino, 1% de P/S (Penicilina/ Estreptomycin); 1% de glutamina; 1% aminoácido o esenciales; 1% de piruvato de sodio y creció en una atmósfera de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

### **Descongelamiento celular**

Para descongelar las células se preparó el baño maría a 37 °C, posteriormente se colocó las MCF-7 a un tubo eppendorf de 15 ml con 5ml de DMEN, después se centrifugo a 500 gravedades por 5 min, se desechó el sobrenadante, mientras que el pellet (precipitado) se resuspendió con 1 ml de medio de cultivo donde se mezcló suavemente con la micropipeta para mejorar su homogenización. Finalmente, se recogió la suspensión anterior y se pasó a una frasca con 12 ml de medio DMEN y se incubo durante 48 horas a 37°C y una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Pases celulares**

Los cultivos celulares con un crecimiento y adherencia de 80% al 100%, observándose previamente en el microscopio, se lavó con 8ml de PBS 1X a 37°C y se desechó luego de realizar movimientos prudentiales de la frasca. Posteriormente se colocó 1ml de tripsina a 37°C para despegar las células, se dispersó la solución y se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 5 minutos.

La actividad de la enzima tripsina se inhibió al añadir 5ml de medio suplementado DMEN. Del total del contenido se dividió para el numero de frascas en la que se realizó los respectivos pases, finalmente se añadió 12 ml del medio y se incubó a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, durante 48 horas.

### **Conteo celular**

Se preparó el baño maría previamente en el cual se colocó: medio (DMEN), PBS, tripsina a 37 °C; después se verifico la cantidad de células viables por medio del microscopio con una adherencia que oscilaba entre el 60% y 70%, posteriormente se desechó el contenido de la frasca, a continuación, se agregó 8 ml de PBS y se desechó, luego se agregó 1 ml de tripsina y se incubo por 3 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se agregó 2 ml del medio y se desengancho las células con movimientos leves de la frasca.

La frasca con su contenido se transfirió a un tubo Falcon y se centrifugo a 500 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de medio y 1ml de PBS, se centrifugo a 500 rpm por 5 min y por último se retiró el sobrenadante y se agregó 2 ml de medio donde se centrifugo a las mismas condiciones. Esta es la solución final donde se encuentran nuestras células de interés (MCF-7).

Para poder realizar nuestro proceso de conteo de células viables, se procedió a utilizar el reactivo Trypan Blue en relación 1:1; (100 µl del reactivo Trypan Blue y 100 µl de la solución final) en un tubo eppendorf. En la cámara de Neubauer se añadió 10 µl de la solución final en los dos cuadrantes para el conteo simultaneo en el microscopio óptico (lente 10X). Para la culminación del proceso se registró los valores obtenidos mediante la utilización de la siguiente fórmula:

$$N_T \times 2 \times 10000 = \# \text{ células /ml};$$

Donde;

$N_T$ : corresponde al # de células viables

### **Cuantificación de Proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó por el método Bradford.

El procedimiento, consistió en pipetear 5µl de la solución proteica a cuantificar, luego se agregó 150µl del Reactivo de Bradford, se agito vigorosamente. A los 2 minutos aproximadamente, se midió la absorbancia de la solución a 595 nm. El producto coloreado se obtuvo dentro de la primera hora de reacción producida. Para estimar la cantidad de proteínas en la solución se utilizó una curva de calibración de proteínas ( Seroalbúmina bovina (BSA) proteína de referencia ) a concentraciones 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 y 1.75 mg/ml.

### **Ensayos MTT**

Para conocer con exactitud la dosis óptima y el IC50 para cada una de las muestras se hizo ensayos MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5(-di-feniltetrazol). Donde se sembró células MCF-7 en placas de 96 pocillos en una concentración de 10000 células/pocillo; después se añadió 100 µl de medio DMEN suplementado en cada pocillo y se dejó incubar durante 24 horas. Luego se realizó dos lavados con PBS 1X y se añadió las muestras (extractos de valerianas) en diluciones sucesivas en logaritmo de 10, se dejó incubar durante 24 horas. A continuación, se removió todo el contenido de cada pocillo y se realizó dos nuevos lavados con PBS 1X, se añadió 10 µl de MTT (5mg MTT/mL PBS 1X) en cada pocillo con 100 µl de medio de cultivo DMEN sin rojo fenol para luego ser incubado durante 2 horas, permitiendo de tal manera la formación de formazan. De manera progresiva, se añadió 100 µl de HCl (0,01 M) y 100 µl de SDS (10%), se mantuvo en la incubadora durante 2 horas en

condiciones estándares. Por último, pasado este tiempo se leyó cada placa en el lector de microplacas Victor X3 (PerkinElmer, USA a una longitud de onda de 570 nm.

### **qRT PCR P53**

Se realizó la extracción de ARN por el método de columnas con el kit de extracción de ARN de invitrogen, después se cuantificó la concentración a través de un nanodrop™ 1000 de Thermo Fisher Scientific tanto de células tratadas y no tratadas y se analizó la expresión de P53 por qRT-PCR en un termociclador (CFX96™ BIORAD). Se obtuvo la mezcla de reacción con el kit SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR, donde se utilizó el: Primer Forward; Primer Reverse; 2X SYBR green RNase-Free Water; ARN Templado para la respectiva medición (**Moore, 2008**).

### **Cuantificación de p53**

Para el análisis de la expresión del gen P53 se utilizó el método de  $\Delta\Delta Ct$  descrito por (**Livak & Schmittgen, 2001**). Con los valores de Ct obtenidos en los ensayos respectivos, en los cuales se aplicó la fórmula de cálculo de expresión génica:

$$Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_m - \Delta Ct_b$$

### **APOPTOSIS TARDIA POR TUNEL EMPLEANDO APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit**

Para el presente método se suspendió  $1 \times 10^6$  células en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS); luego se agregó la suspensión celular en 5 ml de paraformaldehído al 1% (relación p / v) en PBS y se colocó en hielo durante 15 minutos, para posteriormente centrifugar las células durante 5 minutos a 300 rpm y desechar el sobrenadante.

Luego se agregó las células a 5 ml de etanol al 70% (v / v), cabe mencionar que el alcohol debe estar en congelación a  $-20^\circ\text{C}$  por 18 h antes de su uso. Luego se preparó una solución de ADN; La cual requirió un volumen total de 50  $\mu\text{L}$  para cada muestra. Donde se mezcló 10  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción (tapa verde), 0,75  $\mu\text{L}$  de enzima TdT (tapa amarilla), 8,0  $\mu\text{L}$  de BrdUTP (tapa morada), 31,25  $\mu\text{L}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$  y se incubó por 60 min a  $37^\circ\text{C}$ . Estas concentraciones pueden diferir respecto a la cantidad de solución de ADN que se requiera preparar por motivos de ahorro de reactivos.

A continuación, se preparó 100  $\mu\text{L}$  de solución de tinción de anticuerpos para cada muestra; Con una mezcla de 5,0  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-BrdU marcado con colorante Alexa Fluor <sup>TM</sup> 488 (tapa anaranjada) con 95  $\mu\text{L}$  de tampón de enjuague (tapa roja). Luego se incubó las células esta solución durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo las muestras de la luz durante la incubación.

Al final se añadió 0,5 ml de tampón de tinción de yoduro de propidio / RNasa A (botella ámbar) a cada muestra y se incubó las células por 30 minutos a temperatura ambiente, protegiéndolas de la luz para culminar observándolas en el microscopio.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. Análisis y Discusión de resultados

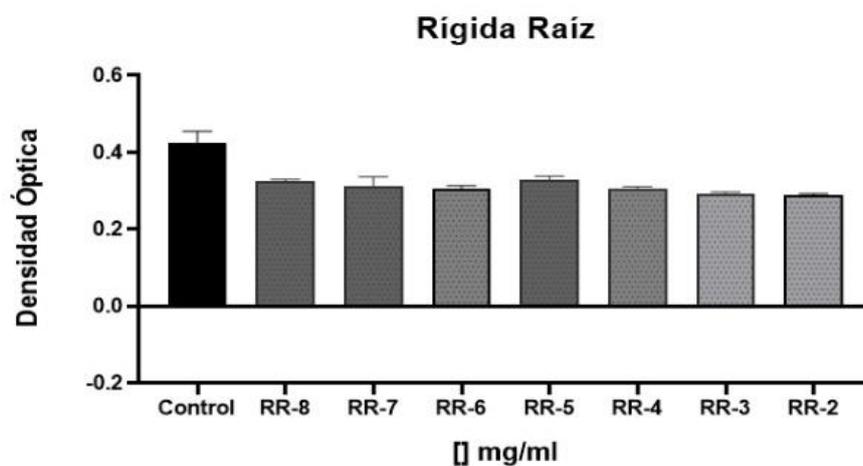
##### 3.1.1. Análisis e interpretación de resultados

**Tabla 1**

*Concentración diluciones MTT para Rígida Raíz*

**RÍGIDA  
RAÍZ**

	CONTROL (mg/ml)	(mg/ml)						
	0,44	0,31	0,35	0,29	0,33	0,31	0,29	0,30
	0,35	0,32	0,27	0,31	0,35	0,30	0,28	0,28
	0,50	0,33	0,36	0,32	0,32	0,30	0,31	0,29
	0,42	0,34	0,29	0,30	0,33	0,31	0,29	0,29
<b>PROM.</b>	0,42	0,32	0,31	0,31	0,33	0,31	0,29	0,29



*Figura 1. Ensayo MTT Rígida raíz*

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

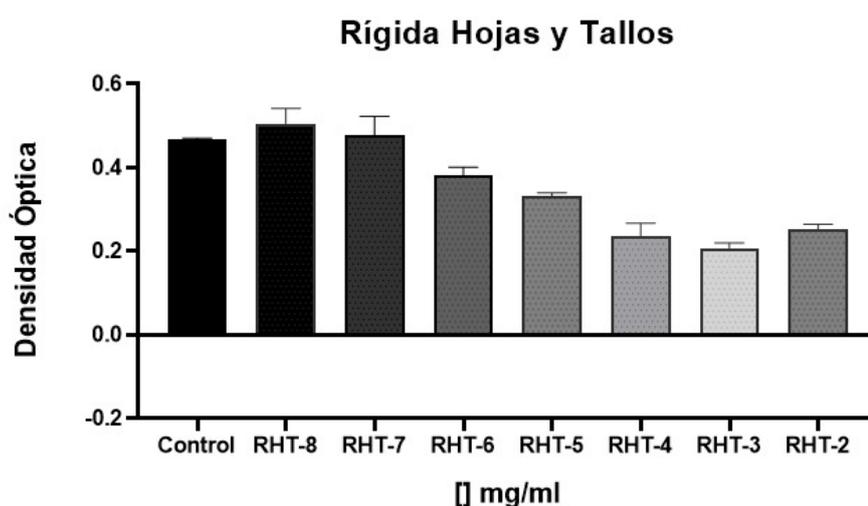
La **Figura 1** se observa como las concentraciones del tratamiento de *Rígida* raíz son menores a la del control como se observa en la **Tabla 1**, respecto a la densidad óptica, que no es nada más que la magnitud que asocia la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia a una longitud de onda específica, para los ensayos MTT esta longitud fue de 570 nm.

**Tabla 2**

*Concentración diluciones MTT para Rígida hoja tallo*

**Rígida hojas  
y tallos**

	Control (mg/ml)	(mg/ml)						
	0,47	0,42	0,35	0,38	0,35	0,32	0,22	0,28
	0,47	0,60	0,53	0,37	0,32	0,19	0,20	0,24
	0,47	0,52	0,54	0,44	0,35	0,19	0,18	0,22
	0,46	0,49	0,50	0,33	0,31	0,24	0,23	0,27
<b>Prom.</b>	0,47	0,51	0,48	0,38	0,33	0,24	0,21	0,25



**Figura 2** Ensayo MTT *Rígida* hoja tallos

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

La **figura 2** muestra que las concentraciones en *Rígida* hoja tallo en las diluciones

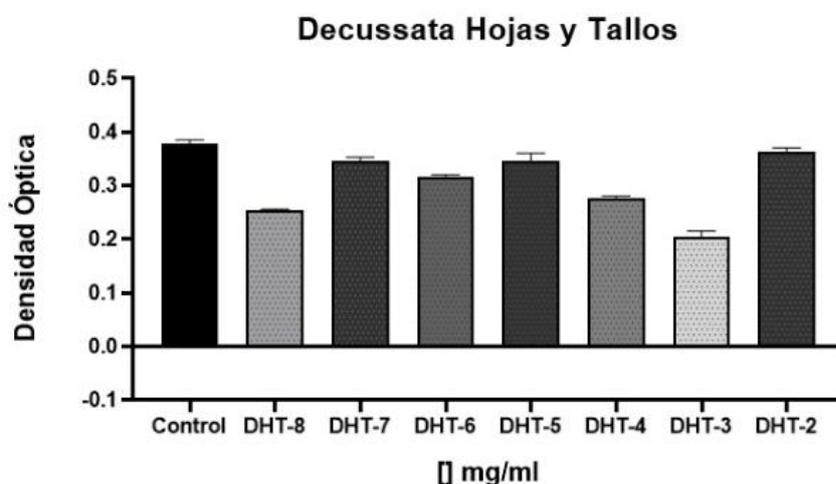
RHT-8 y RHT-7 respectivamente son mayores, así como no muestra la **Tabla 2**, con respecto al control y en relación con la densidad óptica del tratamiento en cuestión.

**Tabla 3**

*Concentración diluciones MTT para Decussata Hoja Tallo*

*Decussata  
hojas y  
tallos*

	Control (mg/ml)	(mg/ml)						
	0,36	0,25	0,34	0,32	0,38	0,29	0,23	0,38
	0,40	0,26	0,33	0,32	0,35	0,27	0,19	0,37
	0,38	0,25	0,36	0,30	0,32	0,28	0,22	0,35
	0,38	0,26	0,36	0,32	0,34	0,27	0,19	0,36
<b>Prom.</b>	<b>0,38</b>	<b>0,25</b>	<b>0,35</b>	<b>0,32</b>	<b>0,35</b>	<b>0,28</b>	<b>0,20</b>	<b>0,36</b>



**Figura 3.** Ensayo MTT *Decussata* hoja tallo

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

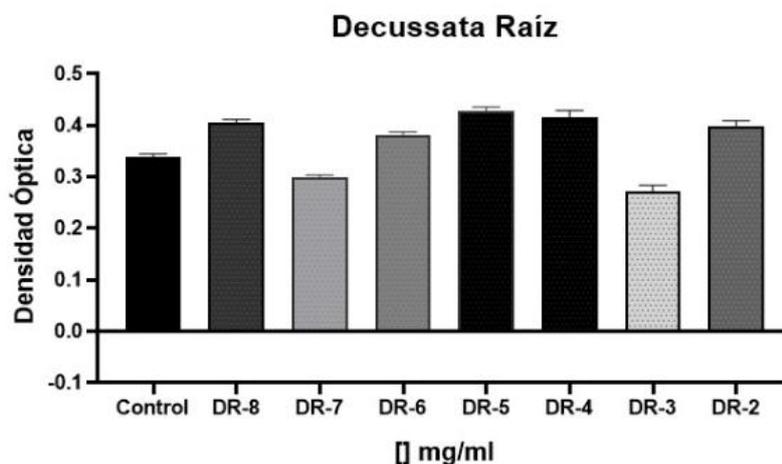
En la **Figura 3** se observa las concentraciones de *Decussata* hoja tallo en las diluciones DHT 2-5-7 son ligeramente similares a la del control a una densidad óptica que oscila entre 0,34 a 0,38. Tal y como nos muestra la **Tabla 3**.

**Tabla 4**

*Concentración diluciones MTT para Decussata Raíz*

**DECUSSATA  
RAÍZ**

	CONTROL (mg/ml)	(mg/ml)						
	0,33	0,42	0,30	0,37	0,44	0,40	0,28	0,42
	0,33	0,40	0,31	0,39	0,40	0,39	0,24	0,36
	0,35	0,40	0,31	0,39	0,44	0,44	0,28	0,41
	0,35	0,40	0,29	0,37	0,43	0,43	0,29	0,40
<b>Prom.</b>	<b>0,34</b>	<b>0,41</b>	<b>0,30</b>	<b>0,38</b>	<b>0,43</b>	<b>0,42</b>	<b>0,27</b>	<b>0,40</b>



**Figura 4.** Ensayo MTT *Decussata* raíz

**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN**

La **figura 4** se observa que la concentración para *Decussata* raíz en las diluciones DR-2-4-5-6-8, son mayores a la del control en un rango de densidad óptica de 0,33 a 0,44 aproximadamente. Comprobando que las dosis ya mencionadas son idóneas para este tratamiento en específico en función de las células viables con respecto a las muertas por citotoxicidad. Tal como muestra la **Tabla 4**.

**Tabla 5**

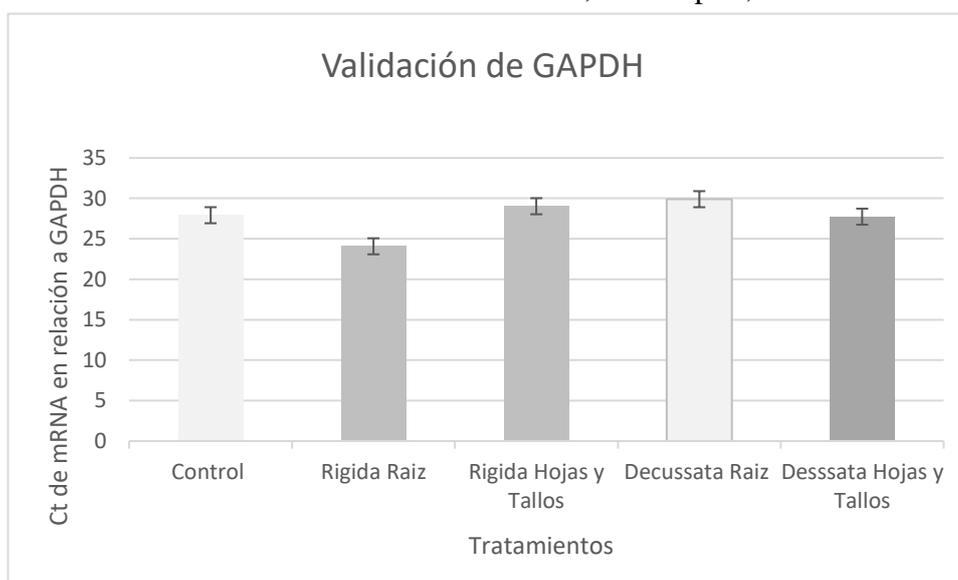
*Ct obtenidos a partir del ARN extraído de las diferentes células tratadas*

*Se emplearon los primers F y R para GADPH (TGCACCACCAACTGCTTAGC / GGCATGGACTGTGGTCATGAG*

	<i>GADPH</i>		<i>Promedio</i>
Control	27,03	28,8	27,915
<i>Rígida Raíz</i>	24,35	23,8	24,075
<i>Rígida Hojas y Tallos</i>	29,09	28,96	29,025
<i>Decussata Raíz</i>	28,61	31,18	29,895
<i>Decussata Hojas y Tallos</i>	29,5	25,97	27,735

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Como se puede apreciar en la **Tabla 1** el gen de control endógeno (GAPDH) no se observa variaciones considerables inducidas por los tratamientos de: *Rígida raíz*, *rígida hoja tallo*, *decussata raíz* y *decussata hoja tallo*, mediante la utilización del análisis de varianza de una sola vía ANOVA, con un  $p > 0,05$ .



**Figura 5.** Validación del Gen GAPDH

**Tabla 6**

*Ct* obtenidos en la qRT-PCR para el gen p53

Se emplearon los primers F y R p53 (GACGGTGACACGCTTCCCTGGATT/GGGAACAAGAAGTGGAGAATGTCA)

Tratamiento	<i>Ct</i> p53		Promedio
Control	20,65	23,8	22,23
Rigida Raíz	17,21	24,48	20,85
Rigida Hojas Y Tallos	30,74	24,78	27,76
Decussata Raíz	30,78	13,3	22,04
Decussata Hojas y Tallos	11,84	25,68	18,76

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

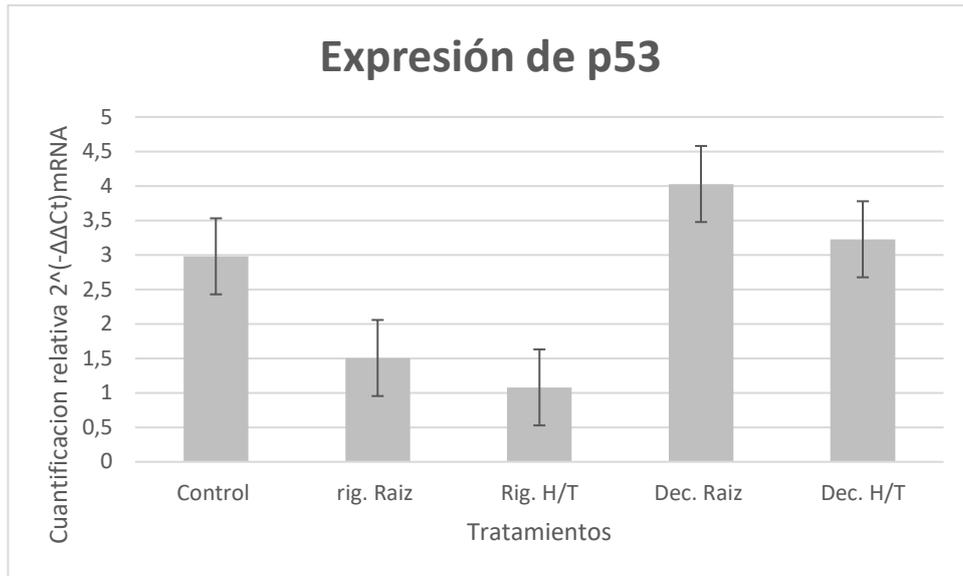
La **Tabla 2** muestra los *Ct* que se obtuvieron por duplicado del gen p53 con sus respectivos tratamientos obtenidos en el software Biorad CFX96 Real Time. Además, se cuantifico la expresión relativa del gen por el método descrito por Livak & Schmittgen como se observa en el **anexo 5**, el cual utiliza los *Ct* de un control endógeno como GADPH en nuestro caso, y sus respetivo para nuestro gen de interés.

Cabe mencionar que a los valores obtenidos de  $\Delta\Delta Ct$  se les realizo una corrección logarítmica para reducir la varianza de los mismos, debido a la naturaleza exponencial que posee la curva de qR-PCR.

**Tabla 7**

Niveles de expresión relativa con el método ( $-\Delta\Delta Ct$ ) para el gen p53

Tratamientos	<i>Ct</i> SD 2 repl.	Promedio $-\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	SD
Control	2,23	1,58	2,98	2,23
Rig. Raíz	0,34	0,59	1,51	0,34
Rig. H/T	4,21	0,11	1,08	4,21
Dec. Raíz	0,06	2,01	4,03	5,06
Dec. H/T	0,48	1,69	3,23	0,48

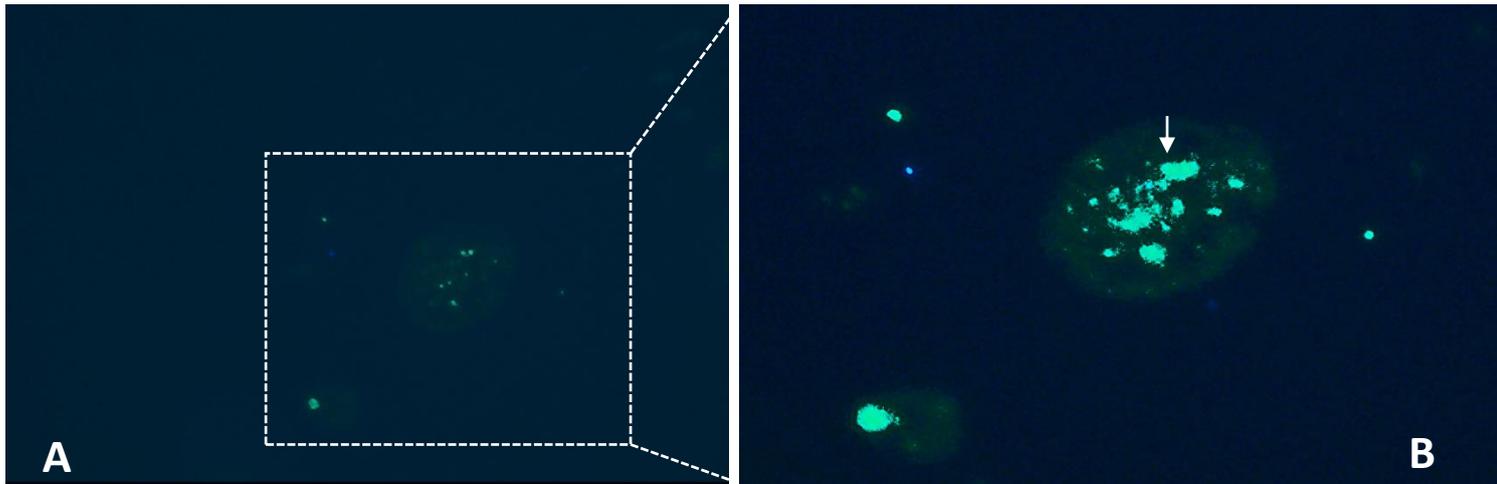


**Figura 6.** Expresión del gen pro- apoptótico p53 con el método de cuantificación relativo  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ .

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

La **Tabla 3** y la **Figura 2** nos muestra la expresión relativa del gen p53 en relación al control, donde se evidencia claramente que los tratamientos; tanto de *Decussata* raíz como de *Decussata* hoja tallo producen un aumento de la expresión del gen apoptótico p53. Cabe recalcar que *Decussata* raíz presenta un incremento más abrupto con respecto a *Decussata* hoja tallo.

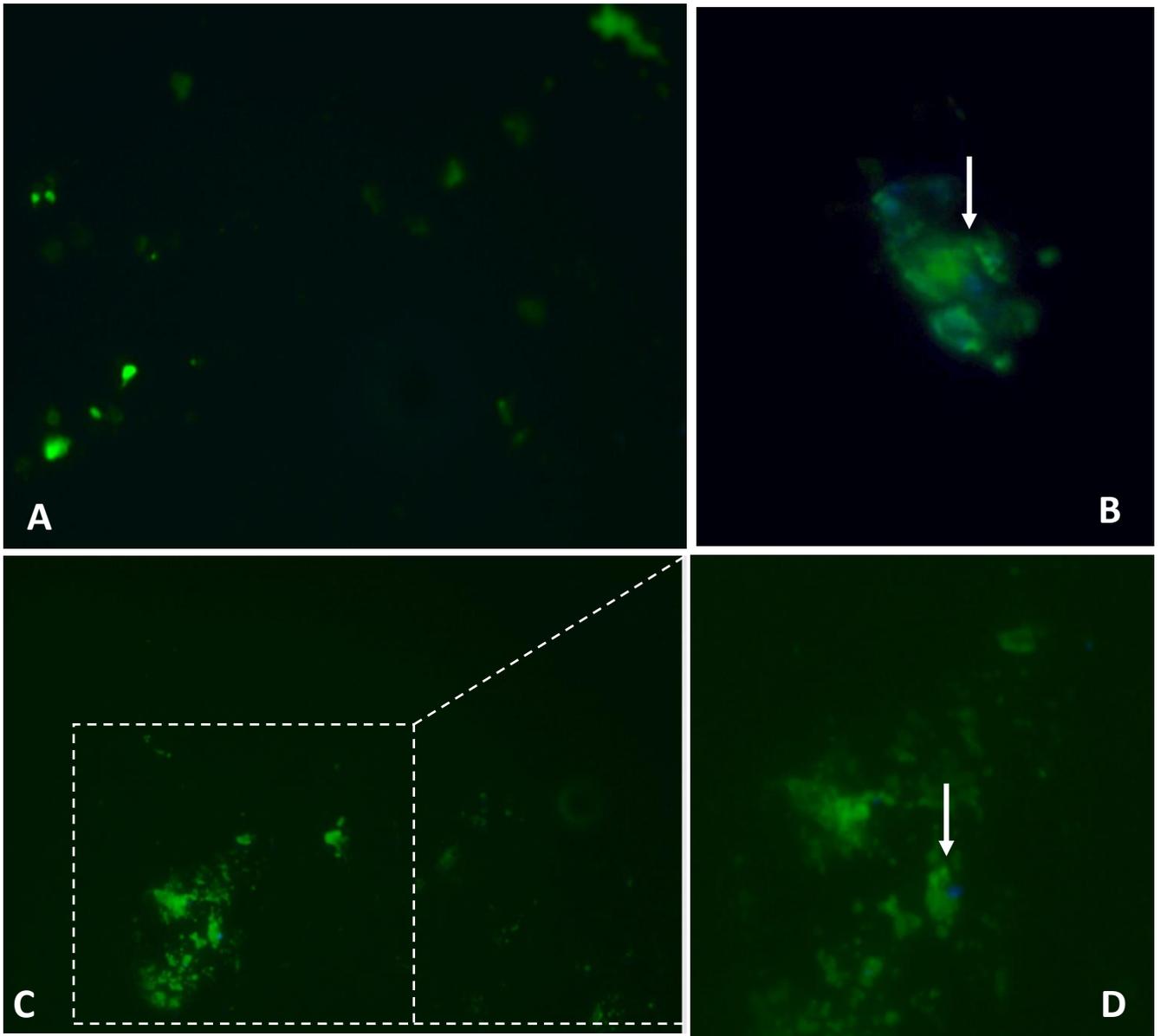
A diferencia a las dos mencionadas *Rigida* raíz y *Rigida* hoja tallo posee una expresión similar al control por lo que estos tratamientos disminuyen claramente la expresión del gen p53.



**Figura 7.** Apoptosis tardía de células MCF-7 control magnificación 630X. Las células fueron teñidas mediante la técnica de tûnel por APO BdrU. La lectura se realizó empleando los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm). Las flechas indican núcleos de células apoptóticas. Control (A) y magnificación ROI (B).

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Al realizar el Apo/Bdru por triplicado se evidencio a las células cancerígenas con un núcleo totalmente fragmentado y con su membrana intacta (imagen A). Al magnificarla se aprecia fácilmente minúsculos segmentos o fragmentos de ADN, tal como se muestra en la imagen B, el cual toma una coloración azulada gracias al compuesto DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) que es un marcador fluorescente que actúa como intercalante con el ADN. Este proceso podría tratarse de la etapa pre-apoptótica de la célula MCF7.



**Figura 8.** Apoptosis tardía de células MCF-7 con tratamiento *Decussata* raíz magnificación 630X. Las células fueron teñidas mediante la técnica de túnel por APO BdrU. La lectura se realizó empleando los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm). Las flechas indican núcleos de células apoptóticas. Célula fragmentada MCF7(A), célula condensada MCF7 (B), *Decussata* Raiz (C) y magnificación ROI (D).

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la **Figura 8** se evidencia claramente el proceso de apoptosis en la célula de línea celular MCF7, que consiste en una etapa de impermeabilización y permeabilización de la misma. En el proceso de impermeabilización el ADN se fragmenta en la superficie del núcleo (como se visualiza en la imagen B), los mismos que a su vez

empiezan a formar gemaciones que a la larga provocaran la fragmentación del núcleo (imagen C y D).

Por otro lado, en la etapa de permeabilización la membrana de la célula pierde su resistencia provocando el paso del líquido del medio, es decir, desequilibrio osmótico, que conlleva inevitablemente a que la célula se hinche y queden disipados los fragmentos del núcleo, tal como ocurre en la imagen (A).

### 3.2 Discusión

Para el presente proyecto se procedió a trabajar con las células cancerígenas MCF-7 debido a la alta incidencia que presenta su mortalidad en el cáncer de mama en el Ecuador, sobre todo en el sexo femenino y al presentar las mujeres un mayor porcentaje poblacional.

A partir de lo mencionado y con la premisa de que las plantas son una fuente invaluable de compuestos antitumorales activos en la terapia anticancerígena y de que solo cerca del 10 % de más de 250.000 especies de plantas han sido estudiadas por sus propiedades farmacológicas, cabe la necesidad de experimentar con nuevas especies como fue el caso de *Valeriana rigida* y *decussata*. Al ser este un proceso de comprobación como se observó anteriormente, es decir, no todas las especies pueden poseer facultades anticancerígenas tal como ocurrió con *Valeriana rígida* que no presentó efectos citotóxicos significativos, ya que en estudios de este tipo estos hallazgos son normales. En una evaluación de este tipo en la que se empleó 10 extractos de plantas medicinales sobre la línea celular humana de cáncer de pulmón A549, 4 plantas (*Parthenium hysterophorus*, *Bixa orellana*, *Momordica charantia* y *Cucurbita máxima*) presentaron concentraciones citotóxicas medias inferiores a 100ug/ml y 6 de estas no llegaron ni al rango. (García et al., 2011)

Otra de las características que se planteó, fue que cada uno de los extractos se clasificaron en: raíz y hojas tallo para las dos especies: donde se obtuvo concentraciones de 0,51 mg/ml y 0,42 mg/ml para *rígida* hoja tallo y *decussata* raíz respectivamente en la línea celular MCF-7. Ávalos-Soto et al., (2014) en la misma línea celular y en proceso de segmentación en extractos etanólicos de semilla y hoja de *Azadirachta indica* (neem), presentó una actividad IC50 de 25,17 ug/ml sobre MCF-7, donde además concluyó que estos resultados son prometedores para continuar

con futuras investigaciones para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. En relación con nuestros resultados se puede deducir que nuestras concentraciones parecieran no ser del todo idóneas y que debe seguirse investigando estas especies de valeriana en específico.

El estudio se basó en determinar si los extractos de *Valeriana rígida* y *decussata* son capaces de aumentar la expresión del gen pro apoptótico p53 específicamente, ya que p53 es aquel que tiene una mayor relevancia de mutación en diferentes tipos de tumores cancerígenos.

Según estudios prestados por la Universidad de Brow el 42% de las muestras de cáncer pancreático tenían el p53 mutado. Asimismo, muestras de carcinomas ováricos y endometrioides presentaban irregularidades en este gen. También se identificó que otro cáncer con alta incidencia de mutación de este gen supresor es el cáncer de mama. **(Romero, s. f.)**.

La expresión del gen en nuestro trabajo evidencio claramente que los tratamientos; tanto de *Decussata* raíz como de *Decussata* hoja tallo producen un aumento de la expresión del gen pro-apoptótico p53, dando un mejor resultado en estos dos tratamientos, existen casos en los que otro tipo de proteínas pueden respaldar la expresión de p53 tal como menciona **Orcid, (2019)**. en el “estudio inmunohistoquímico en 40 casos de liquen plano oral contra BAX, BCL-2, CD-138, Histona 3, Ki-67, MCM3 y p53. Donde Se observó mayor expresión de BAX en contraposición con BCL-2, proponiendo una conducta proapoptótica, vinculado estrechamente a su vez por la ausencia de expresión de p53”.

Estos hallazgos nos permiten inferir que estas especies de valerianas pudiesen representar un tratamiento alternativo para este tipo de cáncer, sin embargo, es importante continuar con estudios en los cuales se incluyan mayor cantidad de marcadores que corroboren estos resultados.

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

- La expresión relativa del gen pro-apoptotico p53 en relación al control evidencio claramente que los tratamientos; tanto de *Decussata* raíz como de *Decussata* hoja tallo producen un aumento de la expresión del gen pro-apoptótico p53. Cabe recalcar que *Decussata* raíz presenta un incremento más abrupto con respecto a *Decussata* hoja tallo.
- El tratamiento de *valeriana Decussata* raíz en el proceso de apoptosis tardía, mostró evidencias de impermeabilización y permeabilización de las células. En el proceso de impermeabilización; el ADN se fragmento en la superficie del núcleo, los mismos que a su vez empiezan a formar gemaciones, que a la larga provocaron la fragmentación del núcleo. Por otro lado, en la etapa de permeabilización la membrana de la célula pierde su resistencia provocando el paso del líquido del medio, es decir, desequilibrio osmótico, que conllevo inevitablemente a una lisis celular.
- En las pruebas que se realizó por triplicado de APO/bdru Tunel para control se evidencio células cancerígenas línea celular MCF7, donde tanto el ADN como el núcleo estaban fragmentados. Para el tratamiento con *Valeriana Decussata* Raíz se evidencio fragmentos de células y otras con fragmentos de ADN que pueden evidenciar el final de la ruta apoptótica, en cuanto *Valeriana Decussata* hoja tallo se observó una solo célula apoptótica pero lamentablemente para *Valeriana rígida* hoja tallo y raíz no se pudo observar ninguna sola célula razones por las cuales no se registró ninguna evidencia.
- Los hallazgos obtenidos nos permiten inferir que estas especies de valerianas pudiesen representar un tratamiento alternativo para este tipo de cáncer, sin embargo, es importante continuar con estudios en los cuales se incluyan mayor cantidad de marcadores que corroboren estos resultados en pro de optimizar la terapéutica del cáncer.

#### 4.2 Recomendaciones

- Se recomienda incluir mayor cantidad de estudios con técnicas como el western blot y el marcaje de otras proteínas que representen blancos

terapéuticos o de progresión.

- Socializar los resultados a mejora de nuevas técnicas alternativas que nos ayuden a combatir el cáncer.
- Profundizar el estudio de los segmentos y tipos de valerianas que indujeron la apoptosis en células MCF-7 e incluir otro tipo de líneas celulares provenientes de diferentes tipos de cáncer que permitan evidenciar si posee en estas el mismo efecto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ávalos-Soto, J., Treviño-Neávez, J. F., Verde-Star, M. J., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Moran-Martínez, J., Serrano-Gallardo, L. B., & Morales-Rubio, M. E. (2014). Cytotoxic evaluation of *Azadirachta indica* (A. Juss) ethanolic extracts against diferentes cells lines [Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares]. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 45(3), 39-44.  
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84975486264&partnerID=40&md5=d0ffbc02970704d24b56e12a09819b13>
- Bray, F., & Piñeros, M. (2016). Cancer patterns, trends and projections in latin america and the caribbean: A global context. *Salud Publica de Mexico*, 58(2), 104-117. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7779>
- García, A. D., Sánchez, H. R., & Lizama, R. S. (2011). Cytotoxicity of medicinal plant extracts on the human lung carcinoma cell line A549. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(1), 101-108.
- Orcid, G. T. (2019). Inmunoexpresión de biomarcadores Bax, Bcl-2, CD138, H3, Ki-67, MCM3 y p53 en liquen plano oral. *Odontoestomatología*, 21(34), 0-2.  
<https://doi.org/10.22592/ode2019n34a3>
- Romero, L. F. (s. f.). *p53 y el Cáncer*.  
[https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/53359156/p53\\_y\\_el\\_Cancer\\_uploaded.pdf?response-content-disposition=inline%253Bfilename%253Dp53\\_y\\_el\\_Cancer.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%252F20200204%252Fus-east](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/53359156/p53_y_el_Cancer_uploaded.pdf?response-content-disposition=inline%253Bfilename%253Dp53_y_el_Cancer.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%252F20200204%252Fus-east)
- Schlaepfer, L., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 41(4).
- Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., Gaudet, M. M., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(4), 284-296.  
<https://doi.org/10.3322/caac.21456>

OMS, "Cáncer: prevención y control," 2014.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer. 2013.

Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. Oct; 388 (10053):1659-1724. 2016.

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 Health*. Sep;4(9):e609-16. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7. 2016.

Stewart BW, Wild CP, editors. World cancer report 2014 Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Práticas Integrativas e Complementares em Saúde: uma realidade no SUS. *Revista Brasileira de Saúde da Família*. Ano X, edição especial. Brasília-DF; 2008

Alvim NAT, Ferreira MA, Cabral IE, Almeida Filho AJ. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. *Revista Latino Americana de Enfermagem*. 2006 Mai-Jun; 14. [Accessed: 25-Abr-2020]

Domínguez MCR, Pérez VR, Trujillo JMG. Procedimiento de enfermería: "curas de heridas agudas y crónicas con el filete de aloe vera". *Revista Enfermería Global*. Mayo 2007; 10: 1-13[Accessed: 25-Abr-2020]

Blanca Gutiérrez JJ, Alvarez Nieto C, Alba Fernández CM. Terapias complementarias en la escuela de enfermería. *Revista Enfermería Global*. Mayo 2007; 10: 1-8.

- Letai A. Proteínas solo BH3 y sus efectos sobre el cáncer. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 687: 49-63. [Accessed: 24-Abr-2020]
- Wong RS. Apoptosis en el cáncer: de la patogénesis al tratamiento. *J Exp Clin Cáncer Res.* 26 de septiembre de 2011; 30: 87 [Accessed: 24-Abr-2020]
- Bender T, Martinou JC. Donde se encuentran los asesinos: permeabilización de la membrana mitocondrial externa durante la apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 ene 1; 5 (1): a011106 [Accessed: 24-Abr-2020]
- Urry, LA, Caín, ML, Wasserman, SA, Minorsky, PV y Reece, JB. *Campbell Biology* (11ª ed.). Pearson. 2017.
- Bradley JR, Pober JS. Factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF). *Oncogén* . 2001 1 de octubre; 20 (44): 6482-91. [Accessed: 25-Abr-2020]
- Hanahan D, RA Weinberg. "Las características del cáncer". 100: 57-70, *Cell.* 2000.
- Sancho Andres P. Inducción de muerte apoptótica y necrótica en células promonocíticas: regulación por asidación y proteínas de estrés. Madrid: Universidad de Alcalá [Internet]. 2004 [citado 14 Jun 2011]. [Online]. Available:  
[http://www.uah.es/estudios/postgrado/detalle\\_proyectos.asp?CdPlan=D221&expe=113&proy=1](http://www.uah.es/estudios/postgrado/detalle_proyectos.asp?CdPlan=D221&expe=113&proy=1)
- Salech F. *Biología del envejecimiento: aspectos biológicos y evolutivos.* Medwave [Internet]. 2009 Nov [citado 9 Jun 2011];9(11). [Online]. Available:  
<http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/4261>
- Male D. *Immunology.* 8va ed. Barcelona: Saunders; 2012.
- Sadler TW. *Langman Embriología médica.* 11na ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.

- Hengartner MO. La bioquímica de la apoptosis. *Naturaleza*. 12 de octubre de 2000; 407 (6805): 770-6. [Accessed: 24-Abr-2020]
- Trapani JA, Smyth MJ. Importancia funcional de la vía de muerte celular de perforina / granzima. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct; 2 (10): 735-47. [Accessed: 24/Abr-2020]
- “Valeriana jatamansi constituyente IVHD-valtrate como un nuevo agente terapéutico para el cáncer de ovario humano: actividades y mecanismos in vitro e in vivo. - PubMed - NCBI.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23597199>. [Accessed: 18-Nov-2019].
- Easton, D., BIO450 Primer Design Tutorial. Buffalo State. <http://faculty.buffalostate.edu/eastondp/dpeastonbiolog/Bio%20450/BIO450%20Primer%20Design%20Tutorial%20.pdf>. 2008.
- Hunt, M.. Real Time PCR. University of South Carolina School of Medicine. <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>. 2009.
- Moore, K. Moore .Lab Protocol: Designing PCR Primers. University of Florida. 2008.
- Poole, D H., Pate Lab Protocol: Polymerase Chain Reaction. Penn State University. 2009.
- Szick-Miranda, K., BIO430 Primer Design. CSU-Bakersfield.[http://www.csub.edu/~kszick\\_miranda/Primer%20Design.doc](http://www.csub.edu/~kszick_miranda/Primer%20Design.doc).2009
- Geiger T, y col. Actividad antitumoral de un oligonucleótido antisentido PKC-alfa en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar contra diversos tumores humanos trasplantados en ratones desnudos. *Anticancerígenos Des*. 13: 35-45, 1998. PubMed: [9474241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9474241/)
- Am J Pathol* 136, 593.(1990)
- Trends Cell Biol* 5, 21 (1995).
- Chu HW, Cheng CW, Chou WC, Hu LY, Wang HW, Hsiung CN, Hsu HM, Wu PE, Hou MF, Shen CY, Yu JC. A novel estrogen receptor-microRNA 190a-PAR1-

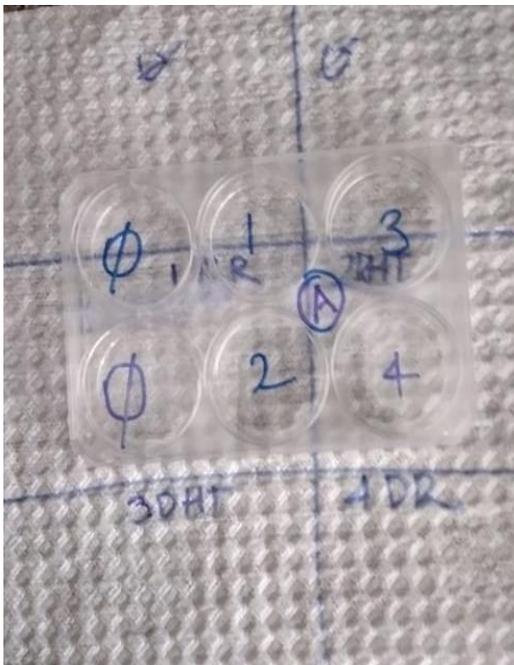
pathway regulates breast cancer progression, a finding initially suggested by genome-wide analysis of loci associated with lymph-node metastasis. *Human Molecular Genetics*. 23 (2):355-367. (2014)

## Anexos

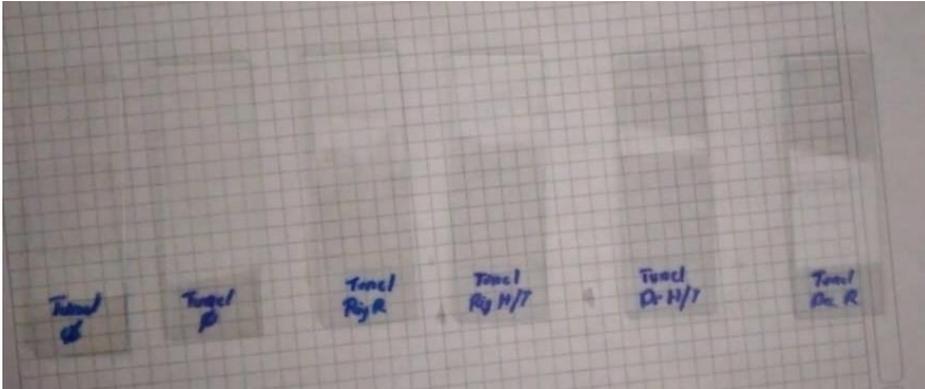
### Anexo 1. Microscopia de fluorescencia



### Anexo 2. Lavado de placas



### Anexo 3 .Tinción y fijación de placas



### Anexo 4. Cultivos celulares



**Anexo 5.** Cuantificación relativa del gen p53

Target	Sample	Ct	Ct Control endogeno (GADPH)	Ct muestra	Ct Calibrador	$\Delta\Delta Ct$	$2(-\Delta\Delta Ct)$	Promedio - $\Delta\Delta Ct$	Desv. Estandar
P53	CONTROL	20,65	27,73	-7,08	-7,08000	0,00	1		
P53	CONTROL	23,8	27,73	-3,93	-7,08000	3,15	0,11266	1,5750	0,627446742
P53	Rig. Raiz	24	27,73	-3,73	-7,08000	3,35	0,09807		
P53	Rig. Raiz	24,48	27,73	-3,25	-7,08000	3,83	0,07032	3,5900	0,019627062
P53	Rig. H/T	30,74	27,73	3,01	-7,08000	10,09	0,00092		
P53	Rig. H/T	24,78	27,73	-2,95	-7,08000	4,13	0,05711	7,1100	0,039737254
P53	Dec. Raiz	30,78	27,73	3,05	-7,08000	10,13	0,00089		
P53	Dec. Raiz	30,7	27,73	2,97	-7,08000	2,97	0,12763	6,5500	0,089614543
P53	Dec. H/T	25	27,73	-2,73	-7,08000	4,35	0,04904		
P53	Dec. H/T	25,68	27,73	-2,05	-7,08000	5,03	0,03061	4,6900	0,013031711

**Anexo 6.** Concentración proteica de los tratamientos por el método de Bradford

	ml	ul	Concentración proteica (ul)
<b>Decussta Hoja tallo</b>	3,01E-04	0,301	6,3
<b>Decussata Raiz</b>	2,94E-04	2,294	4
<b>Rigida Hoja tallo</b>	2,24E-04	0,224	3,6
<b>Rigida Raiz</b>	2,94E-04	0,294	3,2

## Anexo 7. Extracción y cuantificación de ARN



**Anexo 8.** Microscopia de fluorescencia: Apoptosis TUNEL

