



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

**INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:**

**“ACTIVIDAD ANTI-METASTÁSICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS  
EXTRACTOS DE PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*,  
EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA”**

Requisito previo para optar por el Título de Licenciado en Laboratorio Clínico

**Autor:** Cortez Pinto, Juan Carlos

**Tutor:** PhD. Bustillos Ortiz, Alberto Alcides

**Ambato – Ecuador**

**Enero 2020**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación sobre el tema: “ACTIVIDAD ANTI-METASTÁSICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*, EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA” de Juan Carlos Cortez Pinto, 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, Noviembre 2019

**EL TUTOR**

.....

PhD. Bustillos Ortiz, Alberto Alcides

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO**

Los criterios emitidos en el Informe de Investigación “ACTIVIDAD ANTI-METASTÁSICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*, EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA” como también los contenidos, ideas, análisis y conclusiones son de mi exclusiva responsabilidad, como autor de este trabajo de grado.

Ambato, Noviembre 2019

## **EL AUTOR**

.....  
Cortez Pinto, Juan Carlos

## **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 su ponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Ambato, Noviembre 2019

## **EL AUTOR**

.....

Cortez Pinto, Juan Carlos



## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación sobre el tema “ACTIVIDAD ANTI-METASTÁSICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*, EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA” de Cortez Pinto Juan Carlos estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, Enero 2020

**Para constancia firman**

.....

**PRESIDENTE/A**

.....

**1<sup>ER</sup> VOCAL**

.....

**2<sup>DO</sup> VOCAL**

## DEDICATORIA

*El presente trabajo investigativo lo dedico a Dios, que dando gracias a él, aún tengo con vida a mi madre. A mi madre María quien forjo en mí muchos valores para ser un hombre de bien, ¡Gracias! por nunca dejar de creer en mí y siempre inundarme de tu apoyo incondicional en todo este proceso. A mis hermanas Gabriela y Carolina que a pesar de todo siempre estuvieron conmigo y no me dejaron solo, a mi cuñado Luis por sus consejos y de forma muy especial a mi sobrina Emilia, que me enseñó que las pequeñas cosas logran grandes cambios en la vida. A Eric por todo el cariño que me brinda y al que lo quiero como mi hermano menor.*

*A mis tías Maty y Nancy, por haberme acobijado con amor de madre cuando la vida se desmorono por un momento. Infinitas gracias.*

*Cortez Pinto, Juan Carlos*

## AGRADECIMIENTO

En estas líneas quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible esta investigación y que de alguna manera estuvieron conmigo en los momentos difíciles, alegres y tristes. Estas palabras son para ustedes.

Al Phd. Alberto Bustillos por haber puesto su confianza en mí y poder desarrollar este proyecto de investigación.

A la Dra. Yenddy Carrero por haberme compartido sus tan valiosos conocimientos, su valerosa amistad y hasta sus tan sabios consejos, a la Dra. Andrea Zurita que con su paciencia y conocimientos me han encaminado a lograr cosas que pensaba imposibles para mí; de lo que quedo eternamente agradecido.

A mi madre por todo su amor, comprensión y apoyo, pero sobre todo gracias infinitas por la paciencia que me ha tenido. No tengo palabras para agradecerle las incontables veces que me brindó su apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, unas buenas, otras malas, otras locas. Gracias.

A mis hermanas Gaby y Caro. A Caro porque a pesar de las diferencias supo apoyarme a pesar de las peleas, los gritos y herir mi cuerpo de puro amor de hermana. A Gaby por el apoyo incondicional y sobre todo por darme ese regalo más hermoso que amo demasiado y que ahora ilumina mi vida, cada día me enseña muchas cosas nuevas y hermosas. ¡Gracias por darme una sobrinita!

A mis amigos. Oscar, Maritza, Martin, Gabriel, José Luis, Michelle y Edgar que me enseñaron que no importa la cantidad si no la calidad. Gracias por los buenos y malos momentos, porque de todo eso se ha forjado una gran amistad. En especial a Maritza por compartir desde el primer día esta experiencia investigativa y vivir todo tipo de emociones en la misma. Gracias por escucharme y aconsejarme, tus palabras me han ayudado mucho para poder seguir adelante en todos los aspectos que se refiere en la vida.

Cortez Pinto, Juan Carlos



## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTO .....	viii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Antecedentes Investigativos.....	5
1.2 Objetivos.....	8
1.2.1 Objetivo General:.....	8
1.2.2 Objetivos Específicos:.....	8
1.2.3 Cumplimiento de objetivos.....	8
CAPÍTULO II.....	9
METODOLOGÍA.....	9
2.1. Materiales.....	9
2.1.1. Desecación, maceración, destilación y liofilización del material vegetal...9	
2.1.2. Cultivos celulares.....	9

2.1.3. Análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie .....	10
2.1.4. Soft Agar .....	10
2.2. Métodos.....	11
2.2.1. Método de desecación de material vegetal.....	11
2.2.2. Maceración de Etanol 96% y liofilización .....	12
2.2.3. Cultivos celulares.....	12
2.2.4. Descongelación de línea celular MCF-7 .....	12
2.2.5. Pases de cultivos celulares.....	13
2.2.6. Contaje celular con Trypan Blue en cámara de Neubauer .....	13
2.2.7. Análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie .....	14
2.2.8. Soft Agar .....	14
2.2.9. Lectura de los ensayos con ImageJ versión 1.52a .....	15
2.2.10. Análisis de Imágenes.....	15
2.2.11. Análisis Estadístico .....	16
CAPÍTULO III .....	17
3.1. Análisis y discusión de los resultados .....	17
3.1.1. Análisis e Interpretación de resultados.....	17
3.1.2. Discusión .....	21
3.2. Hipótesis .....	25
3.2.1. Hipótesis nula .....	25
3.2.2. Hipótesis alternativa.....	25
3.2.3. Verificación de hipótesis .....	25
CAPÍTULO IV .....	26
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	26
4.1 Conclusiones .....	26
4.2. Recomendaciones .....	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

BIBLIOGRAFÍA.....	28
LINKOGRAFÍA. ....	29
CITAS BIBLIOGRÁFICAS - BASE DE DATOS UTA. ....	31
ANEXOS.....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Materiales, equipos y reactivos usados para la desecación, maceración y liofilización del material vegetal. ....	9
<b>Tabla 2</b> Materiales, equipos y reactivos usados para los cultivos celulares.....	9
<b>Tabla 3</b> Materiales, equipos y reactivos usados para el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie .....	10
<b>Tabla 4</b> Materiales, equipos y reactivos usados para Soft Agar .....	10
<b>Tabla 5</b> Valores obtenidos en el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie .....	17
<b>Tabla 6</b> Valores obtenidos en el ensayo Soft Agar .....	19

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.-</b> Esquema de lectura en barrido de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer. ....	14
<b>Gráfico 2.-</b> Número de UFC encontradas en el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie en células control y sometidas a tratamiento con extractos de <i>Ilex guayusa</i> , <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Croton lechleri</i> .....	18
<b>Gráfico 3.-</b> Número de UFC encontradas en el ensayo Soft Agar en células control y sometidas a tratamiento con extractos de <i>Ilex guayusa</i> , <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Croton lechleri</i> .....	20

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Resolución del proyecto de investigación “Actividad Antimicrobiana y Estudio de Toxicidad In Vitro de Extractos de Plantas Medicinales” RESOLUCIÓN: 0249-CU-P-2017.....	33
<b>ANEXO 2.</b> Resolución y aprobación del tema de investigación, resolución CD-P-2019-1423.....	34
<b>ANEXO 3.</b> Permiso del Ministerio del Ambiente del Ecuador. (Grupal).....	35
<b>ANEXO 4.</b> Permiso del Ministerio del Ambiente del Ecuador. (Individual).....	37
<b>ANEXO 5.</b> Guía de movilización de extractos de plantas emitido por el Ministerio del Ambiente del Ecuador.....	39
<b>ANEXO 6.</b> Consentimiento de recolección de material vegetal.....	40
<b>ANEXO 7.</b> Certificado de haber entregado el material vegetal al “Herbario Misael Acosta Solís” de la Universidad Técnica de Ambato.....	42
<b>ANEXO 8.</b> Certificado por parte de responsable del laboratorio de investigación FCS-UTA. ....	43
<b>ANEXO 9.</b> ESCANEADO DE FRASCAS Y PLACAS.....	44
<b>ANEXO 10.</b> Cuantificación de colonias con ImageJ versión 1.52a .....	49
<b>ANEXO 11.</b> Fotografías .....	56

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

**“ACTIVIDAD ANTI-METASTÁSICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS  
EXTRACTOS DE PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*,  
EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA”**

**Autor:** Cortez Pinto, Juan Carlos

**Tutor:** PhD. Bustillos Ortiz, Alcides Alberto

**Fecha:** Noviembre 28 del 2019

**RESUMEN**

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial, se encuentra entre las neoplasias más comunes en el sexo femenino seguido por el cáncer de cuello uterino, tiroides, estómago y cáncer colorrectal; siendo el cáncer de mama la neoplasia que presenta mayor repercusión en mujeres ecuatorianas. En este contexto, el Ecuador es un país con una gran biodiversidad en flora y etnias, donde las plantas han sido empleadas a través del tiempo como tratamiento para diversas enfermedades. El conocimiento ancestral y el uso de plantas en el país se transmiten de manera empírica, de ahí la importancia de que se deriven investigaciones que proporcionen un sustento científico de sus efectos. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto anti-proliferativo y anti-metastásico de los extractos de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Los extractos se obtuvieron mediante maceración en etanol al 96%, destilación, liofilización y fueron resuspendidos en PBS 1X. Se utilizó la línea celular MFC-7 para el ensayo clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie, así como para el ensayo denominado Soft Agar, cada ensayo consistió en evaluar el efecto de diversas concentraciones de los extractos, siendo dichas concentraciones de 3 µg/µL, 0,3 µg/µL y 0,03 µg/µL. Los resultados mostraron que varios de los extractos analizados poseían una actividad anti-proliferativa sobre

MCF-7, siendo el extracto de *Croton lechleri* el que presentó un mayor efecto para inhibir la proliferación celular. Por otra parte el ensayo de Soft Agar, permitió determinar que los extractos de *Ilex guayusa* presentaron una actividad anti-metastásica dependiente de la concentración, a mayor concentración mayor efecto; *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* presentaron un mayor efecto para inducir metástasis, donde se observó una efectividad total en las diluciones 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; presentando en la dilución 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de *Croton lechleri* una actividad anti-metastásica significativamente positiva en comparación con el Control Positivo. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) Conpos Test de Tukey, obteniendo una significancia  $\leq 0.05$  lo que nos permite aceptar la hipótesis alterna.

**PALABRAS CLAVES:** CÁNCER DE MAMA, MCF-7, ANTI-PROLIFERATIVO, ANTI-METASTÁSICO, *ILEX GUAYUSA*, *UNCARIA TOMENTOSA*, *CROTON LECHLERI*, EXTRACTOS DE PLANTAS, PLANTAS MEDICINALES, MEDICINA ANCESTRAL

**TECHNICAL UNIVERSITY OF AMBATO**  
**FACULTY OF HEALTH SCIENCES**  
**CLINICAL LABORATORY CAREER**

**“ANTI-METASTATIC AND ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY OF *Ilex Guayusa*, *Uncaria tomentosa* and *Croton lechleri* PLANTS, IN THE MCF7 CELULAR LINE OF MAMA CANCER”**

**Author:** Cortez Pinto, Juan Carlos

**Tutor:** PhD. Bustillos Ortiz, Alcides Alberto

**Date:** November 28, 2019

**ABSTRACT**

Breast cancer is the second leading cause of death in women worldwide, among the most common neoplasms in the female sex followed by cervical, thyroid, stomach and colorectal cancer; breast cancer is the neoplasm that has the greatest impact in Ecuadorian women. In this context, Ecuador is a country with a great biodiversity in flora and ethnicities, where plants have been used over time as a treatment for various diseases. Ancestral knowledge and the use of plants in the country are transmitted empirically, hence the importance of derived research that provides a scientific sustenance of their effects. The objective of the research was to evaluate the anti-proliferative and anti-metastatic effect of *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* and *Croton lechleri* extracts on the MCF-7 breast cancer cell line. The extracts were obtained by maceration in 96% ethanol, distillation, freeze-dried and resuspended in PBS 1X. I know used the MFC-7 cell line for the surface adhesion-dependent clonogenic assay, as well as for the assay called Soft Agar, each assay consisted of evaluating the effect of various concentrations of the extracts, with such concentrations being 3 µg/µL, 0.3 µg/µL and 0.03 µg/µL. The results showed that several of the extracts analyzed possessed an anti-proliferative activity on MCF-7, with *Croton lechleri* extract having the greatest effect in inhibiting cell proliferation. Furthermore, the Soft Agar trial, made it possible to determine that the extracts of

*Ilex guayusa* had an anti-metastatic activity dependent on concentration, the higher concentration effect; *Uncaria tomentosa* and *Croton lechleri* had a greater effect in inducing metastasis, where total effectiveness was observed in dilutions 3 µg/µL and 0.3 µg/µL; presenting in the dilution 0.03 µg/µL of *Croton lechleri* a significantly positive anti-metastatic activity compared to Positive Control. The results were analyzed by the analysis of variance (ANOVA) Conpos Test de Tukey, obtaining a significance of  $\leq 0.05$  which allows us to accept the alternating hypothesis.

**KEY WORDS:** MAMA CANCER, MCF-7, ANTI-PROLIFERATIVE, ANTI-METASTIC, *ILEX GUAYUSA*, *UNCARIA TOMENTOSA*, *CROTON LECHLERI*, EXTRACTS OF PLANTS, MEDICINAL PLANTS, ANCESTRAL MEDICINE.



## INTRODUCCIÓN

Una de las primeras evidencias de la presencia del cáncer se remonta al año 1600 a.C., en donde se lo menciona en papiros egipcios. Mientras que Hipócrates fue el primero en utilizar “carcinosis”, como término para denominar dicha enfermedad (1). El cáncer ha sido descrito como un grupo de enfermedades, las cuales se caracterizan por su capacidad de alterar la morfofisiología y crecimiento celular; facilitando la formación de tumores en la gran mayoría de las neoplasias (2). Llegando a ser una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo el cáncer pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario las neoplasias con mayor incidencia en hombres y mujeres. Resaltando que únicamente el cáncer de mama ha causado a nivel mundial 8,8 millones de víctimas mortales en el 2015 (3).

Según la Organización Mundial de la Salud el cáncer es considerado un problema de salud pública, correspondiendo a la segunda causa de muerte a nivel mundial y la tercera en América Latina (3). Esto puede deberse, a que el 80% de individuos que han desarrollado cáncer se presenta a consulta médica especializada en estadios avanzados de la neoplasia; donde el tratamiento no será efectivo y los efectos secundarios tienen una respuesta negativa en el paciente (4). Ante esta situación se debe enfatizar la prevención, ejecutando programas de salud en conjunto con un diagnóstico precoz. Facultando la intervención inmediata del paciente a un tratamiento, lo cual podría estar contribuyendo en la cura de aproximadamente 50% de los casos de cáncer en general (4). Esta proporción puede variar dependiendo de la neoplasia, donde podremos sobresaltar que el porcentaje de curación en cáncer de mama es > a 95% (4)(5).

El cáncer de mama se encuentra entre las neoplasias más comunes en el sexo femenino, seguido por el cáncer de cuello uterino, tiroides, estómago y cáncer colorrectal (6)(7). Siendo el primero, la neoplasia con mayor repercusión en mujeres ecuatorianas. El Observatorio Mundial de Cáncer (GCO), ha registrado 28.058 casos nuevos en Ecuador, para el 2018 (6). Los principales tipos de cáncer de mama son denominados carcinomas, los cuales han sido nombrados en relación al lugar donde se formaron y su alcance de diseminación. Los más comunes son: cáncer in situ

(carcinoma ductal in situ y carcinoma lobular in situ) y cáncer de mama invasivo (carcinoma ductal invasivo y carcinoma lobular invasivo) (8).

Debido a su evolución no invasivo a invasivo, los estadios llegan a ser una dificultad diagnóstica. En el estadio 0, no hay indicios de células anormales o cancerígenas. En el estadio I y II ya se lo categoriza como cáncer invasivo debido a la presencia de un tumor de pequeña dimensión (9). Hasta este estadio la paciente va a carecer de signos y síntomas que puedan ayudar a la detección temprana y oportuna de la enfermedad, siendo esto una dificultad diagnóstica de la neoplasia (8). En el estadio III se presenta un tumor de mayor tamaño y ganglios linfáticos infectados por el cáncer, la formación del tumor es consecuente de la capacidad proliferativa que poseen las células del cáncer de mama (9). En el último estadio mencionado se considera que es una etapa muy avanzada, por cual razón se presenta una morfología anormal de la mama, sensibilidad en el pezón, presencia de un bulto a causa del tumor, hinchazón y enrojecimiento de la mama, pezón y areola; y la secreción de un fluido en el pezón (10). En el estadio IV las células del cáncer han desarrollado la capacidad de migrar, propagándose a otros órganos como pulmones, cerebro, hígado, huesos y piel (9). A este proceso se lo conoce como metástasis, donde las células del cáncer de mama van a tener la capacidad de desprenderse del tumor primario y ser transportadas a otras locaciones del cuerpo por el torrente sanguíneo y en algunas ocasiones por el sistema linfático (11). Dichas células deben ser capaces de invadir las paredes del vaso sanguíneo distante e ingresar al tejido donde se van adherir, proliferar y formar un tumor en la nueva locación, están obligados a desarrollar mecanismos de evasión para no ser reconocidos por el sistema inmunológico y no ser atacados por el mismo. Al causar metástasis, el tratamiento se dificulta y habrá muchos daños colaterales en el paciente (11)(12).

Se debe considerar ciertos factores al momento de asignar un tratamiento, siendo estos: etapa tumoral, subtipo del tumor, estado del receptor hormonal (ER, PR) y de HER2, marcadores genómicos, edad (menopausia), estado de salud general y la mutaciones en genes como *BRCA1* o *BRCA2* (13), estos genes producen proteínas supresoras de tumores, ayudando a reparar el ADN dañado de las células, por lo tanto, tienen el papel de asegurar la estabilidad del material genético de cada una de las células. Cuando cualquiera de estos genes tiene una mutación, ya no se va

a producir la proteína o no cumplirá con su función correctamente y como resultado final puede terminar en cáncer; mencionando que las mutaciones específicas que se heredan en los genes *BRCA1* y *BRCA2* aumentan el riesgo de cánceres de seno y de ovario en las mujeres (14)(15); dichas características determinan el tipo de tratamiento. Existen una serie de tratamientos, siendo la cirugía el más recomendado por los médicos oncólogos. La lumpectomía es la práctica más recurrente, en donde se extirpa el tumor y el tejido sano que se encuentra rodeando el mismo, y la mastectomía que es la extirpación total del seno; como siguiente alternativa terapéutica esta la radioterapia, donde se emplean rayos x de alta gama, cuyo fin es destruir las células cancerígenas (12). Finalmente está la terapia con medicación, que puede ser suministrado por vía intravenosa, intramuscular, oral o subcutánea. Los procedimientos más utilizados para el cáncer de mama son: quimioterapia (ciclofosfamida, etc.), terapia hormonal (tamoxifeno), terapia dirigida (cuando HER2 es positivo se emplea el de medicamentos como trastuzumab, etc.) e inmunoterapia (atezolizumab) (13).

La aparición de efectos secundarios, tales como anemia, alopecia, cambios en la piel y en las uñas, delirio, diarrea, falta de apetito, fatiga, náuseas, vómito, entre otros, en pacientes que se someten a tratamientos para destruir las células cancerígenas; ha impulsado a nivel mundial la búsqueda de nuevas terapias con una efectividad similar o superior a las existentes y con una agresividad inferior para evitar los efectos colaterales de los tratamientos utilizados en la actualidad, mejorando su calidad de vida. Los recursos naturales han llegado a ser parte importante para descubrir y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer (16). Ante la aprobación de nuevos medicamentos para el cáncer, el departamento de Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos resalta que el 62% son de origen natural. Al poseer una estructura molecular muy diversa se les atribuye una actividad más específica, que las drogas sintéticas (16).

El uso ancestral de plantas ha sido el pilar fundamental para el descubrimiento de nuevos compuestos medicinales. De particular interés a lo descrito por Gonzales, G. donde menciona que a través del uso ancestral a lo largo de generaciones en conjunto con la información expuesta de etnias de América del Sur y la investigación científica, se le atribuye efectos anticancerígenos y antitumorales a

las plantas *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* (16). En el presente existe una gran cantidad de información sobre el cáncer de mama que puede ser utilizada en beneficio para investigar y descubrir principios activos derivado de plantas, los que permitan detener el crecimiento, bloquee y elimine a las células neoplásicas. Ayudando a la población con cáncer de mama, disminuyendo la tasa de mortalidad y aportando a la solución de una problemática de salud a nivel mundial.

Estudios realizados por Castro, A. y colaboradores, sugieren que *Croton lechleri* posee una capacidad para inducir muerte celular, siendo esto probado en la línea celular HeLa. En donde se observó un aumento del 30% de apoptosis en comparación a las células control. De igual manera se comprobó que el extracto no posee un efecto toxico sobre las células normales o no cancerígenas (17). En otra investigación Santos, M. y colaboradores demuestran que la *Uncaria tomentosa* posee la capacidad de reducir los efectos adversos causado por la quimioterapia, observando un mejoramiento de la neutropenia y siendo capaz de restaurar el daño del ADN celular resultante de la quimioterapia; y como conclusión le atribuyen la eficacia de ser un tratamiento adyuvante en paciente con cáncer de mama (18).

En el presente estudio, se expondrá la línea celular MCF-7 (cáncer de mama) a los extractos vegetales de las plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* con la finalidad de determinar la capacidad de proliferación y migración (metástasis) de las células ante la presencia del tratamiento. Esto se medirá mediante la elaboración de un análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie (proliferación) y el ensayo clonogénico en soft agar (metástasis). Esto con la finalidad de probar la eficacia de los extractos, los que podrían ser considerados como un posible tratamiento para beneficio de la población.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1 Antecedentes Investigativos

Diversos estudios han tratado de demostrar el efecto de plantas en células cancerígenas a fin de encontrar tratamientos alternativos que optimicen la terapéutica del cáncer; *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* han despertado el interés desde hace algún tiempo y diversos estudios señalan su potencial antineoplásico. Montopoli, M. y colaboradores en el 2012 emplearon *Croton lechleri* y taspina en líneas celulares de cáncer humano SK23 (melanoma), LoVo y HT29 (cáncer colorrectal); encontraron que inhibían la proliferación celular de las células de melanoma y cáncer colorrectal, sugiriendo un posible efecto anticancerígeno (19). En otra investigación realizada en México dirigida por Alonso, A. y colaboradores en el año 2012, evaluaron los efectos citotóxicos y antitumorales de *Croton lechleri* en ratones; donde confirmaron que la inducción de la muerte celular en HeLa por *Croton lechleri* sufrió un aumento de 30% de la apoptosis en comparación con las células no tratadas y concluyeron que *Croton lechleri* muestra efectos tóxicos moderados *in vivo*, ejerciendo efectos citotóxicos sobre las células de HeLa y tiene efectos antitumorales en ratones portadores de tumor HeLa (17). Por otra parte en Italia, en el año 2003, Rossi, D. y colaboradores utilizaron el extracto de *Croton lechleri* sobre la línea celular K562 (leucemia mielogenica humana) y demostraron que tiene efectos anti-proliferativos dependientes de la dosis sobre la línea celular K562, confirmando y extendiendo observaciones anteriores sobre su actividad antitumoral (20).

En otras investigaciones realizadas a nivel mundial vale recalcar lo experimentado en 2010 por el Dr. Radoslaw Pilarski y colaboradores, realizaron ensayos *in vitro* en células cancerosas e *in vivo* empleando *Uncaria tomentosa*. Donde mencionaron que hubo cambios en los ciclos celulares de las células tumorales con una excepción en la disminución celular en la fase G2/M, también recalcaron que el extracto probado no fue toxico y bien tolerado en los ensayos *in vivo* (21). Por otra parte, Farias, I. *et al* en 2011, en Brasil estudiaron la planta *Uncaria tomentosa* sobre células formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos

(CFU-GM) y neutrofilos, encontraron que ayuda a proliferar las células expuestas y promueven su uso con quimioterapia para minimizar los efectos adversos del tratamiento y la consideraron como una “planta poderosa” (22). En España, en el año 2010, García, D. y colaboradores, emplearon *Uncaria tomentosa* en células de sarcoma de Ewing humano (MHH-ES-1) y en las líneas celulares de cáncer de mama (MT-3), encontraron que inhibía el crecimiento de células cancerígenas debido a su alto contenido de alcaloides (23).

En 2018, Ren-You y colaboradores, en China atribuyeron a *Ilex guayusa* los efectos antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena, debido a la presencia de polifenoles, derivados de ácido fenólico mono, di-cafeoilquínico, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico, ácido neoclorogénico y alcaloides como la cafeína y la teobromina. Mencionando el uso de estos compuestos para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas (24). En otro estudio en el año 2007, en España, Lozano, R. y colaboradores demuestran que la cafeína presenta efectos supresores sobre células tumorales que ya han sufrido metástasis (25), recalando que *Ilex guayusa* es una planta que posee una alta concentración del alcaloide cafeína (24).

En otra investigación en el año 2017; Ozra Zarei en conjunto con sus colaboradores en Kerman, Irán. Expusieron a células de cáncer de hígado (LCL-PI 11), adenocarcinoma mamario (MCF-7) y células similares a fibroblastos (HskMC), al extracto etanólico y acuoso de *Fritillaria imperialis L*, encontraron que redujo la viabilidad celular significativamente dependiente de la dosis; también demostraron que el extracto etanólico era más tóxico que el acuoso; contra las células de cáncer de hígado y mama (26).

Los ensayos a desarrollar en una investigación son muy importantes y en gran proporción conocer el interés de cada uno en experimentación. El análisis clonogénico, es un cultivo celular altamente diluido, de modo que permite detectar células individuales, determinando la actividad proliferativa que en concepto es la capacidad de las células individuales de multiplicarse y formar colonias; y Soft Agar, permite evaluar de forma semicuantitativa la capacidad en respuesta a varias concentraciones de tratamiento in vitro y se considera una prueba rigurosa para la transformación maligna de células. Se basa en capas semi-sólidas que permiten un crecimiento selectivo de las células (27).

En Ecuador el estudio de plantas para desarrollar nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer ha ido en aumento, obteniendo información de interés científico e investigativo. Como lo descrito por Villacis, J. en 2017, que empleo *Ilex guayusa* en su investigación; describió que posee un efecto antioxidante sobre el cáncer y menciona que el estudio de esta planta no solo permitiría desarrollar nuevos fármacos, sino que nos permite entender y comprender el uso empírico de las plantas con su finalidad medicinal a través de generaciones en generaciones (28).

Por otra parte en Ambato, en 2018; Bustos, P. empleó *Uncaria tomentosa* y *Mansoa alliacea* en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, demostrando una actividad citotóxica sobre células MCF-7 de cáncer de mama (29). En 2019, otro estudio realizado por Canseco, M; donde uso extractos de las plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, donde encontró que *Croton lechleri* aumenta la expresión del gen Bax y disminuye la expresión de Bcl-2; ambos genes son indispensables para un correcto funcionamiento del proceso fisiológico de la apoptosis; de su funcionamiento en conjunto resultan muchas interacciones en la membrana mitocondrial; el gen Bcl-2 actúa formando homodímeros (Bcl-2 : Bcl-2) y heterodímeros (Bax : Bcl-2), cuando existe una sobre expresión de este gen las células aumentarían su capacidad de supervivencia; cuando existe una cantidad excesiva del gen Bax, se produce homodímeros (Bax : Bax) y la célula es más susceptible a sufrir apoptosis (30).

Conocer sobre el uso empírico de plantas en la medicina tradicional, tiene una gran importancia en la medicina y en el estudio científico, porque nos puede permitir desarrollar nuevas alternativas terapéuticas con mayor efecto sobre enfermedades y de bajo costo, siendo así accesible para toda la población mundial; la presente investigación tiene como importancia exponer los intereses de la medicina tradicional, que nos ayuda al descubrimiento de nuevos fármacos, enfocándonos en la Amazonía Ecuatoriana y el uso de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*; desde los inicios de la historia, los seres humanos han utilizado elementos naturales para beneficio propio, principalmente en el área de salud y alimentación. En Ecuador, el uso de plantas con fines médicos y tradicionales se ha documentado ampliamente, determinándose que su principal aplicación es como tratamiento para enfermedades “sobrenaturales” (28).

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo General:

- Determinar la actividad anti- metastásica y anti-proliferativa de los extractos de plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

### 1.2.2 Objetivos Específicos:

- Obtener los extractos de plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* mediante el método de maceración.
- Investigar los efectos de los extractos vegetales sobre la capacidad de formar colonias dependientes de anclaje.
- Determinar el efecto del tratamiento de extractos vegetales en la línea celular MCF-7 sobre la capacidad de migración celular con el ensayo Soft-agar.

### 1.2.3 Cumplimiento de objetivos

Con el fin de cumplir los objetivos establecidos se utilizó extractos de plantas provenientes de hojas de *Ilex guayusa*, de la corteza del árbol de *Uncaria tomentosa* y savia o látex rojo de *Croton lechleri*. Los cuáles se utilizaron para la ejecución de experimentos *in vitro*, en donde se utilizó la línea celular MCF-7, la cual corresponde a un adenocarcinoma de mama. Se elaboró un análisis clonogénico, en donde se midió la adherencia a la superficie lo cual permitió conocer la capacidad de las células para proliferar y el ensayo Soft Agar el cual midió la capacidad migratoria de las mismas.



## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1. Materiales

##### 2.1.1. Deseccación, maceración, destilación y liofilización del material vegetal

**Tabla 1**

Materiales, equipos y reactivos usados para la desecación, maceración y liofilización del material vegetal.

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
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 (EYELA N-1100 Series)	
Matraz aforado	pHmetro (Thermo Scientific)	
Recipiente de boca ancha	Liofilizador (Virtis Sp)	
Papel Aluminio		
Filtro		

**Autor:** Juan Carlos Cortez Pinto

**PBS1X:** Para preparar se emplea una dilución 1/10. En un volumen total de 1000mL se coloca 900mL de agua destilada con 100mL de PBS10X líquido y será auto clavado a 120°C por 45 minutos obteniendo un reactivo estéril.

##### 2.1.2. Cultivos celulares

**Tabla 2**

Materiales, equipos y reactivos usados para los cultivos celulares

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Frascas Roux 75 mL	Baño María	Células MCF-7
Pipetas automáticas	Centrifuga (Sigma Zentrifugen)	DMEN (Dulbecco Modified Eagle Medium)
Pipetas Graduadas (5-10mL)	Cabina de Flujolaminar nivel de Bioseguridad II	Suero Fetal Bovino (FBS)
Puntas (blancas, amarillas, azul)	Microscopio Invertido de contraste	Glutamina
Tubos cónicos (15 - 50 mL)	Incubadora de atmosfera de CO <sub>2</sub>	Penicilina/Estreptomicina
EPP (Equipo de protección personal)		Tripsina-EDTA 0,25%
		PBS 1X

**Autor:** Juan Carlos Cortez Pinto

**Fuente:** Protocolo de cultivos celulares (31).

### 2.1.3. Análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie

**Tabla 3**

Materiales, equipos y reactivos usados para el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Frascas Roux 75 mL	Baño María	Células MCF-7
Cámara de Neubauer	Centrifuga (Sigma Zentrifugen)	DMEN supplemented
Pipetas automáticas	Cabina de Flujo laminar nivel de Bioseguridad II	Tripsina-EDTA 0,25%
Pipetas Graduadas (5-10mL)	Microscopio Invertido de contraste	PBS 1X
Puntas (blancas, amarillas, azul)	Incubadora de atmosfera de CO <sub>2</sub>	Trypan Blue
Tubos cónicos (15 - 50 mL)	Escáner	Extractos de plantas <i>Ilex guayusa</i> , <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Croton lechleri</i>
EPP (Equipo de protección personal)		Cristal Violeta 0.5%

**Autor:** Juan Carlos Cortez Pinto

**Fuente:** Protocolo del análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie (32)

**DMEM supplemented:** DMEN (Dulbecco Modified Eagle Medium) con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), 1% de Glutamina y 1% de Penicilina/Estreptomina

### 2.1.4. Soft Agar

**Tabla 4**

Materiales, equipos y reactivos usados para Soft Agar

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Frascas Roux 75 cc	Baño María	Células MCF-7
Placas de 12 pocillos (4x3)	Centrifuga (Sigma Zentrifugen)	DMEN supplemented
Pipetas automáticas	Cabina de Flujo laminar nivel de Bioseguridad II	Tripsina-EDTA 0,25%
Pipetas Graduadas (5-10mL)	Microscopio Invertido de contraste	PBS 1X
Puntas (blancas, amarillas, azul)	Incubadora de atmosfera de CO <sub>2</sub>	Trypan Blue
Tubos cónicos (15 - 50 mL)	Autoclave	Agar bacteriológico para uso molecular (Agar agar)
EPP (Equipo de protección personal)	Plancha Magnética	Extractos de plantas <i>Ilex guayusa</i> , <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Croton lechleri</i>

**Autor:** Juan Carlos Cortez Pinto

**Fuente:** Protocolo ensayo clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Método de desecación de material vegetal

Se obtuvo de manera inicial el permiso correspondiente de los dueños de las locaciones mediante un consentimiento de recolección de material biológico; *Ilex guayusa* se recolectó en la Vía Tarqui Km 3, Puyo – Pastaza con coordenadas LAT -1.509928 y LONG -78.010016; *Uncaria tomentosa* se recolectó en la parroquia Indichuris, Puyo - Pastaza con coordenadas LAT -1.652495 y LONG -77.922170; y *Croton lechleri* se recolectó en la parroquia Indichuris, Puyo - Pastaza con coordenadas LAT -1.510172 y LON -78.010431; posteriormente se obtuvo la autorización de investigación científica de flora y fauna por parte de la Dirección Provincial del Ambiente de Pastaza perteneciente al Ministerio del Ambiente; donde nos especificaban las condiciones adecuadas para la recolección y su transporte del material vegetal a utilizar en esta investigación, como es *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*. Al no presentar alteraciones organolépticas fueron aprobadas por el Ing. Homero Vargas encargado del Herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato. El material vegetal fresco como las hojas de *Ilex guayusa*, corteza de *Uncaria tomentosa* y la savia o látex de *Croton lechleri* fue transportado al Laboratorio de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, se utilizó el protocolo estandarizado por el grupo de investigación de la Universidad Técnica de Ambato, donde se realizó un lavado con agua destilada y colocadas en una estufa para que se des sequen durante 24 horas a una temperatura de 40°C y así deshidratar las hojas de *Ilex guayusa* y la corteza de *Uncaria tomentosa*. La savia o látex de *Croton lechleri* al ser un material vegetal de consistencia líquida fue liofilizado directamente para luego ser resuspendido en PBS1X y finalmente esterilizado por filtración (filtro de 0.22mm) (29)(30).

### **2.2.2. Maceración de Etanol 96% y liofilización**

Con el material vegetal seco, se trituró la corteza de *Uncaria tomentosa* y las hojas de *Ilex guayusa* para ser pesados indistintamente en una balanza. Con el valor del peso obtenido se realizó un cálculo para lograr una relación 1:15 (Peso/Volumen); se colocó el material vegetal seco y triturado dentro de un recipiente ámbar, al cual se añadió etanol al 96% dejándolo en maceración por 7 días privado de luz y a temperatura ambiente. Posteriormente, se utilizó una bomba para filtración al vacío WELCH y papel filtro cualitativo Whatman N° 1, se filtró el extracto por dos ocasiones con la finalidad de extraer la mayor cantidad de metabolitos posible. Se colocó el total filtrado en un balón de vidrio para ser ubicado en el rotavapor EYELA N-1100 *Series* para desarrollar el procedimiento de destilación, esto se lo realizo a una velocidad de 500rpm, a una presión reducida de 61 hectopascal (hPa) y a una temperatura de 40 °C, hasta evaporar el etanol y obtener un extracto concentrado. Una vez concluido con la destilación, se cuantifico el pH de los concentrados por medio del pHmetro (Thermo Scientific), los extractos fueron almacenados a una temperatura de -80°C en envases estériles de boca ancha, recubiertos en su totalidad con papel aluminio. Finalmente, el concentrado de cada extracto fue liofilizado durante 24 horas a una presión de 500 miliTorr (mT) y a una temperatura de -42°C en un Liofilizador Virtis *Sp*; produciendo una separación del agua por sublimación, volviendo los concentrados líquidos a solidos; ayudando a preservar los principios activos de los extractos. Cada extracto liofilizado fue resuspendido en PBS1X (Buffer fosfato salino) y esterilizado por filtración (filtro de 0,22 mm). Posterior a uso fue almacenado a -80°C (29)(30).

### **2.2.3. Cultivos celulares**

En esta investigación se trabajó con la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, fueron cultivadas con el medio DMEN suplementado (Dulbecco Modified Eagle Medium) con 10% de suero fetal bovino (FBS), para reducir la frecuencia de contaminación se le agrego 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de Glutamina (31) (30)(33)(34).

### **2.2.4. Descongelación de línea celular MCF-7**

Se colocó 5mL de medio DMEM en un tubo cónico de tipo falcón de 15 mL, el medio previamente se lo temperó en un baño maría a 37°C; se seleccionó el crio

vial a descongelar y se lo sometió a 37°C por un minuto, el concretado de células MCF-7 se colocó en el tubo que tiene el medio DMEM. Se centrifugó la suspensión a 500 gravedades por 5 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y el precipitado o pellet se lo resuspendió en 1 mL de medio DMEM y finalmente se transfirió la resuspensión a una frasca Roux de 75 mL, a la que se le añadió 10 mL de medio DMEM suplementado. Se incubó por 24 horas a una temperatura de 37°C y con una atmosfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> (30).

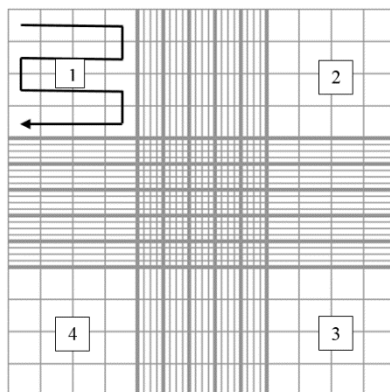
#### **2.2.5. Pases de cultivos celulares**

Los cultivos celulares que llegan a tener una confluencia del 80%, son óptimos para realizar pases celulares. Como punto de partida se desechó el medio, se lavó con 8 mL de PBS1X temperado a 37°C; luego se tripzinizó con 1 mL de tripsina/EDTA al 0,25% que también se temperó a 37°C y se lo incubó por 4 minutos a 37°C y en una atmosfera húmeda de CO<sub>2</sub> a 5%, esto para desenganchar las células que se adhirieron a la superficie de la frasca; la actividad enzimática de la tripsina se la inhibió con 4 mL de medio de cultivo DMEM suplementado. Posteriormente, se centrifugó la suspensión celular a 500 gravedades por 5 minutos; el sobrenadante es eliminado y el pellet o sedimento se lo resuspendió en 1 mL de medio de cultivo DMEM suplementado. El volumen total de la resuspensión celular se dividirá para la cantidad de frascas a obtener y se les añadió 12 mL de medio DMEN suplementado y se incubó por 24 horas a 37°C en una atmosfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### **2.2.6. Contaje celular con Trypan Blue en cámara de Neubauer**

Cuando el cultivo celular esta con una confluencia del 80%, se desechó el medio, se realizó un lavado con 8 mL de PBS1X, se desenganchó las células con tripsina/EDTA al 0,25%, se inactivó la tripsina con 4 mL de DMEM suplementado, se centrifugó por 5 minutos a 500 gravedades, el sedimento se resuspendió en 2 mL de PBS1X con la finalidad de eliminar cualquier residuo de tripsina, y finalmente se lo centrifugó por segunda ocasión y el sedimento final se lo resuspendió en 2 mL de medio de cultivo DMEM suplementado. Posteriormente, para el contaje celular se utilizó Trypan Blue que nos permite observar la viabilidad celular; para lo que se hizo una dilución 1:1 de suspensión celular y de Trypan Blue. Se colocó 10 µL en cada cuadrante de una cámara de Neubauer y se leyó los cuatro cuadrantes en barrido como lo indica el **Grafico N° 1**, en un microscopio óptico con lente de 10X; obtenido

el valor del conteo se lo va a multiplicar \* 2 y \* 10.000, obteniendo el número de células por cada mL (27).



**Gráfico 1.-** Esquema de lectura en barrido de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer.

### 2.2.7. Análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie

Se colocó 29.000 células en una frasca de 75 mL que correspondió a 21  $\mu$ L de concentrado celular, se incluyó 10 mL de medio de cultivo DMEM y se lo dejó incubar por 24 horas. Después del tiempo de incubación se añadió 100  $\mu$ L de tratamiento de los extractos vegetales de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* en concentraciones 3  $\mu$ g/ $\mu$ L, 0,3  $\mu$ g/ $\mu$ L y 0,03  $\mu$ g/ $\mu$ L. Se controló el crecimiento celular del ensayo y se cambió de medio y de tratamiento cada 4 días; después de 20 días se eliminó el medio con el tratamiento, se hizo un lavado con 8 mL de PBS1X, para posteriormente colorear con Cristal Violeta 0,5% por 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó las frascas en dos oportunidades con 5 mL de PBS1X y finalmente para escanear, se limpió la base de la frasca y el escáner con alcohol; también se colocó una hoja en blanco encima de la frasca. Con ayuda del programa ImageJ versión 1.52a se contabilizó la cantidad de colonias formadas en el control positivo y en los distintos tratamientos. Este ensayo se lo hizo por duplicado obteniendo un total de 20 frascas (27).

### 2.2.8. Soft Agar

Se calentó el medio de cultivo DMEM suplementado en un baño maría a 46 C° y se colocó 45mL en un tubo cónico tipo falcón; se diluyó 5 gramos de agar bacteriológico para uso molecular (Agar agar, Sigma Aldrich - México) en 100 mL de agua destilada, esto para obtener agar al 5%, la dilución del agar se autoclavó por 45 minutos a 120 C°, luego de ese tiempo se disolvió 5mL del agar al 5% en el falcón

con el medio de cultivo DMEM suplementado a 46 C°, obtenida la Capa Base A se distribuyó 600 µL en cada pocillo de placas de 3x4 (por duplicado) y se dejó secar por 30 minutos a temperatura ambiente; se regresó la Capa Base A a 46 C°. Se procedió a realizar el conteo celular como se especifica en el **literal 2.2.6** y se preparó una solución  $4 \times 10^4$  de células/mL, donde se tomó 300 µL de la suspensión de células y se completó hasta un volumen de 9 mL con medio de cultivo DMEM suplementado, luego se diluyó 15 mL de Capa Base A y se formó la Capa Superior B; que de igual manera que la Capa Base A, se colocó 600 µL de la Capa Superior B en cada pocillo de las placas de 3x4 y se lo dejó secar por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadió 200 µL de medio de cultivo DMEM suplementado y se lo dejó incubar por 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5%. Después del tiempo de incubación se añadió 50 µL de tratamiento de los extractos vegetales de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* en concentraciones 3 µg/µL, 0,3 µg/µL y 0,03 µg/µL. Se controló el crecimiento celular del ensayo y se cambió de medio y de tratamiento cada 3 días; después de 11 días se eliminó el medio con el tratamiento, se hizo un lavado con 1 mL de PBS1X, para posteriormente colorear con MTT en una concentración de 1 mg/mL por 2 horas a temperatura ambiente privado de luz y finalmente para escanear, se limpió la base de la placa y el escáner con alcohol; se destapó la placa y se colocó una hoja en blanco encima. Con la ayuda del programa ImageJ versión 1.52a se contabilizó la cantidad de colonias formadas en el control positivo y en los distintos tratamientos (27).

#### **2.2.9. Lectura de los ensayos con ImageJ versión 1.52a**

Se seleccionó la imagen previamente escaneada y se le dibujó un campo oval, para recortarlo y luego dibujar una línea para establecer una escala de 3 cm para el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie y de 1 cm para Soft Agar; nuevamente se seleccionó el campo oval y se le aplicó la opción Threshold que va a dar un color rojo a las colonias que están en el campo a leer. Posteriormente, se analizó las colonias con un rango de tamaño de 0 – infinito y se reportó los resultados utilizando el número de colonias (27).

#### **2.2.10. Análisis de Imágenes**

Después de colorear las frascas del análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie y placas de Soft Agar, escanearlas y realizar el conteo

mediante el programa ImageJ versión 1.52a con un campo de 471x471 píxeles con una escala de 3 cm para el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie y con un campo de 1028x1028 píxeles con una escala de 1 cm para Soft Agar, se procedió al análisis estadístico (27).

#### **2.2.11. Análisis Estadístico**

Se empleó el programa GraphPad InStat versión 3 y GraphPad Prism versión 8, se realizó análisis de varianza ANOVA Conpos Test de Tukey para establecer diferencias en los grupos estudiados (Mean  $\pm$  DS), se tomó como índice de confianza el 95% y todo valor de  $p \leq 0,05$ .



## CAPÍTULO III

### 3.1. Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1. Análisis e Interpretación de resultados

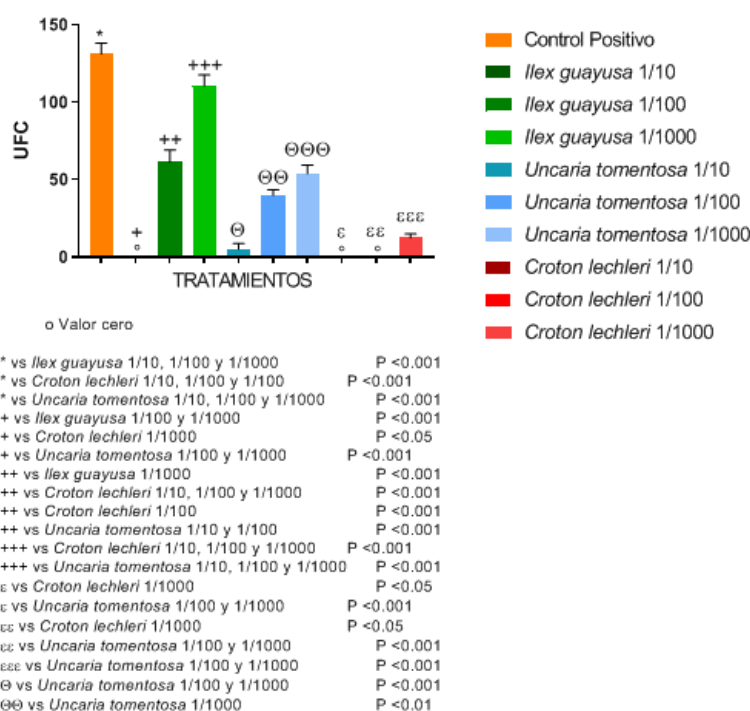
La **Tabla 5** muestra los valores obtenidos en el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie, los cuales se muestran como valores de media ( $\bar{x}$ ) y desviación estándar (DS), es importante recalcar que en comparación con el Control Positivo, *Ilex guayusa* 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , *Croton lechleri* 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  obtuvieron un valor de 0 indicando una efectividad del 100%; *Uncaria tomentosa* 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , *Uncaria tomentosa* 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , *Uncaria tomentosa* 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y *Croton lechleri* 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  se observó un efecto anti-proliferativo pero no al 100% de eficacia; *Ilex guayusa* 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e *Ilex guayusa* 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  presentaron una baja actividad anti-proliferativa.

Se observó que *Ilex guayusa* (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y *Croton lechleri* (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en sus más altas concentraciones; *Croton lechleri* (0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en su concentración media; fueron altamente efectivas sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, ejerciendo una actividad anti-proliferativa efectiva del 100%.

**Tabla 5**

Valores obtenidos en el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie.

Tratamiento	$\bar{x}$	DS
Control Positivo	131	7.071
<i>Ilex guayusa</i> 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0	0
<i>Ilex guayusa</i> 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	61.25	7.805
<i>Ilex guayusa</i> 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	110.5	7.234
<i>Uncaria tomentosa</i> 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	5	3.742
<i>Uncaria tomentosa</i> 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	39.75	3.500
<i>Uncaria tomentosa</i> 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	53.75	5.560
<i>Croton lechleri</i> 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0	0
<i>Croton lechleri</i> 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0	0
<i>Croton lechleri</i> 0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	12.25	2.630



**Gráfico 2.-** Número de UFC encontradas en el análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie en células control y sometidas a tratamiento con extractos de *Ilex guayusa* (+, ++, +++), *Uncaria tomentosa* (Θ, ΘΘ, ΘΘΘ) y *Croton lechleri* (ε, εε, εεε).  
\*1/10 (3 μg/μL), 1/100 (0,3 μg/μL), 1/1000 (0,03 μg/μL)

## Análisis e interpretación

Al comparar Control Positivo (1621 ± 291.33) con las células tratadas con *Ilex guayusa* 3 μg/μL (0 ± 0), 0,3 μg/μL (605 ± 56.569), 0,03 μg/μL (1688 ± 80.610); *Uncaria tomentosa* 3 μg/μL (0 ± 0), 0,3 μg/μL (0 ± 0), 0,03 μg/μL (936 ± 36.770) y *Croton lechleri* 3 μg/μL (0 ± 0), 0,3 μg/μL (0 ± 0), 0,03 μg/μL (397 ± 46.669); se obtuvo una diferencia significativa de  $p \leq 0.001$ . Mencionando a los que mayor diferencia significativa mostraron dentro del análisis estadístico  $p \leq 0.001$ ; *Ilex guayusa* 3 μg/μL vs *Ilex guayusa* 0,3 μg/μL y 0,03 μg/μL; *Ilex guayusa* 3 μg/μL vs *Uncaria tomentosa* 0,3 μg/μL y 0,03 μg/μL; *Ilex guayusa* 0,3 μg/μL vs *Ilex guayusa* 0,03 μg/μL; *Ilex guayusa* 0,3 μg/μL vs *Croton lechleri* 3 μg/μL, 0,3 μg/μL y 0,03 μg/μL; *Ilex guayusa* 3 μg/μL vs *Croton lechleri* 0,3 μg/μL; *Ilex guayusa* 0,3 μg/μL vs *Uncaria tomentosa* 3 μg/μL y 0,3 μg/μL; *Ilex guayusa* 0,03 μg/μL vs *Croton lechleri* 3 μg/μL, 0,3 μg/μL y 0,03 μg/μL; *Ilex guayusa* 0,03 μg/μL vs *Uncaria tomentosa* 3 μg/μL, 0,3 μg/μL y 0,03 μg/μL; *Croton lechleri* 3 μg/μL vs *Uncaria tomentosa* 0,3 μg/μL y 0,03 μg/μL; *Croton lechleri* 0,3 μg/μL vs *Uncaria*

*tomentosa* 0,3 µg/µL y 0,03 µg/µL; *Croton lechleri* 0,03 µg/µL vs *Uncaria tomentosa* 0,3 µg/µL y 0,03 µg/µL y *Uncaria tomentosa* 3 µg/µL vs *Uncaria tomentosa* 0,3 µg/µL y 0,03 µg/µL.

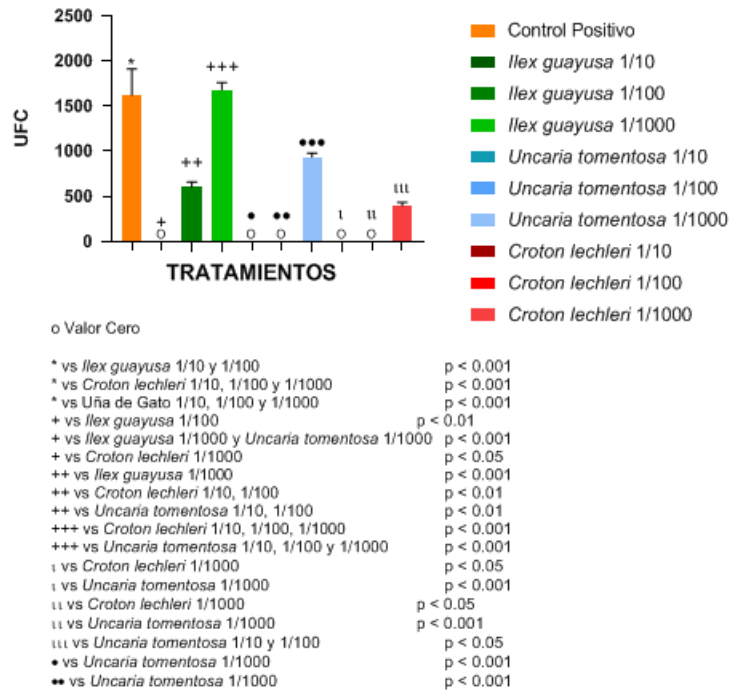
La **Tabla 6** muestra los valores obtenidos en el ensayo Soft Agar, los cuales se muestran como valores de media ( $\bar{x}$ ) y desviación estándar (DS), es importante recalcar que en comparación con el Control Positivo, *Ilex guayusa* 3 µg/µL, *Uncaria tomentosa* 3 µg/µL y 0,3 µg/µL, *Croton lechleri* 3 µg/µL y 0,3 µg/µL obtuvieron un valor de 0 indicando una efectividad del 100%; *Ilex guayusa* 0,3 µg/µL, *Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL y *Croton lechleri* 0,03 µg/µL se observó un efecto anti-metastático pero no al 100% de eficacia; *Ilex guayusa* 0,03 µg/µL presento una baja actividad anti-metastásica.

Se observó que *Ilex guayusa* (3 µg/µL), *Uncaria tomentosa* (3 µg/µL) y *Croton lechleri* (3 µg/µL) en sus más altas concentraciones; *Uncaria tomentosa* (0,3 µg/µL) y *Croton lechleri* (0,3 µg/µL) en sus concentración media; fueron altamente efectivas sobre la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, ejerciendo una actividad anti-metastásica efectiva del 100%.

**Tabla 6**

Valores obtenidos en el ensayo Soft Agar

<b>Tratamiento</b>	$\bar{x}$	<b>DS</b>
Control	1621	291.33
<i>Ilex guayusa</i> 3 µg/µL	0	0
<i>Ilex guayusa</i> 0,3 µg/µL	605	56.569
<i>Ilex guayusa</i> 0,03 µg/µL	1688	80.610
<i>Uncaria tomentosa</i> 3 µg/µL	0	0
<i>Uncaria tomentosa</i> 0,3 µg/µL	0	0
<i>Uncaria tomentosa</i> 0,03 µg/µL	936	36.770
<i>Croton lechleri</i> 3 µg/µL	0	0
<i>Croton lechleri</i> 0,3 µg/µL	0	0
<i>Croton lechleri</i> 0,03 µg/µL	397	46.669



**Gráfico 3.-** Número de UFC encontradas en el ensayo Soft Agar en células control y sometidas a tratamiento con extractos de *Ilex guayusa* (+, ++, +++), *Uncaria tomentosa* (\*, \*\*, \*\*\*) y *Croton lechleri* (l, ll, lll).

\*1/10 (3 µg/µL), 1/100 (0,3 µg/µL), 1/1000 (0,03 µg/µL)

### Análisis e interpretación

Al comparar Control Positivo ( $131 \pm 7.071$ ) con las células tratadas con *Ilex guayusa* 3 µg/µL ( $0 \pm 0$ ), 0,3 µg/µL ( $61.25 \pm 7.805$ ), 0,03 µg/µL ( $110.5 \pm 7.234$ ); *Uncaria tomentosa* 3 µg/µL ( $5 \pm 3.742$ ), 0,3 µg/µL ( $39.75 \pm 3.500$ ), 0,03 µg/µL ( $53.75 \pm 5.560$ ) y *Croton lechleri* 3 µg/µL ( $0 \pm 0$ ), 0,3 µg/µL ( $0 \pm 0$ ), 0,03 µg/µL ( $12.25 \pm 2.630$ ); se obtuvo una diferencia significativa de  $p \leq 0.001$ . Mencionando a los que mayor diferencia significativa dentro del análisis estadístico  $p < 0.001$ ; *Ilex guayusa* 3 µg/µL vs *Ilex guayusa* 0,03 µg/µL y *Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL; *Ilex guayusa* 0,3 µg/µL vs *Ilex guayusa* 0,03 µg/µL; *Ilex guayusa* 0,03 µg/µL vs *Croton lechleri* 3 µg/µL, 0,3 µg/µL, 0,03 µg/µL; *Ilex guayusa* 0,03 µg/µL vs *Uncaria tomentosa* 3 µg/µL, 0,3 µg/µL y 0,03 µg/µL; *Croton lechleri* 3 µg/µL vs *Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL; *Croton lechleri* 0,3 µg/µL vs *Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL; *Uncaria tomentosa* 3 µg/µL vs *Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL y *Uncaria tomentosa* 0,3 µg/µL vs *Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL.

### 3.1.2. Discusión

El Ecuador es un país con una gran biodiversidad en flora y etnias, donde las plantas han sido empleadas desde tiempos inmemorables como tratamiento de diversas enfermedades. El conocimiento ancestral y el uso de plantas en el país se transmiten de manera empírica, de ahí la importancia que se deriven investigaciones que proporcionen un sustento científico de sus efectos (Comunicación personal).

Dentro de los usos y beneficios que se le atribuyen a estas plantas cabe mencionar potencial analgésico, antiinflamatorio, antiemético y coadyuvante en varios tipos de cáncer (35).

Si bien el cáncer constituye un problema de salud a nivel mundial con una distribución heterogénea, existen algunos tipos de cáncer prevalentes en la población femenina como es el caso del cáncer de mama y cérvix (35).

El cáncer de mama ha incrementado su incidencia y niveles de mortalidad en los últimos años; en base a la bibliografía estudiada y partiendo de esos antecedentes se decidió emplear los ensayos y las plantas establecidas para el estudio, tomando en consideración la importancia de la búsqueda de tratamientos alternativos que minimicen los efectos colaterales y/o adversos de la terapia convencional.

Al exponer a las células MCF-7 el extracto de *Ilex guayusa* con la finalidad de encontrar una inhibición en la proliferación, se evidenció que el extracto etanólico de *Ilex guayusa* presenta una actividad anti-proliferativa cuando se comparó las diferentes diluciones con el Control Positivo, siendo la concentración 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  la que mayor efecto presentaron, seguida de 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se identificó una limitante que se expresaba en la concentración 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; lo cual apunta a un potencial uso terapéutico del extracto. En un estudio por Villacís, J. (2017) demostró que en Ecuador se consume ampliamente la guayusa por sus altas concentraciones de cafeína y teobromina, se procesa en infusión y solo se consume como bebida energética, para curar heridas y para la infertilidad (28). En otro estudio Ren-You, G. *et al* (2018) demostraron que *Ilex guayusa* posee polifenoles y derivados de ácido fenólico mono y di-cafeoilquínico, ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y ácido neoclorogénico, y alcaloides como la cafeína y la teobromina. Por lo que se le atribuye actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena (24). El presente

trabajo va de acuerdo a lo expuesto por Villacís, J. (2017), el cual sugiere que el consumo de manera regular de la infusión de *Ilex guayusa*, por su alta cantidad de compuestos antioxidantes, se observó la inhibición de la proliferación de células cancerígenas, se podría obtener un posible tratamiento para cáncer a partir de este compuesto (28).

Al exponer las células MCF-7 a un tratamiento constante de extracto etanólico de *Ilex guayusa* se observó que posee una actividad anti-metastásica en dependencia a la concentración, esto se logró al comparar los valores obtenidos en cada dilución con el Control Positivo, obteniendo una correlación significativa que a mayor concentración del extracto mayor será su capacidad para inhibir células metastásicas; siendo la concentración 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  la que mayor efecto presentaron, se identificó como limitante a 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se observó una nula actividad en 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . La guayusa al presentar gran cantidad del alcaloide cafeína (24), se puede afirmar lo descrito por Lozano, R. *et al* (2007) que las dosis elevadas de cafeína poseen efectos supresores sobre células tumorales metastásicas y que puede combinarse con otros principios activos para mejorar su efecto terapéutico (25).

*Ilex guayusa* podría ser asociada a un tratamiento contra el cáncer gracias a su alta concentración de cafeína y por tal presencia del alcaloide puede ser eficaz sobre células cancerígenas que ya han producido metástasis; y por sus altos niveles de antioxidantes podría ayudar a inhibir la proliferación de células cancerígenas (23)(25). Pero con los resultados obtenidos se le puede atribuir un efecto anti-metastásico y anti-proliferativo sobre la línea celular MCF-7; los efectos mencionados son dependientes a la dosis, mientras mayor sea la concentración del extracto *Ilex guayusa* mayores los efectos mencionados.

La corteza del árbol *Uncaria tomentosa* se utilizó para elaborar nuestro extracto etanólico (36). Los resultados mostraron que el extracto etanólico presenta una actividad anti-proliferativa sobre las células MCF-7, después de comparar los valores obtenidos en cada dilución con el Control Positivo se observó que las concentraciones 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  presentaron un efecto significativamente positivo sin encontrar una limitante en las concentraciones que se usó en el ensayo; lo cual le permite ser considerado como una posible alternativa terapéutica y afirmar lo expuesto por Farias, I. *et al* (2011), donde menciona que

*Uncaria tomentosa* posee la capacidad de causar un efecto positivo sobre las células progenitoras mieloides y ayuda a minimizar los efectos adversos del tratamiento y considerada como una “planta poderosa” (22), por otra parte Garcia, D. *et al* (2010) encontró que es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerígenas debido a su alto contenido de alcaloides (metxalinina) (23); y en otro estudio Santos, M. *et al* menciona que se utilizaron *Uncaria tomentosa* como tratamiento adyuvante en personas que han recibido quimioterapia ayudando a minimizar favorablemente los efectos colaterales que se producen (18).

Los resultados obtenidos mostraron que el extracto etanólico de *Uncaria tomentosa* presenta una gran actividad anti-metastásica sobre la línea celular MCF-7, después de comparar los valores obtenidos en cada dilución con el Control Positivo, se observó que las concentraciones 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  presentaron un efecto absoluto y su limitante es 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; lo cual le permite ser considerado como una posible alternativa terapéutica. En un estudio realizado por Azevedo, B. *et al* (2019) demuestran por primera vez que el extracto acuoso de *Uncaria tomentosa* tiene un efecto antioxidante independiente de la cantidad de alcaloides (37). En otro estudio Lozada, I. *et al* (2015) menciona que la presencia de alcaloides oxindólicos pentacíclicos en el extracto hidralcohólico de *Uncaria tomentosa* interfiere positivamente sobre el sistema inmunitario y con la ayuda de un ensayo *in vivo* observó que al incrementar la concentración de TNF- $\alpha$  puede incrementar el número de linfocitos CD4 o a activar a macrófagos M1 y que la disminución de IL-17A favorece directamente al funcionamiento de linfocitos CD8a; proponiendo así que estas causas inciden en la ausencia de metástasis en las ratas que presentaban melanomas (38).

Después de la experimentación *Uncaria tomentosa* presento resultados relevantes para el ensayo Soft Agar, atribuyéndole un efecto anti-metastásico sobre la línea celular MCF-7; los resultados para el análisis clonogénico dependiente a la adherencia de la superficie fueron favorables por lo que el efecto anti-proliferativo es atribuido a *Uncaria tomentosa*, pero para obtener una efectividad del 100 % se debería emplear una concentración más alta.

Para el estudio de *Croton lechleri* se utilizó la savia de color rojo intenso que exuda del árbol al recortar su corteza, conocido en la medicina ancestral y por sus

usos empírico contra el cáncer. En nuestra investigación se observó un efecto de inhibición celular favorable de *Croton lechleri* sobre las células MCF-7, cuando se comparó los resultados obtenidos con un Control Positivo, se observó que en la concentración 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  existe un efecto del 100%, y en 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  el efecto que se obtuvo es muy favorable. En un estudio realizado por Escobar, J. *et al* (2018) nos menciona que la alta bioactividad del extracto *Croton lechleri* se debe a las elevadas concentraciones de proantocianidinas, taspina, catequina, epigalocatequina, epicatequina y un pequeño porcentaje de compuestos de terpeno (39). En un estudio realizado por Rossi, D. *et al* (2003) demostró que tiene efecto anti-proliferativo dependiente de la dosis a la que sean expuestas las células cancerígenas (20). La presente investigación va de acuerdo a lo expuesto por Montopoli, M. *et al* (2012) que *Croton lechleri* y tapsina son capaces de inhibir la proliferación de las células de melanoma SK23 y HT29 de cáncer de colon y afirmando el uso empírico en la medicina ancestral como un posible agente anticancerígeno (19).

*Croton lechleri* al ser considerada como una planta con muchos efectos terapéuticos en la medicina ancestral y sobre todo como un tratamiento empírico contra el cáncer. Al obtener los resultados significativamente positivos al compararlos con el Control se observó que en la concentración 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  existe un efecto del 100%, y en 0.03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  el efecto que se obtuvo es muy favorable; podemos atribuirle una gran y eficiente actividad anti-metastásica. Así mismo, al revisar la bibliografía y observar el amplio campo estudio que se está desarrollando con *Croton lechleri* vale mencionar el estudio realizado por Alonso, A. *et al* donde demuestra que *Croton lechleri* tiene efectos tóxicos sobre células HeLa de cáncer de cérvix y efectos antitumorales in vivo en ratones portadores de tumor HeLa (17).

Los resultados que presento *Croton lechleri*, son muy favorables para la investigación y de gran interés científico para futuras investigación de una alteración terapéutica contra cáncer de mama en base *Croton lechleri*; atribuyéndole así los efectos anti-metastásico y anti-proliferativo con una amplia efectividad sobre la línea celular MCF-7.



## **3.2. Hipótesis**

### **3.2.1. Hipótesis nula**

Los extractos *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* no presentan actividad anti-proliferativa y anti-metastásica en la línea celular MCF-7.

### **3.2.2. Hipótesis alternativa**

Uno de los extractos *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* presentan actividad anti-proliferativa y anti-metastásica en la línea celular MCF-7.

### **3.2.3. Verificación de hipótesis**

Luego de haber analizado los resultados obtenidos en cada ensayo desarrollado, se rechazó la hipótesis nula y se afirmó la hipótesis alternativa donde los extractos *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* presentaron efectos anti-proliferativo y anti-metastásico en la línea celular MCF-7.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

- Para la elaboración de los extractos etanólico se presentaron diferentes pasos a seguir, siendo el primero la obtención del permiso de los propietarios de las áreas donde iban a ser recolectadas las especies vegetales, seguido por los permisos del MAE para posteriormente para posteriormente recolectar el material vegetal; para finalmente seguir un protocolo y obtener como resultado final el extracto etanólico, y utilizarlo en los ensayos de la investigación.
- Los extractos de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* presentaron un efecto inhibitor de proliferación celular sobre células MCF-7, siendo *Croton lechleri* el extracto que presento mayor efecto en comparación con el Control y los extractos *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa*. Concluyendo que los extractos poseen una actividad anti-proliferativa pero siendo *Croton lechleri* el que presento un efecto más eficiente.
- Al exponer las células MCF-7 a los extractos de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*, posteriormente comparándolos con un Control; nos permite concluir que *Ilex guayusa* presenta un efecto en relación a la concentración del extracto, mientras mayor sea la cantidad del extracto en la dilución mayor será su efecto; *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* presentaron un efecto muy favorable sobre la línea celular MCF-7 y lo que permite atribuirles la actividad anti-metastásica.

#### 4.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar estudios para determinar el compuesto químico que provoca la actividad anti-metastásica en *Croton lechleri* sobre células MCF-7.
- Realizar investigaciones in vivo con los extractos *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*, para corroborar las actividades anti-proliferativas y anti-metastásicas, y poder establecerlos como una alternativa terapéutica.

- Realizar una investigación donde se conjuguen plantas de las Regiones Andinas y Amazónicas, para descubrir nuevas vías para futuros medicamentos no invasivos contra el cáncer.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### BIBLIOGRAFÍA.

1. Azevedo BC, Roxo M, Borges MC, Peixoto H, Crevelin EJ, Bertoni BW, et al. Antioxidant Activity of an Aqueous Leaf Extract from. (37)
2. Beltran N. Técnicas de cultivos celulares e. 2016. 86 p. (31)
3. Carrero Y, Dávila M, Moya J, Núñez I, Acosta M, Aranda C. Zanahoria blanca ( Arracacia xanthorrhiza bancr ) potencial fitofármaco : mini revisión. Invest Clin. 2018;59(July):109–11. (35)
4. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. Anticancer Res. 2015;35(6):3147–54. (33)
5. Escobar JD, Prieto C, Pardo-Figuerez M, Lagaron JM. Dragon’s blood sap: Storage stability and antioxidant activity. Molecules. 2018;23(10). (39)
6. Gan RY, Zhang D, Wang M, Corke H. Health Benefits of Bioactive Compounds from the Genus Ilex, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. Nutrients. 2018;10(11). (24)
7. García Giménez D, García Prado E, Sáenz Rodríguez T, Fernández Arche A, De La Puerta R. Cytotoxic effect of the pentacyclic oxindole alkaloid mitraphylline isolated from uncaria tomentosa bark on human ewing’s sarcoma and breast cancer cell lines. Planta Med. 2010;76(2):133–6. (23)
8. Gonzales GF, Valerio LG. Medicinal Plants from Peru : A Review of Plants as Potential Agents Against Cancer. 2006;429–44. (16)
9. Lozada-Requena I, Núñez C, Álvarez Y, Kahn L, Aguilar J. Poblaciones linfocitarias, células dendríticas y perfil de citoquinas en ratones con melanoma tratados con Uncaria tomentosa. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015;32(4):633. (38)
10. Lozano RP, García YA, Tafalla DB, Farré Albaladejo M. Cafeína: Un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. Adicciones. 2007;19(3):225–38. (25)
11. Parra G. Estandarización del ensayo clonogénico en el centro de biología celular y molecular utilizando como control positivo de citotoxicidad

- Doxorrubicina, en las líneas celulares tumorales MCF-7 y SK-LU-1 [Internet]. Vol. 2. Universidad Técnica Particular de Loja; 2009. (34)
12. Pilarski R, Filip B, Wietrzyk J, Kura M, Gulewicz K. Phytomedicine Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* ( Willd .) DC . preparations with different oxindole alkaloid composition. 2010;17:1133–9. (21)
  13. Rossi D, Bruni R, Bianchi N, Chiarabelli C, Gambari R, Medici A, et al. Evaluation of the mutagenic , antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* ( Muell . Arg .) latex. 2003;139–44. (20)
  14. Santos M, Farias IL, Gutierrez J, Santos C, Dalmora SL, Farias J, et al. *Uncaria tomentosa* — Adjuvant Treatment for Breast Cancer : Clinical Trial. 2012;2012. (18)
  15. Snow AD, Castillo GM, Nguyen BP, Choi PY, Cummings JA, Cam J, et al. The Amazon rain forest plant *Uncaria tomentosa* (cat’s claw) and its specific proanthocyanidin constituents are potent inhibitors and reducers of both brain plaques and tangles. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–28. (36)
  16. Zaharia M. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública en*. 2013;30(1):7–8. (4)

## LINKOGRAFÍA.

1. Acs. Cáncer avanzado, cáncer metastásico y metástasis en los huesos [Internet]. 2016. Available from: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/cancer-avanzado/que-es.html> (11)
2. ACS. Types of breast cancer [Internet]. 2017. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html> (8)
3. Alonso-castro AJ, Ortiz-sánchez E, Domínguez F, López-toledo G, Chávez M, Ortiz-tello ADJ, et al. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull . Arg . ( Euphorbiaceae ). *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012;140(2):438–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.009> (17)
4. ASCO. Tipos de tratamiento en cáncer de mama [Internet]. 2015. Available

- from: <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/types-treatment> (13)
5. BreastCancer. Estadios del Cáncer [Internet]. 2015. Available from: <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estadios> (9)
  6. Bustos P. Actividad citotóxica de extractos de *Uncaria tomentosa* y *Mansoa alliacea* en líneas celulares de cáncer de mama [Internet]. Universidad Técnica de Ambato; 2018. Available from: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/28581> (29)
  7. Cancer IN del. Cáncer Metastático [Internet]. 2016. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cancer-metastatico> (12)
  8. Cancer IN del. Mutaciones en BRCA: Riesgo de cáncer y pruebas genéticas [Internet]. 2018. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica/hoja-informativa-brca> (14)
  9. Canseco M. 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* [Internet]. Universidad Técnica de Ambato; 2019. Available from: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/30428> (30)
  10. Farias I, Do Carmo Araújo M, Zimmermann ES, Dalmora SL, Benedetti AL, Alvarez-Silva M, et al. *Uncaria tomentosa* stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011;137(1):856–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.011> (22)
  11. Gandur Natalia. Manual de Enfermería Oncológica. 2014; Available from: [http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000011cnt-08-manual-enfermeria\\_08-03.pdf](http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000011cnt-08-manual-enfermeria_08-03.pdf) (1)
  12. José Villacís-Chiriboga. Etnobotánica y sistemas tradicionales de salud en Ecuador. Enfoque en la guayusa (*Ilex guayusa Loes*). *Etnobiología* [Internet]. 2017;15(3):101. Available from: <http://asociacionetnobiologica.org.mx/revista/index.php/etno/article/view/217/213> (28)
  13. Montopoli M, Bertin R, Chen Z, Bolcato J, Caparrotta L, Foldi G. *Croton lechleri* sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *J Ethnopharmacol*

- [Internet]. 2012;144(3):747–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.032> (19)
14. MSP. Incidencia del cáncer de mama en el Ecuador [Internet]. 2018. Available from: <https://www.salud.gob.ec/cifras-de-ecuador-cancer-de-mama/> (6)
  15. Salud OM de la. Cáncer [Internet]. 2017. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (3)
  16. SaludSA. Cáncer en el Ecuador [Internet]. 2016. Available from: <https://www.saludsapersonas.com/vivesaludtotal/index.php/cancer/el-cancer-en-el-ecuador/423-el-cancer-en-el-ecuador> (7)
  17. School HM. Cancer Overview [Internet]. 2018. Available from: [https://www.health.harvard.edu/a\\_to\\_z/cancer-overview-a-to-z](https://www.health.harvard.edu/a_to_z/cancer-overview-a-to-z) (2)
  18. Solca. Diagnóstico Oportuno Cáncer de Mama [Internet]. 2018. Available from: <https://www.solca.med.ec/informacion-al-paciente/prevencion-de-cancer/diagnostico-oportuno-cancer-de-mama/> (10)
  19. Valiathan C, McFaline JL, Samson LD. A rapid survival assay to measure drug-induced cytotoxicity and cell cycle effects. DNA Repair (Amst) [Internet]. 2012;11(1):92–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.11.002> (32)
  20. Zarei O, Mehdi M. Cytotoxic effects of Fritillaria imperialis L . extracts on human liver cancer cells , breast cancer cells and fibroblast-like cells. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017;94:598–604. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.127> (26)

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS - BASE DE DATOS UTA.

1. **PROQUEST.** Stuart BH. [Internet]. 2004. p. 244. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliocauladechsp/reader.action?docID=3216667&query=metodolog%25C3%25ADa%2Bde%2Bla%2Binvestigaci%25C3%25B3n%2B> (5)
2. **SPRINGER.** Cristina López-Jato CL, Gómez C, Pérez E, Vázquez L, Lázaro M, Castellanos J. Metástasis hipotálamo-hipofisaria en paciente con cáncer de

mama. Revista oncológica. 2004

3. **SPRINGER.** Enrique D, Martínez N, García A, Giménez J, Vázquez C. Factores pronósticos del cáncer de mama. Modelo predictivo. Revista de oncología. 2004
4. **SPRINGER.** García AR, Fernández AO, Sáez RS, Martín G, González-Sarmiento R, Hernández JJC. Metástasis ovárica de cáncer de mama en mujer portadora de mutación en BRCA1. Clin Transl Oncol. 2004. (15)
5. **SPRINGER.** Martínez P, Navarro MA. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. Revista Oncológica. 2003



## ANEXOS

### ANEXO 1. Resolución del proyecto de investigación “Actividad Antimicrobiana y Estudio de Toxicidad In Vitro de Extractos de Plantas Medicinales” RESOLUCIÓN: 0249-CU-P-2017



#### Universidad Técnica de Ambato Consejo Universitario

Av. Colombia 02-11 y Chile (Cdda. 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

JURADO

Ab. MSc. José Romo Santana  
SECRETARIO GENERAL



## ANEXO 2. Resolución y aprobación del tema de investigación, resolución CD-P-2019-1423



### CONSEJO DIRECTIVO

FCS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DE LA SALUD

Ambato, 22 de Abril de 2019  
Resolución CD-P-2019-1423

Señor  
**Cortez Pinto Juan Carlos**  
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 22 de Abril de 2019, en conocimiento del acuerdo UTA-UAT-FCS-2019-0247-A, suscrito por el Dr. Esp. Jesús Chicuirza Tayupanta, Presidente de la Unidad de Titulación, sugiriendo se apruebe la **PROPUESTA DE TRABAJO DE TITULACIÓN** del/la estudiante **CORTEZ PINTO JUAN CARLOS** de la carrera de Laboratorio clínico, al respecto.

CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:

- APROBAR A LA SEÑORITA CORTEZ PINTO JUAN CARLOS, ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO, CON EL TEMA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN "ACTIVIDAD ANTI-METASTÁSICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS Hex guayusa, Uncaria tomentosa y Croton tchleri, EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA ", PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADO/A EN LABORATORIO CLÍNICO.
- DESIGNAR COMO TUTOR DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN, AL DOCTOR PHD. BUSTILLOS ORTIZ ALCIDES ALBERTO, 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 EN 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, INCISO TERCERO Y CUARTO DEL REGLAMENTO DE RÉGIMEN ACADÉMICO.

Atentamente,

  
Dr. Marcelo Ochoa Egas  
Presidente



Anexo  
c.c.

acuerdo UTA-UAT-FCS-2019-0247-A (DOCUMENTACIÓN CORRESPONDIENTE)  
CARPETA ESTUDIANTE  
DOCTOR PHD. BUSTILLOS ORTIZ ALCIDES ALBERTO, (TUTORA)



UNIVERSIDAD  
TÉCNICA DE AMBATO

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

www.uta.edu.ec

### ANEXO 3. 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 Gudiño	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.

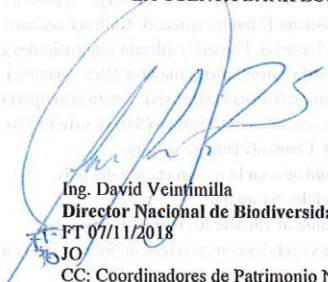
Complementos autorizados para llevar a cabo la Investigación en campo.

10. Recolecciones de las plantas medicinales se realizarán en senderos vecinos de los cantones de Pillaro, 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 INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
  35. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
  36. 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 ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA. Y DEMAS NORMATIVA PERTINENTE.
  37. 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.
  38. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA BANK ECUADOR 0010000785, CÓDIGO SUB LÍNEA 190499





Ing. David Veinimilla  
Director Nacional de Biodiversidad (Encargado).  
FT 07/11/2018

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 4. 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-2019-008**

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:

Sr. Juan Carlos Cortez Pinto. Con C.C: 180443629-1.

- Para que lleven a cabo el proyecto de investigación "**ACTIVIDAD ANTI-METASTÁSICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS EXTRATOS DE PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*. EN LA LINEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA**"

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

- 1.- **Solicitud del ingresada por el Sr. Juan Carlos Cortez Pinto. Con C.C: 180443629-1.**
- 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:**

- a) Entregar tres (3) copias de formato impreso y digital (formato PDF) de los resultados finales del investigador en idioma castellano.
- b) Entregar copias de las fotografías (impreso y digital) y/o video que formen parte de la investigación en el trabajo final.
- c) 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:**

- a) Cumplir con los plazos de entrega de informes finales o parciales.
- b) Informar a las dependencias correspondientes del Ministerio del Ambiente sobre irregularidades cometidas por el investigador.

DIRECCION PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA  
Dirección: Av. Bolívar y Av. Ciudad Nueva  
Pastor - Ecuador  
Código Postal: 080100  
Teléfono: (08) 3 2884000 - 32884070  
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: Sr. Juan Carlos Cortez Pinto. Con C.C: 180443629-1

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 Ivar Guerrero Naranjo

DIRECTOR PROVINCIAL DEL  
AMBIENTE DE PASTAZA



**ANEXO 5. Guía de movilización de extractos de plantas emitido por el Ministerio del Ambiente del Ecuador**



**GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE**  
**Nro. DPAP-UPN-VC-2019-041**

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 Sr. Juan Carlos Cortez Pinto. 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	
JC001	<i>Ilex guayusa</i>	Tarqui	100 hojas	X -1.509928	Y -78.010016
JC002	<i>Croton lechleri</i>	Tarqui	100ml		
JC003	<i>Uncaria tomentosa</i>	Tarqui	500g		

Observaciones:

Las muestras biológicas serán movilizadas en:

Responsable de la movilización: Sr. Juan Carlos Cortez Pinto con C.C. 180443629-1

Vehículo:

Placas: TGB-2627. Color: Rojo.

Los especímenes van en calidad de:

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

“ACTIVIDAD ANTI-MATASTASICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS EXTRATOS DE PLANTAS. *Ilex guayusa*, *Uncaria Tomentosa*, y *Croton lechleri* EN LA LINEA CELULAR MCF7 DE CANCER DE MAMA.”

Blgo. Víctor Curicama  
 Responsable de Biodiversidad  
 C.I. 1719099028



Sr. Juan Carlos Cortez  
 Responsable de la movilización  
 C.C. 180443629-1

## ANEXO 6. Consentimiento de recolección de material vegetal



### 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

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

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](mailto:me.gudino@uta.edu.ec)





## 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


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


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](mailto:me.gudino@uta.edu.ec)

**ANEXO 7. 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. 05-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 Dr. Alberto Bustillos Investigador del Proyecto “Actividad antimetaxica y antiproliferativa de los extractos de plantas *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Crototn lechleri* en la línea celular MVF 7 de cáncer de mama”. Realiza la entrega a través de su estudiante Sr. Juan Carlos Cortez Pinto integrante de su grupo de investigación de un duplicado de las siguientes colecciones botánicas: *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Crototn 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,

Ph.D. José Homero Vargas López  
CURADOR HERBARIO (AMAS)



**ANEXO 8. 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**  
CAMPUS QUEROCHACA

---

**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 el señor Juan Carlos Cortez Pinto portador de la cédula de identidad 1804436291, 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: **“ACTIVIDAD ANTIMESTASTÁSICA Y ANTIPROLIFERATIVA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri* EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA”** 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 12 de noviembre 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, 12 de noviembre de 2019

Atentamente;

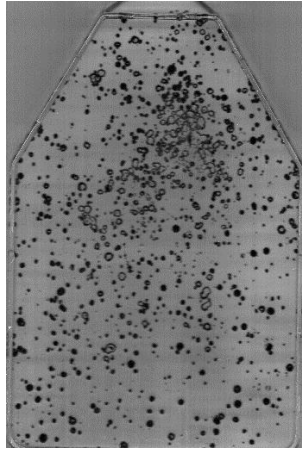
Ing. Diana González Palacios



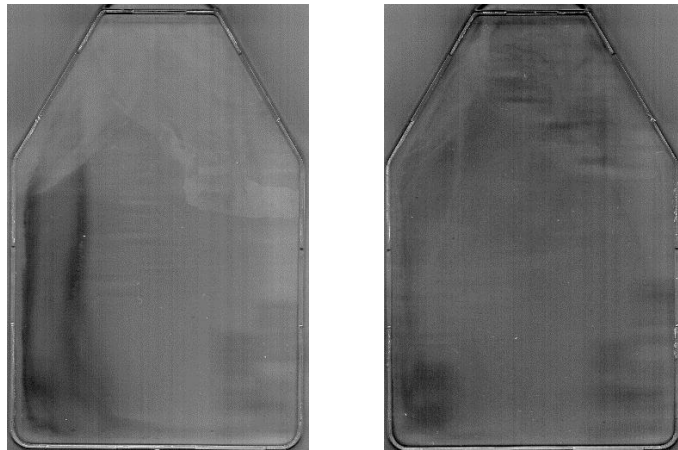
## ANEXO 9. ESCANEADO DE FRASCAS Y PLACAS

- **Análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie**  
Cada punto observado en las imágenes representa a una colonia de células MCF-7

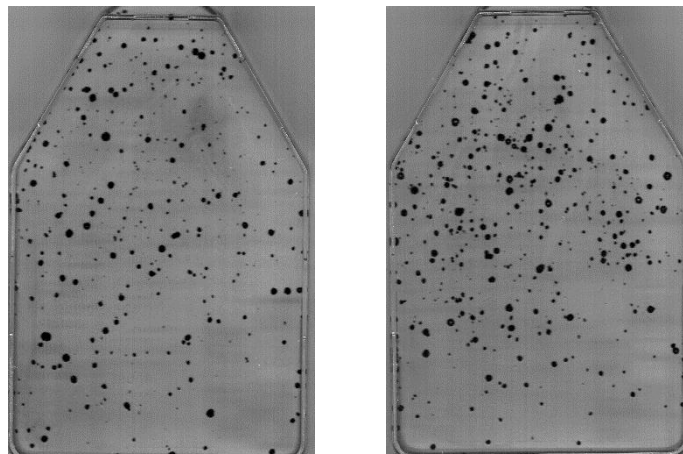
### Control Positivo



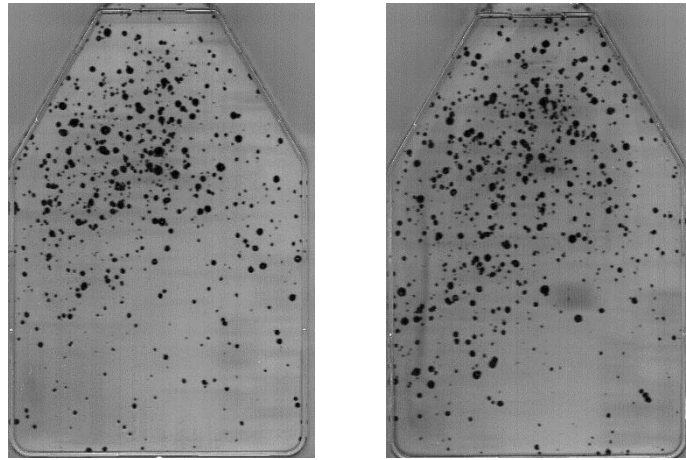
### *Ilex guayusa* 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$



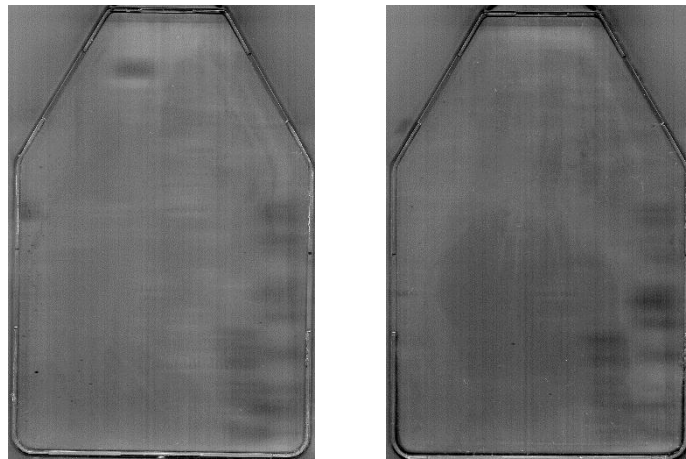
### *Ilex guayusa* 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$



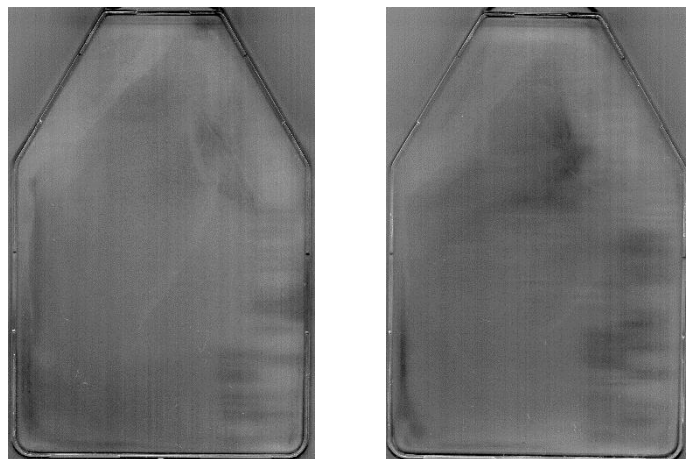
*Ilex guayusa* 0,03 µg/µL



*Croton lechleri* 3 µg/µL

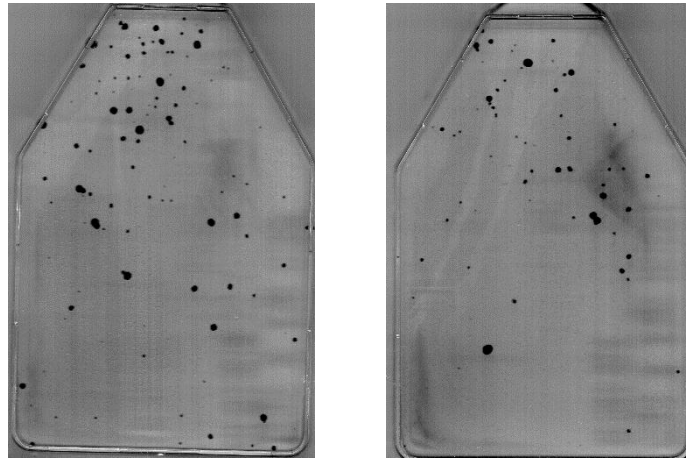


*Croton lechleri* 0,3 µg/µL

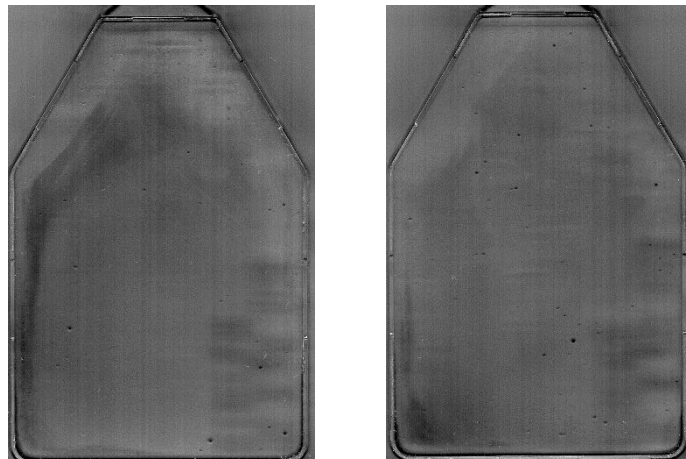




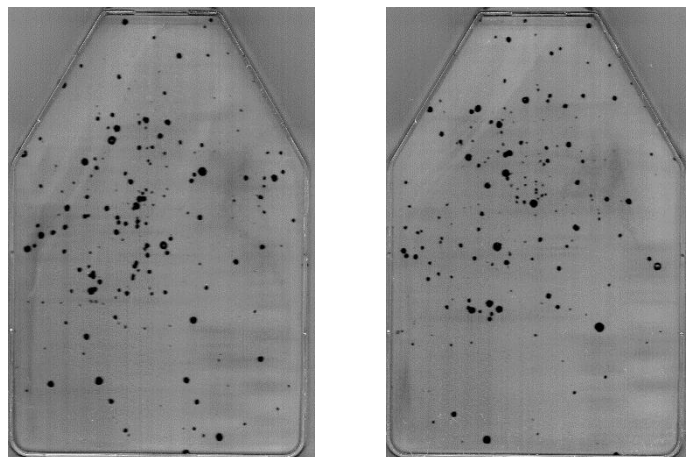
*Croton lechleri* 0,03 µg/µL



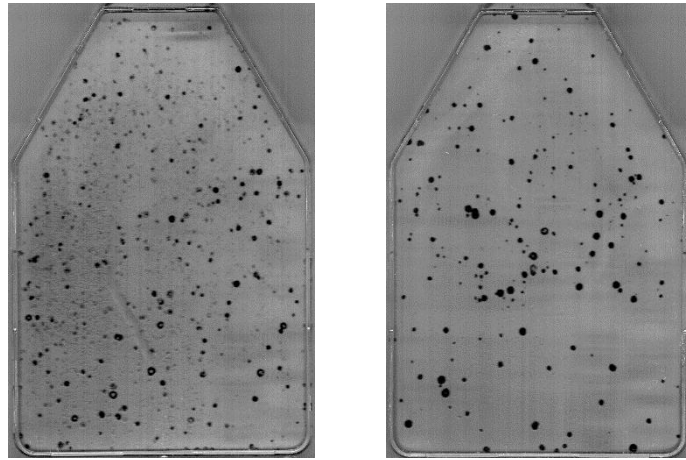
*Uncaria tomentosa* 3 µg/µL



*Uncaria tomentosa* 0,3 µg/µL

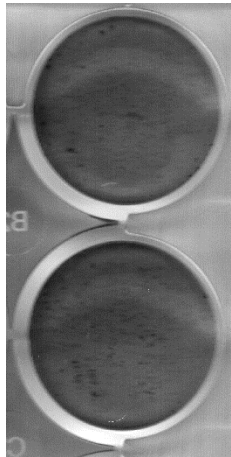


*Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL

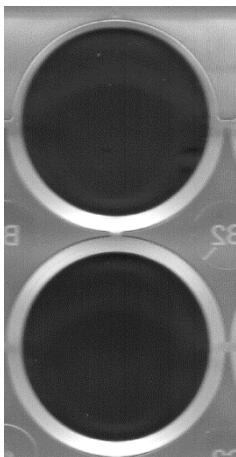


- Soft Agar

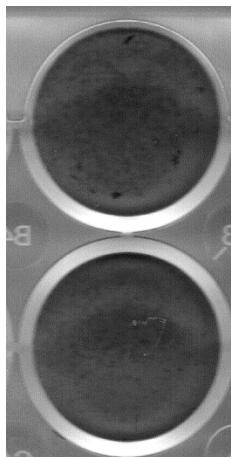
**Control Positivo**



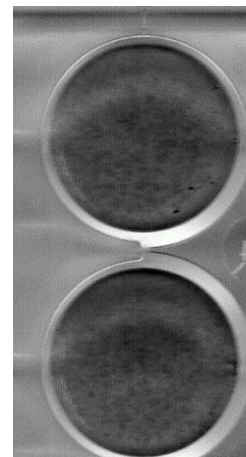
*Ilex guayusa* 3 µg/µL



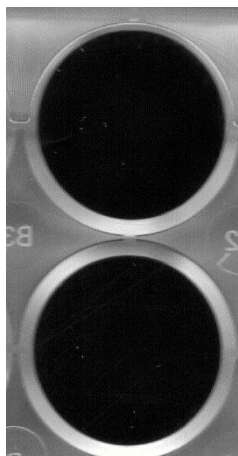
*Ilex guayusa* 0,3 µg/µL



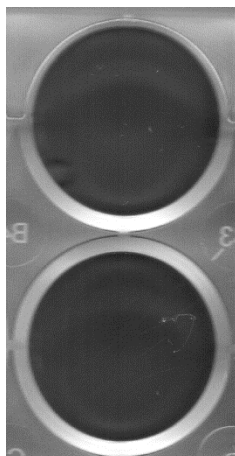
*Ilex guayusa* 0,03 µg/µL



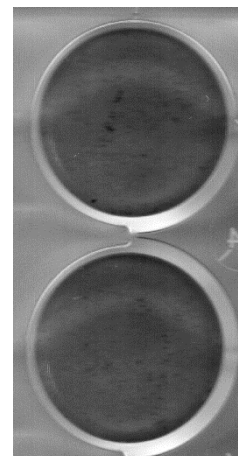
*Croton lechleri* 3 µg/µL



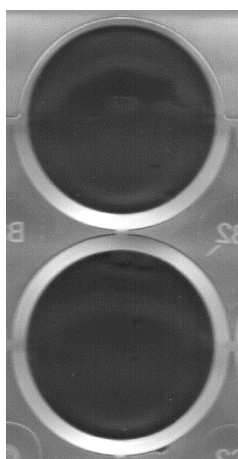
*Croton lechleri* 0,3 µg/µL



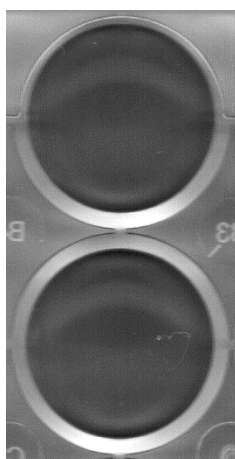
*Croton lechleri* 0,03 µg/µL



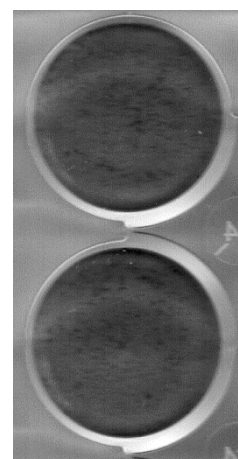
*Uncaria tomentosa* 3 µg/µL



*Uncaria tomentosa* 0,3 µg/µL



*Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL

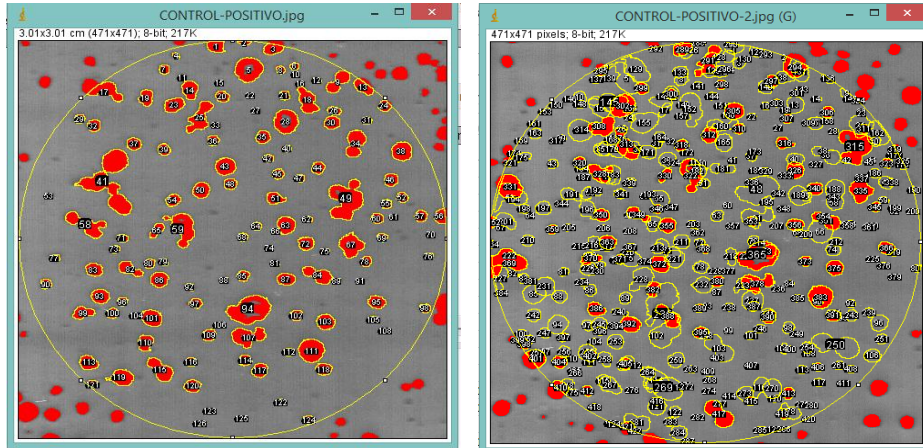




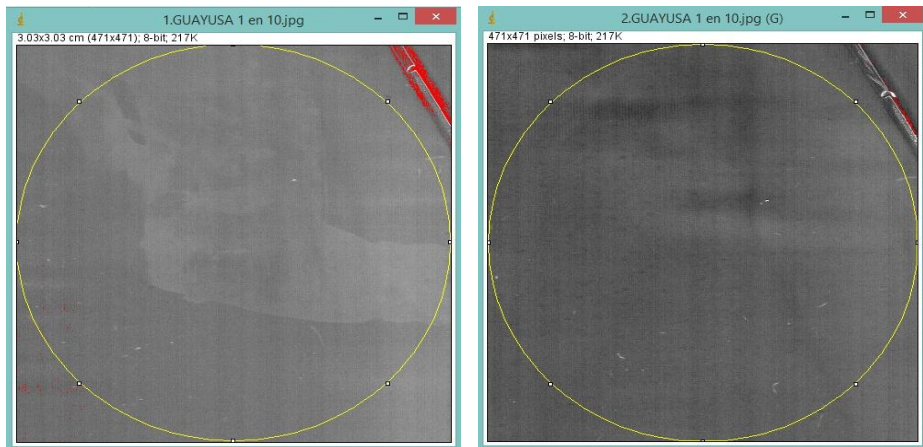
## ANEXO 10. Cuantificación de colonias con ImageJ versión 1.52a

- **Análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie**  
Cada punto representa a una colonia de células MCF-7

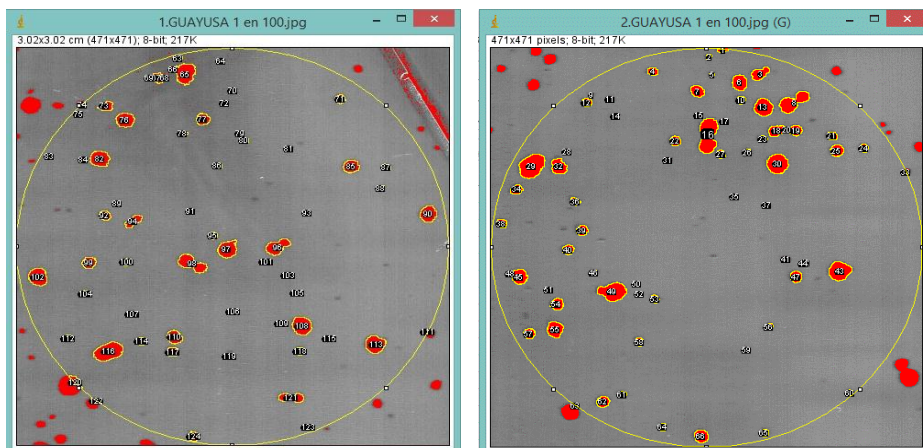
### Control Positivo



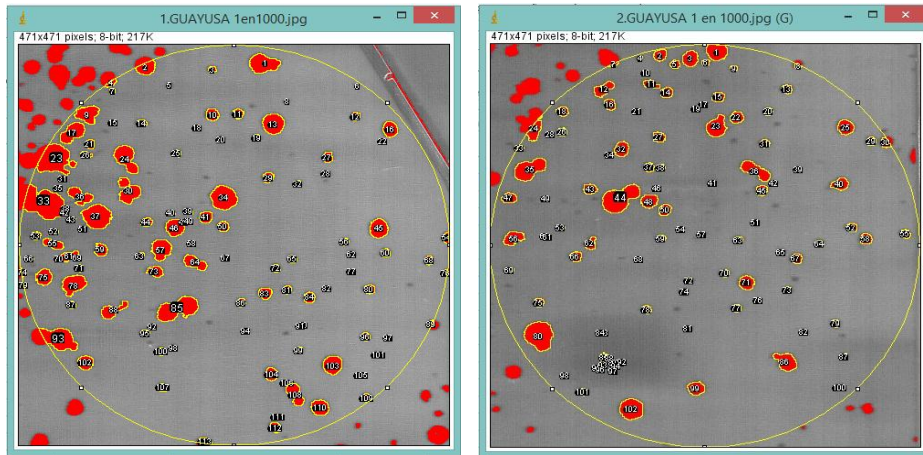
### *Ilex guayusa* 3 µg/µL



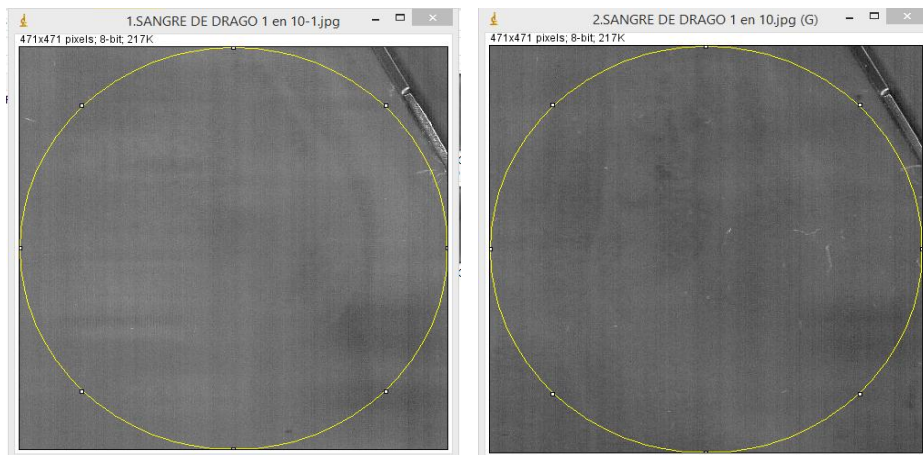
### *Ilex guayusa* 0,3 µg/µL



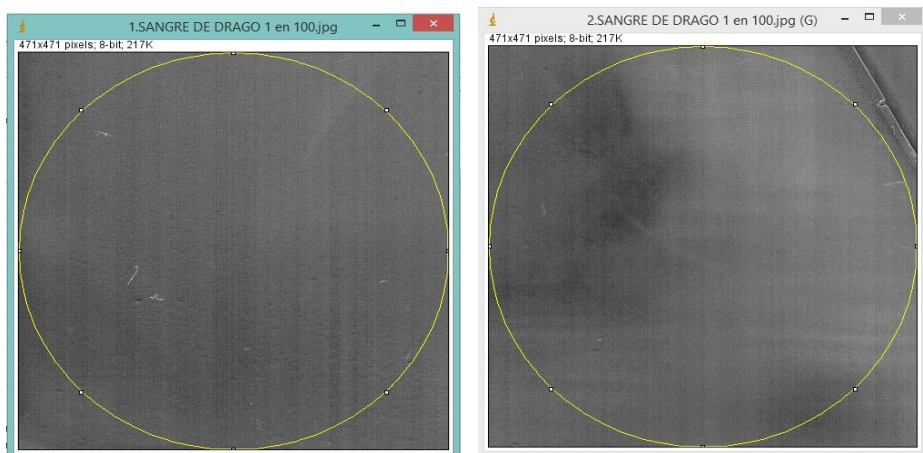
*Ilex guayusa* 0,03 µg/µL



*Croton lechleri* 3 µg/µL

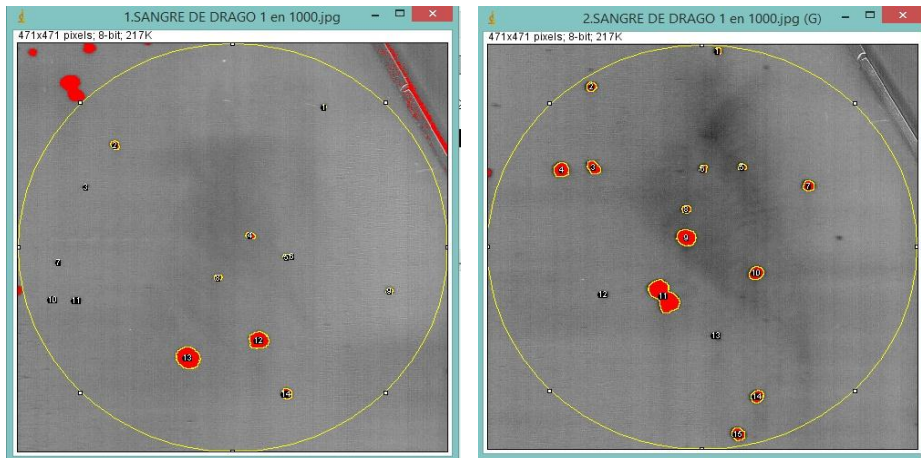


*Croton lechleri* 0,3 µg/µL

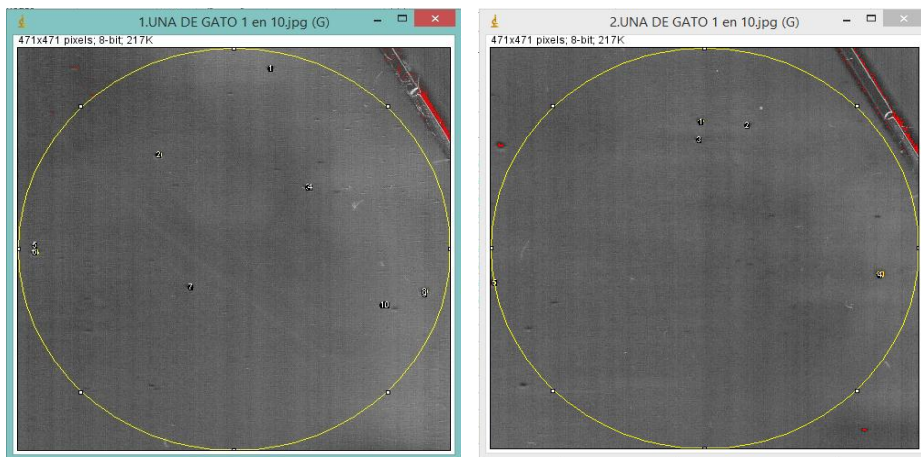




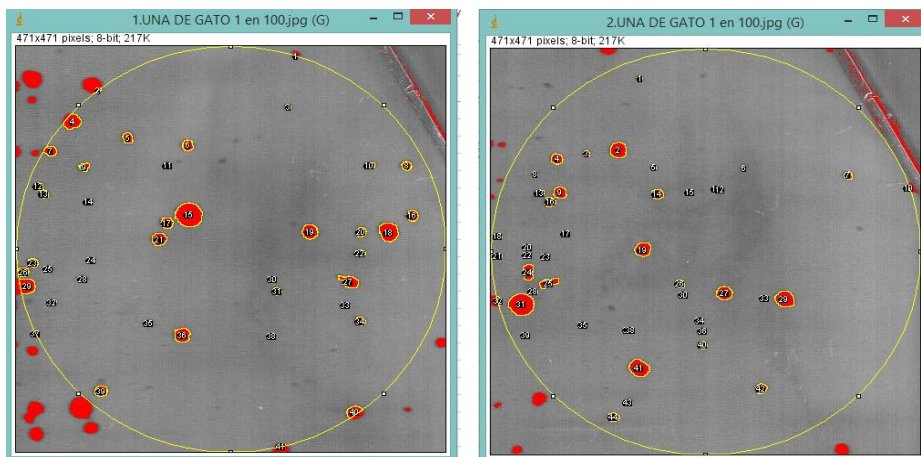
*Croton lechleri* 0,03 µg/µL



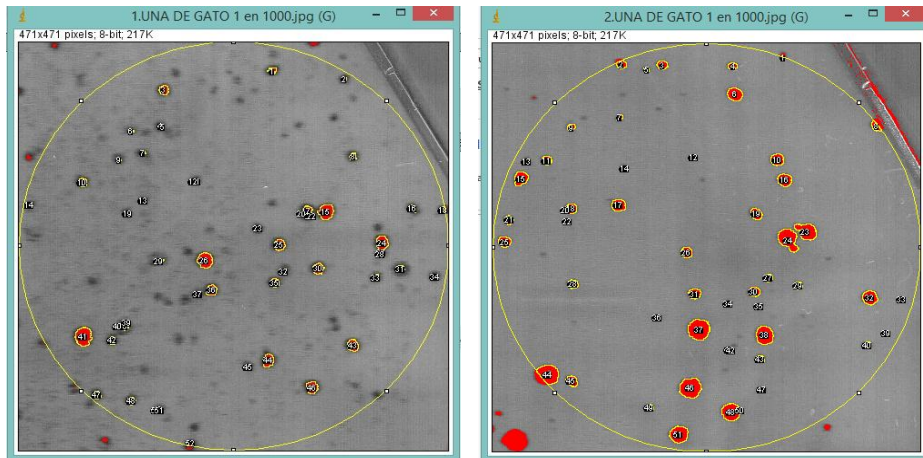
*Uncaria tomentosa* 3 µg/µL



*Uncaria tomentosa* 0,3 µg/µL

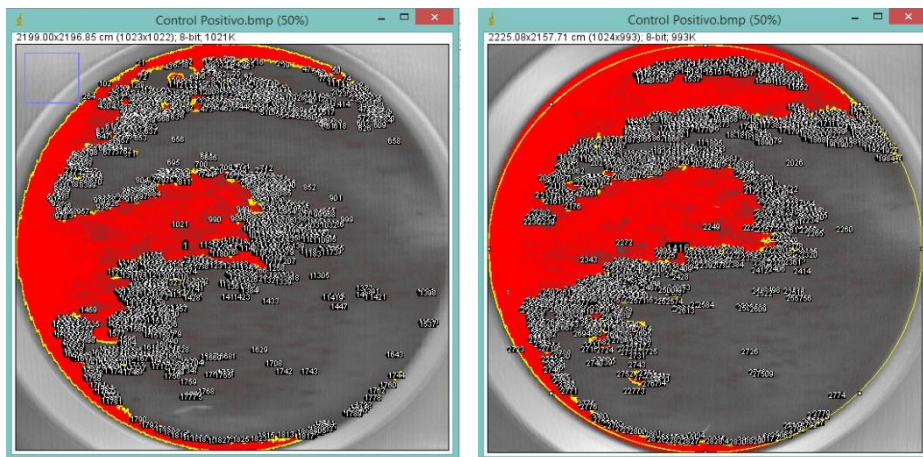


*Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL

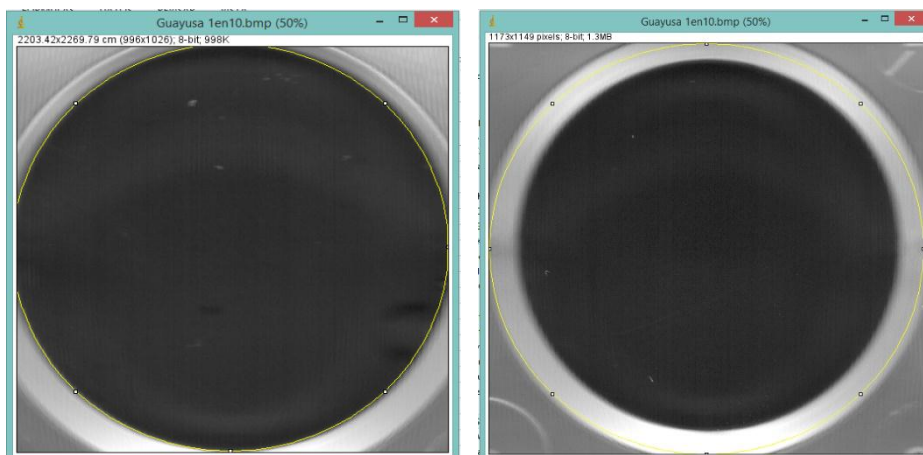


- Soft Agar

**Control Positivo**

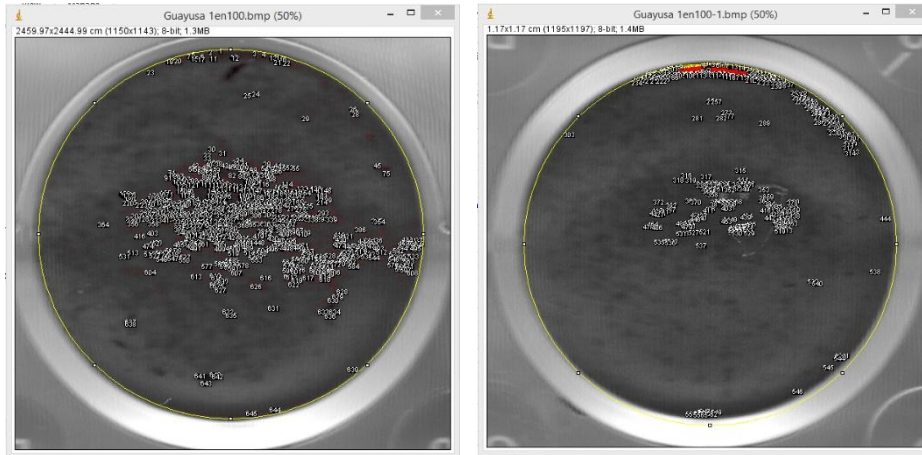


*Ilex guayusa* 3 µg/µL

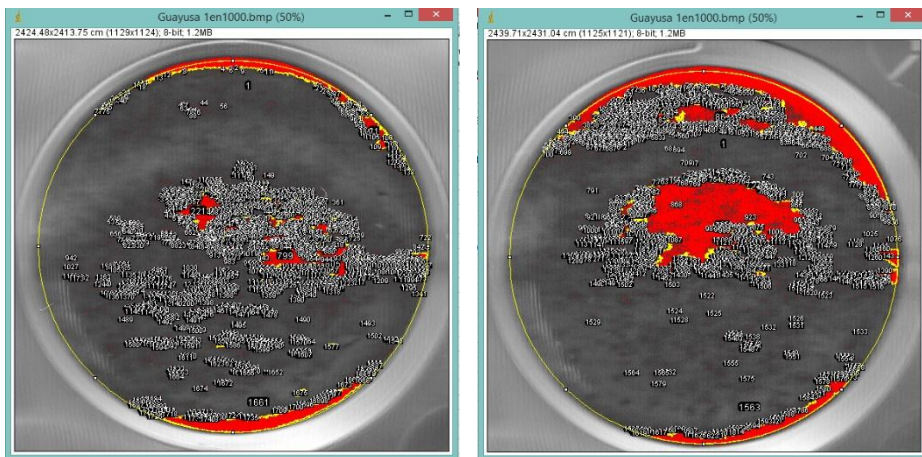




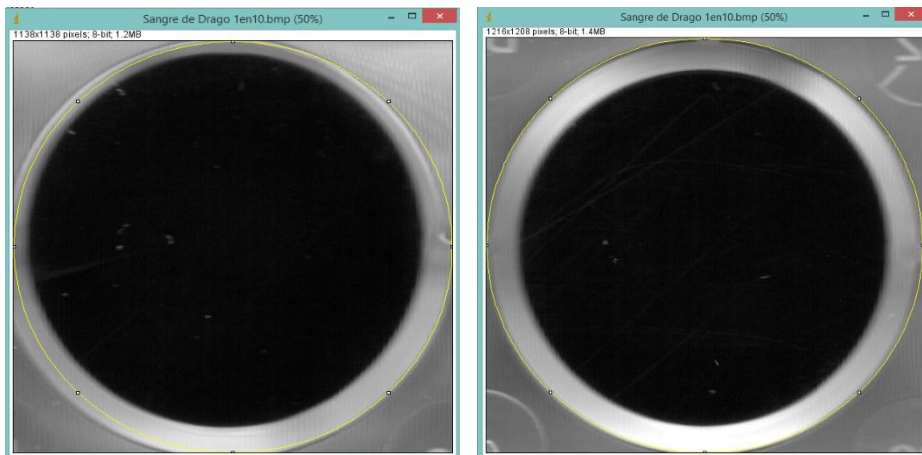
*Ilex guayusa* 0,3 µg/µL



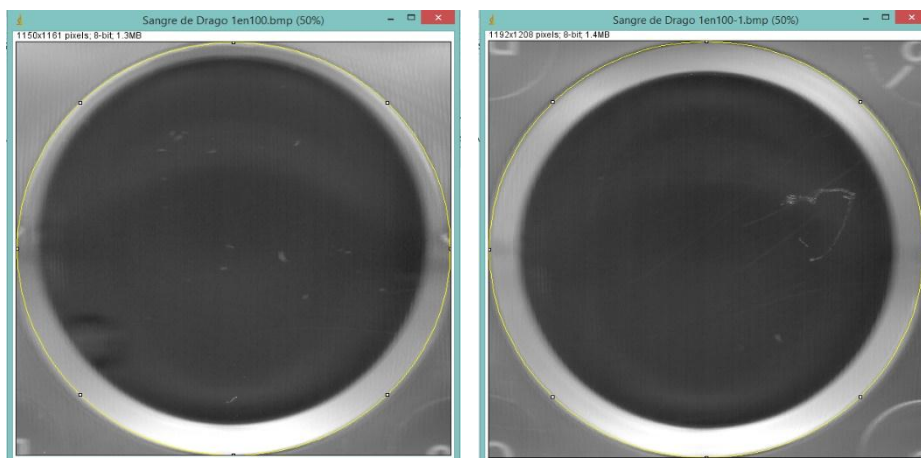
*Ilex guayusa* 0,03 µg/µL



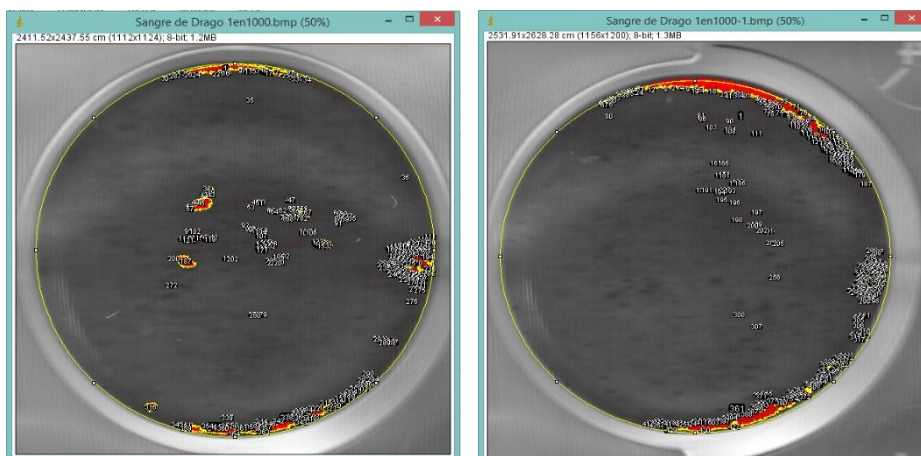
*Croton lechleri* 3 µg/µL



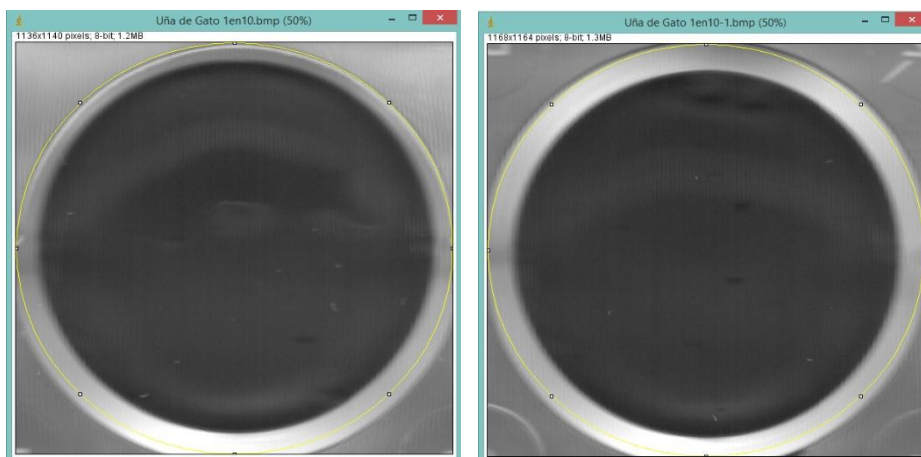
*Croton lechleri* 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$



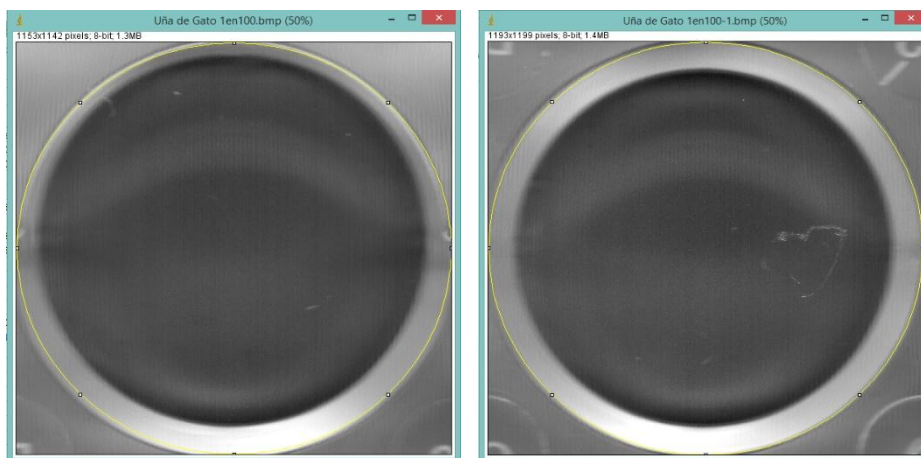
*Croton lechleri* 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$



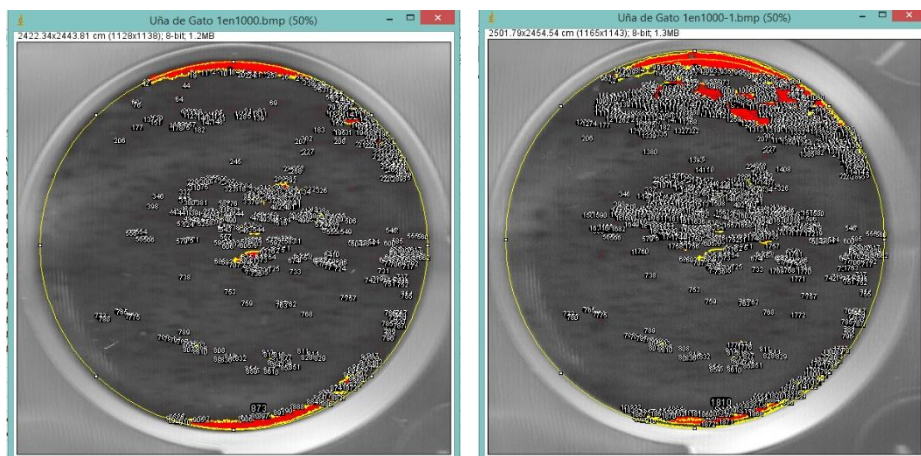
*Uncaria tomentosa* 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$



*Uncaria tomentosa* 0,3 µg/µL



*Uncaria tomentosa* 0,03 µg/µL





## ANEXO 11. Fotografías

### Recolección del material vegetal



*Uncaria tomentosa*



*Croton lechleri*



*Ilex guayusa*

### Lavado del material vegetal



### Desecación



### Maceración en etanol 96%





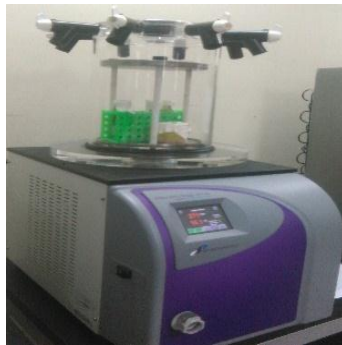
### Filtrado al vacío



### Destilación y concentración de los extractos



### Liofilización de los extractos



### Preparación de los extractos

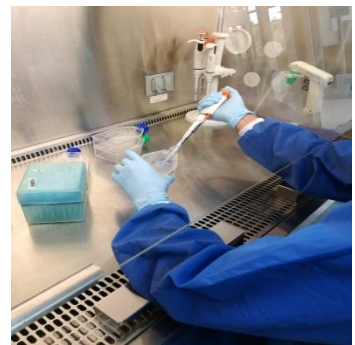
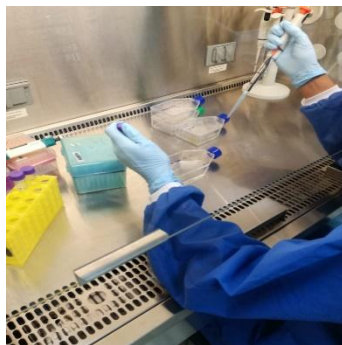


## Cultivos

### Cultivos celulares

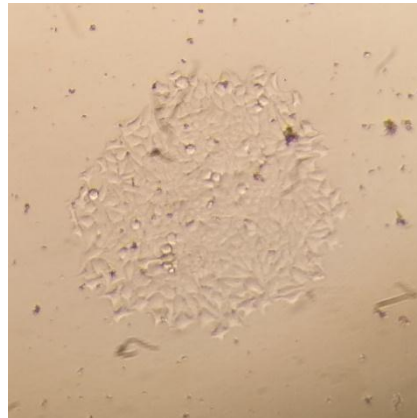


### Análisis clonogénico dependiente de la adherencia a la superficie

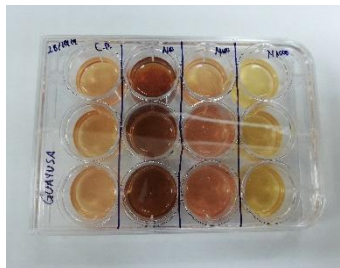




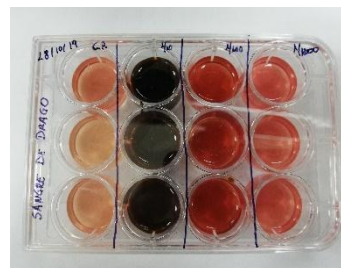
Colonia celular de MCF-7 vista desde el microscopio



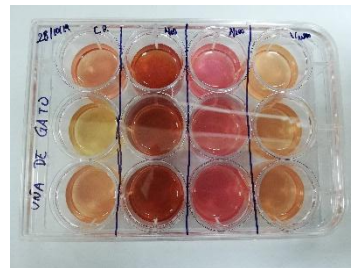
Soft Agar



*Ilex guayusa*



*Croton lechleri*



*Uncaria tomentosa*