



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN

“Determinación del efecto citotóxico y/o inductor de proliferación celular del extracto de *Calendula officinalis* y *Amphipterygium adstringens* en dos líneas celulares evidenciado por el método colorimétrico de Mosmann”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A N :

GUADALUPE VERA VIVIANO  
SILVIA SELENE GARDEA GARCÍA

ASESORES: M.V.Z GERARDO CRUZ JIMÉNEZ  
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA  
DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. JOSÉ ABEL CIPRIÁN CARRASCO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por otorgarme la vida y así llegar a una de mis metas más importantes.*

*A la máxima casa de estudios de este país la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por abrirme sus puertas para mi formación profesional.*

*A mis asesores: MVZ Gerardo Cruz Jiménez y MVZ José Antonio Licea Vega por la confianza depositada en nosotras para asignarnos este importante proyecto. Gracias por su tiempo, paciencia y enseñanzas.*

*A mi compañera de tesis: SELENE GARDEA, porque tuve la oportunidad de conocer a una gran persona a nivel profesional y personal, fue un placer trabajar contigo en este proyecto.*

*A todos los profesores de esta Facultad que estuvieron involucrados en mi educación y formación profesional, en especial a la Profa. Andrea Becerril.*

*A los sinodales, por haber dedicado su valioso tiempo en la revisión y corrección de esta tesis.*

*A la Dra. Susana Mendoza, Dr. Abel Ciprián, Dr. Eliseo, Sr. Gabino y Prof. David, por permitirnos utilizar las instalaciones del laboratorio de Virología para desarrollar la fase experimental de nuestro proyecto.*

*A la Dra. Alejandra Meléndez (INDRE), Dra. Leonor Quintero (FES-C), M.C. Jorge Vidal (CINVESTAV), Dr. Enrique Ángeles (FES-C), tesistas Aleida. Francisco y Ángel, Dra. Reyna Pichardo y Dr. Gerardo García (FES-C), por el material donado para la realización de esta tesis, ya que sin el simplemente no se hubiese llevado a cabo.*

*A la Sra. Erika, por su importante apoyo durante nuestra estancia en el laboratorio de microbiología.*

*A mis grandes amigas: Juanita, Anel, Lupita, Angélica, Verónica y Amalia, que compartieron conmigo el proceso de aprendizaje en esta Facultad y siempre me dieron palabras de aliento para seguir en este importante proyecto.*

*A Sonia, Amalia, Miriam, Erika, Eva, Mónica, Sara, Juanita, Mario, Marco y Ulises, por brindarme su amistad.*

**Guadalupe**

## *DEDICATORIAS*

*A mi madre: sin tu amor, fortaleza, paciencia, sacrificios y confianza, no hubiera emprendido este proyecto personal y profesional. Gracias por ser mi mayor ejemplo. Te amo.*

*A mi hermano: que siempre me has cuidado y apoyado en todo momento. Gracias por tu comprensión y cariño. Te amo.*

*Guadalupe*

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar a Dios por la maravillosa oportunidad de vivir y haberme ayudado a cumplir una meta más.*

*A la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán...es un orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios.*

*A mis Asesores: M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez y M.V.Z. José Antonio Licea Vega por su confianza, sus enseñanzas y su amistad. Gracias por todo!!*

*A ti Lupita no tengo palabras para agradecerte todo tu apoyo en la realización de este proyecto. Gracias por compartir la decepción cuando veíamos morir los cultivos y la alegría cuando por fin todo marchaba bien. Te aprecio mucho. Sigue así, eres una gran persona!*

*A la profesora Andrea Becerril y a todos en el laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico por todo lo que aprendí y por haber hecho mi estancia en ese laboratorio una de mis mejores experiencias. Gracias!!*

*A mis profesores por haber contribuido en mi formación profesional.*

*A cada uno de los sinodales, por el tiempo que invirtieron revisando este trabajo y por sus consejos para mejorarlo.*

*A todos en el laboratorio de Virología, en especial a la Dra. Susana E. Mendoza, Dr. Abel Ciprián, Dr. Eliseo, Prof. David y al Sr. Gabino por todas las facilidades que nos brindaron en la realización de este proyecto. A los tesisas Aleida, Francisco y Ángel gracias por las porras y por su ayuda!*

*A la Dra. Alejandra Meléndez (INDRE), Dra. Leonor Quintero (FES-C), M.C. Jorge Vidal (CINVESTAV), Dr. Enrique Ángeles (FES-C), Dra. Reyna Pichardo y Dr. Gerardo García (FES-C). Gracias por todo su apoyo y por haber estado siempre dispuestos a ayudarnos.*

*A todos en el laboratorio de Microbiología, gracias por hacer tan amena la realización de este proyecto!!*

*A la Gen. 28 y a todos mis amigos por todos los buenos recuerdos.*

*A Víctor y Araceli, por ser mis confidentes. Los quiero mucho!!*

*A mis comadres Hilda y Olga por todas las cosas que pasamos juntas!!*

*Selene.*

## DEDICATORIAS

*A mis padres: Por ustedes soy quien soy y he llegado hasta donde estoy ahora, les estoy profundamente agradecida por todo su cariño y su apoyo. A ti mami que siempre has estado al pendiente de mi y que nunca me has dejado sola. A ti papi que me has dado toda la confianza y la libertad para decidir por mi misma lo que está bien y lo que está mal, por lo que aprendí lo que es la responsabilidad. Todos mis logros son el reflejo de su esmero. Los Amo!!*

*A ti Pedro Angel Clemente Hernández: que solo me has demostrado amor, comprensión y paciencia, por enseñarme que después de la tempestad hay calma y por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas. Este es solo el inicio de una etapa más en mi vida y es un placer compartir todo esto contigo. Te admito por lo que eres: un gran hombre. Te Amo!!*

*Selene.*

Índice  
Resumen  
Introducción  
Hipótesis  
Objetivos  
Metodología  
Resultados  
Discusión  
Conclusiones  
Sugerencias  
Apéndice  
Glosario  
Referencias

**Palabras clave:** Caléndula, *Calendula officinalis*, Cuachalalate, *Amphipterygium adstringens*, Cultivo Celular, Líneas Celulares, Medio de Cultivo, Suero Fetal Bovino, Método Colorimétrico de Mosmann, MTT.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

abs	absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIM-V	Serum-free lymphocyte medium. (Medio libre de suero para linfocitos)
ARN	ácido ribonucleico
ATCC	Colección de Cultivos Tipo Americano (American Type Culture Collection)
BVD	Virus de la Diarrea Bovina
c.b.p.	cuanto baste para
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
DEN	dietilnitrosamina
D-MEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECACC	Colección europea de líneas celulares
EEB	Encefalopatía Espongiforme Bovina
EET	Encefalopatías Espongiformes Transmisibles
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FSH	Hormona Folicoestimulante
GH	Hormona del crecimiento
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
lb.	libras
Mabs	Anticuerpos monoclonales (Monoclonal Antibodies)
MBE	Medio Basal de Eagle
MDBK	Madin-Darby-Bovine-kidney
MEM	Medio esencial mínimo
µl	microlitros
µm	micrómetro
ml	mililitros
msnm	metros sobre el nivel del mar
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetarazolio
NEN	New England Nuclear
nm	Nanómetros
°C	grados centígrados
NVSL	National Veterinary Services Laboratories
PBS	solución buffer de fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario
PTH	Parathormona
rpm	revoluciones por minuto
RPMI 1640	Medio 1640 del Rosewell Park Memorial Institute
SFB	Suero Fetal Bovino
SFM	Medios Libres de Suero (Serum-Free Medium)
T <sub>3</sub>	Triyodotironina
T <sub>4</sub>	Tetrayodotironina
TSH	Thyroid-Stimulating-Hormone (Hormona Estimulante de la Tiroides)
USDA	United States Department of Agriculture
v/v	volumen/volumen



---

---

## RESUMEN

En años recientes la biotecnología celular se ha extendido en gran medida de una base relativamente limitada, principalmente interesada en la producción de vacunas, a una mayor búsqueda de biomedicamentos, los cuales ahora corresponden a más del 40% del total del mercado biofarmacéutico y al 2% del total de las ventas de medicamentos. Ejemplos de los productos usados clínicamente son los anticuerpos monoclonales, vacunas, medicamentos para enfermedades cardiovasculares, respiratorias e inmunológicas, así como una variedad de agentes antitumorales. La tecnología detrás de estos productos puede ser muy especializada y diferir significativamente de las técnicas empleadas en los cultivos celulares para fines de menor escala.

El mayor riesgo asociado al uso de productos biológicos como terapia en humanos, está relacionado a la contaminación celular. Esta contaminación comprende virus animales o humanos y priones capaces de multiplicarse y producir enfermedades infecciosas transmisibles. La presencia de virus (incluyendo los tipos no patógenos) o priones en un producto es inaceptable para su uso clínico.

Convencionalmente, los medios de cultivo se suplementan con Suero Fetal Bovino (SFB): tal suero representa un riesgo potencial de contaminación por proteínas exógenas y transmisión de enfermedades relacionadas a virus o priones, por lo tanto, el desarrollo de medios libres de suero (SFM) así como libres de proteínas de origen animal o humano es de suma importancia para el incremento en la seguridad de los productos biológicos.

Con el fin de contribuir en la búsqueda de nuevas alternativas para la sustitución del suero fetal bovino y de otras especies como caballo, en los cultivos celulares empleados para la producción de biológicos, en el presente trabajo se realizó la evaluación del efecto de los extractos de Caléndula (*Calendula officinalis*) y Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), de los cuales existen reportes de ser eficientes cicatrizantes (promotores de proliferación celular). Para ello se preparó una infusión al 2% de la corteza de Cuachalalate, así como una maceración de los pétalos de Caléndula.

---

---

El estudio se llevó a cabo en dos líneas celulares. Las células MDBK fueron proporcionadas por el Laboratorio de Virología en Palo Alto en tanto que las células VERO fueron donadas por el Laboratorio de Histología de la FES-C Campo 4. Los ensayos consistieron en enfrentar a los cultivos con los extractos por separado así como una mezcla de los mismos. La prueba se realizó a diferentes concentraciones de Suero Fetal Bovino esto con el fin de probar si es factible la disminución de la cantidad de dicho suero (6%, 2% y 0.25%) y obtener una proliferación celular semejante o mayor en comparación con un control positivo cuyo porcentaje de suero era del 10%.

Al concluir la fase experimental observamos que a determinadas concentraciones los extractos de cuachalalate, caléndula y la mezcla de estos, tuvieron efectos estimulantes en la proliferación celular.

Como anteriormente mencionamos, las absorbancias obtenidas se compararon con sus respectivos controles positivos y se obtuvieron, en algunos casos, comportamientos similares e inclusive mayores que estos. Para determinar si había una diferencia estadísticamente significativa en los promedios de las absorbancias obtenidas para cada extracto y la media de las lecturas de los controles positivos, se realizó con ayuda del programa Statgraphics la prueba de comparación de medias para dos muestras.

Para determinar cuantitativamente la proliferación celular se empleó el método colorimétrico de Mosmann, en el cual se utiliza bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que determina la presencia de células viables a partir de la reducción de este por la acción de una deshidrogenasa producida por dichas células.

Por último, todos los resultados se presentaron en tablas, graficas e imágenes para hacer más fácil su análisis y discusión.

---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 CULTIVO CELULAR

#### 1.1.1 DEFINICIÓN

Un cultivo celular se define como el conjunto de células que provienen de un tejido, el cual es disgregado por medio de métodos mecánicos o enzimáticos. Puede ser cultivado como una monocapa adherente sobre una superficie sólida (botellas de plástico o vidrio) o como una suspensión en un medio de cultivo.<sup>(1)</sup>

Por cultivo celular se entiende al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, (Ver Fig. 1), conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. De manera general, estas técnicas abarcan el cultivo de órganos (mantenimiento de pequeños fragmentos de tejido u órganos completos *in vitro*) y el cultivo de células (propagación de células dispersas tanto en suspensión como en monocapas sobre cristal o plástico).<sup>(2)</sup>

También se define como el proceso de siembra de células animales de organismos vivos en un medio químico definido que contiene los principales iones, sacáridos, aminoácidos, etc., necesarios para la supervivencia del desarrollo celular.<sup>(3)</sup>



Fig.1 Tipos de Cultivo. Tomado de <http://www.ceniap.gov.ve><sup>(2)</sup>

---

---

### 1.1.2 ANTECEDENTES<sup>(4)</sup>

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907.

Harrison fue el primer autor que empleó técnicas *in vitro* realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada.

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los cultivos de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener tejidos obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

Rous y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan.

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años. Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel.

---

---

### 1.1.3 APLICACIONES DEL CULTIVO CELULAR

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular.<sup>(4)</sup>

- ❖ **Actividad intracelular.** Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ejemplo transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, etc.
- ❖ **Flujo intracelular.** Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ejemplo ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares.
- ❖ **Ecología celular.** Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación, como por ejemplo sus necesidades nutricionales, infecciones, la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular.
- ❖ **Interacciones celulares.** Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.

Como ejemplo de áreas de investigación fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular son: <sup>(4)</sup>

- ❖ **Virología:** establecimiento de condiciones de cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas antivirales.
- ❖ **Investigación del Cáncer**
- ❖ **Inmunología.** Gracias especialmente a la introducción de las técnicas de fusión celular en la producción de anticuerpos monoclonales, así como en el análisis de la genética de la célula somática.
- ❖ **Ingeniería de proteínas.** Por la producción de proteínas en líneas celulares : interferón, insulina, hormona de crecimiento.
- ❖ **Estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo.** Comprende el estudio de los receptores y de las vías de translocación de la señal.

- 
- ❖ Aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales y ensayos de toxicidad.
  - ❖ Aplicaciones médicas. Mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.
  - ❖ Aplicaciones industriales y agronómicas. Producción por reproducción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial.

El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio de diferentes actividades celulares, incluyendo endocitosis, movimiento celular, división de la célula, tráfico a través de la membrana y síntesis de macromoléculas; la oportunidad de estudiar la diferenciación celular, que es el proceso mediante el cual las células embrionarias no diferenciadas se convierten en células de tipo altamente especializado, y el hecho de que las células cultivadas respondan al tratamiento con fármacos, hormonas, factores de crecimiento y otras sustancias activas. La capacidad de las líneas celulares de diferenciarse *in vitro* también es objeto de un intenso estudio. Tanto la tecnología de la fusión celular como los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular que, en cierto modo, han sido diseñadas para sustituir a la metodología *in vivo*.<sup>(6)</sup>

## 1.2 TIPOS DE MEDIOS Y SUPLEMENTOS<sup>(6)</sup>

Los medios para el mantenimiento de células animales *in vitro* son usualmente soluciones acuosas de numerosos componentes de bajo peso molecular químicamente definidos tales como aminoácidos, vitaminas y sales. A estos medios también es necesario añadirles un suplemento protéico como el suero.

El cultivo celular ha sido ayudado grandemente por el desarrollo de medios químicamente definidos que contienen casi todos los requerimientos nutritivos para el desarrollo de las células. El mejor conocido de estos medios, atribuible a Eagle, es una solución isotónica de sales simples, glucosa, vitaminas, coenzimas y aminoácidos, amortiguada a pH 7.4 y que tiene antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias. Debe agregarse suero al medio de Eagle para abastecer a las células con un factor adicional, cuya naturaleza continua indefinida, pero sin el cual la mayoría de las células no crecería.<sup>(25)</sup> Este medio se utiliza normalmente para células adherentes (formadoras de

---

---

tapiz o monocapa) como las células HeLa y algunas células primarias. Posteriormente se han desarrollado otros medios a partir del MBE, como por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM). Se elaboró añadiendo al medio basal de Eagle una mayor cantidad de vitaminas y aminoácidos, y se utilizó por primera vez para cultivar células de embrión de ratón. Sin embargo, en la actualidad se emplea para una amplia gama de líneas celulares de mamífero, principalmente aquellas que proliferan como monocapas celulares adherentes.

El medio esencial mínimo (MEM) se desarrolló para células de mamífero formadoras de monocapa con mayores exigencias que las satisfechas por el MBE. Se utiliza de forma generalizada, principalmente para células primarias de mamífero, pero también para muchas líneas celulares establecidas.

En la composición de muchos medios de cultivo se incluyen sales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{HCO}_3^-$  principalmente ya que contribuyen en el equilibrio osmótico del medio, por otra parte, algunos medios contienen elevadas cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  porque estos cationes divalentes son necesarios para la adherencia de proteínas situadas sobre las células formadoras de monocapa. Los medios para el cultivo de células en suspensión no necesitan concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , por ejemplo, el RPMI 1640 (medio 1640 del Rosewell Park Memorial Institute) utilizado frecuentemente para leucocitos humanos o murinos normales y neoplásicos: estas células crecen en suspensión y necesitan poco calcio.

Para permitir el desarrollo de las células, los medios básicos precisan la adición de suplementos como la glutamina y el suero. La glutamina es la fuente principal de carbono para la mayoría de las células en cultivo y genera precursores para posteriores biosíntesis y para la producción de proteínas. También actúa, junto con la glucosa (y a veces con el piruvato sódico), como fuente de energía mediante la ruta del ciclo de Krebs. El suero contiene una mezcla importante pero poco definida de compuestos favorecedores del crecimiento (por ej., polipéptidos, hormonas, lípidos, trazas de metales). Se han analizado los componentes del suero que resultan importantes para ayudar a la proliferación celular, lo que ha permitido la producción de un suplemento similar al suero y químicamente definido. Su principal ventaja es la eliminación de la interferencia resultante de factores desconocidos presentes en el suero que podría alterar algunos experimentos. Sin embargo

---

---

el suero sigue siendo utilizado por la mayoría de los que trabajan con cultivos celulares, normalmente en forma de suero fetal bovino (SFB).

### 1.3 CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DEL SUERO <sup>(7)</sup>

Las funciones de las proteínas en el suero incluyen:

- ❖ fijación y expansión de las líneas celulares adherentes
- ❖ Nutrición (trazas de elementos, nutrientes insolubles en agua)
- ❖ Estimulación (Factores de Crecimiento, hormonas, proteasas)
- ❖ Protección :
  - ✓ Biológica (antitoxinas, antioxidantes, inhibidores de proteasas)
  - ✓ Mecánica (en sistemas de agitación)

El suero se deriva del plasma extracelular que constituye aproximadamente el 80% del volumen de sangre completa y contiene una gran cantidad de proteínas, aproximadamente un total protéico de 70g/litro. Las proteínas que constituyen en mayor proporción el suero se enlistan en la tabla 1.

El suero de algunas especies animales se usa como suplemento para los medios de cultivo celular, siendo los más comunes el SFB y el Suero de Caballo adulto. El uso de estos y cualquier otro tipo de suero tiene sus ventajas y desventajas que deben ser consideradas antes de elegir alguno.

El SFB es un potente promotor de proliferación de varios tipos de células y contiene muy bajos niveles de inmunoglobulinas, también contiene proteínas como albúmina, (Ver Tabla 1), transferrina e insulina que comprenden del 80 al 90% de las proteínas presentes. Los factores de crecimiento se encuentran en cantidades muy pequeñas, entre  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  por 100 de las proteínas totales. Es muy versátil y permite la proliferación de varios tipos de líneas celulares con buena estabilidad y productividad. <sup>(8,9)</sup>



Tabla 1. Composición del Suero Fetal Bovino (SFB)<sup>(9)</sup>

Componente	mM (concentración)		
	Pm	mM	mg/ml
Cloro	35	540,000	19,312
Sodio	23	134,000	3,082
Potasio	39	11,948	466
Glucosa	180	9.2	1.6
Urea	60	6.0	0.3
Calcio	40	3.4	0.1
Proteína total	70,000	2.5	180.5
Albúmina	69,000	1.6	113
		mM x 10 <sup>-3</sup>	ng/ml
Colesterol	386	970	375
Fósforo	31	600	78.5
Triglicéridos	800	460	370
Creatinina	131	228	30
Ácido úrico	168	166	28
Vitamina C	176	50	9
Hierro	56	35	2
Bilirrubina	585	12	7
Vitamina E	431	5.3	2.3
Glutation reducido	307	4.8	1.5
Disulfuros (cys)	121	2.5	0.3
Lipoproteína	300,000	1.2	360
Glutation oxidado	612	0.4	0.3
Hemoglobina	68,000	0.3	21
		mM x 10 <sup>-6</sup>	ng/ml
Cobre	63	4,650	105,000
Vitamina A	300	700	210,000
Selenio	79	830	26,000
T <sub>4</sub>	777	158	123,000
Cortisol	362	33	12,000
Prolactina	23,500	0.1	2,517
		mM x 10 <sup>-9</sup>	ng/ml
Prostaglandina F	355	60	22.8
Prostaglandina E	357	40	15.5
T <sub>3</sub>	650	2.1	1.4
GH	22,000	1.5	34.6
FSH	17,000	1.0	17.9
Progesterona	314	0.5	0.1
PTH	9,000	0.3	3.1
TSH	25,000	0.1	2.3

Estos datos son un ejemplo de la complejidad del medio interno fisiológico en el que viven normalmente las células animales. Existen otros componentes que no se han mencionado aquí tales como los factores de crecimiento (proteínas) y otros que probablemente se desconocen.

---

---

### 1.3.1 USO DEL SUERO EN CULTIVOS CELULARES

El papel de suero, especialmente el SFB en el establecimiento y mantenimiento de líneas y cultivos celulares, es fundamental <sup>(8)</sup>. Los tipos de suero empleados son suero de ternera (calf serum, CS), suero fetal de ternera o bovino (fetal calf serum, FCS), suero de caballo (horse serum, HS) y suero humano (human serum, HuS). El más usado es el CS, mientras que el FCS es usado en líneas más exigentes, y el HS en líneas humanas.<sup>(5)</sup>

En la mayoría de los cultivos, se requiere como suplemento el suero al 10% v/v para mantener la proliferación de las células. Este suero puede obtenerse de varias especies animales, pero el suero proveniente de bovinos y equinos es el más común.

Uno de los suplementos más efectivos es el SFB por su alto contenido en factores de crecimiento. Sin embargo, la inclusión del suero en el medio de cultivo tiene algunas desventajas. Es una mezcla químicamente indefinida y la variación de calidad entre los lotes puede provocar resultados inconsistentes en cuanto al desarrollo del cultivo. El suero como suplemento es muy caro, del 70 al 80% del costo total del cultivo corresponde a su uso, en especial si se emplea SFB. Además de que productos extracelulares liberados se mezclan en una sopa de proteínas de la cual es difícil extraerlos.<sup>(7)</sup>

### 1.3.2 DESVENTAJAS DE SU USO

La utilización de suero es problemática pues:

- ❖ A pesar de que la composición del suero es conocida, existen gran cantidad de componentes presentes en cantidades variables en éste que pueden influir notablemente en el cultivo (hormonas, factores de crecimiento, etc.)
- ❖ La calidad del suero varía de lote a lote, y cada uno se puede emplear como máximo 1 año, probablemente deteriorándose a lo largo de ese tiempo, a pesar del almacenamiento a baja temperatura.
- ❖ Cada cambio de lote de suero requiere realizar una serie de controles tediosos y costosos.
- ❖ Si se cultivan varios tipos celulares cada uno puede requerir un lote diferente, lo que complica el almacenamiento e incrementa los costos.

- 
- 
- ❖ Crea una dependencia importante de un suministro que no siempre puede mantenerse con la periodicidad y calidad requerida.
  - ❖ Si se han de purificar productos del medio de cultivo, tales como hormonas o proteínas, la presencia de los componentes del suero dificulta notablemente estos procesos, ya que es necesario purificar el medio antes de obtener los productos deseados.
  - ❖ El suero puede estar contaminado con virus como consecuencia de la infección intrauterina de los bovinos donantes del suero. Durante la obtención y centrifugación de la sangre, el suero puede contaminarse también con bacterias y mycoplasma, lo que representa un grave peligro para el cultivo ya que se altera la eficiencia de la replicación celular así como la producción de metabolitos específicos importantes para los laboratorios de investigación y diagnóstico.
  - ❖ Algunos factores séricos como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF) estimula la proliferación de fibroblastos, lo que puede ser un problema en el establecimiento de cultivos primarios especializados ya que al no lograr un cultivo puro, pueden verse alterados resultados de investigación y hasta la proliferación de las células de interés provocando incluso que el cultivo no pueda lograrse.

### 1.3.3 IMPACTO DEL USO DEL SUERO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

El porcentaje de contaminación del suero fetal comercial oscila entre el 10 y el 70%.<sup>(11)</sup> El uso del suero en los cultivos celulares trae consigo la posibilidad de introducir agentes adventicios tales como virus y otros agentes transmisibles (por ej. Encefalopatía Espongiforme Bovina). Adicionalmente, el uso del suero como materia prima impacta negativamente la economía de los procesos que involucran cultivos celulares.<sup>(10)</sup>

El gasto económico dependerá del porcentaje y tipo de suero que se use, el SFB es el más común y también el más costoso, con un promedio de 456 dólares por litro, por lo tanto el suero puede contribuir significativamente en el costo de los productos que en su elaboración lo requieran como materia prima.<sup>(8)</sup>

---

---

Convencionalmente, los medios de cultivo se suplementan con SFB: tal suero representa un riesgo potencial de contaminación por proteínas exógenas y transmisión de enfermedades relacionadas a virus o priones si es usado en el cultivo de células dirigidas a la reimplantación en humanos. <sup>(12)</sup>

Han sido detectados en un importante número de productos biológicos, virus adventicios originados por el uso de compuestos derivados de animales en el cultivo de células y/o virus, entre ellos el Virus de la Diarrea Bovina (BVD) que es el contaminante más común y el SFB es la fuente principal de esta contaminación. Esto se debe a la capacidad del BVD de atravesar la barrera placentaria y subsecuentemente infectar al feto inmunológicamente inmaduro. Se han realizado intensos esfuerzos para mejorar los procesos de esterilización de las materias primas, por ejemplo, con radiación gamma. Sin embargo, un brote de BVD después de la vacunación con una vacuna activa contaminada demostró la relevancia del problema. <sup>(13)</sup>

Por otra parte, la producción de Anticuerpos Monoclonales (MAbs) requiere de un grado de pureza química y biológica muy elevado, esto porque los MAbs son inoculados a humanos para aplicaciones *in vivo*, tales como inmunoterapia o inmunoquimioterapia. Los MAbs se pueden obtener *in vitro*, sin embargo, en la mayoría de los casos los medios de cultivo contienen suero de caballo o bovino y/o tejido animal digerido lo que puede acarrear contaminación por microorganismos y/o endotoxinas, sin olvidar que las proteínas presentes en el suero pueden provocar reacciones de hipersensibilidad en algunos pacientes. <sup>(14)</sup>

La experiencia clínica con cardiomioplastía celular (que emplea SFB para el cultivo de mioblastos) ha mostrado significantes arritmias ventriculares malignas y muertes súbitas en pacientes. Se tienen hipótesis de que el contacto de las células humanas con el SFB produce la fijación de proteínas animales en la superficie de las células, lo que podría generar un sustrato antigénico que activa procesos inmunológicos e inflamatorios adversos. <sup>(15)</sup>

La infección causada por la encefalopatía esponjiforme bovina (EEB) ha sido recientemente ligada con un padecimiento en humanos conocido desde hace tiempo como la enfermedad de Creutzfeld-Jakob. Consecuentemente, todos los países exportadores de suero bovino tienen que

---

---

certificar la ausencia del prion causante de EEB. Por este motivo Canadá y EU tienen leyes de importación muy estrictas para este producto.<sup>(16)</sup>

### 1.3.4 REQUISITOS SANITARIOS<sup>(17)</sup>

Normas y Procedimientos Zoosanitarios Bovinos

Fracción Arancelaria Sanitaria:

- 30.02.00 Sangre bovina preparada para usos terapéuticos, profilácticos o diagnósticos
- 30.02.10 Sueros específicos de bovinos inmunizados y demás componentes de la sangre
- 30.02.20 Suero fetal bovino

Dichos productos estarán amparados por un certificado sanitario oficial expedido por la Administración veterinaria del país exportador.

Solo se permite la importación de estos productos provenientes de países o zonas libres de: fiebre aftosa, peste bovina, encefalopatía espongiforme bovina y otras enfermedades exóticas o emergentes; caso contrario, las administraciones veterinarias podrán utilizar la metodología de análisis de riesgo para permitir o prohibir la importación.

En aquellos casos en que la Administración Veterinaria de el Ministerio de agricultura y Ganadería considere necesario, deberán tomarse las muestras requeridas para pruebas rutinarias referidas a este tipo de productos y/o subproductos.

## 1.4 CONTAMINACIÓN DE LÍNEAS CELULARES POR VIRUS Y PRIONES<sup>(18)</sup>

Algunas líneas o cultivos celulares pueden contener virus endógenos o pueden ser contaminados por virus exógenos, y pueden producir o liberar partículas virales o expresar antígenos virales en su superficie. Además ciertos productos biológicos (por ej. Suero fetal bovino) pueden contener partículas priónicas. Las fuentes primarias de contaminación viral y priónica provienen de tejidos animales usados para preparar reactivos y medios biológicos, productos biológicos de donadores, en el caso de trasplantes, (por ej. Médula ósea) y contaminación durante la

---

---

manipulación en el laboratorio. Por otra parte trabajadores de laboratorio infectados pueden provocar la contaminación de los cultivos celulares por manipulación.

El uso de suero fetal bovino en líneas celulares requiere una urgente valoración de los riesgos de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), lo que lleva al desarrollo de pruebas sensibles y específicas en todos los productos derivados de rumiantes.

El humano puede estar expuesto a infecciones secundarias de EET por procedimientos médicos o por la administración de productos biológicos obtenidos de humanos incluyendo sangre. Por ello, deben tomarse medidas preventivas para evitar la transmisión de priones a los receptores de estos biológicos (injertos de células o tejido, derivados sanguíneos, etc.).

### 1.5 MEDIOS SIN SUERO O SERUM-FREE MEDIUM (SFM)

El desarrollo de medios libres de suero (SFM) así como libres de proteínas de origen animal o humano es de suma importancia para el incremento en la seguridad de los biológicos producidos para terapia y vacunas.<sup>(21)</sup>

La sustitución o reducción del empleo del suero en medios de cultivo para células animales ha tenido algunos avances (Iscove, 1984). Desde los años 60's se han hecho intensos esfuerzos para lograr el reemplazo del suero en cultivos celulares empleando proteínas hidrolizadas de tejidos animales (peptonas, triptosa), de productos lácteos (lactoalbumina, caseína), y de microorganismos (extracto de levadura, peptonas bacterianas).<sup>(20)</sup>

Para conseguir sustituir el suero completamente de un medio es necesario reemplazar <sup>(5)</sup>:

- ❖ Los factores de adhesión como la fibronectina. Células crecidas en medios libres de suero requieren el suplemento de fibronectina (25-50 µg/ml) o laminina (1-5 µg/ml) en el medio, o bien el tratamiento de las placas con poli-lisina (1 mg/ml) antes de la siembra para lograr que las células puedan adherirse a la superficie del recipiente de cultivo, especialmente tratándose de células formadoras de monocapa.

- 
- 
- ❖ **Inhibidores de proteasas.** Después de la tripsinización de un cultivo el exceso de actividad enzimática se inhibe por la adición de suero al medio. En ausencia de éste deben usarse inhibidores de proteasas como el inhibidor de tripsina de soja.
  - ❖ **Hormonas.** El complemento hormonal dependerá especialmente del tipo de célula, tales como hormona de crecimiento, T3, hidrocortisona, dexametasona, FSH, etc.
  - ❖ **Factores de crecimiento peptídico.** En la actualidad se han identificado algunos polipéptidos de actividad mitogénica: FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (epidermal growth factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) con un rango amplio de actividad. Asimismo se han aislado otros factores con mayor especificidad de acción.
  - ❖ **Nutrientes.** Fe, Cu, Se, y otros minerales, a pesar de que los fundamentos de su función son desconocidos en muchos casos.

Hasta 1999 la mayoría de los SFM estaban basados, como ya se mencionó, en el empleo de peptonas e hidrolizados derivados de animales y/o proteínas purificadas de origen animal o humano, y aunque este fue el primer paso importante no fue suficiente porque el riesgo de introducir agentes adventicios aún estaba presente.<sup>(21)</sup>

Existen algunos medios de cultivo formulados sin ningún componente que sea derivado animal o humano y diseñados para soportar el desarrollo de varias líneas celulares que son de interés para la producción de virus y para la biotecnología. <sup>(21,22)</sup>

El medio Iscove's suele utilizarse como base para la preparación sin suero; se trata de una modificación del D-MEM al que se añaden suplementos (por ej., albúmina sérica bovina, transferrina y lípidos de semilla de soja). Pueden comprarse suplementos preparados de empresas como Gibco. El medio Iscove's fue desarrollado para el cultivo de células híbridas y linfocitos murinos. Entre los medios sin suero se encuentran el AIM V de Gibco y el "Medio sin suero y sin proteínas para hibridomas" de Sigma, también el medio SerXtend (NEN), Ventrex (Ventrex Lab Ltd.) y Nu-serum (Collaborative Res.). Pueden obtenerse comercialmente como preparaciones completas para algunos tipos celulares y no requieren suplementos adicionales.<sup>(6)</sup>

---

---

La mayoría de los productos derivados de animales pueden ser reemplazados por sustancias sintéticas o por productos derivados de plantas. Las peptonas de carne, como Primatone, un aditivo de varios SFM para diferentes líneas celulares, o la peptona de caseína (usada en el medio MDSS2,<sup>(23)</sup>), pueden ser fácilmente reemplazados por peptonas derivadas de plantas, como se hizo en el medio MDSS2N en donde se empleó un hidrolizado de frijol de soya<sup>(21)</sup>. En todo caso los nuevos SFM deben probar una actividad de proliferación celular similar a la de un medio que sí contenga suero y más aún ser útil para la producción de biológicos, (por ej. permitir la replicación viral, en el caso de producción de vacunas).

Los medios libres de suero tienen ventajas fundamentales con respecto a los medios que si lo contienen, estas incluyen<sup>(8)</sup>:

- ❖ Una composición simple y bien definida
- ❖ Reducción de contaminantes
- ❖ Eliminación de una fuente potencial de agentes infecciosos
- ❖ Bajo costo

## 1.6 LÍNEAS CELULARES

Como la proliferación de células se presenta en cada cultivo, la propagación de líneas celulares resulta factible.<sup>(24)</sup>

Las líneas celulares son células de un solo tipo, capaces de propagarse *in vitro* para siempre. Tales líneas inmortales se originan generalmente de cánceres o por mutación ocurrida en cepas de células diploides <sup>(25)</sup>. También pueden derivarse de células normales que después de continuos pases se transforman.<sup>(26)</sup>

Las Líneas Celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo.



---

---

Este tipo de cultivo tiene la característica de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación. Una transformación puede inducirse fisiológicamente (interacción celular, polaridad) a través de hormonas como la hidrocortisona o utilizando inductores no fisiológicos. <sup>(27)</sup>

Las líneas celulares establecidas han sufrido un importante proceso de adaptación y modificaciones cromosómicas que les permiten desarrollarse en forma permanente en los cultivos.<sup>(3)</sup>

En la actualidad existen tres grandes colecciones mundiales de líneas celulares (y de otros valiosos materiales biológicos tales como genotecas, plásmidos, semillas, sondas, virus, etc.). Es recomendable obtener de estos centros las líneas celulares que se han de emplear en el laboratorio para asegurar su origen y condiciones iniciales. <sup>(28)</sup>. Las tres grandes colecciones son:

- American Type Culture Collection (ATCC)
- European Collection of Cell Lines (ECACC)
- Collection of Cancer Cell Lines (Japón)

---

## 1.6.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS

### 1.6.1.1 VERO (Células de riñón de mono verde africano<sup>(29)</sup>)

La línea celular VERO se obtuvo a partir del riñón normal de un mono verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*) el 27 de Marzo de 1962, por Y. Yasumura y Y. Kawakita de la Univesidad Chiba en Chiba, Japón. B. Simizu llevó la línea celular al laboratorio de Virología Tropical del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas en el pase 93 el 15 de Junio de 1964. Su morfología es de tipo epitelial y son células diploides.

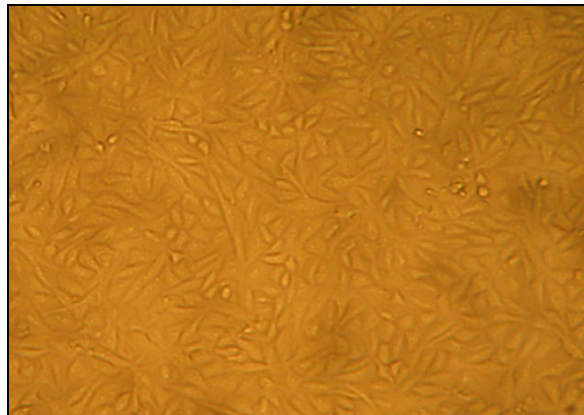


Fig. 2. Monocapa de células VERO

---

---

### 1.6.1.2 MDBK (Madin-Darby-Bovine-Kidney) <sup>(29)</sup>

La línea MDBK se obtuvo a partir del riñón aparentemente normal de un bovino adulto el 18 de Febrero de 1957, por S. H. Madin y N. B. Darby. En 1973 se detectó que la línea celular estaba infectada con el virus que provoca la Diarrea Viral Bovina (BVD).

En 1982, R.A. Van Deusen de la NVSL, USDA, Ames, Iowa informó a la ATCC que habían encontrado células MDBK libres de la infección con BVD. Estas células originalmente fueron obtenidas de la ATCC en Julio de 1967 en el pase 96. Pruebas exhaustivas (35 pases) realizadas por la NVSL no detectaron evidencia de contaminación viral en esta particular progenie de MDBK.

R.A. Van Deusen propuso la línea MDBK a la ATCC en el pase 110 en Agosto de 1982. Hasta la fecha la línea ha mostrado estar libre de BVD. Presenta morfología de epitelio.

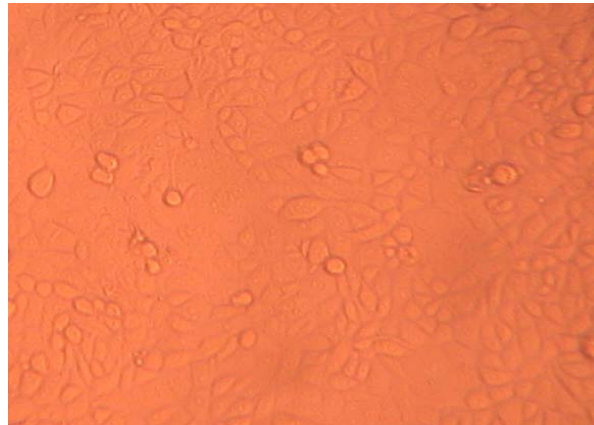


Fig. 3. Monocapa de células MDBK

---

---

## 1.7 LA HERBOLARIA EN MÉXICO

La Herbolaria estudia las propiedades curativas y medicinales de la gran diversidad de hierbas y plantas. Esta es una práctica milenaria que nunca ha dejado de tener vigencia.<sup>(30)</sup>

El Biólogo M.C. Mauricio González Ferrara refiere que en la herbolaria internacional se habla de tres países en cuanto a cultura herbolaria se refiere: México, India y China, sin embargo México no tiene el mismo nivel de desarrollo e investigación en herbolaria que la India, China o países europeos.<sup>(31)</sup>

Desde hace unos años la investigación de plantas medicinales ya no es vista como un folklore, sino, como una relevante actividad científica, ya que las plantas medicinales son una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, en la obtención de nuevas moléculas bioactivas que se manifiesten en diferentes mecanismos de acción.

La investigación de plantas medicinales consta de diferentes disciplinas: la etnomedicina, la farmacología, la fitoquímica, la toxicología, la investigación clínica, la biotecnología y el diseño de medicamentos. Este proceso de investigación no puede ser desarrollado por un solo grupo, en realidad es una larga cadena en la que debe intervenir mucha gente, diferentes instituciones, dependencias de gobierno y particularmente la industria.

Se podría asegurar que la única de las disciplinas que ha logrado grandes avances es la etnobotánica. Hoy contamos ya con grandes obras, catálogos, colecciones, bancos de datos sobre medicina tradicional, sus recursos humanos, sus recursos naturales, plantas medicinales, organización social de médicos tradicionales. Simplemente por dar un ejemplo existen actualmente en el país mas de 40 herbarios; el solo Herbario del IMSS cuenta con una colección de más de 12,000 ejemplares, 2,500 especies medicinales diferentes.

Durante mas de 20 años diferentes grupos han hecho por su parte etnobotánica, química, farmacología y recientemente biotecnología, ellos han acumulado experiencia y el trabajo ahora es reunirlos, orientarlos a la investigación clínica y vincularlos a la producción en el campo y la industria.<sup>(32)</sup>

---

---

## 1.7.1 CALÉNDULA

Nombre científico : *Calendula officinalis*

Familia : Compuestas

Nombre común : Calendula, maravilla, marigold, alta reyna, mercadela. (33,34,37)

### 1.7.1.1 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

Es una planta anual o perenne originaria del sur de Europa y en México es cultivada como planta de ornato, se encuentra presente en clima semiseco y templado desde los 20 hasta 2000 m. sobre el nivel del mar.<sup>(33,36)</sup> La planta se recolecta principalmente durante el mes de agosto en el cual las flores son más abundantes.



Fig. 4. Flor de Caléndula

### 1.7.1.2 USOS

Esta planta ha sido utilizada durante mucho tiempo en la medicina tradicional y se le han atribuido más de 35 propiedades a las infusiones y tinturas de las flores, por ejemplo, antiinflamatorio, analgésico, antitumoral, diurético, bactericida, antiviral, por su capacidad emenagoga, favorece la aparición de la menstruación en mujeres que padecen amenorrea y al mismo tiempo regula y hace disminuir las pérdidas excesivas de sangre, mejora la dismenorrea, favorece la cicatrización de las úlceras de estómago, alivia la gastritis, es útil también en las afecciones de la piel como llagas, verrugas y callos así como cicatrizante de la piel.<sup>(35,36)</sup>

Tabla 2. Forma de preparación y usos de Caléndula<sup>(37)</sup>

Forma de preparación	Usos
Infusión	Emenagoga y reguladora menstrual, colerética y antiulcerosa. Gastroenteritis y vómitos
Pomada	Quemaduras y eccemas.
Aceite	Contra verrugas víricas (vulgares) de la piel. Suavizante e hidratante de la piel.
Loción de jugo	Quemaduras, furúnculos y eccemas.
Cataplasma	Quemaduras, furúnculos y eccemas. Acción antirreumática.
Compresas	Quemaduras, furúnculos, eccemas, antirreumática y callicida.

### 1.7.1.3 FITOQUÍMICA

Las flores de Calendula contienen carotenoides (provitamina A), un principio amargo (calendina), flavonoides, saponinas, resinas, aceites esenciales y pequeñas cantidades de ácido salicílico.<sup>(37)</sup> La presencia de ácidos fenólicos, taninos y coumarinas es reportada por varios investigadores.<sup>(38)</sup>

Entre los compuestos más investigados dado su interés farmacológico están los carotenoides y los flavonoides.

### 1.7.1.4 EXPERIMENTACIÓN FARMACOLÓGICA

Dumenil<sup>(39)</sup> plantea que los extractos etanólicos al 80% mostraron actividad antibacteriana especialmente contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*. Schipochliev y Fleischner<sup>(40)</sup> realizaron estudios en que se demostró la propiedad antiinflamatoria de extractos de Caléndula. Michel y Fleischner<sup>(41,42)</sup> demostraron el poder cicatrizante de los extractos de *C. officinalis* en animales de experimentación y en humanos. Rocaud<sup>(43)</sup> demostró la actividad antitumoral y citotóxica de extractos de Calendula ricos en saponinas triterpenoides.

---

---

J.I. Pérez-Carreón<sup>(44)</sup> y colaboradores, realizaron estudios con extractos hidroalcohólicos, acuosos, etanólicos y clorofórmicos de flores de *Calendula officinalis* en hepatocitos de ratas tratadas con dietilnitrosamina (DEN). Esta investigación dio como resultado que el extracto hidroalcohólico en concentraciones de ng/ml es capaz de proteger a las células de el efecto genotóxico del carcinógeno DEN, dicho efecto lo atribuyen a la presencia de flavonoides. También se observó que este mismo extracto en concentraciones de µg/ml cercanas a la concentración protectora eran genotóxicas. Similares efectos controversiales han sido demostrados en flavonoides como la quercetina<sup>(45)</sup>, el cual es un antioxidante pero que a altas concentraciones puede actuar como pro-oxidante.

## 1.7.2 CUACHALALATE

Nombre científico : *Amphipterygium adstringens*

Familia : Julianaceae

Nombre común : Cuachalalate, cuachalalá,, matixerán (Michoacán), volador (Puebla), chalalate, coachalalate, cuachalatl (Distrito Federal), macerán, pacueco, cuachinalá (Oaxaca) <sup>(46)</sup>

### 1.7.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

Árbol de 10 m de altura, con el tronco torcido de corteza moreno grisáceo o gris plomizo con grandes escamas, las hojas están agrupadas en las puntas de las ramas en número de tres a cinco, en el anverso son verde opaco y en el reverso verde grisáceo. Las flores pueden encontrarse solitarias o en ramilletes. Los frutos son nueces abultadas y alargadas que están en ramas de color verde pálido. Esta especie es de clima cálido, y templado, se encuentra desde los 100 hasta los 3000 msnm.<sup>(48)</sup>

El Cuachalalate es una planta endémica de México, se cultiva en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos y Puebla<sup>(47)</sup>. Sus poblaciones naturales se ven fuertemente impactadas, debido al descortezamiento tradicional, irregular y destructivo<sup>(48)</sup>



Fig. 5 Corteza de Cuachalalate



Fig. 6 Árbol de Cuachalalate<sup>(48)</sup>

### 1.7.2.2 USOS

Se utiliza en varios estados de México principalmente el cocimiento de la corteza, como tratamiento de úlceras, cáncer de estómago, gastritis, lesiones cutáneas, endurecimiento de encías, tifoidea, tifo y heridas antiguas. También se remoja la corteza para el tratamiento de úlceras. En el caso de heridas, puede aplicarse hecha polvo o macerada en agua. Para el tratamiento de granos y llagas también se utiliza la resina de la corteza, que también puede ser aplicada a animales domésticos. Puede utilizarse también para tratar rozaduras de bebés, mordeduras o piquetes de animales ponzoñosos y como cicatrizante.<sup>(35,36)</sup>



Tabla 3. Usos y Forma de Preparación del Cuachalalate <sup>(49)</sup>

Forma de preparación	Usos	Aplicación
Remojado	Cicatrizante	Como agua de uso
Pomada	Cicatrizante	Local
Jarabe	Tos	Se toma 3 - 4 veces al día
Tónico	Fortalecer el pulmón, tos, asma	Se toma de una a tres veces al día
Té	Cicatrizante	Se toma varias veces al día

### 1.7.2.3 CONTRAINDICACIONES

No se debe ingerir por largos períodos, se recomienda utilizar en ciclos de dos semanas con una semana de descanso. Su uso en grandes dosis puede afectar la vista.<sup>(49)</sup>

### 1.7.2.4 FITOQUÍMICA

Toda la investigación química se ha realizado en México <sup>(35)</sup>. En la corteza del tallo se han identificado los siguientes compuestos <sup>(35,36,51)</sup>

Triterpenos ácidos: 3-alfa y 3-epi-masticadienónico

Isomasticadienónico

Epi-oleanólico

Compuestos benzílico: ácidos 6-heptadecil

6-nonadecil

6-pentadecil-salicílico

Esteroles: beta-sitosterol

En la hoja se ha identificado el ácido cuachalálico (triterpeno).

Existen reportes de que las acumulaciones más elevadas de ácido masticadienónico ocurren en el mes de Febrero, mientras que en el caso del ácido  $\alpha$ -hidroximasticadienónico comúnmente se encuentran en el mes de Noviembre.<sup>(47)</sup>

---

---

Los ácidos masticadienónico y  $\alpha$ -hidroximasticadienónico han sido encontrados en la resina de los árboles macho, mientras que solo el ácido masticadienónico ha sido encontrado en la resina de los árboles hembra. Un dato interesante es que la cantidad de ácido masticadienónico es mayor en ambos sexos.<sup>(47)</sup>

#### 1.7.2.5 EXPERIMENTACIÓN FARMACOLÓGICA

Se ha comprobado la actividad antitumoral de un extracto metanólico de la planta, administrado a ratones por vía intramuscular con tumores mamarios tipo carcinoma. También se ha demostrado el efecto hipocolesterolemia a través de extracto hexánico administrado a ratas.<sup>(51)</sup>

Se realizó una prueba farmacológica anti-inflamatoria con el ácido  $\alpha$ -hidroximasticadienónico en ratas Wistar macho y se observó una fuerte inhibición de la inflamación a una dosis de 10mg/Kg, con un 93% de disminución del edema. <sup>(47)</sup>

Existen estudios con extractos metanólicos y hexánicos, sin embargo también el extracto acuoso de Cuachalalate ha resultado altamente efectivo en el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales, esto demostrado en una evaluación farmacológica de la acción antiulcerosa de una infusión de Cuachalalate a diferentes dosis mediante una curva dosis efecto gradual en ratas Wistar. Aunque todavía falta conocer el mecanismo por el cual esta planta corrige problemas gastrointestinales, algunos autores señalan que el Cuachalalate puede tener un efecto citoprotector y cicatrizante en la mucosa gástrica.<sup>(50)</sup>

Los componentes químicos activos del Cuachalalate representan potencial de desarrollo para el país a través de la elaboración de productos farmacéuticos y el desarrollo de investigaciones biomédicas.<sup>(51)</sup>

---

## 1.8 MTT ó 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

El MTT, también conocido como Azul de Tiazol. Es una sal de tetrazolio soluble en agua. En solución tiene una coloración amarilla.<sup>(52)</sup>

La prueba colorimétrica de MTT ha sido previamente descrita para medir citotoxicidad y proliferación celular <sup>(53)</sup> así como para un índice de medición de activación celular <sup>(54)</sup> ambos cuantitativa y cualitativamente.

La prueba de MTT se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables para transformar la sal de MTT tetrazolio (de color amarillo), en un producto de color azul (MTT formazona). La intensidad del color azul será proporcional al número de células vivas presentes.<sup>(55)</sup>

La activación celular en respuesta a un mitógeno exógeno a diferentes concentraciones se lee después de 72 hrs. de cultivo por la formación de la formazona. La absorbancia del colorante se mide a una longitud de onda de 570 nm o a la longitud más cercana.<sup>(52)</sup>

---

## 2. HIPÓTESIS

Estudios anteriores han demostrado que los extractos de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y Caléndula (*Calendula officinalis*) tienen un efecto citoprotector así como mitógeno (cicatrizante). Si al enfrentar los extractos a un cultivo celular donde el porcentaje de SFB se ha disminuido, hay una promoción de proliferación celular igual o mayor a la de un control positivo que contenga SFB 10%, entonces puede proponerse a estos extractos como posibles alternativas para la sustitución del SFB y así disminuir los riesgos de contaminación de los productos biológicos que empleen cultivos celulares.

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Enfrentar dos líneas celulares con los extractos de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y *Calendula officinalis* para determinar si tienen un efecto citotóxico o inductor de proliferación celular al disminuir el volumen de SFB, empleando el método colorimétrico de Mosmann (MTT) como prueba cuantitativa.

#### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Obtener un extracto de Cuachalalate y *Calendula officinalis* con calidad microbiológica.
- ❖ Comparar el efecto de los extractos de Cuachalalate y *Calendula officinalis* en la línea celular MDBK y VERO.
- ❖ Determinar el sinergismo o antagonismo de los extractos realizando una mezcla de ambos y enfrentándola a las células MDBK y VERO.
- ❖ Emplear el método de MTT como prueba cuantitativa en la determinación del efecto de los extractos.
- ❖ Determinar la concentración óptima a la que los extractos inducen la proliferación celular.
- ❖ Realizar los correspondientes análisis estadísticos.

---

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

La corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) y las flores de Caléndula (*Calendula officinalis*) fueron obtenidas en "La Magnolia" Guatemala # 10 col. Centro, México DF.

#### 4.1.1 Extracto etanólico de Caléndula

Los pétalos de las flores se secaron en una estufa a 56°C el tiempo necesario. Se colocaron 5g de los pétalos en un matraz Erlenmeyer que contiene 500ml de etanol al 70%, se mantuvo en agitación durante 3 días protegido de la luz. Se retiró el material insoluble por filtración empleando papel filtro del nº 3 Wattman<sup>®</sup>, el macerado se colocó en un rotavapor a 56°C hasta casi sequedad. Se obtuvo el material sólido y de aquí se pesaron 0.8 mg, se disolvieron en 1 ml de DMSO y 10 ml de D-MEM, para una concentración de 0.0727µg/µl, esta solución se utilizó para el ensayo de las células MDBK. Con respecto a las células VERO se pesaron 1.4 mg del extracto y se disolvieron en 1.5 ml de DMSO más 20.5 ml de D-MEM para una concentración final de 0.0636 µg/µl. Esta solución se esterilizó por filtración con una membrana millipore de 0.22µm y se conserva a 4°C hasta su uso.

#### 4.1.2 Extracto acuoso de Cuachalalate

Se calentaron 50ml de agua desionizada hasta ebullición en un vaso de precipitado de 100ml manteniéndolo cubierto, se adicionó 1g de corteza de Cuachalalate. Se retiró del fuego y se dejó reposar durante 10 minutos. Se filtró empleando un embudo de vidrio y papel filtro del nº 3 Wattman<sup>®</sup> y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La infusión se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22µm y se conserva a 4°C hasta su uso.

Para determinar la concentración se pesaron 3 viales en una balanza analítica y se adicionó 1ml del extracto en cada uno, estos viales se colocaron en un horno Pasteur a una temperatura no

---

---

mayor de 100°C hasta la total evaporación del extracto. Los viales se volvieron a pesar y con el promedio de las diferencias de los pesos se obtuvo la concentración.

**NOTA:** La infusión de Cuachalalate se utilizó como máximo a un día de preparada, esto por la inestabilidad de sus componentes.

## **4.2 CULTIVO CELULAR**

Para llevar a cabo el cultivo de las células MDBK y VERO, así como la preparación de los reactivos necesarios (ver Preparación de reactivos en Anexo) se empleó una cabina de flujo laminar (VECO<sup>®</sup>).

Las células MDBK y VERO en D-MEM - DMSO (medio para congelar) almacenadas en nitrógeno líquido, se descongelaron bruscamente, colocando los criotubos en agua a 37°C, se pipeteó el contenido y se depositó en botellas Falcon de 25 cm<sup>2</sup> las cuales contenían 3ml de D-MEM-SFB 10% y se incubaron a 37°C (incubadora para cultivo celular) hasta obtener una confluencia del 100% en cada botella.

Se realizó un monitoreo diario de los cultivos con ayuda de un microscopio de luz invertido y se realizaron los pases celulares (ver Técnicas realizadas en Apéndice) necesarios para los ensayos de una a dos veces por semana.

## **4.3 ENFRENTAMIENTO CÉLULA-EXTRACTO**

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, en cada ensayo se utilizaron dos botellas Falcon de 25cm<sup>2</sup> con células al 100% de confluencia. Se tripsinizaron las células para desprender la monocapa, las células se transfirieron a un tubo de vidrio para centrifuga de 50ml estéril y se adicionó D-MEM sin SFB hasta un volumen final de 22 ml. De esta suspensión de células se tomaron 200µl y se colocaron en un vial eppendorf que contenía un volumen igual del colorante Azul de Tripán para realizar un conteo celular en un cámara de Neubauer. (ver Técnicas realizadas en Anexo).

En 6 viales estériles de 10 ml se prepararon los problemas y los controles según como se muestra en la Tabla 4. Posteriormente en dos microplacas estériles de 96 pozos (una para cada extracto) se colocaron 100µl de D-MEM sin SFB en cada pozo, excepto en la columna 1. En la columna antes mencionada se colocaron 200µl de extracto, a partir de aquí se tomaron 100µl y se procedió a realizar diluciones dobles hasta la columna 9. De la columna 1 a la 9 se adicionaron 100µl de células. Cada 2 filas de la microplaca corresponden a cada una de las concentraciones de SFB que se prepararon (10%, 6%, 2% y 0.25%). El volumen final de cada uno de los pozos es de 200µl.

Las columnas 10, 11 y 12 corresponden al blanco, control positivo y control negativo respectivamente.

Los pozos de la columna blanco solo contienen 100µl de extracto y 100µl de D-MEM sin SFB. Con respecto al control positivo los pozos contienen 100µl de D-MEM y 100µl de suspensión de células con SFB al 10%, a diferencia del positivo, a la suspensión de células del control negativo no se le adicionó SFB.

**NOTA:** Al transferir los 100µl de la suspensión de células de los viales a los pozos que ya contienen 100µl de D-MEM el SFB se diluye, por esto es necesario preparar los viales al doble del porcentaje deseado.

**Tabla 4.** Preparación de los problemas y controles para el ensayo

Vial	µl SFB	ml Suspensión de células	% de SFB en vial	% de SFB en pozos
1	800	4	20	10
2	480	4	12	6
3	160	4	4	2
4	20	4	0.5	0.25
5	400	2	20	10
6	----	2	0	0



---

---

#### 4.4 MEZCLA DE LOS EXTRACTOS DE CALÉNDULA Y CUACHALALATE

Para el enfrentamiento de las células con una mezcla de Caléndula y Cuachalalate se siguió el mismo procedimiento que en el caso del enfrentamiento célula-extracto por separado, la diferencia únicamente radica en la preparación de las diluciones de los extractos en la microplaca. Para este ensayo en la columna 1 se colocaron 100µl de extracto de cuachalalate y 100µl de extracto de caléndula, en lugar de los 200µl de un solo extracto. A partir de aquí el procedimiento a seguir es exactamente el mismo.

#### 4.5 PRUEBA CUANTITATIVA. MÉTODO DE MTT

Las microplacas se sellaron y se incubaron a 37°C, a las 24 horas se observaron en un microscopio de luz invertido para verificar la confluencia celular en cada uno de los pozos y determinar si era factible realizar la prueba cuantitativa de MTT.

El tiempo de incubación varió en cada línea celular siendo de 24 horas para las células MDBK y de 72 horas para las células VERO.

Una vez que se observó que la confluencia celular era del 100% se procedió, bajo condiciones de esterilidad (cabina de flujo laminar), a retirar el medio por decantación. Después las microplacas se lavaron con PBS estéril, el cual se adicionó con pipetas desechables estériles de 5 ml, este se desechó de igual manera por decantación y se repitió el procedimiento hasta la eliminación total del medio. Se adicionaron 40µl de PBS y 10µl del reactivo de MTT a cada pozo y se dejó incubar durante 3 horas a 37°C. Después de este tiempo se adicionó el reactivo de paro, que es alcohol Isopropílico (ver Preparación de reactivos en Anexo). Finalmente se leyeron las placas en un Elisómetro o Lector de ELISA a una longitud de onda de 540 nm.

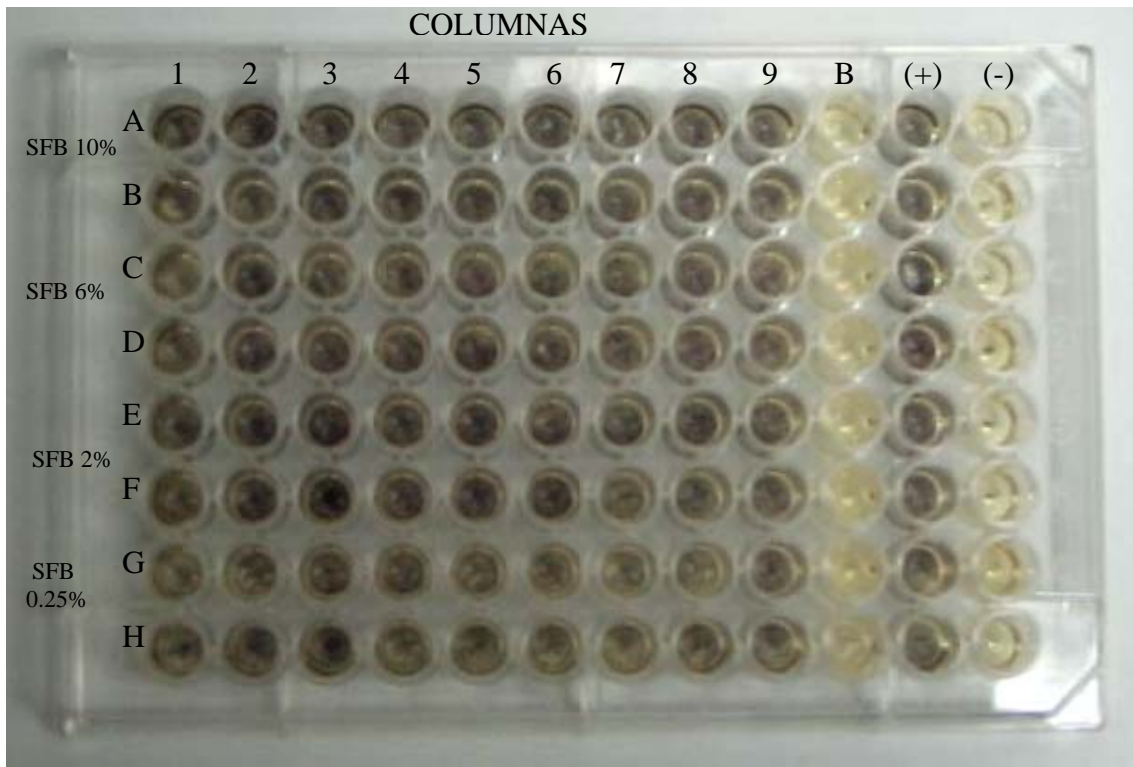
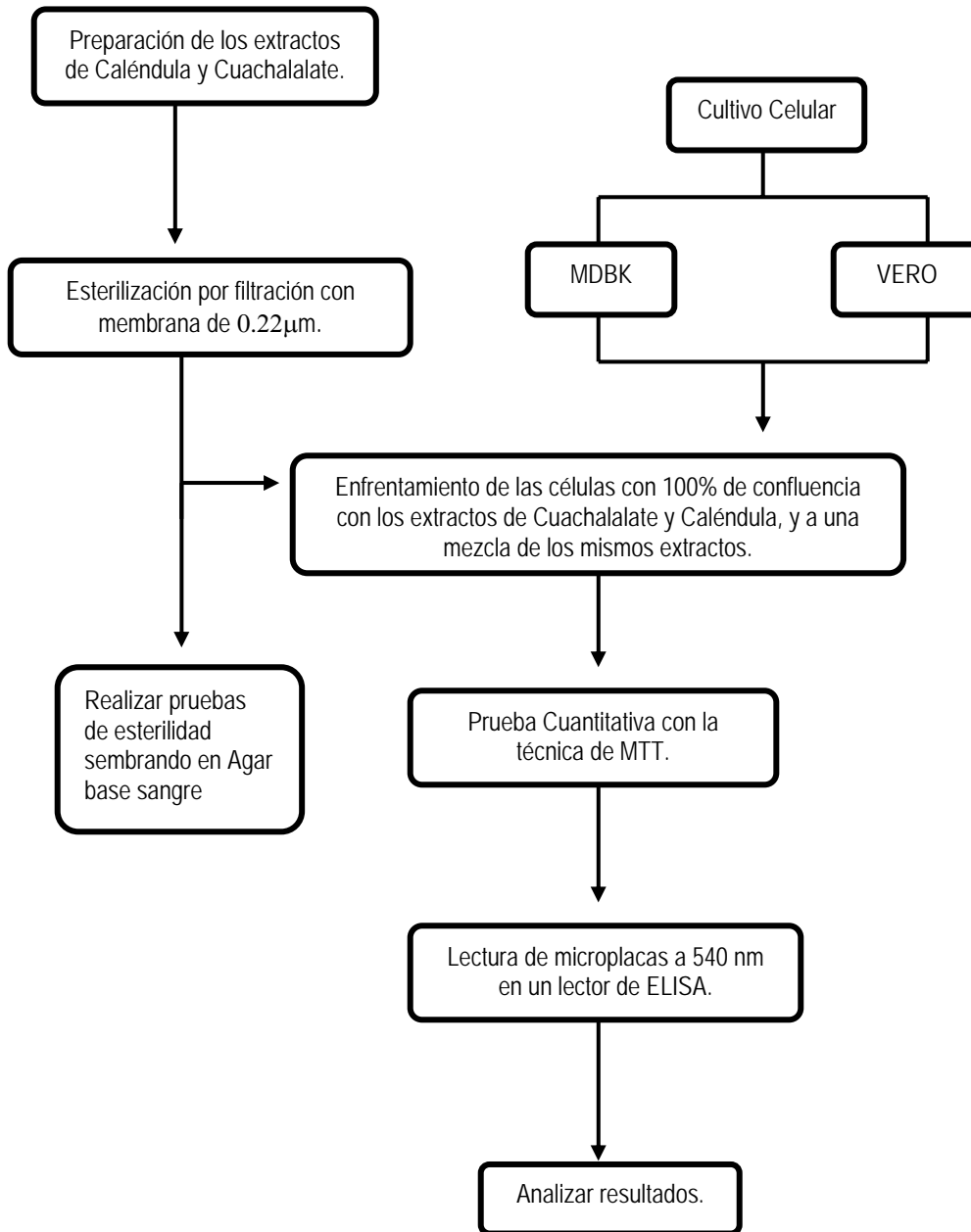


Fig. 7 Placa de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular

La intensidad del cambio de color del MTT es proporcional al número de células viables, por lo tanto con esta prueba determinamos cuantitativamente si hubo una mayor, igual o menor estimulación de la proliferación de las células que se enfrentaron con los extractos en comparación a la proliferación de las células en el control positivo, es decir, si la absorbancia del problema fue mayor que la absorbancia del control positivo, se evidenció que el extracto funcionó como un promotor de proliferación celular, en tanto que si la absorbancia del problema fue menor que la absorbancia del control positivo, el extracto tuvo un efecto citotóxico.

---

## 5. DIAGRAMA DE TRABAJO



---

---

## RESULTADOS

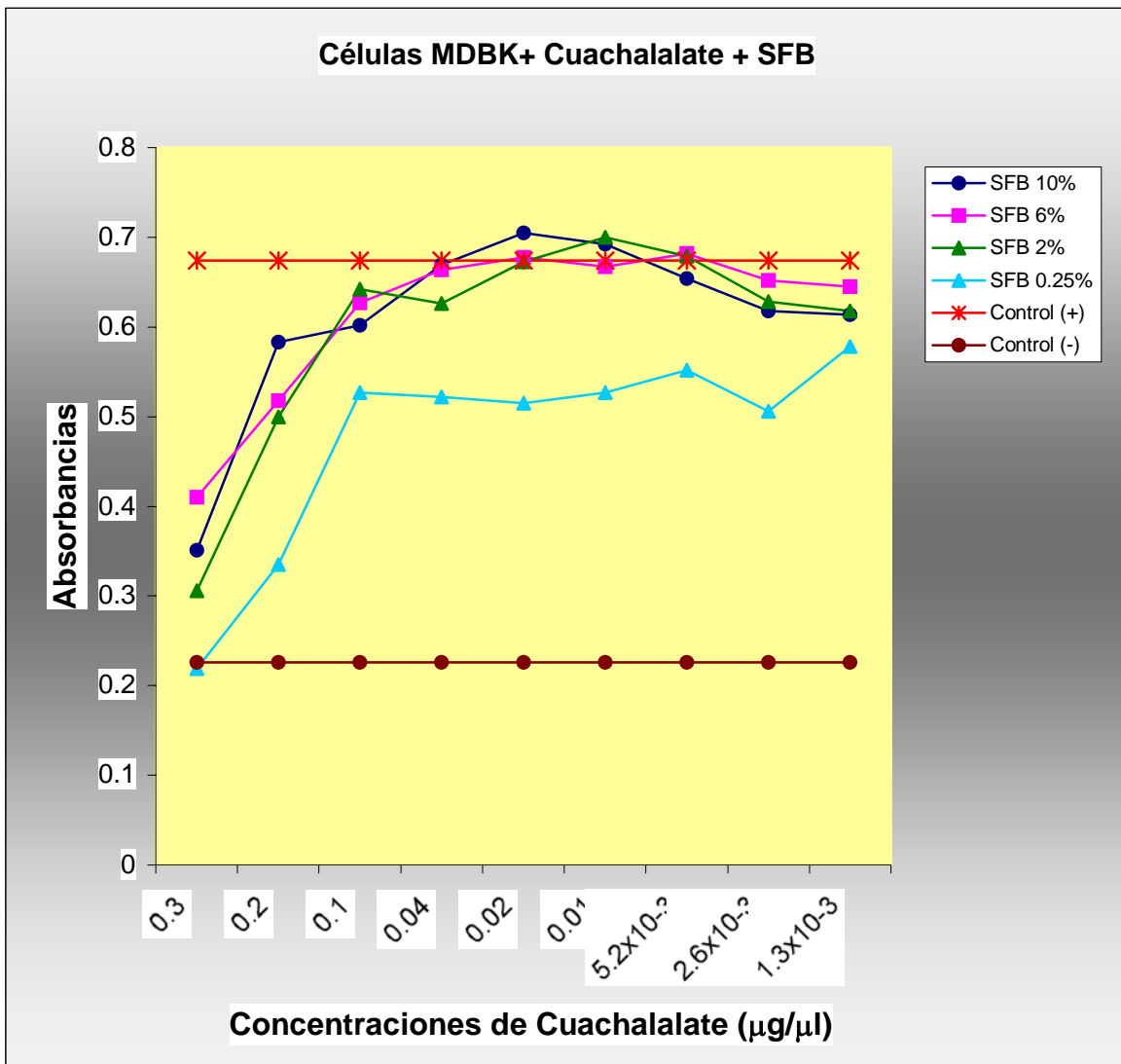
### 6.1 EFECTO DEL EXTRACTO DE CUACHALALATE SOBRE LAS CÉLULAS MDBK

Las diferentes concentraciones del extracto de Cuachalalate se muestran en la **Tabla 5** así como las absorbancias obtenidas con la técnica cuantitativa de MTT. En las columnas 5, 6 y 7 se obtuvieron las absorbancias que son mayores que la absorbancia del control positivo. En este ensayo se adicionaron a las microplacas un promedio de 21,000 células por cada pozo y se incubaron durante 24 hrs. a una temperatura de 37°C. En la **Gráfica 1** se observan las variaciones en la proliferación celular a diferentes concentraciones de SFB y extracto de Cuachalalate.

**Tabla 5.** Células MDBK + Cuachalalate + SFB. Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 540 nm.

columna	Conc. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Cuachalalate	Absorbancia SFB 10%	Absorbancia SFB 6%	Absorbancia SFB 2%	Absorbancia SFB 0.25%
1	0.3	0.351	0.410	0.306	0.219
2	0.2	0.583	0.518	0.500	0.335
3	0.1	0.602	0.627	0.642	0.527
4	0.04	0.669	0.664	0.626	0.522
5	0.02	0.705	0.678	0.673	0.515
6	0.01	0.692	0.667	0.700	0.527
7	$5.2 \times 10^{-3}$	0.654	0.682	0.679	0.552
8	$2.6 \times 10^{-3}$	0.618	0.652	0.628	0.506
9	$1.3 \times 10^{-3}$	0.614	0.645	0.618	0.578

	Absorbancia
Control (+)	0.674
Control (-)	0.226
Blanco	0.228



Grafica 1. Absorbancia con respecto a la concentración del extracto de cuachalalate a diferentes cantidades de SFB.

Con estos datos se determinó que la concentración óptima para la proliferación celular se encuentra dentro del rango de  $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  a  $5.2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Las células proliferaron adecuadamente aún cuando la concentración de SFB se disminuyó al 2%, pero fue notorio un efecto citotóxico cuando el SFB se disminuyó a 0.25% y cuando el extracto se encontraba en mayores concentraciones, esto se determinó al observar células con morfología anormal (formación de vacuolas).

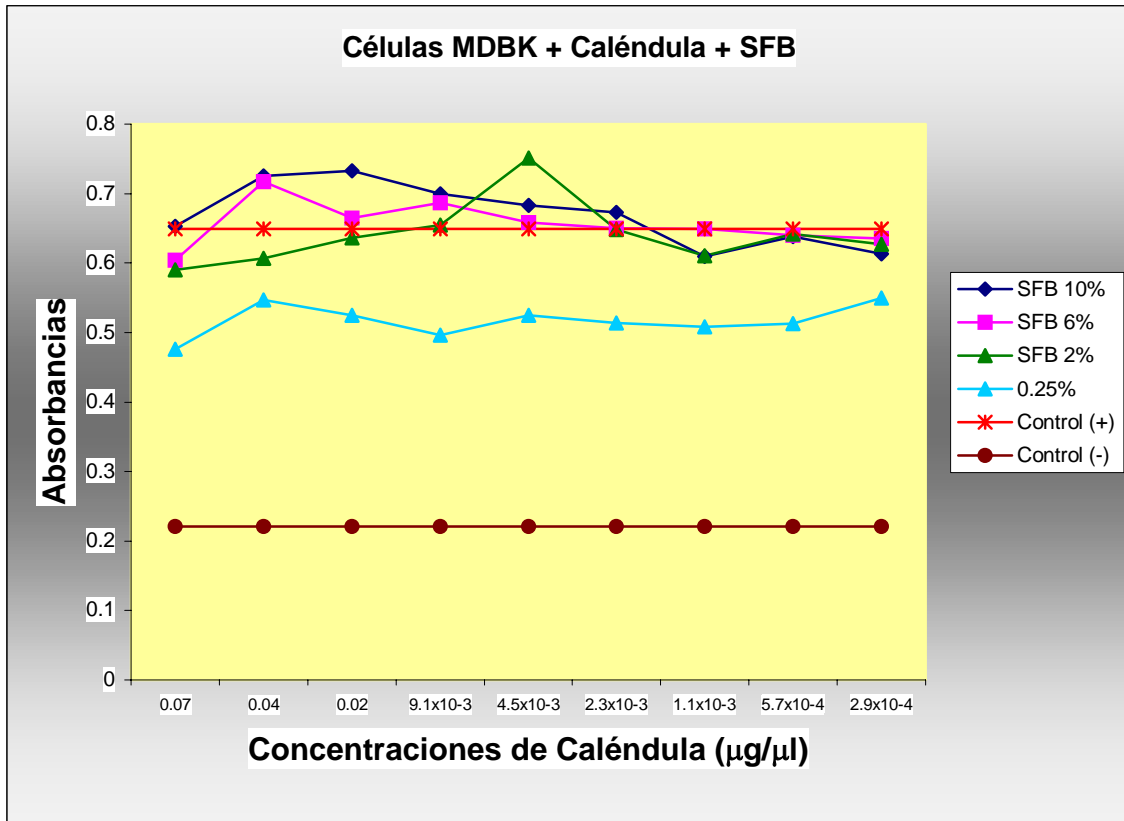
## 6.2 EFECTO DEL EXTRACTO DE CALÉNDULA SOBRE LAS CÉLULAS MDBK

En la **Tabla 6** se presentan las absorbancias que se obtuvieron al enfrentar a las células MDBK con el extracto de Caléndula, así como las diferentes concentraciones del extracto. Nótese las absorbancias mayores que la absorbancia del control positivo. En promedio se adicionaron 21,000 células por pozo y se incubaron por 24 horas a 37°C. En la **Gráfica 2** se observan las variaciones en la proliferación celular a diferentes concentraciones de SFB y extracto de Caléndula.

Tabla 6. Células MDBK + Caléndula + SFB. Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 540 nm.

columna	Conc. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Caléndula	Absorbancia SFB 10%	Absorbancia SFB 6%	Absorbancia SFB 2%	Absorbancia SFB 0.25%
1	0.07	0.653	0.604	0.590	0.476
2	0.04	0.725	0.717	0.607	0.547
3	0.02	0.733	0.665	0.636	0.525
4	$9.1 \times 10^{-3}$	0.700	0.687	0.655	0.496
5	$4.5 \times 10^{-3}$	0.683	0.658	0.751	0.525
6	$2.3 \times 10^{-3}$	0.673	0.650	0.648	0.514
7	$1.1 \times 10^{-3}$	0.609	0.649	0.610	0.508
8	$5.7 \times 10^{-4}$	0.638	0.640	0.642	0.513
9	$2.9 \times 10^{-4}$	0.613	0.635	0.627	0.550

	Absorbancia
Control (+)	0.649
Control (-)	0.221
Blanco	0.215



Grafica 2. Absorbancia con respecto a la concentración del extracto de caléndula a diferentes cantidades de SFB.

En el caso del extracto de Caléndula, se determinó que la concentración óptima para la proliferación celular se encuentra dentro del rango de 0.04μg/μl a 4.5x10<sup>-3</sup>μg/μl. También se observó una mayor proliferación celular en comparación con la que se obtuvo al enfrentar las células con el extracto de Cuachalalate, sin embargo, el extracto de Caléndula provocó el mismo efecto citotóxico que el extracto de Cuachalalate cuando el SFB se disminuyó a 0.25% y cuando el extracto se encontraba en una mayor concentración.

---

---

### 6.3 EFECTO DE LA MEZCLA DE LOS EXTRACTOS SOBRE LAS CÉLULAS MDBK

En la **Tabla 7** se presentan las absorbancias que se obtuvieron al enfrentar las células MDBK a una mezcla de los extractos de Caléndula y Cuachalalate. El promedio de células fue de 21,000 por pozo y se incubaron 24 horas a 37°C

Se observó una mejoría en cuanto al efecto citotóxico de los extractos al disminuir el SFB al 0.25%, sin embargo, también se observó un aumento de citotoxicidad cuando los extractos se encontraban a mayores concentraciones.

En este ensayo se determinó que las concentraciones óptimas para la proliferación celular se encuentran dentro de un rango de 0.02/ 0.4 µg/µl (Caléndula/Cuachalalate) a  $1.1 \times 10^{-3}$ /0.03 µg/µl (Caléndula/Cuachalalate). A diferencia de cuando las células se enfrentaron a los extractos por separado, en este ensayo no se observó un efecto citotóxico severo aún cuando los extractos se encontraban más concentrados y al disminuir el SFB a 0.25%.

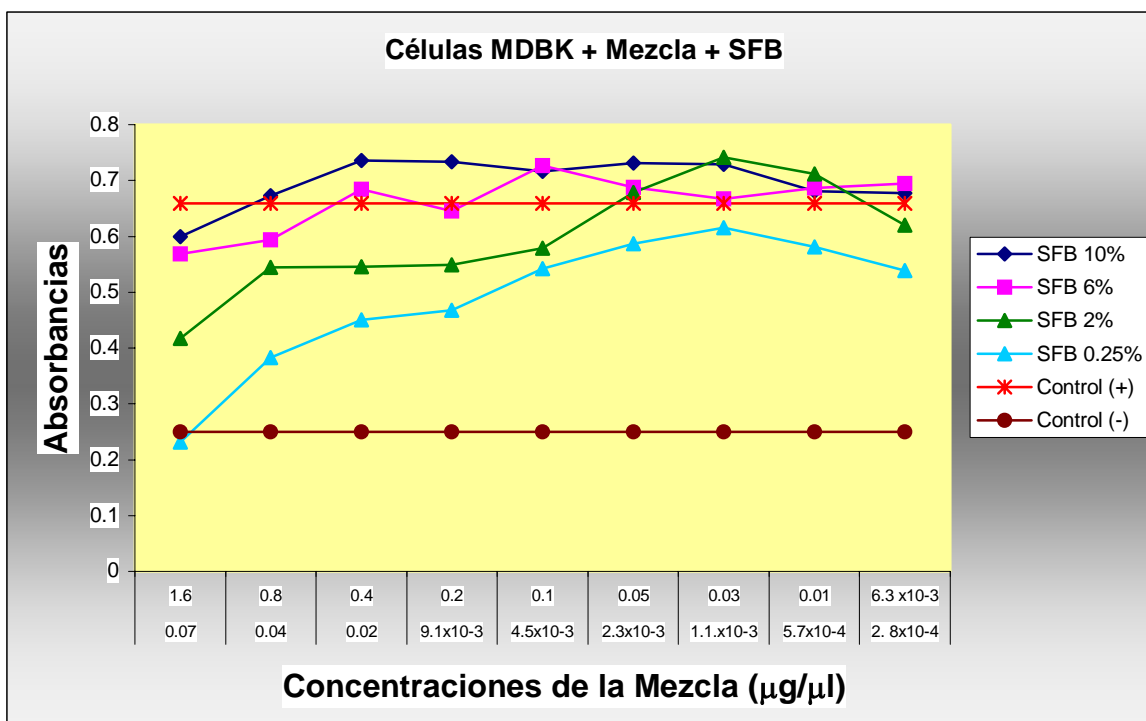
En el **Gráfico 3** se observan las variaciones en la proliferación celular a diferentes concentraciones de SFB y la mezcla de los extractos.



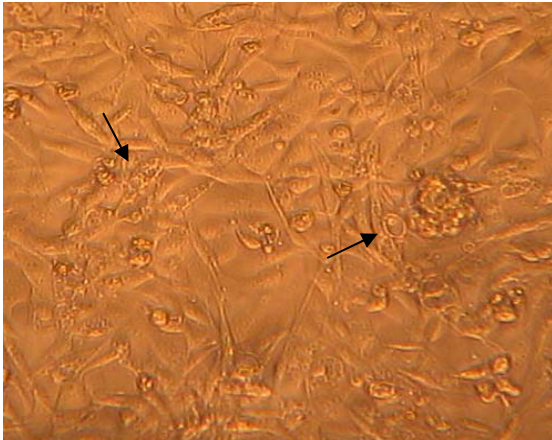
Tabla 7. Células MDBK + Mezcla + SFB. Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 540 nm.

columna	Conc. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$		Absorbancia SFB 10%	Absorbancia SFB 6%	Absorbancia SFB 2%	Absorbancia SFB 0.25%
	Caléndula	Cuachalalate				
1	0.07	1.6	0.600	0.568	0.417	0.231
2	0.04	0.8	0.673	0.594	0.544	0.383
3	0.02	0.4	0.736	0.684	0.545	0.450
4	$9.1 \times 10^{-3}$	0.2	0.733	0.645	0.549	0.468
5	$4.5 \times 10^{-3}$	0.1	0.716	0.727	0.579	0.542
6	$2.3 \times 10^{-3}$	0.05	0.731	0.688	0.679	0.587
7	$1.1 \times 10^{-3}$	0.03	0.729	0.667	0.742	0.616
8	$5.7 \times 10^{-4}$	0.01	0.681	0.686	0.712	0.581
9	$2.8 \times 10^{-4}$	$6.3 \times 10^{-3}$	0.677	0.695	0.620	0.539

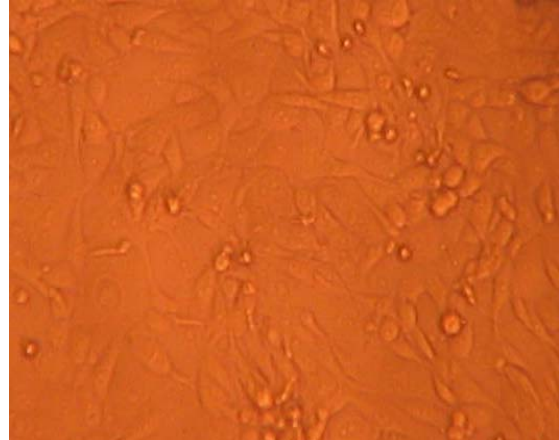
	Absorbancia
Control (+)	0.659
Control (-)	0.250
Blanco	0.238



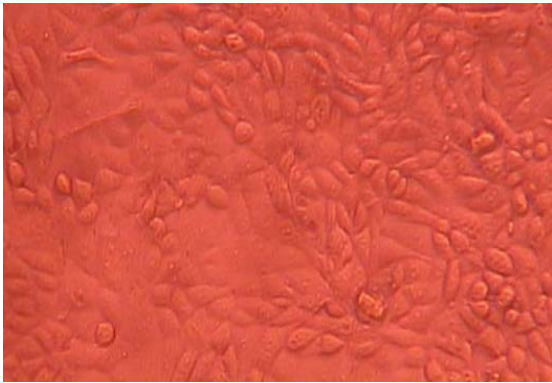
Grafica 3. Absorbancia con respecto a las concentraciones de la mezcla de los extractos a diferentes cantidades de SFB.



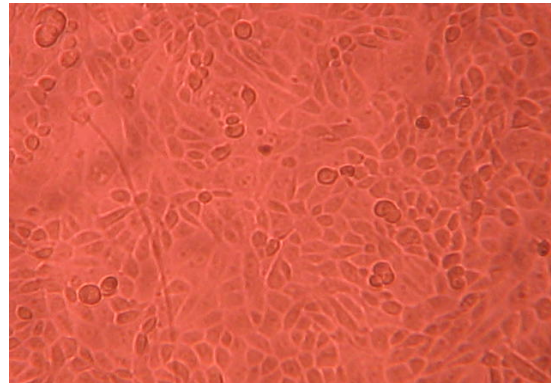
**Fig. 8** Células MDBK + Cuachalalate + SFB 10%. Nótese el daño en las células. Concentración:  $0.3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Objetivo: 10x



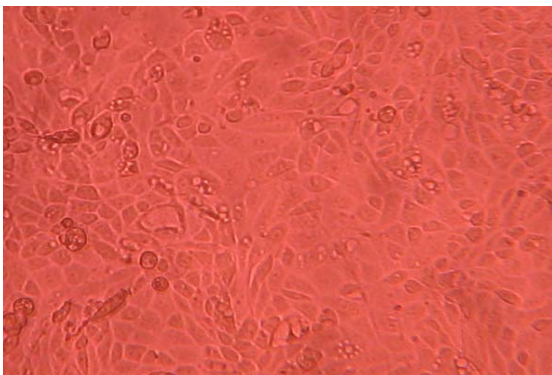
**Fig. 9** Células MDBK + Mezcla + SFB 10%. Nótese la mejoría en la morfología celular. Concentración:  $0.07/1.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Caléndula/Cuachalalate). Objetivo: 40x



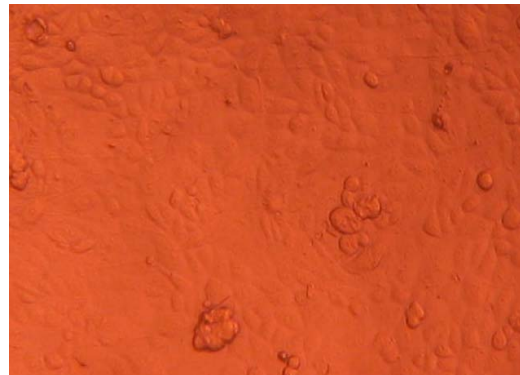
**Fig. 10** Células MDBK + Caléndula + SFB 6%. Objetivo: 10x



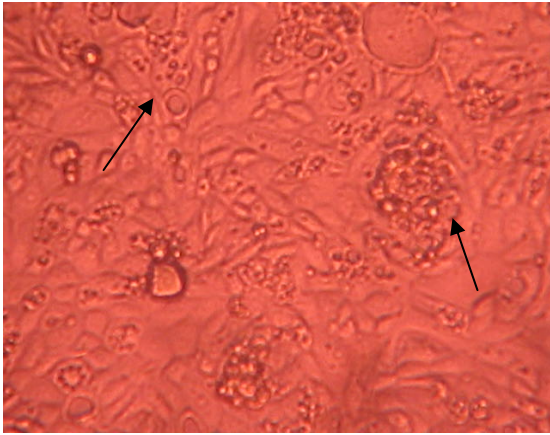
**Fig. 11** Células MDBK + Cuachalalate + SFB 6%. Objetivo: 10x



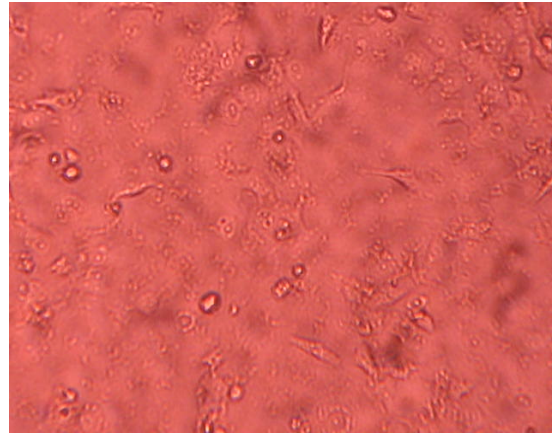
**Fig. 12** Células MDBK + Caléndula + SFB 2%. Objetivo: 10x. Nótese que aunque la confluencia es buena, la morfología de las células es anormal.



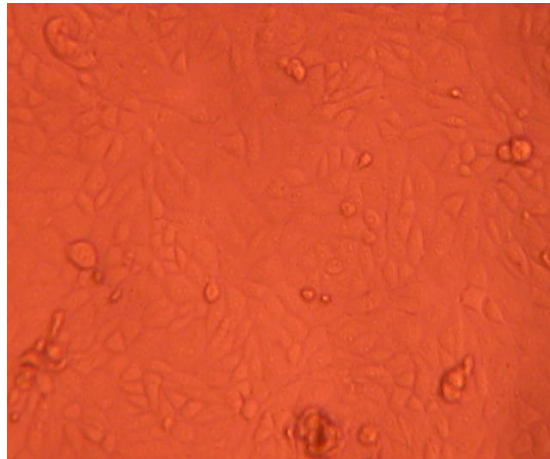
**Fig. 13** Células MDBK + Mezcla + SFB 2%. Objetivo: 10x. Nótese la confluencia y la morfología normal de las células.



**Fig. 14** Células MDBK + Caléndula + SFB 0.25%.  
Objetivo: 10x. Nótese el efecto citotóxico.  
Concentración:  $2.8 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$



**Fig. 15** Células MDBK + Cuachalalate + SFB 0.25%.  
Objetivo: 10x. La confluencia celular es mínima.  
Concentración:  $1.3 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$



**Fig. 16** Células MDBK + Mezcla + SFB 0.25%.  
Objetivo: 10x. Nótese la confluencia celular y la normalidad de la morfología. Concentración:  $2.8 \times 10^{-4} / 6.3 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Caléndula /Cuachalalate).

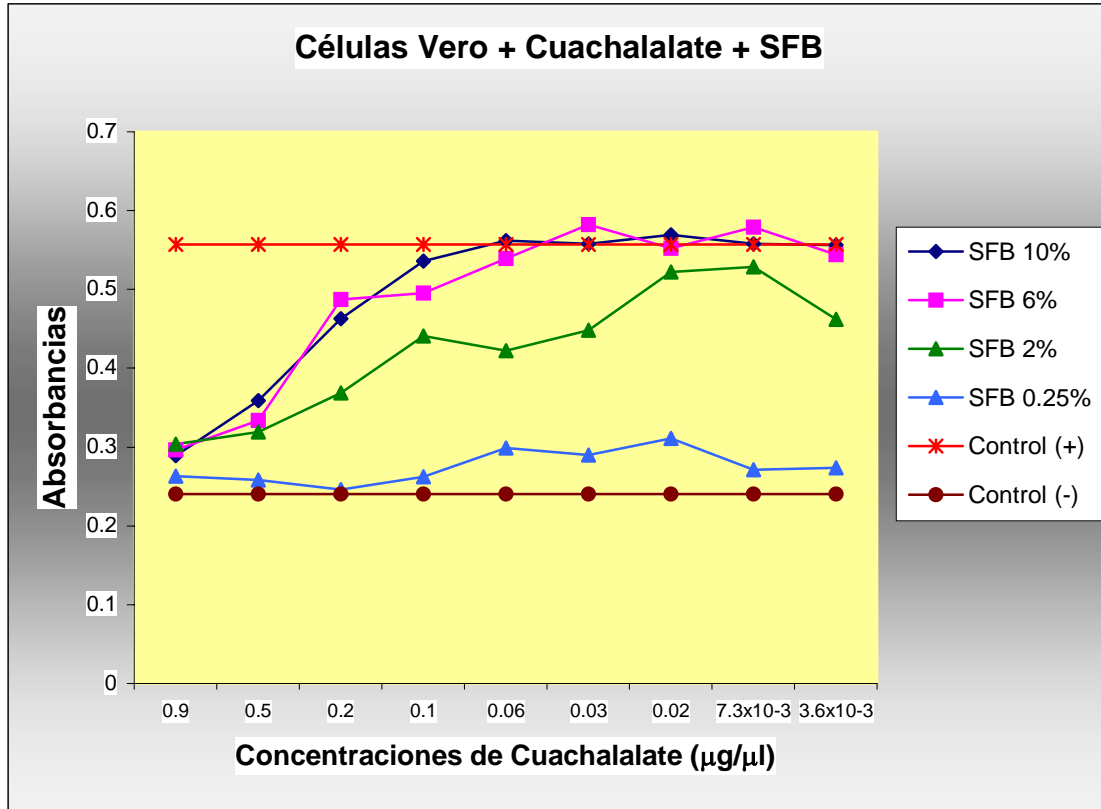
## 6.4 EFECTO DEL EXTRACTO DE CUACHALALATE SOBRE LAS CÉLULAS VERO

En la **Tabla 8** se presentan los promedios de las absorbancias obtenidas después de realizar la prueba cuantitativa de MTT y haber enfrentado las células VERO con el extracto de Cuachalalate así como las diferentes concentraciones del extracto. En este ensayo se adicionaron en promedio 13,000 células por pozo y se incubaron 72 horas a 37°C. En la **Gráfica 4** se observan las variaciones en la proliferación celular a diferentes concentraciones de SFB y extracto de Cuachalalate.

**Tabla 8.** Células VERO + Cuachalalate + SFB. Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 540 nm.

columna	Conc. µg/µl Cuachalalate	Absorbancia SFB 10%	Absorbancia SFB 6%	Absorbancia SFB 2%	Absorbancia SFB 0.25%
1	0.9	0.289	0.296	0.304	0.263
2	0.5	0.359	0.334	0.319	0.258
3	0.2	0.463	0.487	0.369	0.246
4	0.1	0.536	0.495	0.441	0.262
5	0.06	0.562	0.539	0.422	0.299
6	0.03	0.558	0.582	0.448	0.290
7	0.02	0.569	0.552	0.522	0.311
8	7.3x10 <sup>-3</sup>	0.558	0.579	0.529	0.271
9	3.6x10 <sup>-3</sup>	0.556	0.544	0.462	0.274

	Absorbancia
Control (+)	0.557
Control (-)	0.240
Blanco	0.239



Gráfica 4. Absorbancia con respecto a la concentración del extracto de cuachalalate y diferentes cantidades de SFB.

Con las lecturas de absorbancia obtenidas se determinó que la concentración óptima para la proliferación de las células se encuentra dentro de un rango de 0.03 µg/µl a 3.6 x10<sup>-3</sup> µg/µl pero solo cuando el SFB se encuentra a una concentración de 10% y 6%, ya que cuando el SFB se disminuyó a 2% y 0.25% la proliferación celular se vio poco favorecida, observando un efecto citotóxico similar al producido en las células MDBK.

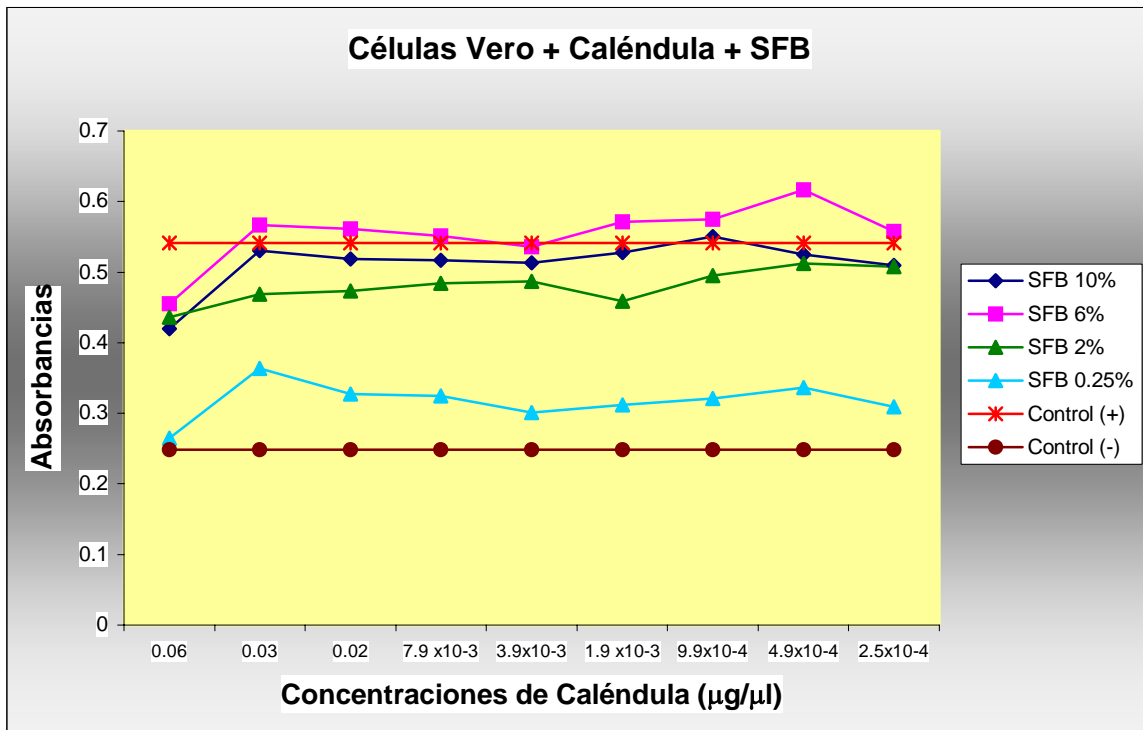
## 6.5 EFECTO DEL EXTRACTO DE CALÉNDULA SOBRE LAS CÉLULAS VERO

En la **Tabla 9** se muestran los promedios de las absorbancias obtenidas después de enfrentar a las células VERO con el extracto de Caléndula. Se adicionaron en promedio 13,000 células por pozo y se incubaron 72 horas a 37°C. En la **Gráfica 5** se observan las variaciones en la proliferación celular a diferentes concentraciones de SFB y extracto de Caléndula.

Tabla 9. Células VERO + Caléndula + SFB. Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 540 nm.

columna	Conc. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Caléndula	Absorbancia SFB 10%	Absorbancia SFB 6%	Absorbancia SFB 2%	Absorbancia SFB 0.25%
1	0.06	0.420	0.455	0.436	0.265
2	0.03	0.530	0.567	0.469	0.364
3	0.02	0.519	0.561	0.473	0.327
4	$7.9 \times 10^{-3}$	0.517	0.551	0.484	0.325
5	$3.9 \times 10^{-3}$	0.513	0.536	0.487	0.301
6	$1.9 \times 10^{-3}$	0.528	0.571	0.459	0.312
7	$9.9 \times 10^{-4}$	0.550	0.575	0.495	0.321
8	$4.9 \times 10^{-4}$	0.525	0.617	0.512	0.336
9	$2.5 \times 10^{-4}$	0.510	0.558	0.508	0.309

	Absorbancia
Control (+)	0.541
Control (-)	0.248
Blanco	0.253



Gráfica 5. Absorbancia con respecto a la concentración del extracto de caléndula y diferentes cantidades de SFB.

---

---

En este ensayo se determinó que la concentración óptima para la proliferación de las células se encuentra dentro del rango de  $1.9 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  a  $2.5 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , sin embargo, a estas concentraciones también se observó una notable disminución de la proliferación celular cuando el SFB se disminuyó al 0.25%.

## 6.6 EFECTO DE LA MEZCLA DE LOS EXTRACTOS SOBRE LAS CÉLULAS VERO

En la **Tabla 10** se presentan las absorbancias que se obtuvieron al enfrentar las células VERO a una mezcla de los extractos de Caléndula y Cuachalalate. El promedio de células fue de 6,000 por pozo y se incubaron 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

En este ensayo no se observó una mejoría en cuanto al efecto citotóxico de los extractos al disminuir el SFB al 0.25%, sin embargo, se observó un aumento en la proliferación celular cuando el SFB se encontraba al 10% y al 6%.

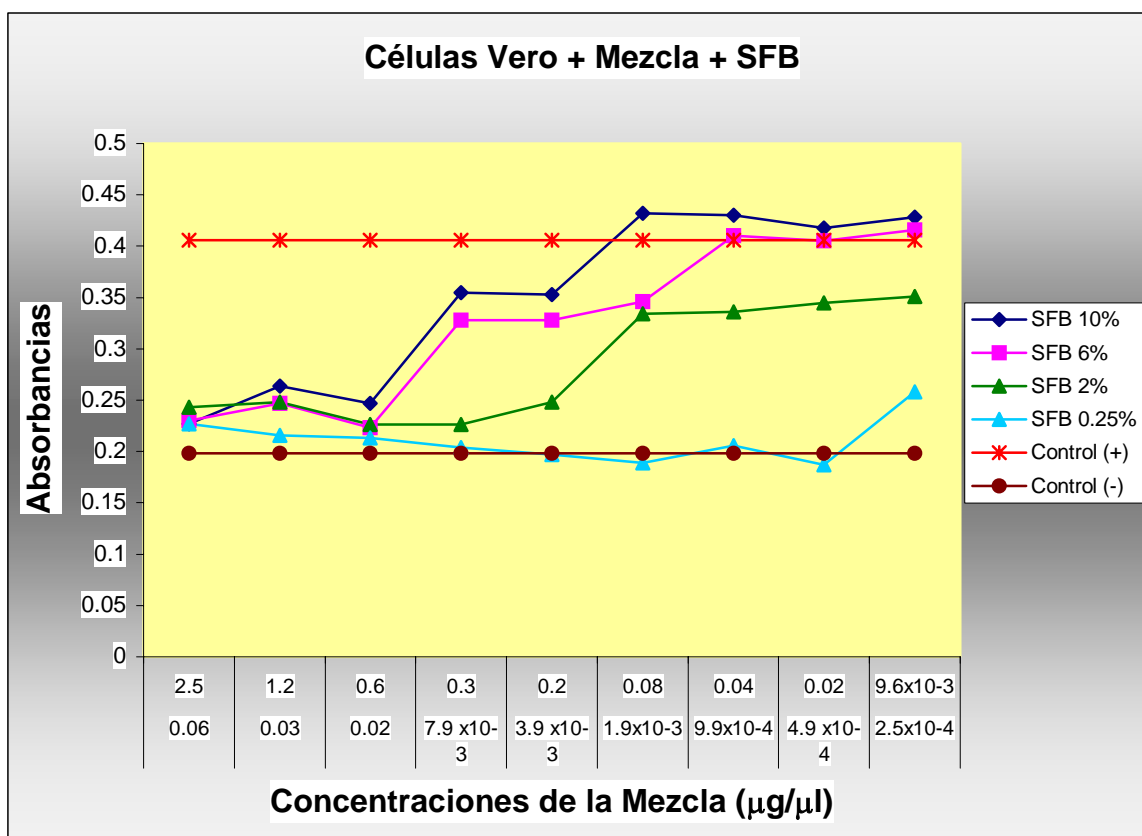
En este ensayo se determinó que las concentraciones óptimas para la proliferación celular se encuentran dentro de un rango de  $1.9 \times 10^{-3} / 0.08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Caléndula/Cuachalalate) a  $2.5 \times 10^{-4} / 9.6 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Caléndula/Cuachalalate). Al igual que cuando las células se enfrentaron a los extractos por separado, en este ensayo se observó un efecto citotóxico al disminuir el SFB a 2% y 0.25%.

En el **Gráfico 6** se observan las variaciones en la proliferación celular a diferentes concentraciones de SFB y la mezcla de los extractos.

Tabla 10. Células VERO + Mezcla + SFB. Promedio de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 540 nm.

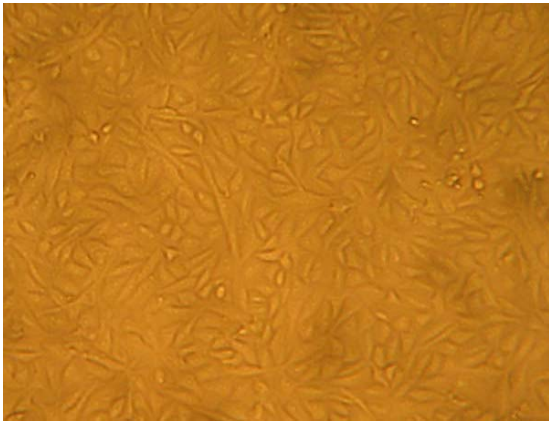
columna	Conc. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$		Absorbancia SFB 10%	Absorbancia SFB 6%	Absorbancia SFB 2%	Absorbancia SFB 0.25%
	Caléndula	Cuachalalate				
1	0.06	2.5	0.227	0.23	0.243	0.227
2	0.03	1.2	0.264	0.247	0.248	0.216
3	0.02	0.6	0.247	0.223	0.226	0.213
4	$7.9 \times 10^{-3}$	0.3	0.355	0.328	0.226	0.204
5	$3.9 \times 10^{-3}$	0.2	0.353	0.328	0.248	0.197
6	$1.9 \times 10^{-3}$	0.08	0.432	0.346	0.334	0.189
7	$9.9 \times 10^{-4}$	0.04	0.43	0.41	0.336	0.206
8	$4.9 \times 10^{-4}$	0.02	0.418	0.405	0.345	0.187
9	$2.5 \times 10^{-4}$	$9.6 \times 10^{-3}$	0.428	0.416	0.351	0.258

	Absorbancia
Control (+)	0.406
Control (-)	0.198
Blanco	0.191

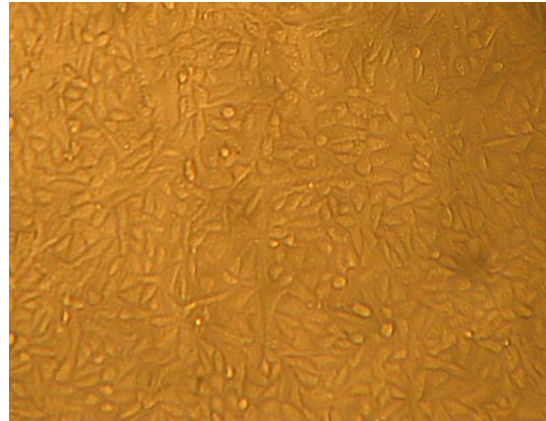


Gráfica 6. Absorbancia con respecto a las concentraciones de la mezcla de los extractos y diferentes cantidades de SFB.

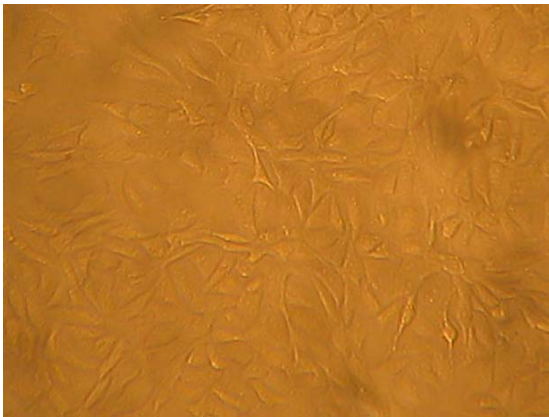




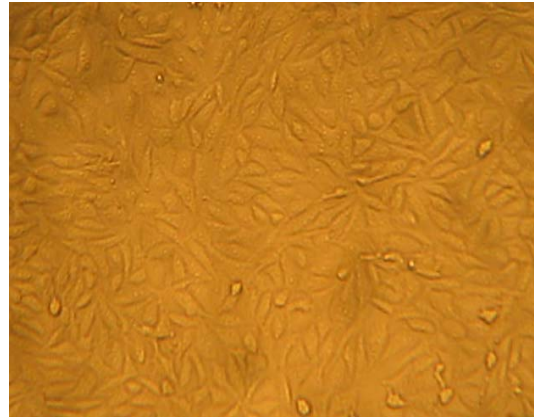
**Fig. 17** Células VERO + Mezcla + SFB 10%  
Concentración: 0.02 µg/µl



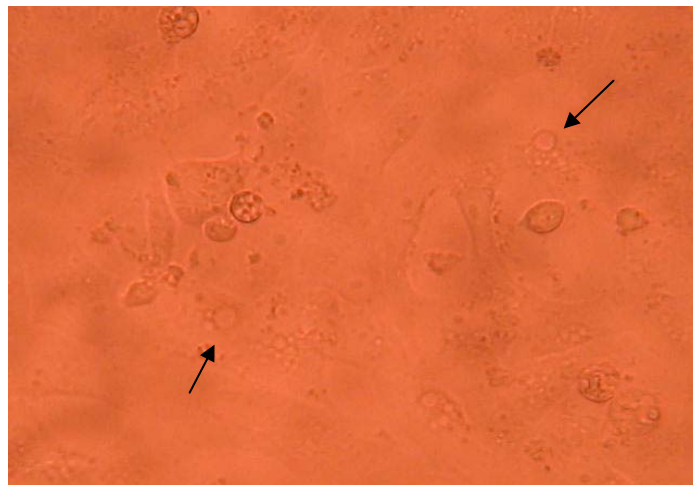
**Fig. 18** Células VERO + Calendula + SFB 6%  
Concentración:  $1.9 \times 10^{-3}$  µg/µl



**Fig. 19** Células VERO + Cuachalalate + SFB 6%  
Concentración: 0.03 µg/µl



**Fig. 20** Células VERO + Mezcla + SFB 6%  
Concentración:  $9.9 \times 10^{-4}$  / 0.04 µg/µl  
(Calendula/Cuachalalate)



**Fig. 21** Células VERO + Mezcla + SFB 0.25%  
Columna  $3.9 \times 10^{-3}$  / 0.2 µg/µl (Calendula/Cuachalalate).  
Efecto Citotóxico

---

---

## 6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si hay una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios o medias de las absorbancias obtenidas para cada extracto y el promedio o medias de las absorbancias de los controles positivos se realizó con ayuda del programa Statgraphics la prueba de Comparación de medias para dos muestras, obteniendo los siguientes resultados:

### 6.7.1 CÉLULAS MDBK + CUACHALALATE

Para el caso de las células MDBK con extracto de cuachalalate y SFB 10% se determinó que a una concentración de  $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  hay una diferencia estadísticamente significativa (P-value = 0.001) con respecto al control positivo.

A una concentración de  $5.2 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  para las células con SFB 6% y de  $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  para las células con SFB 2%, se determinó que no hay una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo (P-value = 0.59, P-value = 0.064 respectivamente), lo que nos indica que hay una proliferación celular semejante a la del control, por lo que el extracto está funcionando como promotor y compensa la disminución de SFB.

En el caso de las células con SFB 0.25% a una concentración de Cuachalalate mayor o igual a  $1.3 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  hay una diferencia estadísticamente significativa (P-value = 0.000002) con respecto al control positivo muy evidente, debida sobre todo a la citotoxicidad del extracto, con lo que podemos afirmar que a esta concentración el extracto no muestra un efecto favorable y que las células requieren de una mayor concentración de SFB para proliferar adecuadamente.

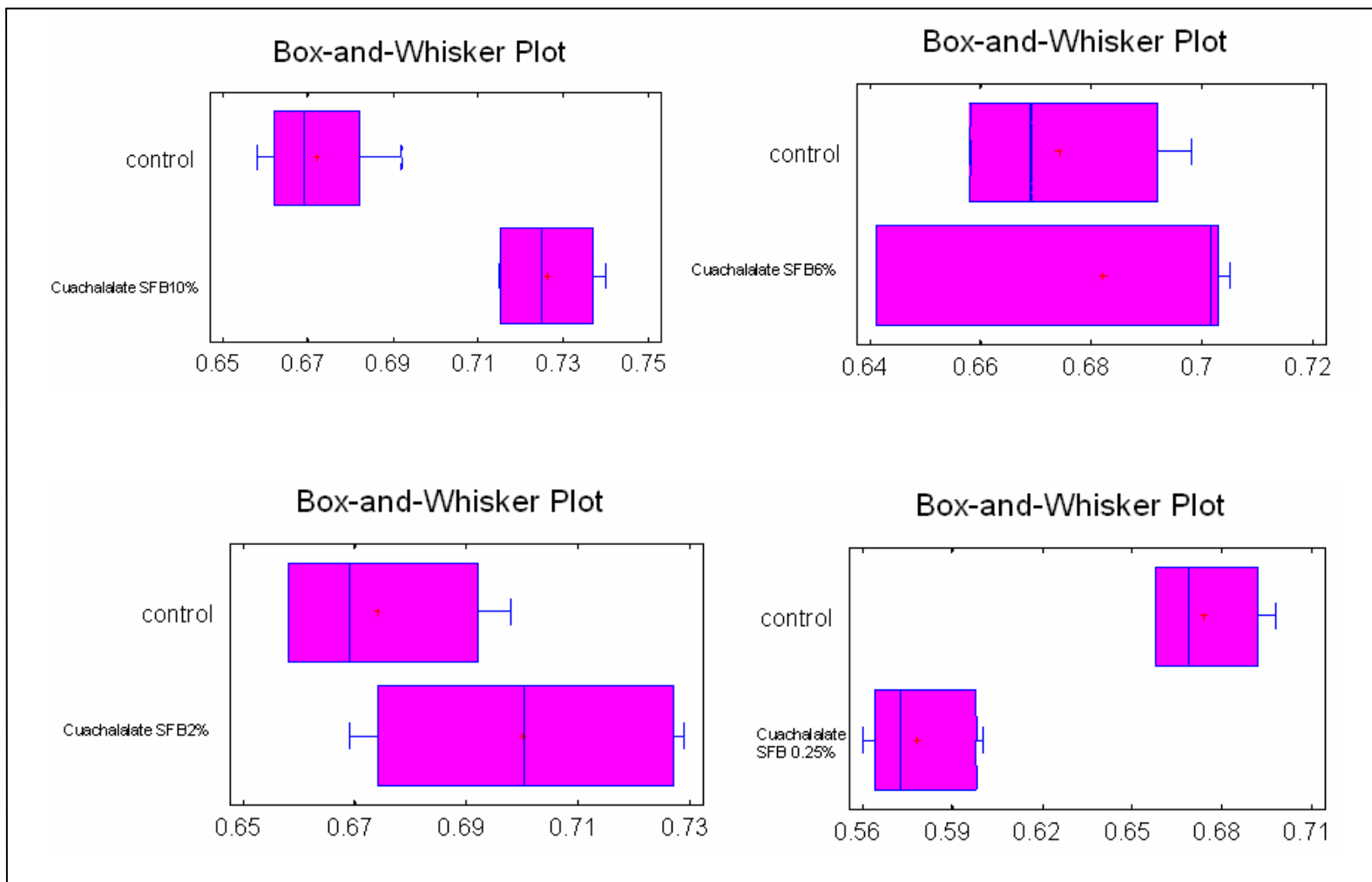


Fig. 22 Células MDBK + Cuachalalate + SFB. Representación gráfica de la Comparación de medias para dos muestras, obtenidos con ayuda del programa Statgraphics. Entre más lejanas estén las cajas rosas mayor será la diferencia estadística entre las medias a un intervalo de confianza del 95%.



---

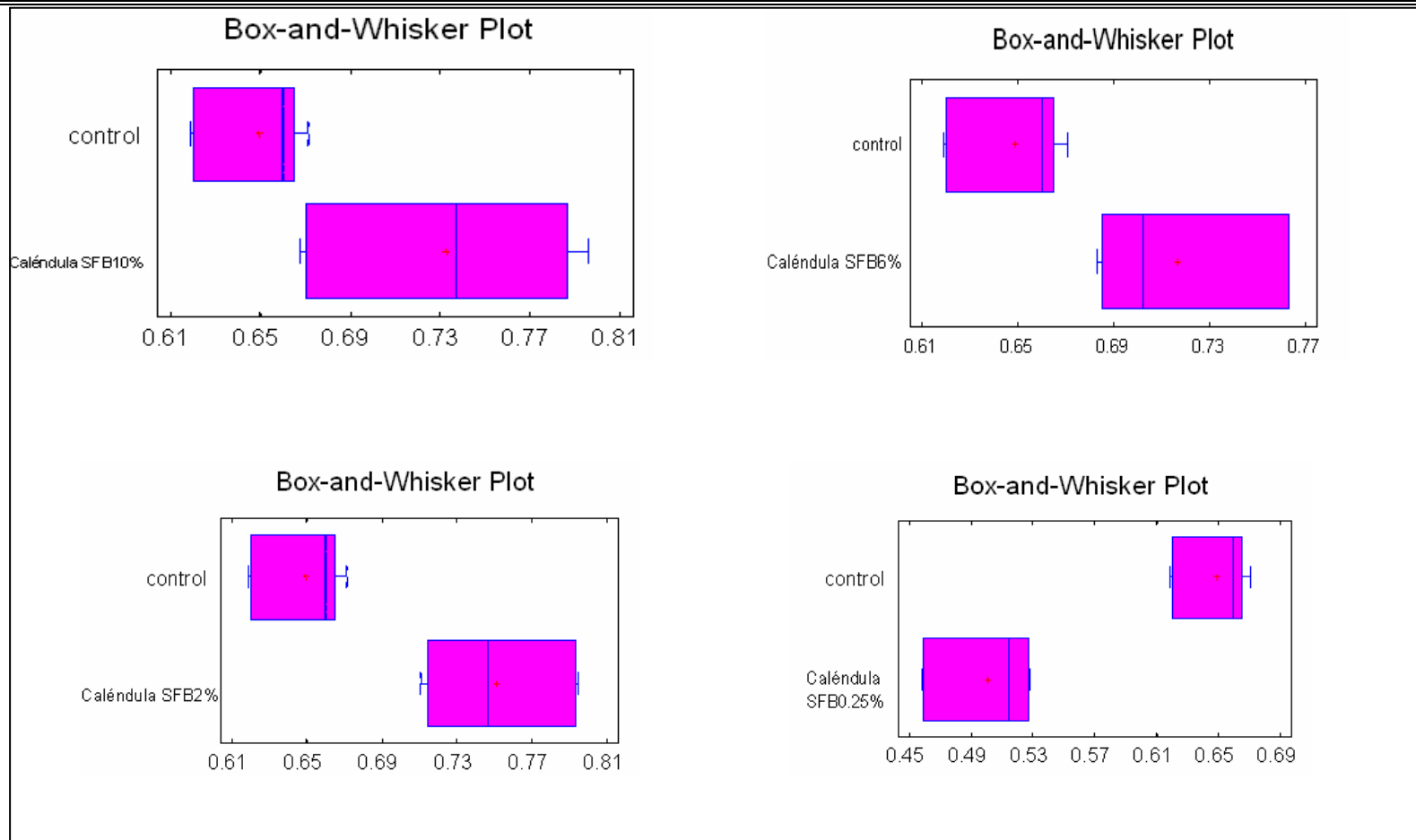
---

## 6.7.2 CÉLULAS MDBK + CALÉNDULA

En las células MDBK con extracto de Caléndula y SFB 10% se determinó que a una concentración de extracto de  $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  hay una diferencia estadísticamente significativa (P-value = 0.007) que muestra que las células están siendo estimuladas aún más que las células del control positivo.

Cuando las células se enfrentan al extracto de Caléndula a una concentración de  $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  agregando SFB 6% y a una concentración de  $4.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  agregando SFB 2%, hay una diferencia estadísticamente significativa (P-value = 0.004, P-value = 0.0002 respectivamente) con lo que se demuestra que hay una proliferación celular mayor que la del control positivo, sin embargo como ya se mencionó anteriormente, las células con extracto de Caléndula y SFB 2% morfológicamente presentan anormalidades al observarlas al microscopio, es decir, están proliferando pero el extracto también está teniendo un efecto negativo sobre la estructura celular (Fig.12).

Al igual que en el caso de las células con extracto de Cuachalalate y SFB 0.25%, la proliferación de las células con Caléndula y SFB 0.25% disminuyó y se presentó un efecto citotóxico por lo que estadísticamente hay una diferencia significativa (P-value = 0.000004) con respecto al control positivo.



**Fig. 23** Células MDBK + Caléndula + SFB. Representación gráfica de la Comparación de medias para dos muestras, obtenidos con ayuda del programa Statgraphics. Entre más lejanas estén las cajas rosas mayor será la diferencia estadística entre las medias a un intervalo de confianza del 95%.

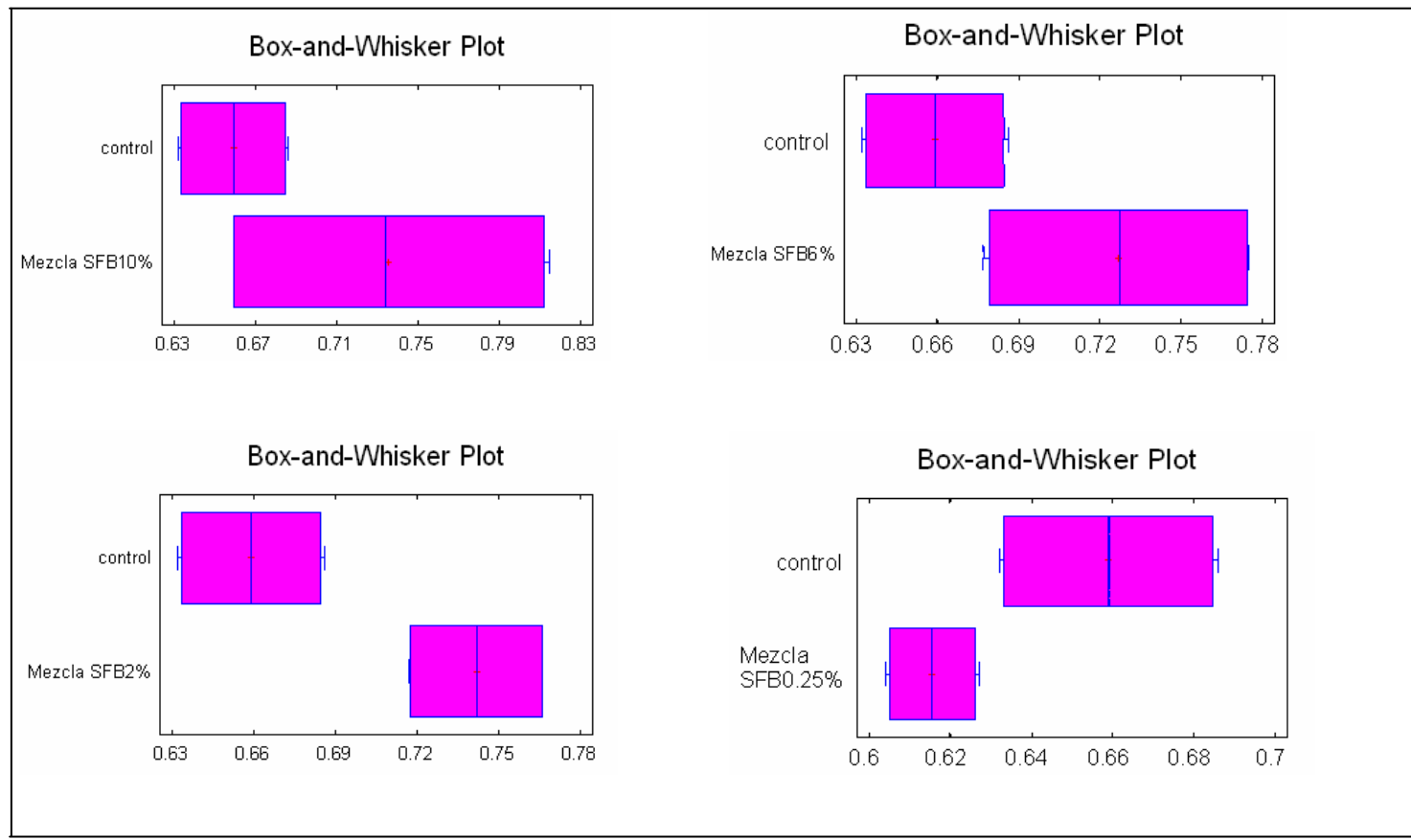
---

---

### 6.7.3 CÉLULAS MDBK + CALÉNDULA/CUACHALALATE

En el caso de las células que se enfrentaron con la mezcla de los extractos y a una concentración de SFB de 10% y 6%, no hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo (P-value = 0.2, P-value = 0.07 respectivamente).

Para las células con la mezcla y SFB 2% a las concentraciones de  $1.1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  /  $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Caléndula/Cuachalalate) se obtuvo un P-value = 0.007 lo que nos indica una diferencia estadísticamente significativa y que a estas concentraciones los extractos están favoreciendo la proliferación de las células y a diferencia del efecto de los extractos por separado, en este ensayo se observó que la citotoxicidad disminuye y se está compensando adecuadamente la disminución de SFB. Caso contrario es el efecto que se obtiene con las células con la mezcla y SFB 0.25% en donde P-value = 0.03 lo que indica una diferencia significativa pero que se debe a que la proliferación de las células es menor a la del control positivo, sin embargo es importante destacar que se observó una morfología celular normal y una ausencia de efecto citotóxico particularmente a las concentraciones de  $2.8 \times 10^{-4}$  /  $6.3 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Caléndula /Cuachalalate) (Fig. 16).



**Fig. 24** Células MDBK + Mezcla + SFB. Representación gráfica de la Comparación de medias para dos muestras, obtenidos con ayuda del programa Statgraphics. Entre más lejanas estén las cajas rosas mayor será la diferencia estadística entre las medias a un intervalo de confianza del 95%.

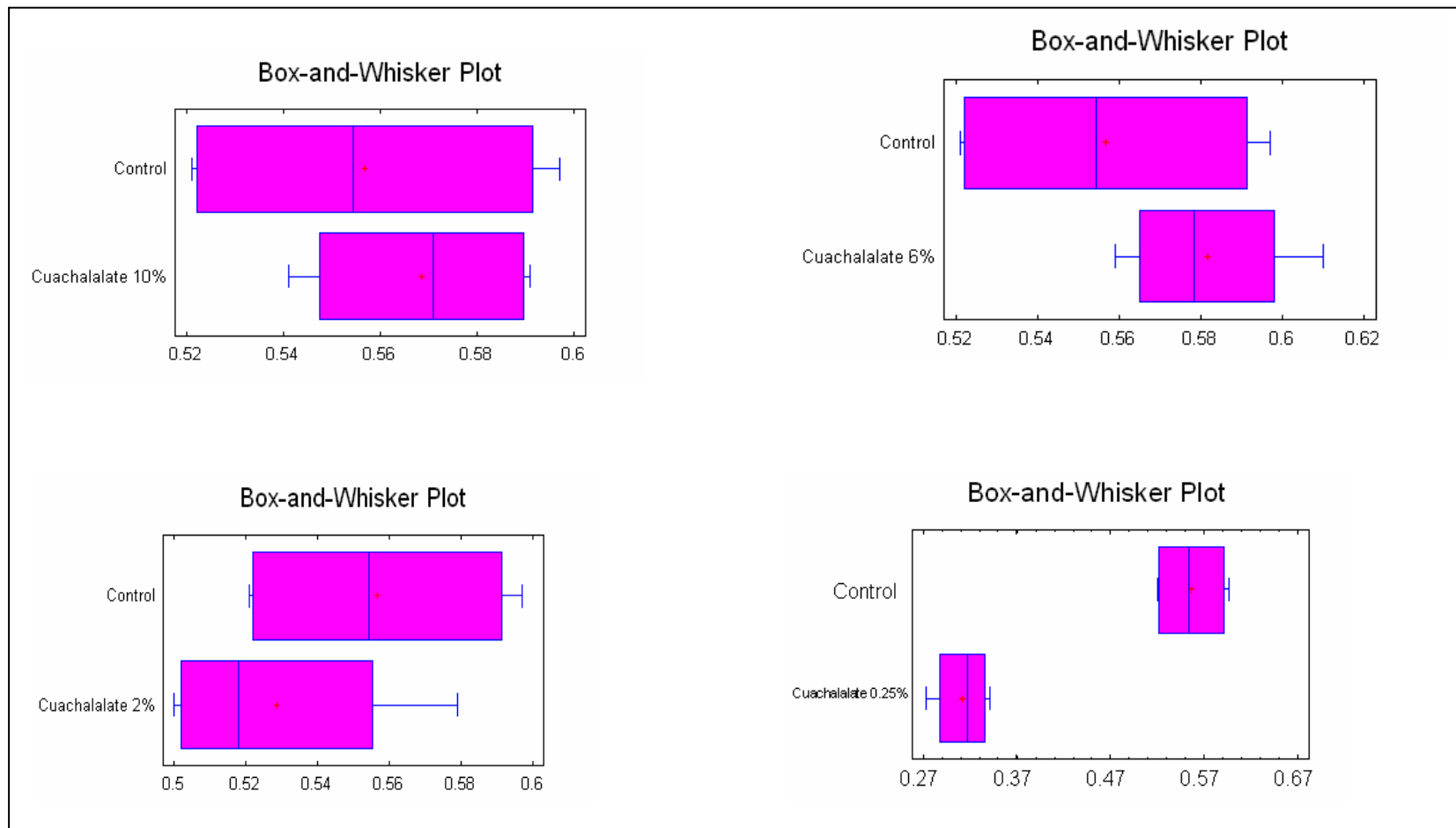


---

#### 6.7.4 CÉLULAS VERO + CUACHALALATE

Cuando se adiciona SFB al 10%, 6% y 2 % los valores de P son 0.6, 0.3 y 0.3, respectivamente, que estadísticamente no muestran una diferencia significativa. Lo cual nos indica que al adicionar extracto de cuachalalate este tiene un efecto inductor de la mitosis celular, puesto que al bajar el volumen de suero en los cultivos celulares se tiene una confluencia semejante al control positivo (Fig. 19).

Lo anterior no sucede cuando el SFB esta al 0.25% pues el valor de  $P = 0.00007$ , el cual estadísticamente si es significativo, pues esta tan alejado del comportamiento que tiene el control positivo que la confluencia de células se ve mermada y hay citotoxicidad.



**Fig. 25** Células VERO + Cuachalalate + SFB. Representación gráfica de la Comparación de medias para dos muestras, obtenidos con ayuda del programa Statgraphics. Entre más lejanas estén las cajas rosas mayor será la diferencia estadística entre las medias a un intervalo de confianza del 95%.

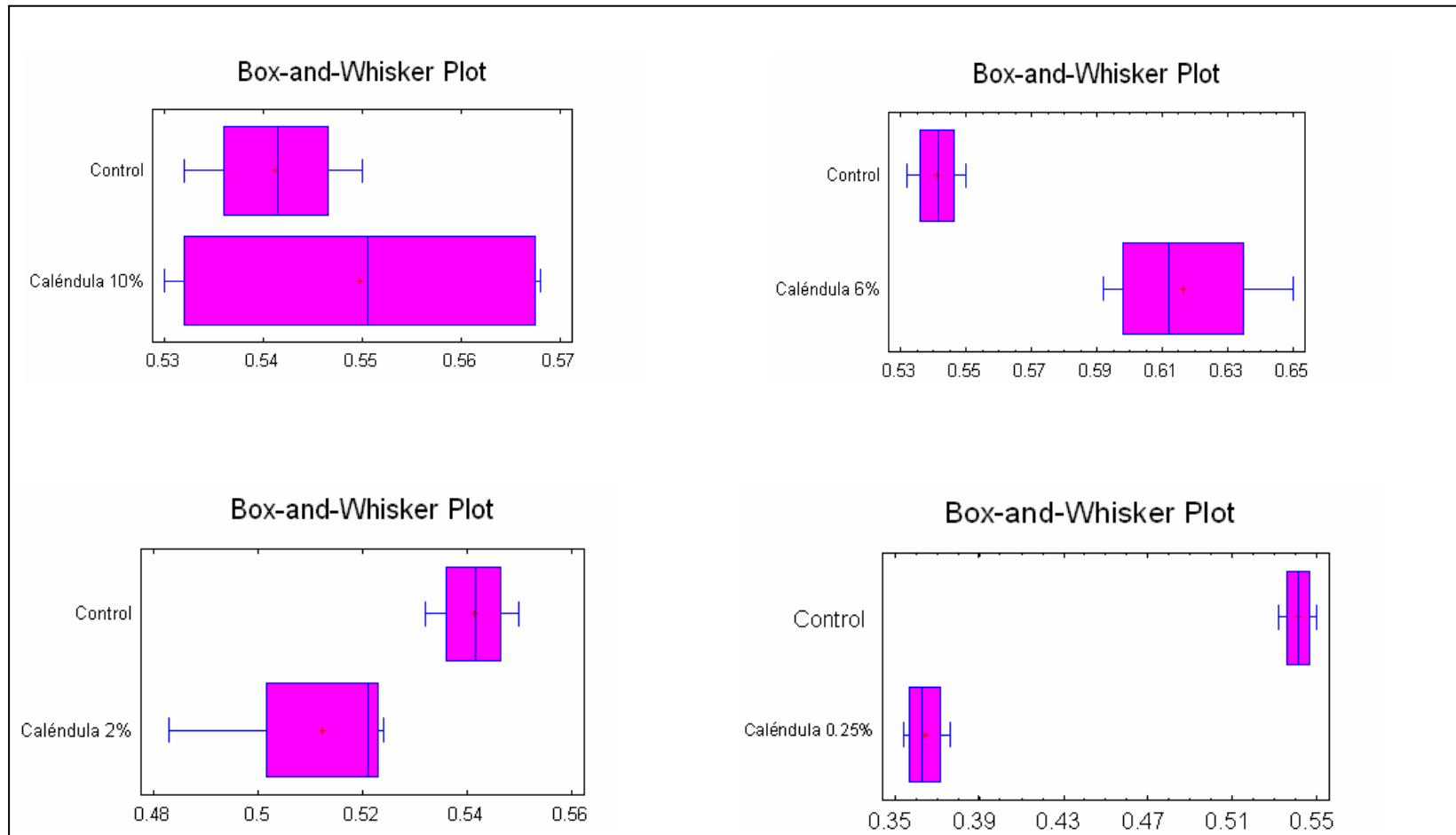
---

---

### 6.7.5 CÉLULAS VERO + CALÉNDULA

Al adicionar SFB al 10% tenemos P-value = 0.5, este resultado nos dice que la proliferación celular es un poco mayor que el control positivo. Cuando el volumen de suero disminuye al 6% la caléndula tiene un efecto promotor de la mitosis más evidente que el primer caso puesto que el valor de  $P = 0.001$  estadísticamente sí es significativo (Fig. 18).

En los dos últimos casos, sí se tiene una disminución de la confluencia celular y por ello los valores de  $P$  son 0.03 y  $1.0 \times 10^{-7}$ , cuando el suero está al 2 y 0.25%, respectivamente. Estadísticamente la diferencia es significativa en el último caso, pues la proliferación celular es muy bajo comparado con el positivo e inclusive hay efecto citotóxico.



**Fig. 26** Células VERO + Caléndula + SFB. Representación gráfica de la Comparación de medias para dos muestras, obtenidos con ayuda del programa Statgraphics. Entre más lejanas estén las cajas rosas mayor será la diferencia estadística entre las medias a un intervalo de confianza del 95%.

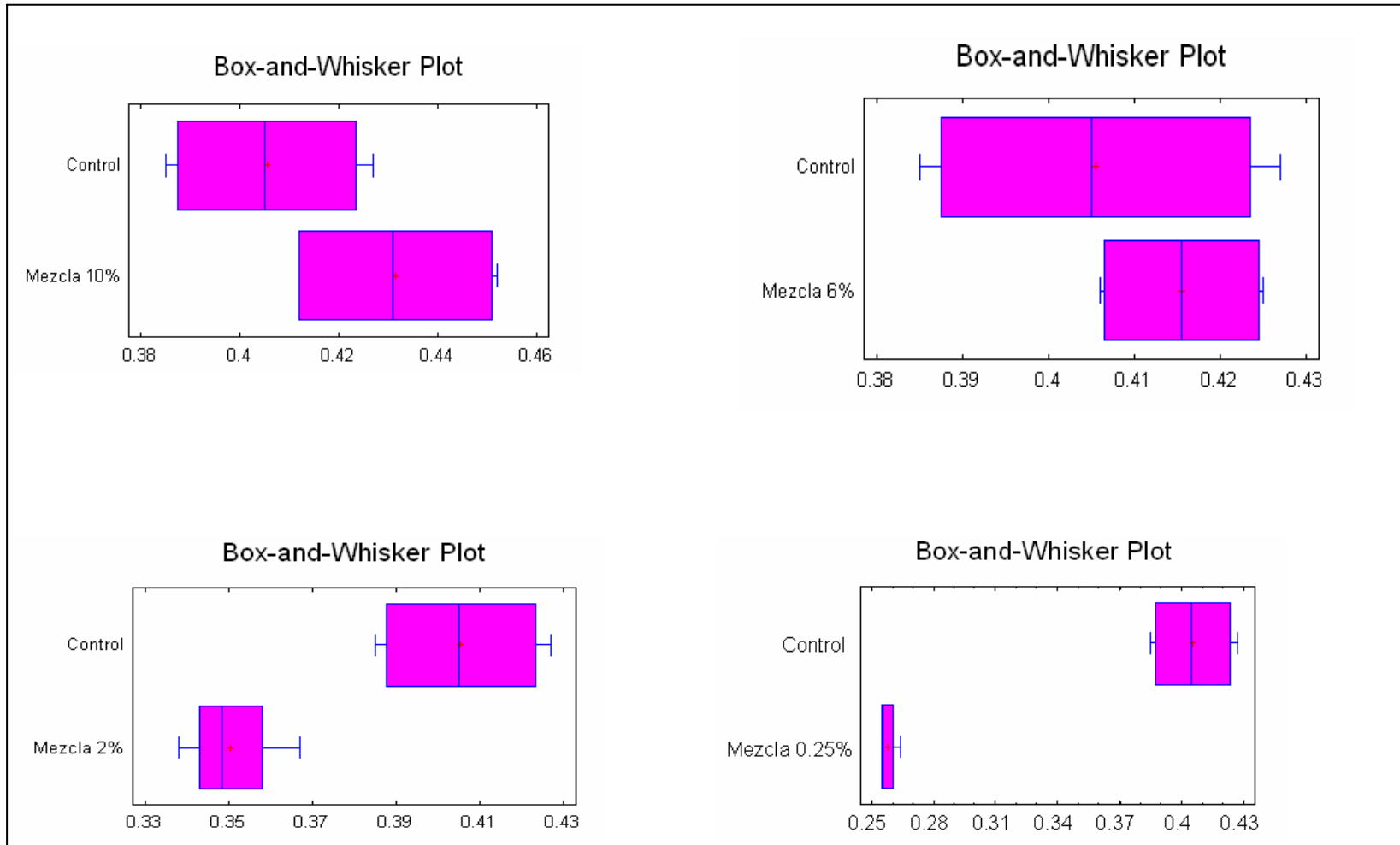
---

---

#### 6.7.6 CÉLULAS VERO + CALÉNDULA/CUACHALALATE

Para las células con la mezcla y SFB al 10 y 6%, se obtuvieron P-value = 0.1 y 0.4, respectivamente, no hubo diferencias significativas con respecto al control positivo, sin embargo si se observó una mejor morfología celular con respecto a la morfología celular del control positivo (Fig. 17 y 20).

Sin embargo al adicionar suero en un 2% y 0.25% existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo, los valores de P son 0.004 y 0.000009, respectivamente, pero esta diferencia se debe al efecto citotóxico de los extractos ya que la proliferación celular es mínima y en algunas concentraciones, nula. (Fig. 21)



**Fig. 27** Células VERO + Mezcla + SFB. Representación gráfica de la Comparación de medias para dos muestras, obtenidos con ayuda del programa Statgraphics. Entre más lejanas estén las cajas rosas mayor será la diferencia estadística entre las medias a un intervalo de confianza del 95%.

---

---

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 CÉLULAS MDBK + CUACHALALATE

En la **Gráfica 1** se observa que bajo la concentración de  $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  del cuachalalate la absorbancia máxima fue de 0.705, la cual es mayor comparada con el control positivo que tiene un valor de 0.674. Si tomamos este último como el 100% de nuestra proliferación celular entonces el problema tiene un valor de 104.60%, lo cual nos dice que el cuachalalate tiene un efecto estimulante de la división celular y por lo tanto hay un ligero aumento en el número de células, que se ve evidenciado al utilizar la técnica de Mosmann (MTT). Sin embargo, es importante mencionar que a la concentración de  $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  se observaron células con vacuolas (Fig. 8), lo cual nos dice que hay un efecto citotóxico por parte del extracto. Conforme va decreciendo la concentración del cuachalalate, al hacer diluciones dobles, este efecto también se ve disminuido.

Cuando el SFB esta al 6% el máximo valor obtenido fue de 0.682, equivalente al 101.19% y aquí observamos que sigue siendo ligeramente mayor que el control positivo. Lo mismo ocurre cuando el suero esta al 2%, pues la absorbancia fue de  $0.700 = 103.86\%$ , por lo tanto sigue habiendo un estímulo en la actividad celular. Caso contrario ocurre cuando se disminuye la cantidad de suero al 0.25%, ya que el resultado máximo obtenido fue de  $0.578 = 85.76\%$ . en este caso se observó citotoxicidad en las células así como la disminución de la confluencia celular, esto se muestra en la Fig. 15.

En el caso del extracto de Cuachalalate es importante la concentración a la que sea utilizado ya que de acuerdo a los resultados cuantitativos y a lo que se observó cualitativamente, el efecto fue citotóxico cuando se empleó a concentraciones altas, llegando incluso a inhibir la proliferación celular, sin embargo a concentraciones por debajo de las concentraciones que provocaron el efecto citotóxico, el extracto si tuvo un efecto inductor de proliferación celular siendo esta proliferación considerablemente buena aunque el SFB se haya disminuido a un 6% y 2%.

---

---

## 7.2 CÉLULAS MDBK + CALÉNDULA

Cuando el SFB esta al 10% y la concentración del extracto es de 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  se obtuvo la mayor absorbancia, que fue de 0.733 y esta representa el 112.94% de la proliferación celular, la cual es mayor que el positivo 0.649 =100%.

Al bajar el volumen de suero al 6% y 2%, observamos que la confluencia celular sigue siendo óptima al comparar con el control positivo, ya que las absorbancias mas elevadas fueron de 0.717 = 110.48% y 0.751 = 115.72%, respectivamente. Es importante recalcar que el efecto citotóxico que presentan las células MDBK con el extracto acuoso de cuachalalate, no se observa en este caso (Fig.10).

Cuando se emplea suero al 0.25%, el efecto mitógeno del extracto se pierde, puesto que la mayor absorbancia obtenida fue de 0.550 que representa el 84.75% de la proliferación celular, aunado a un daño celular (Fig. 14).

Al igual que el extracto de Cuachalalate, es importante la concentración en la que se empleó el extracto de Caléndula, de hecho, los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos en el estudio realizado por J.I. Pérez-Carreón et al. <sup>(44)</sup>, ya que se observó que si el extracto de Caléndula se emplea a concentraciones altas, el efecto en vez de ser promotor es inhibidor, e incluso provoca un efecto citotóxico, sin embargo, a concentraciones menores este extracto es un buen mitógeno. Por otra parte existen reportes <sup>(61)</sup> sobre las propiedades de el extracto de Caléndula en la regeneración del epitelio de tejidos donde se asume que este efecto es debido a un aumento en el metabolismo de glicoproteínas, nucleoproteínas y colágeno durante el periodo regenerativo de los tejidos, lo cual puede explicar el porque del efecto mitógeno de Caléndula al enfrentarlo a los cultivos de células, sin embargo aún falta determinar cual es el compuesto o compuestos que provocan dicho efecto.

De igual manera, al comparar el efecto que el extracto de Caléndula tuvo al ser enfrentado con las células, respecto al efecto que tuvo el extracto de Cuachalalate, se observó que el efecto citotóxico a concentraciones elevadas fue similar (formación de vacuolas) y que el extracto de Cuachalalate si promovió la proliferación celular, pero el extracto de Caléndula tuvo mejores



---

---

resultados en este aspecto, que se reflejaron cuantitativamente con las absorbancias obtenidas al emplear el método de MTT.

### 7.3 CÉLULAS MDBK + MEZCLA

En lo que respecta a la mezcla el máximo valor fue de  $0.736 = 111.68\%$ , al añadir suero al 10%, el cual es mayor a el control positivo  $0.659 = 100\%$ . Algo similar sucede cuando tenemos SFB al 6% y 2%, puesto que las absorbancias fueron de  $0.727=110.32\%$  y  $0.742=112.59\%$ , respectivamente. En estos 3 casos hay un sinergismo de los extractos sobre las células y también se visualizó una mejoría en la morfología celular (Fig. 9 y 13) si se compara con la Fig. 8 que corresponde a cuachalalate. Cuando se adiciona suero al 0.25% la confluencia celular se ve disminuida ya que el dato más elevado fue de  $0.616 = 93.47\%$ . Bajo estas circunstancias el efecto citotóxico de los extractos también se reduce, pues si se comparan las Fig. 14 y 15 con la Fig. 16 esto se hace más notorio.

Los extractos juntos obtuvieron buenos resultados ya que el efecto citotóxico disminuyó considerablemente, notando que el efecto mitógeno de ambos extractos se vio beneficiado con esta combinación aún cuando el suero se disminuyó a 0.25%. También se observó que al mezclar los extractos, se obtuvieron mejores resultados cuando ambos extractos se encontraban no muy concentrados, por lo que aún al mezclarlos es importante tomar en cuenta la concentración de ambos extractos para obtener resultados favorables.

### 7.4 CÉLULAS VERO + CUACHALALATE

La máxima absorbancia obtenida fue de  $0.569 = 102.15\%$ , esto cuando adicionamos SFB al 10%, que es mayor que el control positivo  $0.557=100\%$ . Lo mismo ocurre cuando se utiliza el suero al 6 % pues el valor fue de  $0.582=104.49\%$ . Por lo tanto, el extracto de Cuachalalate a estas concentraciones ( $0.02$  y  $0.03 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ , respectivamente) promueve la proliferación celular (Fig. 19).

---

---

Sin embargo, conforme disminuye la concentración de suero al 2% dicho efecto va decayendo, por lo que el valor más elevado fue de 0.529=94.97% y por ello al bajar más la cantidad de suero al 0.25% solo tenemos el 55.83% de confluencia (abs = 0.311), así como un daño celular más evidente.

## 7.5 CÉLULAS VERO + CALÉNDULA

Cuando el SFB se encuentra al 10% y la concentración del extracto es de  $9.9 \times 10^{-4} \mu\text{g} / \mu\text{l}$  se obtiene una absorbancia de 0.550=101.66%, la cual es considerable si se toma en cuenta que al 10% de SFB normalmente las células proliferan, sin embargo al disminuir el SFB al 6% y agregar  $4.9 \times 10^{-4} \mu\text{g} / \mu\text{l}$  de extracto de caléndula, la absorbancia máxima es de 0.617=114.05%, lo cual indica que la actividad celular está siendo estimulada en mayor proporción si se compara con el control positivo cuyo resultado es de 0.541=100%. Aquí también podemos notar que el efecto es mejor que el del Cuachalalate (Fig. 18).

En el caso de las células con SFB al 2%, la proliferación celular disminuye a un 94.64% (abs = 0.512). Pero cuando se tiene suero al 0.25%, el efecto mitógeno no es tan evidente como en los casos anteriores con una absorbancia de 0.364 que corresponde solo al 67.28% de proliferación con respecto al control positivo.

## 7.6 CÉLULAS VERO + CALÉNDULA/CUACHALALATE

El caso de las células que se enfrentaron con la mezcla de los extractos es particular porque se demuestra la importancia de la concentración a la que se encuentren los extractos, la concentración del extracto de cuachalalate con la que se iniciaron las diluciones para el ensayo es más alta que la que se empleó en los ensayos anteriores ( $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), por lo que solo se obtuvieron resultados favorables en las menores concentraciones, es decir, en las últimas columnas de la microplaca.

---

---

Las únicas concentraciones que funcionaron fueron las de  $1.9 \times 10^{-3}/0.0769 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  y  $2.5 \times 10^{-4}/9.61 \times 10^{-3} \mu\text{g} / \mu\text{l}$  (Caléndula/Cuachalalate) con absorbancias de  $0.432=106.40\%$  y  $0.416=102.46\%$ , respectivamente, esto cuando el SFB se agregó al 10% y 6%, ver Fig. 17 y 20. Al igual que con las células MDBK, podemos decir que al mezclar los extractos hay un efecto sinérgico, pero solo cuando las concentraciones de cada uno de los extractos son las óptimas.

Al seguir disminuyendo la concentración del suero al 2% y 0.25% , las absorbancias también disminuyen:  $0.351=86.45\%$  y  $0.258=63.55\%$ , respectivamente. Por lo cual el efecto de nuestros extractos va mermando, además se observó toxicidad en las células (Fig. 21).

En este ensayo se determinó que aún cuando el extracto de Caléndula demostró ser un buen mitógeno en otros ensayos, la alta concentración del extracto de Cuachalalate inhibió su efecto y fue notorio que al combinar los extractos, ambos deben encontrarse en la concentración óptima para obtener un buen resultado ya que en este caso, el efecto no fue del todo sinérgico y que predominó el efecto citotóxico del extracto de Cuachalalate.

---

---

Los extractos naturales probados, solos y combinados, favorecieron la proliferación celular solo a ciertas concentraciones, teniendo los mejores resultados cuando el SFB se encontró al 10% 6% y al 2% (aunque para este último solo se observó en el caso de las células MDBK), lo que indica que sería necesario probar otras fuentes de nutrientes naturales más los extractos probados para obtener un medio de cultivo celular carente totalmente de la fuente bovina que finalmente es el vehículo de agentes microscópicos (Virus y/o partículas virales, Priones).

El uso de el extracto de Caléndula y Cuachalalate puede minimizar el uso de SFB pero no es factible su total sustitución. Por otra parte también es importante determinar si el empleo de los extractos naturales puede interferir en los cultivos de virus ya que se tienen reportes <sup>(62)</sup> de que el extracto de *Calendula officinalis* en cultivos celulares ha demostrado inhibir la replicación del virus del VIH, por lo tanto sería necesario probar si el tratamiento de las células con Caléndula sola o mezclada con otros extractos no interfiere en la replica de diferentes virus de importancia médica humana y veterinaria.

---

---

## CONCLUSIONES

- Determinamos las concentraciones óptimas en las que hay un efecto inductor de la mitosis celular, gracias al método colorimétrico de Mosmann (MTT) .
- Tiene un mejor efecto mitógeno caléndula que cuachalalate.
- Existe un sinergismo de ambos productos naturales cuando se emplean combinados.
- El efecto promotor y citoprotector del extracto de cuachalalate se ve reducido al paso de los días. Caso contrario es el extracto de Caléndula, que demostró ser más estable.
- No se puede sustituir el SFB en su totalidad, pero si se podría disminuir su volumen para el cultivo de células. Ya que al emplear los extractos bajo las concentraciones indicadas se obtendrían confluencias celulares iguales e inclusive un poco más elevadas que las que se obtienen al usar SFB al 10%.
- Con el uso de los extractos se minimiza el costo de los cultivos celulares y se reduce la posibilidad de contaminación de los cultivos especialmente con virus y anticuerpos.

## 9. SUGERENCIAS

A nivel comercial ya existen medios libres de suero, preparados a partir de productos naturales, como peptonas extraídas del frijol de soya, sería interesante tener otros medios que contengan cuachalalate y/o caléndula utilizados para el cultivo celular.

Sería interesante seguir realizando estudios que involucren a estas plantas y probar los extractos en otras líneas celulares e inclusive investigar el efecto en el cultivo de virus.

---

## APÉNDICE

### 10.1 MATERIAL

- Botellas Falcon<sup>®</sup> de 25 cm<sup>2</sup>
- Mechero bunsen y manguera de latex
- Micropipeta de 40 a 200 µl Oxford<sup>®</sup>
- Micropipeta de 2 a 10 µl Oxford<sup>®</sup>
- Micropipeta de 200 a 1000 µl BOECO<sup>®</sup>
- Micropipeta de 0.5 a 10 µl BOECO<sup>®</sup>
- Micropipeta multicanal TRANFERPETTE<sup>®</sup> 8 de 20 a 200 µl
- Tubos de vidrio para centrifuga PIREX<sup>®</sup> No. 8082
- Botella de vidrio WHEATON<sup>®</sup> de 1000 ml
- Microplacas de 96 pozos de fondo plano. Corning, INC.
- Puntas desechables para micropipeta
- Membranas millipore<sup>®</sup> (0.45 y 0.22 µm)
- Cámara de Neubauer
- Frascos de vidrio estériles
- Viales ámbar
- Viales Eppendorf
- Matraces Erlenmeyer KIMAX<sup>®</sup> de 250, 500 y 1000 ml
- Vasos de precipitados KIMAX<sup>®</sup> 100, 250 y 1000 ml
- Cajas petri KIMAX<sup>®</sup>
- Embudo de vidrio
- Papel filtro nº 3 Wattman<sup>®</sup>
- Soporte universal, pinza de nuez y malla de asbesto

---

## 10.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Línea celular MDBK
- Línea celular VERO
- Pétalos de flor de *Calendula officinalis*
- Corteza de Cuachalalate

## 10.3 EQUIPO

- Rotavapor BUCHIR R-114, Waterbath B-480
- Autoclave All American Modelo 1925X
- Parrilla con agitador Nuova II Stir Plate
- Microscopio de luz invertido Zeiss® IDO3
- Microscopio óptico Olympus® modelo CHS
- Lector de ELISA Hypervión MicroRead 4 plus
- Estufa Rios.Rocha S.A
- Congelador American
- Refrigerador IEM
- Filtro millipore Corporation
- Bomba de vacío G.E.-Hoffman-Pinthe, modelo 0210
- Balanza granataria Triple beam balance 700 series
- Balanza analítica
- Horno Pasteur Rios.Rocha S.A. modelo HS-41
- Cabina de flujo laminar VECO®
- Baño maría Grant®
- Centrífuga Dynac®
- Tanque para crioconservación Thermolyne® Locator-8
- Congelador Baxter®
- Destilador de Agua Milli-Q plus®

---

#### 10.4 REACTIVOS

- Etanol puro (96<sup>0</sup>) High Purity de México
- Agua desionizada
- MTT MP biomedicals, LLC
- Extracto acuoso de Cuachalalate
- Extracto etanólico de *Calendula officinalis*
- SFB MP biomedicals ,LLC
- Fungi-Bact Solution IRVINE SCIENTIFIC
- Tripsina-Verseno 0.05% : 0.05%
- Bicarbonato de Sodio MONTERREY<sup>®</sup>
- L-Glutamina MERCK<sup>®</sup>
- PBS 1X
- D-MEM GIBCO<sup>®</sup>
- Agar Base Sangre MERCK<sup>®</sup>
- Colorante Azul de Tripán SIGMA
- Buffer HEPES IRVINE SCIENTIFIC
- Alcohol Isopropílico BAKER ANALYZED



---

---

## 10.5 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### PBS 1x

NaCl (REPROQUIFIN)	8.0g
KCl (J.T.BAKER)	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (MONTERREY)	1.15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Mallinckrodt)	0.2g
Agua desionizada	c.b.p. 1000 ml

Ajustar pH a 7.0 y esterilizar en Autoclave (ALL AMERICAN Modelo N<sub>o</sub> 1925X) a 15 lb. de presión por 15 minutos.

Conservar a 4°C.

### D-MEM

D-MEM (GIBCO)	13.38 g
NaHCO <sub>3</sub> (MONTERREY)	3.7g
Solución Fungi-Bact (Irvine Scientific)	10ml
L-Glutamina (Merck)	10ml
Agua desionizada	c.b.p. 1000 ml

Se ajusta pH a 6.8 con HEPES y se prefiltra con membrana de 0.45 µm (millipore). Finalmente se esteriliza con membrana de 0.22 µm (millipore).

Conservar a 4°C.

### AZUL DE TRIPÁN AL 0.4%

Azul de Tripán (SIGMA)	0.4g
Agua desionizada	c.b.p. 100 ml

### L-GLUTAMINA AL 1%

L-Glutamina (MERCK)	1g
Agua desionizada	c.b.p. 100 ml

Esterilizar con membrana de 0.22 µm (millipore).

Conservar en congelación.

---

---

**TRIPSINA-VERSENO 0.05% : 0.05%***Solución 1*

Tripsina	0.05g
PBS	c.b.p. 100 ml

*Solución 2*

EDTA (Verseno) (J.T.BAKER)	0.05g
PBS	c.b.p. 100 ml

Se toman 50 ml de la solución 1 y 50 ml de la solución 2 y se homogenizan. La solución resultante se esteriliza con una membrana de 0.22  $\mu$ m (millipore).

Conservar en congelación.

**MTT (5mg/ml)**

MTT (MP biomedical, INC.)	250mg
RPMI-1640 sin rojo de fenol (SIGMA)	c.b.p 50 ml

Se esteriliza con membrana de 0.22  $\mu$ m (millipore).

Conservar a 4°C en vial ámbar.

**RPMI-1640 SIN ROJO DE FENOL**

RPMI-1640 sin rojo de fenol (SIGMA)	519.5 mg
Agua desionizada	c.b.p. 50 ml

Se esteriliza con membrana de 0.22  $\mu$ m (millipore).

Conservar a 4°C.

**ALCOHOL ISOPROPÍLICO ÁCIDO**

HCl (MONTERREY)	1.6 ml
Alcohol Isopropílico (BAKER ANALYZED)	c.b.p. 100 ml

**NOTA :** Realizar monitoreo periódico de los reactivos sembrando en Agar Base Sangre (Merck) el cual se prepara según como el marbete.

**ETANOL AL 70%**

Etanol puro	70 ml
Agua desionizada	c.b.p. 100 ml

---

---

## 10.6 TÉCNICAS REALIZADAS

### TRIPSINIZACIÓN DE CÉLULAS (PASE CELULAR)

- ❖ Retirar el medio de cultivo de la botella confluyente.
- ❖ Lavar con PBS
- ❖ Adicionar 3ml de PBS y dejar reposar por 10 min.
- ❖ Retirar el PBS y adicionar 500µl de Tripsina-Verseno. La enzima debe permanecer menos de 1 minuto en contacto con las células para evitar que se dañen.
- ❖ Adicionar 1ml de D-MEM-SFB 10% para obtener una suspensión celular.
- ❖ Tomar con una pipeta estéril el volumen necesario (aprox. 500µl) y depositarlo en una botella Falcón nueva que contenga 3ml de D-MEM-SFB 10%.

De este procedimiento se obtienen 3 pases, se puede aumentar o disminuir el volumen de medio según convenga.

### CONGELACIÓN DE CÉLULAS

- ❖ Preparar la solución para congelar:

Medio D-MEM	15 ml
SFB	5 ml
DMSO	2 ml*

- ❖ Retirar el medio de cultivo de una botella de no más de 48 hrs.
- ❖ Lavar con PBS
- ❖ Seguir el procedimiento de Tripsinización antes mencionado
- ❖ Adicionar D-MEM-SFB 10%
- ❖ Centrifugar a 1250 rpm por 3 minutos
- ❖ Resuspender células con D-MEM-SFB 10%
- ❖ **\*Añadir el DMSO a la solución de congelación**
- ❖ Depositar las células en la solución de congelación
- ❖ Distribuir 1.5 ml de la solución en criotubos

Refrigerar una hora, congelar a -70°C durante 24 horas, después de este tiempo colocar los criotubos en nitrógeno líquido.

---

---

## CONTEO CELULAR

- ❖ Desechar el medio de cultivo y lavar con PBS
- ❖ Tripsinizar
- ❖ Colocar las células desprendidas en un tubo para centrifuga estéril y añadir 2 ml de D-MEM sin SFB
- ❖ Tomar 200 µl de esta suspensión y colocarlos en un tubo Eppendorf.
- ❖ En el mismo tubo colocar 200 µl del colorante Azul de Tripán. Homogenizar para lograr una adecuada tinción.
- ❖ Llenar la cámara de Neubauer y realizar el conteo.
- ❖ Se enfoca la cuadrícula de la cámara empleando el objetivo de 10x y se localizan los cuadrantes a contar. (los mismos que se emplean para el conteo de leucocitos)
- ❖ Se pueden contar solo dos cuadrantes, pero de preferencia se deben contar los 4 para disminuir el rango de error.
- ❖ El número de células por mililitro se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Cel./ml} = \frac{(\# \text{ de células contadas})}{(\# \text{ de cuadrantes contados})} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

Para esta técnica el factor de dilución es de 1 y por lo tanto no se toma en cuenta.

---

---

## 11. GLOSARIO

**Absorbancia:** propiedad física de una sustancia que dentro de ciertos límites puede ser directamente proporcional a su concentración. Es una medida de la cantidad de radiación electromagnética, habitualmente luz que la sustancia absorbe. Esta propiedad se utiliza en la espectrofotometría.

**Amenorrea:** ausencia de la menstruación.

**Amniocentesis:** técnica obstétrica en la que se toma una pequeña cantidad de líquido amniótico para su estudio en el laboratorio.

**Arritmia:** desviación del patrón normal en los latidos cardíacos.

**Asepsia:** eliminación o destrucción de los organismos productores de enfermedades o de un material infectante. Ausencia de gérmenes.

**Cardiomioplastia:** destrucción del tejido cardíaco que sigue a un infarto agudo al miocardio.

**Célula somática:** cualquiera de las células del tejido corporal que tienen un número diploide de cromosomas, para distinguirlas de las células germinales, que contienen un número haploide .

**Clon:** grupo de células u organismos genéticamente idénticos derivados mediante mitosis de una única célula u organismo común.

**Deshidrogenasa:** enzima que cataliza una reacción de oxidorreducción en la cual se extraen hidrógenos.

---

---

**Dexametasona:** corticoesteroide sintético utilizado como antiinflamatorio.

**Dismenorrea:** dolor asociado a la menstruación.

**Emenagogo:** que estimula o favorece el flujo menstrual.

**Fibroblasto:** célula plana, alargada, indiferenciada del tejido conectivo, que origina diversas células precursoras, como el condroblasto, el colagenoblasto y el osteoblasto, que forman el tejido fibroso, de unión y soporte del cuerpo.

**Fibronectina:** proteína de 440 KDa de unión celular.

**Genoteca:** biblioteca genómica.

**Hidrocortisona o cortisol:** glucocorticoide que se produce a partir del 11-desoxicortisol por acción de la enzima 11- $\beta$ -hidroxilasa en la corteza suprarrenal.

**Mioblastos:** células indiferenciadas capaces de regenerar el músculo después de una lesión.

**Meiosis:** división de una célula sexual, cuando es madura, en dos y después en 4 gametos, recibiendo el núcleo de cada uno la mitad del número de cromosomas que poseen las células somáticas de la especie.

**Mitógeno:** agente que desencadena la mitosis.

**Mitosis:** tipo de división celular que tiene lugar en las células somáticas que da lugar a la formación de 2 células hijas genéticamente idénticas que contienen un número diploide de cromosomas característico de la especie.

**Neoplasia:** desarrollo de células nuevas y anormales, que pueden ser benignas o malignas.

---

---

**Oncogén:** protooncogén mutado que produce un proceso de división celular anormal.

**Parathormona:** Hormona que controla junto con la vitamina D la concentración de calcio plasmático específicamente del calcio ionizado ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

**Plásmido:** molécula de ADN circular de solo unos millares de pares de bases fuera de los cromosomas. Puede haber muchas copias del mismo en la célula. Son moléculas de ADN de las bacterias en las que habitualmente radica la resistencia a antibióticos.

**Prión:** una de las diversas clases de partículas proteínicas que se creen responsables de enfermedades neurodegenerativas transmisibles, como la tembladera (scrapie) en el ganado ovino y el kuru y la enfermedad de Creutzfeld-Jacob en seres humanos. Dado que los priones carecen de ácido nucleico detectable, no son inactivados por los procesos usuales para destruir los virus.

**Serxtend:** (Serum Extender) Producto libre de suero que contiene varios factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos. Se adiciona a medios de cultivo libres de suero.

**Sonda de ADN:** molécula de ADN complementaria a una porción de otro ácido nucleico que se utiliza para identificar células que contienen un gen clonado o una determinada molécula de ácido nucleico.

**Transcripción:** proceso por el cual se sintetiza una molécula de ARN utilizando como modelo una hebra del ADN.

**Transfección:** introducción de material genético en células eucariotas.

**Transferrina:** proteína de 80 KDa que transporta hierro en el plasma. Está formada por la apotransferrina y el hierro.

---

**Traslocación:** mutación estructural que produce el cambio de posición de un segmento de ADN dentro del cromosoma.

**Vacuna:** suspensión de microorganismos atenuados o muertos administrada por vía intradérmica, intramuscular, oral o subcutáneo para inducir inmunidad activa frente a enfermedades infecciosas.

**Virus:** microorganismo parasitario de tamaño muy inferior al de una bacteria, no tiene actividad metabólica independiente, y solo se puede replicar en el interior de una célula de una planta viva o de un huésped animal.



---

## 12. REFERENCIAS

- (1) Paymend P., Trudel. Methods and Techniques in Virology. Marcel Dekker Inc. 1993. USA
- (2) Rolando duran, Alberto Valle. Importancia biológica del mantenimiento de líneas celulares estables. Antecedentes  
[http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/duran\\_r2/arti/duran\\_r2.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/duran_r2/arti/duran_r2.htm)
- (3) Bennington, James L. Diccionario Enciclopédico del Laboratorio Clínico. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 2000.
- (4) Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 1. introducción al cultivo celular. [www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/Cap1.htm#1](http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/Cap1.htm#1).
- (5) Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 3. El medio de cultivo. [www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/Cap3.htm#1](http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/Cap3.htm#1)
- (6) Morgan, Sara J., Darling David C. Cultivo de Células Animales. Editorial ACRIBA S.A. Zaragoza, España. 1995.
- (7) Butler, Michael. Mammalian Cell Biotechnology. A Practical Approach. Oxford University Press. New York. 1991. pp 27 - 28
- (8) Sheldon E. Broedel. Technical Brief: Why Use Serum-Free Medium?. Jr.Athena Environmental Sciences, Inc., Baltimore , MD.  
<http://www.athenaes.com/WhyChooseSFMTechBrief.pdf>
- (9) Coll Morales, Julio. Técnicas de Diagnóstico en Virología. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 1993. pp. 150,152
- (10) Jenkins, Nigel. Animal Cell Biotechnology. Methods and protocols. Methods in biotechnology Series. Human Press Inc. Totowa, New Jersey. 1999. pp V – Vi, 11 – 13
- (11) Suplementación de los medios con suero. [www.encolombia.com/acovez24\\_contenido2.htm](http://www.encolombia.com/acovez24_contenido2.htm)
- (12) McAlinden M.G., Wilson D.J. 2000. Comparison of cancellous bone-derived cell proliferation in autologous human and fetal bovine serum. Cell Transplant. Jul-Aug; 9(4), 445 – 51.
- (13) Makoschey B., Patel J.R., P.T.J.A. van Gelder. 2002. Serum-free produced Bovine Herpesvirus type 1 and Bovine Parainfluenza type 3 virus vaccines are efficacious and safe. Cytotechnol 39, 139 – 145.

- 
- (14) Yves-Jacques Schneider. 1989. Optimisation of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in a chemically defined, serum- and protein- free culture medium. *J. Immunol Methods*. 116, 65 – 77.
- (15) Chachques J.C., Herreros J., Trainini J., Juffe A., Rendal E., Prosper F., Genovese J. 2004. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol Jun;95 Suppl 1:S29 – 33*.
- (16) Fetal Bovine Serum (FBS; also named as 'FCS')  
<http://www.biochrom.de/frameset.php?go=fbs&language=eng>
- (17) Normas y Procedimientos Zoosanitarios Bovinos.  
[http://www.oirsa.org/dtsa/directrices/bovinas/normas\\_bovinas.html#30.02.20%20suero%20fetal%20bovino](http://www.oirsa.org/dtsa/directrices/bovinas/normas_bovinas.html#30.02.20%20suero%20fetal%20bovino)
- (18) Fernando Cobo, Glyn N. Stacey, Charles Hunt, Carmen Cabrera, Ana Nieto, Rosa Montes, José Luis Cortés, Purificación Catalina, Angela Barrie, Ángel Concha. 2005. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation. Mini-Review. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, 456 – 466.
- (19) Fernando Cobo, Paloma Talavera, Ángel Concha. 2005. Diagnostic approaches for viruses and prions in stem cell banks. *J Virol* <http://www.elsevier.com>.
- (20) Ernst-Jürgen Schlaeger. 1996. The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *J Immunol Methods*. 194, 191 – 199.
- (21) Merten O.W., H. Kallel, J.C. Manuguerra, M. Tardy-Panit, R. Crainic, F. Delpeyroux, S. Van der Werf, P. Perrin. 1999. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. *Cytotechnol* 30, 191 – 201.
- (22) Neuza M. Frazzatti-Gallina, Regina M. Mourao-Fuches, Rosana L. Paoli, Maria L.N. Silva, Cosue Miyaki, Elizabeth J.G. Valentín, Isaías Raw, Hisako G. Higashi. 2004. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine* 23, 511 – 517.
- (23) Merten O.W., Kierulff K.V., Castignolles N., P. Perrin. 1994. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: use of various cell lines. *Cytotechnol* 14, 47 – 59.

- 
- (24) Chavarría Torres, Norma Alicia. Estudio comparativo de la permisividad al virus de la Influenza que presentan diferentes líneas celulares aplicando distintos métodos de inoculación. Tesis para la licenciatura de QFB. FES Cuautitlán. UNAM. 2000.
- (25) Fenner, Frank. Virología médica. Prensa medica mexicana, 2ª ed. México. 1981
- (26) Collier, Leslie & John Oxford. Human Virology. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford University Press. New York. 2000. pp 248.
- (27) Cultivos celulares.  
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/cultivos.htm>.
- (28) Colecciones de células y material biológico : ATCC / ECACC.  
[http://www.wbc/recursos/colecciones\\_de\\_celulas.htm](http://www.wbc/recursos/colecciones_de_celulas.htm)
- (29) American Type Culture Collection. Cell lines and Hybridomas.  
<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/CellBiology.cfn>
- (30) <http://www.verdenatural.com/herbolaria/default.asp>
- (31) [http://www.verdenatural.com/entrevista\\_con/Biol\\_Mauricio\\_Gonzalez.asp](http://www.verdenatural.com/entrevista_con/Biol_Mauricio_Gonzalez.asp)
- (32) [http://www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres/3FC1286D-83CE-4EA7-83DE-F7559BF0788A/12704/DrJaimeTortoriello\\_doc.doc](http://www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres/3FC1286D-83CE-4EA7-83DE-F7559BF0788A/12704/DrJaimeTortoriello_doc.doc)
- (33) Juscafresca, Baudilio. Guía de la flora medicinal. Edit. AEDOS, Barcelona. España. 1995.
- (34) Brees, Mark H. El Manual Merck de diagnóstico y tratamiento. 10ª edición española. ed. Harcourt. Madrid. 1999.
- (35) Instituto Nacional Indigenista. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I. México. 1994.
- (36) Lara, O. F. y C. M. Alonso. Plantas medicinales de México: composición, usos y actividad biológica. UNAM. México. 1996.
- (37) Plantas que curan. Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Planeta DºAgostini. Vol. 11. Barcelona, España. 1999.
- (38) Lastra Valdés Humberto y Piquet García Rosario. 1999. Artículos de Revisión. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. *Calendula officinalis*. Rev Cubana Farm. 33, 188 – 94.
- (39) Dumenil G. 1980. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis*. Ann Pharm Fr. 38(6): 493 – 9.

- 
- (40) Schipochliev T. 1981. Study on the antiinflammatory effect of a group of plant extract. *Vet Med Nauki*. 18(6): 87 – 93.
- (41) Fleischner AM. 1985. Plants extract to accelerate healing and reduce inflammation. *Cosmet Toilet*. 100, 45 – 6, 48 – 51, 54 – 8.
- (42) Michel F. 1977. *Apis mellifica* and *Calendula officinalis* combination active against sunburn. Ger offen 2.720.420 (01 Dec 1977).
- (43) Rocaud Maitre A. 1988. A citotoxic and antitumoral activity of *C. officinalis* extracts. *Pharmazie*. 43(3): 220 – 1.
- (44) J.I. Pérez-Carreón, G. Cruz Jiménez, J.A. Licea Vega, E. Arce Popoca, S. Fattel Fazenda, S. Villa-Treviño. 2002. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol in Vitro*. 16(3), 253 – 258.
- (45) Laughton, M.J., Halliwell B., Evans P.J., Houlst J.R. 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin dependant DNA damage. *Biochemical Pharmacol*. 38, 2859 – 2865.
- (46) Linares M. Bye, y R. Flores B. Plantas Medicinales de México usos y remedios tradicionales. Instituto de Biología UNAM. 1999.
- (47) Olivera Ortega A.G., M. Soto Hernández, M. Martínez Vázquez, T. Terrazas Salgado, F. Solares Arenas. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J Ethnopharmacol*. 68, 109-113.
- (48) Sociedad Botánica de México. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. <http://www.socbot.org.mx/resumenes/resumen656.html>
- (49) Boletín de la Academia General de Biología. Cuernavaca, Morelos. Número 10 y 11. Junio-Julio 2004. [http://www.cib.uaem.mx/agebiol/bol\\_junio\\_julio2004.htm](http://www.cib.uaem.mx/agebiol/bol_junio_julio2004.htm).
- (50) Martínez Fuentes, Daniel. Evaluación farmacológica de la acción antiulcerosa de la infusión de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) procedente de Puebla. Tesis para la licenciatura de QFB. FES Cuautitlán. UNAM. 2005.
- (51) <http://www.cucba.udg.mx/new/informacionacademica/coaxican/herbolaria/cuachalalate.htm>
- (52) Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. Sigma Chemical Company. St. Louis. 1994

- 
- (53) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55–63.
- (54) Gerlier, D., Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Meth.* 94, 57–63.
- (55) B.C. Saravanan et al. (2003). A rapid MTT assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Veterinary parasitology.* 113, 211-216.
- (56) Alfredo Rigalli. *Diccionario de Química Biológica*. Editorial: Corpus. Argentina, 2005. Pág. 1, 74, 83, 385, 117, 131, 206, 219, 250, 252, 264, 265.
- (57) *Diccionario Mosby. Medicina, enfermería y Ciencias de la Salud Vol. 1.* España: Edit. Elsevier, 2003. Pág. 69, 74, 129, 148, 274, 294, 310, 487, 679, 1004, 1044, 1081.
- (58) *Diccionario Mosby. Medicina, enfermería y Ciencias de la Salud Vol. 2.* España: Edit. Elsevier, 2003. Pág. 1260, 1639, 1681.
- (59) *Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas 13ª. Edición.* México: Salvat, 1994. Pág. 384.
- (60) Karp, Gerarld. *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos.* McGraw-Hill Interamericana editores. México. 1998. Pág. 720.
- (61) Kloucheck-Popova E., Popov A., Pavlova N., Krusteva S. (1982). Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.* 8(4): 63-67.
- (62) Kalvatchev Z., Walder R., Garzaro D., (1997). Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed Pharmacother.* 51(4): 176-180.