

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

« Caléndula officinalis »

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A N :
IRMA BOLAÑOS URIBE
CLAUDIA GUADALUPE YAÑEZ LUNA

ASESORES:
M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMENEZ
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

IRMA

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por haberme dado la vida, por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida y cuidarme siempre en cada momento y lugar en donde me encuentro, por los momentos difíciles en que ha estado conmigo, por nunca dejarme sola y por su infinito amor.

A mis padres:

Juana Uribe Jiménez e Isidro Bolaños García.

Por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, por su ejemplo que me ha permitido ser una persona con valores, por sus consejos para que siempre siga adelante. Les agradezco por su paciencia y comprensión que me han dado para poder culminar mi carrera. Por que son pocas las palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí y por que quiero que sepan que siempre los llevo en mente. Gracias!!. Los quiero mucho.

A mi esposo: Héctor Ramírez Trujillo

Por tu amor, comprensión y apoyo, por hacerme creer que si puedo cuando yo creo que no, por estar siempre conmigo y acompañarme en esas noches de desvelo y no dejarme sola, por ser mi gran apoyo y compañía. Quiero decirte además que a esta meta llegamos juntos y estoy segura que el resto de nuestras vidas juntos estará llena de éxito y de amor. Gracias por hacerme feliz y por quererme tanto, y por tenerme tanta paciencia. Te amo!!

A mis hermanos y sobrinos : (Alicia, Mari, Isabel, Rosa, Samuel, Jesús, José, Beto, Riky y Andy)

Por su confianza y amistad en todo momento, por ser un buen ejemplo ya que de cada uno de ustedes he aprendido muchas cosas que día a día me han enseñado, por que siempre han estado cuando los he necesitado. Por su gran tolerancia y paciencia y por todos los momentos y alegrías que han dejado en mí. Los quiero mucho!!

A Claudia Yañez Luna

Por ser mi amiga y compañera durante esta etapa de mi vida, por compartir tus experiencias y consejos, por motivarme siempre. Por la amistad que incondicionalmente me has ofrecido siempre. Por terminar este trabajo juntas, y porque solo tu y yo sabemos lo que nos ha costado culminarlo. Gracias!!

Quiero agradecer especialmente a mi Asesor y Co. Asesor de tesis el prof. Gerardo Cruz Jiménez y el prof. José Antonio Licea Vega quienes aportaron todo su tiempo, conocimiento y experiencia con gran generosidad. Sin su ayuda no habría sido posible la realización de esta tesis. Gracias por haberme brindado su amistad, paciencia, orientación y estímulo.

A cada uno de los sinodales: MVZ. Gerardo Cruz Jiménez, Dra. Susana E. Mendoza Elvira, MC. Lidia Rangel Trujano, MC. Brígida del C. Camacho Enríquez y Dr. Benjamín Velasco Bejarano. Gracias por su contribución y tiempo en la revisión de este trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte esta gran casa de estudios.

A mis amigos: Vero Urrutia, Rubén Becerril, Alejo, Gisela Mendoza, Damaris, Mireya, Meche y Lupita. Gracias por su amistad y compañerismo y por todo lo que he aprendido de ustedes.

A los amigos de la Hemeroteca especialmente a Andrea y Ray, por su amistad, enseñanzas y consejos, y por estimularnos para culminar este proyecto.

A la Profesora Soledad Carreto

Por su amistad, tiempo y paciencia, por su trato amable, y su grandísima ayuda, por enseñarme personalmente que sí importan los títulos, pero que más importa la esencia de cada persona. Gracias!!

A cada uno de los compañeros que integran el laboratorio de Microbiología 10, por su apoyo y amistad.

CLAUDIA

DEDICATORIAS

A DIOS: Por darme la oportunidad de terminar este trabajo, aun con todos los contratiempos por los que pasamos.

A MIS PADRES: Ya que si no me hubieran recibido en su hogar, no podría haber realizado esta carrera, ni lo que soy.

A MI TIO PACO y ABUELITA JUANITA Q.E.D.: Por el ejemplo que me dieron con su forma de vivir y sus consejos.

A MI HIJO: MIGUEL SANTIAGO. ARRONA YAÑEZ

A TI... MI FUTURO BEBÉ

AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis representa un parteaguas entre una etapa muy enriquecedora y el camino que el tiempo obliga. En toda la experiencia universitaria y la conclusión de este trabajo, ha habido personas que merecen las gracias porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible la culminación de esta fase, de la misma manera hay quienes se merecen este agradecimiento por haber plasmado su huella en mi camino.

A DIOS Y SU CORTE CELESTIAL por darme la fortaleza necesaria para seguir superándome y la perseverancia para alcanzar mis grandes sueños y anhelos.

*A MIS PAPAS. * PETRA LULA GUTIERRES (mamá titus)
* MANUEL YAÑEZ ESPINOSA*

Por darme todo su amor y cariño, pero sobre todo por darme un hogar y hacer de mi una mejor persona. No hay palabras por todo lo que me dieron. Los quiero muchisisisísimo.

A MIS HERMANOS : Por haberme aceptado en su hogar, por el cariño y apoyo que me han brindado. Y a todos mis sobrinos por su sonrisa que me dan.

A MI TIO PACO, MI ABUELITA JUANITA y PLACIDO HINOJOSA. Q.E.D. Donde quiera que se encuentren nos lo he olvidado y hoy están presentes es este día tan importante de mi vida. Y a mi perrita COFY que siempre me dio su cariño.

A MI ESPOSO: MIGUEL ANGEL ARRONA SANDOVAL. Gracias por amarme, por estar conmigo incondicionalmente en las buenas y en las malas, por darle alegría a mi vida y por permitirme hacer realidad mis sueños junto a ti. Te amo

A MI HIJO: MIGUEL SANTIAGO ARRONA YAÑEZ (Gusanito sololoy). Gracias por ser un angelito que lleno mi vida de luz. Con tu sonrisa cambiaste mi vida. Eres uno de mis grandes motivos para ser feliz y luchar por ti, porque estuviste conmigo y con tus palabritas me alentabas a salir adelante. Mil gracias HIJITO MIO!!

A TI IRMA BOLAÑOS URIBE. (MORRIS). Por haber compartido este trabajo que es un círculo que ambas queríamos cerrar. Y estar conmigo en las buenas y en las malas, ya que sin ti este trabajo no se hubiera realizado. Gracias sinceramente Morris. T.Q.M.

A MIS COMPADRES: MIREYA, LUIS y FERNANDA. Por todo el apoyo y cariño que me han brindado para sacar adelante este trabajo y a mi niño. Gracias de todo corazón.

A MIS AMIGOS Y AMIGOS DE LA GENERACION 18^{AVA}, DE QFB., Vero Urrutia, Lupita Villegas (frutilupis), Mercedes (Meche), Guadalupe Vera (china), Angélica Mendoza (Angy), Nora Torres, Beatriz Acevedo, Leticia Dávalos, Angeles Anzures, Rubén Becerril (Nanis), Carlos H. A., Armando, Arturo, Rubén Basurto, Hugo, Alejo, Marco A. B. B. y a todos los que me faltaron apuntar, pero que fueron parte de mi vida estudiantil y fuera de la escuela. MUCHISISIMAS GRACIAS porque de todos ustedes aprendí algo bueno.

A LA MAESTRA SOLEDAD CARRETO. Sinceramente Muchas Gracias, ya que en la última recta para culminar este trabajo nos apoyo incondicionalmente, no encontrando las palabras con que expresar mi agradecimiento. De Todo Corazón le doy las Gracias.

A MI AMIGUCHA ANDREA MERCADO. Por haberme dado su cariño apoyo y consejos y estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias Por Todo Amiga..

A la sección de la hemeroteca: A RAY, ARMANDO Y NIDIA por habernos dado animo y apoyo para salir adelante con este trabajo.

A MIS AMIGOS DE LA BIBLIOTECA. Que aunque ya no estén laborando en ella fueron importantes en mi vida estudiantil, a Adrian, Martina y Sr. Memo.

A MIS MAESTROS: René Damián, Jesús Hernández Madrigal, Andrea Becerri, Ana Laura, Gina y Luís Antonio M. Por haber sido más que maestros amigos, que siempre me brindaron una sonrisa.

A MIS AMIGOS Y TIOS DE MI HIJO: Leticia Ramírez, David Roque, Joss, Julio Pacheco. Por estar conmigo en las buenas y en las malas y siempre darnos una mano. GRACIAS.

A MIS SINODALES: Dra. Susana E. Mendoza, MC. Lidia Rangel Trujano, MC. Brígida del C. Camacho E. y Dr. Benjamín Velasco Bejarano. Por su apoyo y aportaciones en la revisión de esta tesis. MUCHAS GRACIAS.

A MIS ASESORES: Gerardo Cruz Jiménez, y José Antonio Licea Vega. Por su apoyo para la realización de este trabajo, ya que ha pesar de que pasaron muchos años para culminar este trabajo siempre nos recibían con una sonrisa y nos alentaban para culminarlo y ser más que maestros amigos. Sinceramente Gracias por haber confiado en nosotras y por su paciencia. Muchisisisimas gracias.

A todo el laboratorio de Microbiología 10 (Sra. Erica, Mónica, Nelly, Sonia, Tania, Lupita, Marco, Mario, Ulises, por brindarme su amistad y apoyo).

A MI UNIVERSIDAD. Gracias por todo lo que me enseñó.

Lista de abreviaturas.....	IV
Índice de tablas.....	V
Índice de cuadros.....	V
Diagramas.....	V
Índice de figuras.....	V
Índice de gráficos.....	VI
Resumen.....	IX
□□□□□□□□□□□□.....	1
1.1 Generalidades.....	3
1.1.1 Antecedentes históricos del cultivo celular.....	3
1.1.2 Concepto de cultivo celular.....	5
1.1.3 Tipos de cultivo celular.....	5
1.1.4 Medio de cultivo para células de mamíferos.....	7
1.1.5 Aplicaciones del cultivo celular	8
1.1.6 Áreas de investigación del cultivo celular.....	8
1.1.7 Ventajas y desventajas de las técnicas de cultivo celular..	10
□□□□□□□□□□□□□□□□.....	12
1.2.1 Suplementación de los medios con suero.....	12
1.2.2 Contaminación del suero fetal bovino.....	13
1.2.3 Encefalopatía espongiforme de los bovinos (enfermedad de las vacas locas).....	14
1.2.4 Obtención del suero fetal bovino.....	15
1.2.5 Método alternativo al suero fetal bovino.....	15
□□□□□□□□□□□□□□□□.....	17
1.3.1 Características de las líneas celulares empleadas.....	17
1.3.1.1 Línea celular HELA.....	17
1.3.1.2 Línea celular VERO.....	18

.....	36
4.1 Efecto del extracto (crudo y comercial) de <u>Caléndula officinalis</u> sobre células BHK-21.....	36
4.2 Efecto del extracto (crudo y comercial) de <u>Caléndula officinalis</u> sobre células VERO.....	42
4.3 Efecto del extracto (crudo y comercial) de <u>Caléndula officinalis</u> sobre células RD.....	48
.....	54
.....	60
.....	62
7.1 Material biológico.....	62
7.2 Reactivos.....	62
7.3 Material.....	63
7.4 Equipo de trabajo.....	63
7.5 Preparación de reactivos.....	64
..... (Técnicas realizadas).....	67
.....	70
.....	72

□□□□□□□□□□□□□□□□

Abs.	Absorbancia
BHK-21	Células de riñón de hámster dorado
BVD	Virus de la diarrea bovina
° C	Grados centígrados
c.b.p.	Cuanto basta para
<u>C. officinalis</u>	<u>Caléndula officinalis</u>
cto.	Crecimiento
D-MEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
EEB	Encefalopatía Espongiforme Bovina
ext.	Extracto
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
HELA	Células de carcinoma de cerviz humano
HEP-2	Células de carcinoma de laringe humano
INDRE	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
L-15	Medio Leibovitz
M	Molar
mg/L	Miligramos por litro
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
No.	Número
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-i1] -2,5-difeniltetrazolio
RD	Células de rabdomiosarcoma humano
rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Solución buffer de fosfatos
pp	Precipitado
SFB	Suero Fetal Bovino
SSF	Solución Salina Fisiológica
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
VERO	Células de riñón de mono verde africano

□□□□□□□□□□□□□□

Tabla No.1	Preparación de controles y problemas	□□
Tabla No.2	Promedio de absorbancias y porcentaje de crecimiento de células BHK-21+ SFB + <u>C. officinalis</u> (extracto crudo)	□□
Tabla No.3	Promedio de absorbancias y porcentaje de crecimiento de células BHK-21 + SFB + <u>C. officinalis</u> (extracto comercial)	□□
Tabla No.4	Promedio de las absorbancias y porcentaje de crecimiento de células VERO + SFB + <u>C. officinalis</u> (extracto crudo)	□□
Tabla No.5	Promedio de las absorbancias y porcentaje de crecimiento de células VERO +SFB + <u>C. officinalis</u> (extracto comercial)	□□
Tabla No.6	Promedio de las absorbancias y porcentaje de crecimiento de células RD + SFB + <u>C. officinalis</u> (extracto crudo)	□□
Tabla No.7	Promedio de las absorbancias y porcentaje de crecimiento de células RD + SFB + <u>C. officinalis</u> (ext. comercial)	□□

□□□□□□□□□□□□□□

Cuadro No. 1	Tipos de cultivos celulares	□
Cuadro No. 2	Medios de cultivo para células de mamíferos	□
Cuadro No. 3	Composición del suero fetal bovino	□□











□□□□□□□□

Diagrama No.1	Preparación de diluciones del extracto crudo y/o comercial de <u>Caléndula officinalis</u>	□□
---------------	--	----

□□□□□□□□□□□□□□

Figura No. 1	Flor del espécimen vegetal de <u>Caléndula officinalis</u>	19
Figura No. 2	Microplaca de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular	□□



- Gráfica No.1 Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10 
- Gráfica No.2 Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:100 
- Gráfica No.3 Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:1000 
- Gráfica No.4 Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10000 
- Gráfica No.5 Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:10 
- Gráfica No.6 Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:100 
- Gráfica No.7 Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:1000 
- Gráfica No.8 Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:10000 
- Gráfica No.9 Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10 
- Gráfica No.10 Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:100 

-
-
- Gráfica No.11 Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:1000 □□
- Gráfica No.12 Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10000 □□
- Gráfica No.13 Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:10 □□
- Gráfica No.14 Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:100 □□
- Gráfica No.15 Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:1000 □□
- Gráfica No.16 Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:10000 □□
- Gráfica No.17 Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10 □□
- Gráfica No.18 Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:100 □□
- Gráfica No.19 Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:1000 □□
- Gráfica No.20 Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10000 □□

-
-
- Gráfica No.21 Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al porcentaje de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:10
- Gráfica No.22 Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al porcentaje de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:100
- Gráfica No.23 Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al porcentaje de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:1000
- Gráfica No.24 Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al porcentaje de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:1000

□□□□□□□□

La principal meta del cultivo de células es desarrollar medios definidos libres de suero que apoyen el crecimiento de las células, ya que uno de los problemas más frecuentes en el cultivo celular, es la utilización de medios de cultivo suplementados con Suero Fetal Bovino (SFB), el cual representa un riesgo de contaminación. Actualmente los controles están diseñados para detectar aquellos contaminantes de crecimiento rápido y que producen cambios notables en el medio de cultivo pues estos se detectan fácilmente; eliminándolos por filtración, adicionando antibióticos o irradiándolos; pero ni con uno ni con otro método se erradica la presencia del prión, responsable de la enfermedad de las vacas locas (Encefalopatía Espongiforme Bovina) por lo cual la búsqueda de medios libre de suero, es de suma importancia.^{1,3}

Se tienen antecedentes de que el biólogo francés Chistian Ribiere, aisló y puso en evidencia la primera molécula vegetal que permite el crecimiento del cultivo celular en ausencia de todo producto de origen animal que promueva el crecimiento celular.⁸

Con el propósito de contribuir en la búsqueda de nuevas alternativas en la sustitución del suero fetal bovino (SFB) para cultivo celular, en el presente trabajo se realizó la evaluación del efecto de extractos (crudo y comercial) de Caléndula officinalis, la cual ha sido utilizada durante mucho tiempo en medicina tradicional y se le atribuyen un gran número de propiedades que van desde cicatrizante hasta considerarse como antitumoral.²

Para ello se realizaron diversos ensayos por triplicado, en microplacas de 96 pozos para cada una de las líneas celulares (BHK-21, VERO, HELA, HEP-2 y RD), consistiendo estos en adicionar parcialmente el Suero Fetal Bovino (SFB) en el cultivo celular a concentraciones de 10, 5, 3 y 0% sustituyéndolas con un extracto crudo elaborado en la FES C-1 y un extracto obtenido de manera comercial de Caléndula officinalis, a diluciones de (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) En cada pozo se colocaron aproximadamente 600 células, se

incubaron en cámara de CO₂ por 24 horas y se procedió a agregar el MTT. Con el propósito de probar si es viable la disminución parcial o total de la cantidad de SFB en el cultivo celular, además de evaluar el comportamiento entre las diferentes líneas celulares y la eficacia entre uno y otro extracto.

Con el fin de evidenciar cuantitativamente el crecimiento celular, se utilizó el método de Mossman (MTT) como un marcador de crecimiento celular por medio de una reacción de oxido-reducción con desarrollo de color. La diferencia entre un pozo y otro en cuanto a la confluencia celular la determina la intensidad del color, en base a esto las placas se leyeron con un espectrofotómetro a longitud de onda de 640 nm con un prefiltro de 590 nm.

Las absorbancias obtenidas se compararon con sus respectivos controles positivos el cual contenía SFB al 10% y se obtuvo, que para las células HEP-2 y HELA no se logro ningún crecimiento celular con ambos extractos de C. officinalis, más bien hubo un efecto citotóxico.

Los resultados se expresan en porcentaje comparados con el control positivo que contiene SFB al 10%.

Para las células RD el porcentaje de crecimiento más sobresaliente fue de 98.52% muy cercano al control positivo del 100% con el extracto crudo a una dilución de 1:100 y SFB al 5 %.

Ahora bien en las células BHK-21 con extracto crudo y SFB al 5% se logro superar el 100%, siendo este de 108.6%, con el extracto crudo en la dilución de 1:10000.

En cuanto a las células VERO con el extracto crudo y SFB al 5% se obtuvieron resultados de 105.0% en la dilución de 1:10 y 120.0% en la de 1:1000 superando al control positivo, en tanto que para el extracto comercial y SFB al 3% el crecimiento fue de 127.83% en la dilución de 1:100 superando al control positivo.

El papel sobresaliente que desempeñan los cultivos celulares, a provocado que hoy día muchas prestigiadas firmas comerciales implementen estos bioensayos en sus protocolos para evaluar rápida, reproducible y confiablemente la actividad biológica de productos desarrollados por ellos, solo basta con mirar en la hoja técnica de un producto para reconocer que se utilizó un cultivo celular para medir la actividad biológica de su molécula.

Las industrias y laboratorios que utilizan suero fetal bovino (SFB) hoy en día, corren un peligro importante con el uso de sueros de origen animal, ya que estos pueden estar infectados con microorganismos que aun no se han podido eliminar por completo, como es el caso de los priones.



1.1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS DEL CULTIVO CELULAR ^{5,9}

Los cultivos celulares son huéspedes experimentales que vienen progresivamente reemplazando a los animales de laboratorio y son utilizados en prácticamente todos los campos de la Biomédica.

El cultivo de tejidos se desarrollo como una continuación de las técnicas de la embriología, a partir de los últimos años del siglo XIX.

1885 Wilhem Roux demostro que en una solución salina las células embrionarias de pollo pueden mantenerse vivas.

1907 Harrison cultivó médula espinal de anfibio en un coágulo linfático, demostrando así que los axones se producen como prolongaciones de células nerviosas.

1910 Rous indujo un tumor utilizando un extracto filtrado de célula tumoral de pollo, que más tarde se demostró que contenían un virus de RNA (virus del sarcoma de Rous).

1913 Carrel demostró que las células podían crecer en cultivo durante mucho tiempo, siempre que fueran alimentadas regularmente en condiciones asépticas.

1948 Earle y colaboradores aislaron células de la línea celular L y demostraron que en cultivo tisular formaban clones.

1952 Gey y colaboradores establecieron una línea continua de células derivada del carcinoma cervical humano, que más tarde se convirtió en la conocida línea celular HELA.

1954 Levi-Montalcini y sus colaboradores demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimula el crecimiento de los axones en cultivo.

1955 Eagle desarrolló la primera investigación sistemática sobre los requerimientos nutricionales esenciales de las células en cultivo y encontró que las células animales se pueden propagar en una mezcla

-
-
- definida de pequeñas moléculas suplementada con una reducida proporción de proteínas séricas.
- 1956 Puck y colaboradores seleccionaron mutantes con requerimientos de crecimiento alterados a partir de células HELA en cultivo.
- 1958 Temin y Rubin desarrollaron un método cuantitativo para la infección de cultivos de células de pollo mediante el virus del sarcoma de Rous purificado. En la década siguiente Stoker, Dulbecco, Green y otros virólogos establecieron las características de ésta y de otras transformaciones víricas.
- 1961 Hayflick y Morread demostraron que los fibroblastos humanos en cultivo mueren tras un número finito de divisiones.
- 1964 Littelfield introdujo el medio HAT para el crecimiento selectivo de híbridos celulares somáticos. Junto con la técnica de la fusión celular, este medio hizo accesible la genética de las células somáticas.
- Kato y Takeuchi obtuvieron una planta completa de zanahoria a partir de una sola célula de Raíz de zanahoria mantenida en cultivo.
- 1965 Ham introdujo un medio definido, sin suero, que permitía el crecimiento clonal de células de mamífero.
- Harris y Watkins produjeron los primeros heterocariontes de células de mamífero, mediante la fusión inducida víricamente de células humanas y de células de ratón.
- 1968 Augusti-Tocco y Sato adaptaron al cultivo células nerviosas tumorales de ratón (neuroblastoma) y aislaron clones que eran excitables eléctricamente y producían prolongaciones nerviosas. En esta época se aislaron otras células diferenciadas, entre ellas líneas celulares de hepatocitos y de músculo esquelético.
- 1975 Kohler y Milstein produjeron las primeras líneas de hibridomas que segregaban anticuerpos monoclonales.
- 1976 Sato y colaboradores publicaron el primero de una serie de informes, demostrando que para crecer en un medio sin suero, las líneas celulares diferentes requieren mezclas diferentes de hormonas y de factores de crecimiento.
- 1977 Wigler y Axel y colaboradores desarrollaron un eficiente método para

1.1.4 MEDIO DE CULTIVO PARA CELULAS DE MAMIFEROS ¹⁴

Las células animales son más difíciles de cultivar que los microorganismos, dado que requieren muchos otros nutrientes. A pesar de estas dificultades, es posible cultivar con éxito varios tipos de células animales.

Los componentes esenciales del medio de cultivo son los aminoácidos, siendo en su gran mayoría elaborados por la misma célula, vitaminas, que no pueden ser sintetizadas por las células, o sólo en cantidades insuficientes, distintas sales, glucosa y suero.

Algunos tipos de células de mamíferos se pueden cultivar en un medio completo definido, libre de suero, complementado con oligoelementos, factores de crecimiento proteicos específicos y otros componentes mencionados en el cuadro No. 2.

□ □ □ □ □ □ □ □ Medio de cultivo para células de mamíferos ¹⁴

MEDIO CON SUERO	
Aminoácidos esenciales	Los aminoácidos esenciales –histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, arginina triptófano y valina- más cisteína, glutamina y tirosina (todos en concentración 10^{-4} , 10^{-5} M)
Vitaminas	Colina, ácido fólico, nicotinamida, pantotenato, piridoxal y tiamina (todos en concentración de: (1 mg/L); inositol (2 mg/L); riboflavina (0,1 mg/L)
Sales	Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} , HCO_3^-
Glucosa	0,9 g/L
Suero dializado	5-10-% del volumen total
MEDIO DEFINIDO (SIN SUERO)	
Aminoácidos	Como el anterior más alanina y asparagina (10^{-4} M)
Vitaminas, sales, glucosa	Como el anterior
Otros agregados:	
Ácidos grasos	Ácido linoleico, ácido lipoico
Compuestos nitrogenados	Hipoxantina, timidina, putrescina
Fuente de carbono	Piruvato y glucosa (0,9 g/L)
Oligoelementos	Cadmio, Manganeso, molibdeno, níquel, estaño, vanadio.
Hormonas y factores de crecimiento	Insulina, transferrina, hidrocortisona, Factor de de crecimiento de fibroblastos, Factor de crecimiento epidérmico.

1.1.5 APLICACIONES DEL CULTIVO CELULAR ¹²

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular como son:

- a) Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ejemplo transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético.
- b) 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.
- c) Ecología celular. En el estudio de las condiciones ambientales del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación como por ejemplo estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular.
- d) Interacciones celulares. En los procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacción célula-célula.

1.1.6 AREAS DE INVESTIGACION DEL CULTIVO CELULAR ¹²

Hasta hace pocos años atrás los cultivos celulares eran utilizados solamente por los biólogos celulares en la investigación de la estructura y función celular; y por los virólogos para el aislamiento, caracterización, estudio del ciclo replicativo y patogenia de los distintos agentes virales, así como también en el desarrollo de vacunas contra los mismos. Actualmente ha pasado a ser una herramienta indispensable para algunas otras áreas de investigación, entre las cuales se encuentran las siguientes:

1.1.7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS TECNICAS DE CULTIVO CELULAR ¹³

Las técnicas de cultivo celular tienen una serie de ventajas innegables, y desventajas que hay que tomar en consideración.

□□□□□□□□

□ Permiten un control preciso y fino del medio ambiente.

Se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial), fisiológicos para algunas líneas celulares, de las que se ha definido su medio.

□ Caracterización y homogeneidad de la muestra.

Las células de una línea celular en un cultivo son homogéneas, con morfología y composición uniforme. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherentes asociado al uso de animales de experimentación.

□ Economía.

En el estudio de reactivos o fármacos las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en un animal completo, el proceso de cultivo continuo ofrece factores económicos decisivos (utilización de mejores equipos, reducida manipulación) cuando se trata de producir cultivos a una mayor escala de operación.

□ Motivaciones éticas.

La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo In Vivo pero es una alternativa válida en muchas situaciones.

□□□□□□□□□□

□ Técnica sensible.

El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas, etc.) y además dado que proceden de organismos pluricelulares son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el flujo intersticial. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como del personal calificado para su manipulación.

□ Cantidad y costo.

El costo de producción de 1 g de tejido en cultivo es 10 veces superior al obtenido en el animal, asimismo existe una limitación de producción que es del orden de 10 g de células en un laboratorio normal, y que para ser superior a 100 g requiere instalaciones de tipo industrial.

□ Inestabilidad.

Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado, o después de un determinado número de generaciones.

□ Validez del modelo In Vitro.

Cuando se establece el cultivo, las células se diferencian y entre otras cosas se hacen móviles e inician su proliferación. Esta diferenciación puede en algunos casos ser revertida por procedimientos de diferenciación inducida por hormonas, confluencia, inductores químicos; pero no está claro si el estado rediferenciado es equivalente al estado de diferenciación In Vivo. Por todo lo anterior hemos de ser precavidos en cuanto a la validez de los resultados obtenidos In Vitro respecto a lo que pueda observarse In Vivo. Sin embargo actualmente se están realizando gran cantidad de estudios de validación de modelos In Vitro dentro del desarrollo de los métodos alternativos a la experimentación animal.

crecimiento celular requiere la suplementación con hormonas y otros factores de crecimiento que están involucradas en transporte de nutrientes, mantenimiento de balance de energía celular, control de síntesis de macromoléculas y factores que estimulan la formación del producto deseado; etc. Por lo que muchos de los factores suplementados son purificados del mismo suero lo cual hace que cultivos a gran escala con medio libre de suero no sean rentables.

La mayoría de los cultivos 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.

A menudo se utiliza suero de fetos vacunos, porque contiene mayores concentraciones de determinados factores de crecimiento que el de otras especies como (cerdo, cobayo, conejo, etc.)

Uno de los suplementos más efectivos es el SFB, sin embargo la inclusión del suero en el medio de cultivo tiene algunas desventajas; como que es una mezcla químicamente indefinida, la variación de la calidad entre los lotes, puede provocar resultados inconsistentes en cuanto al desarrollo del cultivo, así mismo la contaminación de este. Aunado a esto 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.

1.2.2 CONTAMINACION DEL SUERO FETAL BOVINO ^{1,19}

El uso del SFB en los cultivos celulares trae consigo la posibilidad de introducir agentes adventicios tales como virus y priones, ya que se ha reportado que el porcentaje de contaminación del suero fetal comercial oscila entre el 10 y el 70%.

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, especialmente si va dirigidas a la reimplantación en humanos.

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 o virus, entre ellos el Virus de la Diarrea Bovina (BVD), que es un contaminante común y el SFB es la fuente principal de esta contaminación.

También se hace mención a la contaminación por priones, por lo que el uso de SFB en líneas celulares requiere una urgente valoración de los riesgos de las Encefalopatías Espongiformes Bovina (EEB).

1.2.3 ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME DE LOS BOVINOS (Enfermedad de las vacas locas)

Se tienen indicios de esta enfermedad a partir de noviembre de 1986 en Gran Bretaña. Se observó que se parecía mucho al Scrapie, que es una encefalopatía espongiforme que afecta a los borregos.

Actualmente la mayoría de los investigadores consideran que el agente etiológico es un príon constituido por una glicoproteína anormalmente resistente a la proteasa que mide de 4 a 6 por 100 a 500 nm.⁹ Recientemente ha sido ligada con un padecimiento en humanos conocido como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Consecuentemente, los países exportadores de suero bovino tienen que certificar la ausencia del príon causante de EEB.¹⁹

Los agentes etiológicos de la encefalopatías espongiformes son muy resistentes al formol, calor, luz ultravioleta, radiación ionizante y a los desinfectantes químicos.⁹

1.2.4 OBTENCION DEL SUERO FETAL BOVINO ¹⁷

El SFB se obtiene en aquellas áreas del mundo donde se crían vacas de forma extensiva (Australia, Nueva Zelanda, el continente Americano). Esto es, manadas en las que las vacas y los toros deambulan libremente, suponiendo que algunas vacas estén preñadas cuando las llevan al matadero. Durante el proceso en el que se apartan los órganos internos de cada vaca puede ser que aparezca un feto. Si el matadero tiene las instalaciones para ello, el aparato reproductor entero, incluyendo el feto, se corta rápidamente del cadáver de la madre y se lleva a una zona más aséptica (Área de procesado de terneros). Primero, el feto se separa del útero. Se arranca el cordón umbilical, se limpia el feto de fluido amniótico, y se desinfecta. Entonces, se inserta una aguja de gran diámetro a través de la piel y entre las costillas, directamente al corazón latiente del feto. La sangre se extrae normalmente al vacío en una bolsa recolectora de sangre estéril a través de un tubo conectando a ambos. Después, se destruye el feto vacío para asegurarse que no será usado para consumo humano.

1.2.5 METODO ALTERNATIVO AL SUERO FETAL BOVINO ¹⁶

Las técnicas de cultivos celulares representan una forma de realizar investigación científica, médica, toxicológica, entre otras sin el empleo de animales vivos. Afortunadamente, las líneas celulares pueden crecer durante muchísimas generaciones en un recipiente plástico de lo que lo harían en el animal vivo.

Para cultivar células, tejidos y órganos son necesarias ciertas condiciones adecuadas de crecimiento, esto se consigue añadiendo el medio de cultivo a menudo combinado con SFB, este contiene muchas sustancias que las células cultivadas necesitan para crecer y vivir adecuadamente

Se sabe que en algunos países centroeuropeos los fetos bovinos serían o han sido criados específicamente con el propósito de recolectar su sangre;

aparentemente hay una contradicción In Vitro cuando se trata de usar el SFB en los cultivos celulares.

Cada año cerca de medio millón de litros de SFB se obtienen de más de un millón de fetos bovinos en todo el mundo. Con unas pocas excepciones, los proveedores comerciales se muestran casi todos muy renuentes a la hora de dar información sobre cualquier aspecto concerniente a la obtención del SFB. También hay disponible suero fetal de caballo y de cerdo, mayoritariamente producido en el sur de los E. U. y en México.

Entre los sustitutos tenemos los medios 100% sintéticos específicos según el tipo de célula, y caros de desarrollar, los medios de suero reducido son de más amplia aplicabilidad que los medios sintéticos.



Las líneas celulares son células de un solo tipo capaces de propagarse In Vitro para siempre, generalmente pertenecen a los tres tipos más comunes de células según su aspecto morfológico en cultivo: linfoide, epitelial y fibroblástico.^{13,18}

Estas células han sufrido un importante proceso de adaptación y modificaciones cromosómicas que les permiten desarrollarse en forma permanente en los cultivos, ejemplo de ello son las células:

VERO	Riñón de mono verde africano, monocapa fibroblastos
BHK-21	Riñón de hámster dorado, monocapa fibroblastos
HELA	Carcinoma de cervix humano, monocapa epitelial
HEP-2	Carcinoma de laringe humano, monocapa epitelial
RD	Derivado de un rabdomiosarcoma humano ^{10,20}

1.3.1 CARACTERISTICAS DE LAS LINEAS CELULARES EMPLEADAS

1.3.1.1 LINEA CELULAR HELA (Carcinoma de cervix humano, monocapa epitelial)

Es el primer tipo celular humano cultivado, se obtuvo originalmente en 1952 de un tumor maligno (carcinoma) de cuello uterino.

Esta línea celular ha sido muy valiosa para la investigación de células humanas. Usada en cultivo de virus y para el estudio de fármacos antitumorales, puede crecer en monocapa y suspensión.^{14, 21,22,23}

1.3.1.2 LINEA CELULAR VERO (Riñón de mono verde africano monocapa fibroblastos)

Línea celular derivada de riñón de mono verde africano adulto (*Cercopithecus Aethiops*), se obtuvo el 27 de marzo de 1962 por Y. Yasumura y Y. kawakita en Japón. Utilizada principalmente en los estudios de replicación viral y ensayos de placa.^{21, 22, 23}

1.3.1.3 LINEA CELULAR RD (Derivado de un rhabdomiosarcoma humano)

Se consiguió su cultivo en el año de 1968 derivada de un Rhabdomiosarcoma embrional maligno de la pelvis de una mujer caucásica de 7 años de edad, células grandes multinucleadas.^{22,23}

1.3.1.4 LINEA CELULAR HEP-2 (Carcinoma de laringe humano, monocapa epitelial)

Obtenida de un hombre caucásico de aproximadamente 56 años. Es susceptible a virus como el newcastle y el poliovirus.²²

1.3.1.5 LINEA CELULAR BHK-21 (Riñón de hámster dorado, monocapa fibroblastos)

Esta línea fue y sigue siendo usada como sustrato para elaborar la vacuna antirrábica.²²

☐☐☐ **Caléndula Officinalis** ^{24,30,32}

1.4.1 NOMBRE COMÚN: Caléndula

1.4.2 NOMBRE CIENTÍFICO: Caléndula officinalis L.

1.4.3 FAMILIA: Compuestas, Asteráceas

1.4.4 SINONIMIA

Castellano: maravilla, mercadela,
flor de muerto, flamenquilla, etc.

Catalán: boixac

Gallego: boninas

Vasco: illen

Francés: souci

Inglés: marigold

Alemán: ringelblume

Italiano: fiorrancio

☐☐☐☐☐☐☐ Flor del espécimen vegetal de Caléndula officinalis



1.4.5 DESCRIPCION BOTANICA ^{33,34,37}

Es una hierba anual más o menos pelosa, de 30 a 60 cm. de altura, hojas simples, alternas, algo gruesas, de oblongas a obovado-oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas; cabezuelas solitarias en pedúnculos robustos, vistosos de 3.75 a 5 cm. de diámetro; los radios planos, extendidos de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, que se cierran por la noche.

Los tallos son firmes, los frutos son aquenios, espinosos, rugosos, arqueados los periféricos, casi anulares los centrales. El olor de la planta es poco grato.

1.4.6 DISTRIBUCION GEOGRAFICA ^{35,36}

Es una planta anual que se cultiva en todo el mundo. Originaria de Europa. Cultivada con fines de ornato y medicinales en Europa y América desde el siglo XII, existe como subespontánea en la región mediterránea.

Clima: templado pero resiste heladas y sequías.

Suelo: poco exigente para su cultivo.

1.4.7 HISTORIA ^{35,41}

Esta planta es conocida desde la antigüedad. El nombre Caléndula proviene del latín calendae (calendario) que designa el primer día de cada mes. Con este nombre, que algunos le atañen a tiempo de los romanos, se hace referencia a la floración que prácticamente se produce todos los meses del año. Los aztecas le atribuían propiedades espirituales, mágicas y medicinales.

El Códice de la Cruz-Badiano fechado en 1552 es el primer documento escrito conocido que hace mención a esta planta. En 1578 el botánico Dodoens hace

referencia a ella. Tiene unas flores agradables, de color amarillo brillante, las cuales se cierran a la caída del sol. También Nicholas Culpeper (1660-1738) famoso herbolista, la recomendaba para fortalecer el corazón.

Tanto en Latinoamérica como en algunos países europeos, las flores se utilizan para adornar los altares en las fiestas de todos los santos. También se utilizan en ceremonias religiosas hindúes.

1.4.8 USOS ^{39,40,42,43}

Esta planta ha sido empleada por largo tiempo en la terapia tradicional, atribuyéndole más de 35 propiedades a las decocciones y tinturas de las flores, actualmente es ampliamente utilizada en remedios homeopáticos comerciales.

Los extractos acuosos de las flores de *C. officinalis* presentan las propiedades farmacológicas siguientes:

Cicatrizante	Antiinflamatorio	Antibacteriano
Tranquilizante	Astringente	Antiséptico
Antiespasmódica	Callicida	Suavizante
Antihipertensiva	Antitusivo	Aperitivo
Artritis	Analgésico	Expectorante
Bronquitis	Carminativo	Cáustico
Expectorante	Colagoga	Colitis
Depurativo	Diurético	Diaforético
Diabetes	Emoliente	Otros
Hemostático	Antiviral	

Utilizado para baños de asiento en el tratamiento de las hemorroides y en fomentos en picaduras de abeja e inflamación de la piel. Al igual se aplica en

lavados de los senos paranasales cuando hay infección (sinusitis), así como en lavados vaginales, contra enfermedades del hígado, así como en úlcera de estómago, regula la menstruación, recuperación de la piel.

1.4.9 COMPOSICION QUIMICA ^{25,26, 27, 28,29,42}

Las flores de *C. officinalis* presentan un amplio espectro de tipos de compuestos químicos, lo cual esta concordancia con la diversidad de acciones farmacológicas que presenta la planta.

Entre los compuestos más investigados dado su interés farmacológico están los carotenoides y los flavonoides, así tenemos que se plantea un contenido de 0.078 y 0.017% de carotenoides totales en las flores liguladas y en los receptáculos respectivamente, y de los compuestos identificados se encuentran y caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6 epoxicaroteno, - zeacaroteno, mutatoxantina y lutein epóxido.

En relación con los flavonoides se plantea un contenido de 0,88 y 0,33% de flavonoides totales en las flores liguladas y receptáculos respectivamente, y de los compuestos identificados se encuentran: isorhamnetina 3-0 glicósido, isorhamnetina, rutinósido, isorhamnetina neohesperidósido, quercetina glucósido, calendoflosido, calendoflavosido, narcisina, isoquercetina, quercetina, rutosido y kaemferol, etc.

Otros compuestos de interés en las flores de *C. officinalis* son los triterpenos, de los cuales han sido identificados por diversos investigadores el 3,16,21 trihidroxiursaeno, el ursadiol, los heliantriol A₀ B₁, B₂ y C, el lolilido, el 3,15,28 trihidroxi olean-12-eno, el 3,16,28 trihidroxi lup-20, 3,16,22 trihidroxi tarax-20-eno y calendulosido F.

También se destaca en las flores de *C. officinalis* un aceite esencial, del cual se plantea un rendimiento de 0,02% para la flor en su conjunto y se señala rendimiento de 0,12 y 0,40 % respectivamente para las flores liguladas y los receptáculos. En relación con su composición se determinó la presencia de

pedunculatina y ionona, oxidotranscariofileno, carnova, cariofileno, 2 cardinoles, geranil acetona, -ionona-5,6-epóxido, dihidroactinidiolido, oplopanona, guaiol y torryol.

Las saponinas son otros compuestos presentes entre las reportadas están el ácido oleanólico.

Así mismo presencia de ácidos fenólicos es reportada por varios investigadores, entre los que se pueden señalar los siguientes: coumárico, gentísico, vainillíco, caféico, siríngico, ohidroxifenilacético, protocate-quínico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, salicílico, clorgénico, verátrico, o-coumárico, ácidos fenólicos totales.

La presencia de ácidos fenólicos es reportada por varios investigadores entre los que se pueden señalar los siguientes: coumárico, gentísico, vainillíco, caféico, p-hidroxibenzoico, salicílico, clorgénico, verátrico, etc.

Así mismo también reportan la presencia de coumarinas, de las cuales se identifica la escopoletina, umbeliferota y esculetina.

1.4.10 FORMAS DE USO RECOMENDADAS ^{29,38,40}

Entre las diferentes formas de uso se encuentran: decocción, infusión, tintura, crema, ungüento, loción para el cutis, extracto líquido y otras preparaciones farmacéuticas.

1.4.11 RECOLECCION ^{30,37,42}

Para el aprovechamiento de las sumidades floridas, la recolección debe hacerse cuando éstas se hallan en plena floración que sería entre la segunda y primera quincena de junio y julio respectivamente.

El secado de la planta tiene gran importancia para la preservación de los principios activos, ya que su almacenamiento por 3-5 horas en sacos de polietileno conlleva una pérdida del 28-30% de los carotenoides y del 24-26% de los flavonoides.



Las células que adquieren la capacidad de proliferar indefinidamente en medios de cultivo representan una considerable ventaja para las ciencias biomédicas, ya que se dispone de células con características semejantes y en forma permanente, recordemos que las células se conservan congeladas a muy bajas temperaturas en nitrógeno líquido a -196°C ; sin que se pierdan sus propiedades, recurriendo a ellas cada vez que se necesite repetir el bioensayo.

Actualmente en los cultivos celulares el Suero Fetal Bovino (SFB) puede ser un vehículo para la transmisión de agentes patógenos entre los que se encuentran los priones, máxime si los cultivos celulares se usan para la elaboración de vacunas. Hoy en día el desarrollo de medios libres de suero fetal bovino, es de suma importancia para el incremento en la seguridad de los productos biológicos.

□□□□□□□□ □□□ □□□□□□

Se ha visto en estudios anteriores que el extracto de Caléndula officinalis promueve el crecimiento celular. Entonces si sustituimos parcialmente el Suero Fetal Bovino (SFB) por extractos de Caléndula officinalis, y obtenemos un desarrollo superior al del control positivo, entonces podremos proponer a esta como una alternativa posible para el uso de cultivo celular libre de suero, evitando así la contaminación por priones y disminuyendo los costos.



2.1 OBJETIVO GENERAL

Sustituir parcialmente el Suero Fetal Bovino por extractos de Caléndula officinalis, en la elaboración de cultivos celulares en líneas establecidas (BHK-21, VERO, HELA, HEP-2 y RD), para determinar si tiene un efecto promotor celular.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- * Obtener un extracto crudo con calidad microbiológica de Caléndula officinalis.
- * Comparar el efecto de los extractos crudo y comercial de Caléndula officinalis en las diferentes líneas celulares empleadas.
- * Determinar el efecto proliferativo y/o citotóxico del extracto de Caléndula officinalis, en las diferentes líneas celulares.
- * Utilizar el método de Mossman (MTT) como prueba cuantitativa para valorar el efecto de los extractos.
- * Determinar cual es la mejor dilución del extracto de Caléndula officinalis, que promueve el desarrollo celular.

3.3 CULTIVO CELULAR.

Las líneas celulares utilizadas para este trabajo son: BHK-21, VERO, HELA, HEP-2 y RD; las cuales fueron donadas por el INDRE (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias).

Inicialmente los criotubos con las células fueron descongelados bruscamente colocándolas en agua destilada a 37°C, de las cuales se tomaron con una micro pipeta de 500 µL pasándolas a una botella Falcón® de (25 cm²) que contenía previamente 4.5 mL de medio correspondiente para cada línea celular con SFB al 10%, lo mismo se realizó para cada una de las líneas celulares. Incubándose en estufa de CO₂ a 37°C hasta obtener una confluencia celular en cada botella.

Todos los cultivos se monitorearon diariamente con un microscopio invertido, para verificar la morfología, crecimiento y contaminación de cada uno, prosiguiendo a realizar los pases celulares (ver técnica en anexo), necesarios para los ensayos en microplaca.

3.4 ENSAYO CELULA – EXTRACTO

Para llevar a cabo el ensayo célula-extracto se realiza un conteo celular (ver técnica en anexo). De este conteo se tomaron aproximadamente 600 células. Los ensayos se realizan por triplicado y todo el procedimiento se efectúa dentro de una cabina de flujo laminar en condiciones estrictamente estériles.

La preparación de los problemas se realizó de la siguiente manera adicionando a cada uno de los pozos de la microplaca: 50 µL de D-MEM, L-15 y 199 dependiendo de la línea celular a trabajar, 50 µL de extracto de *C. officinalis* (crudo y/o

comercial) y 25 μ L de células (600 células por pozo aproximadamente); el SFB la cantidad necesaria según el por ciento designado. Como se muestra en tabla 2.

Preparación de controles y problemas

Columna	Medio (μ L)	Extracto (μ L)	Susp. de cel. (μ L)	SFB (μ L)	% SFB
1	125	---	---	---	---
2	100	---	25	---	---
3	100	---	25	12.5	10%
4-6	50	50	25	6.25	5%
7-9	50	50	25	3.75	3%
10-12	50	50	25	---	0%

En esta tabla muestra la forma de preparación de los ensayos para la microplaca

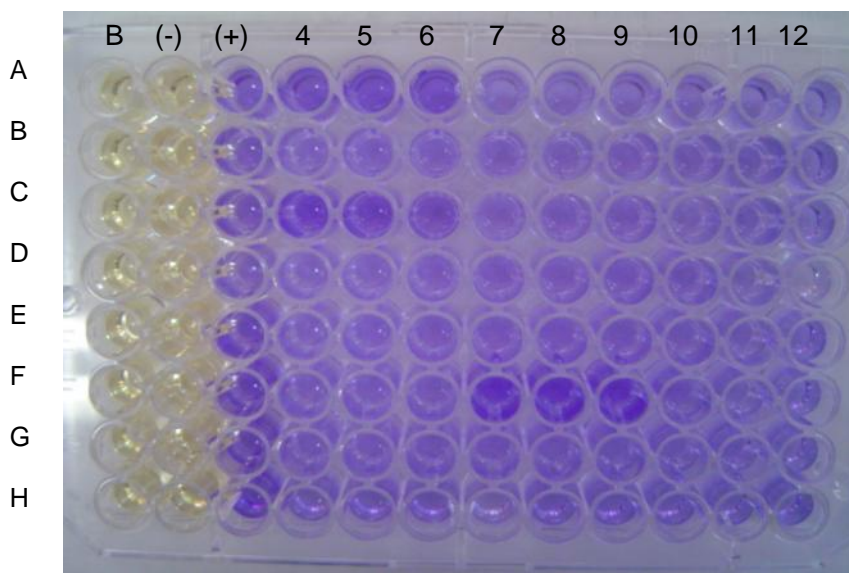
La distribución y llenado de la microplaca para los ensayos se realizó de la siguiente manera. Las columnas 1, 2 y 3 corresponden al blanco, control negativo y control positivo respectivamente.

Los pozos de la columna blanco solo contienen 125 μ L de medio, para el control negativo se adiciona 100 μ L de medio, 25 μ L células. Con respecto al control positivo los pozos contienen 100 μ L de medio, 25 μ L células y SFB CELlect™GOLD al 10%.

De la columna 4 a la 6 el porcentaje de SFB es de 5%, de la 7 a la 9 es de 3% y de la 10 a la 12 0%.

Ahora bien las filas de la microplaca se dividieron de la A a la D para el extracto crudo y de la E a la H para el extracto comercial; además correspondiéndole una dilución del extracto de *C. officinalis* a cada una: en la fila A la dilución es 1:10, en la B 1:100, C 1:1000 y D 1:10000, siendo de igual forma de la E a la H, como se muestra en la figura 2.

□□□□□□□□ Microplaca de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular



En esta placa se observan los resultados obtenidos al enfrentar la línea celular VERO con los extractos de *C. officinalis* crudo y comercial con diferentes diluciones.

3.5 PRUEBA CUANTITATIVA (Método colorimétrico de Mossman)

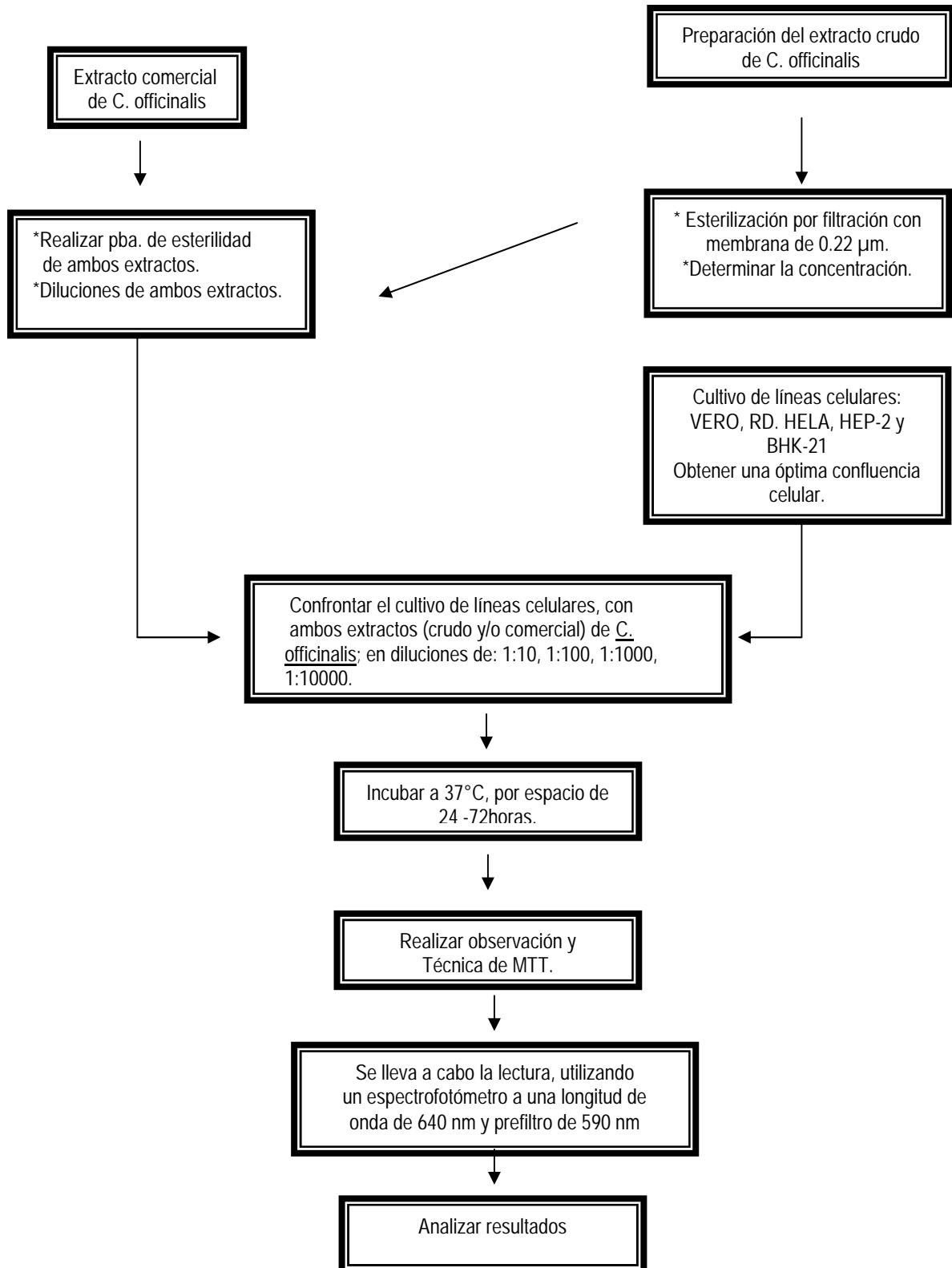
Las microplacas se sellaron y se incubaron a 37°C, a las 24 horas se observaron en un microscopio invertido para verificar la confluencia celular en cada uno de los pozos y decidir si es posible realizar la prueba cuantitativa de MTT.

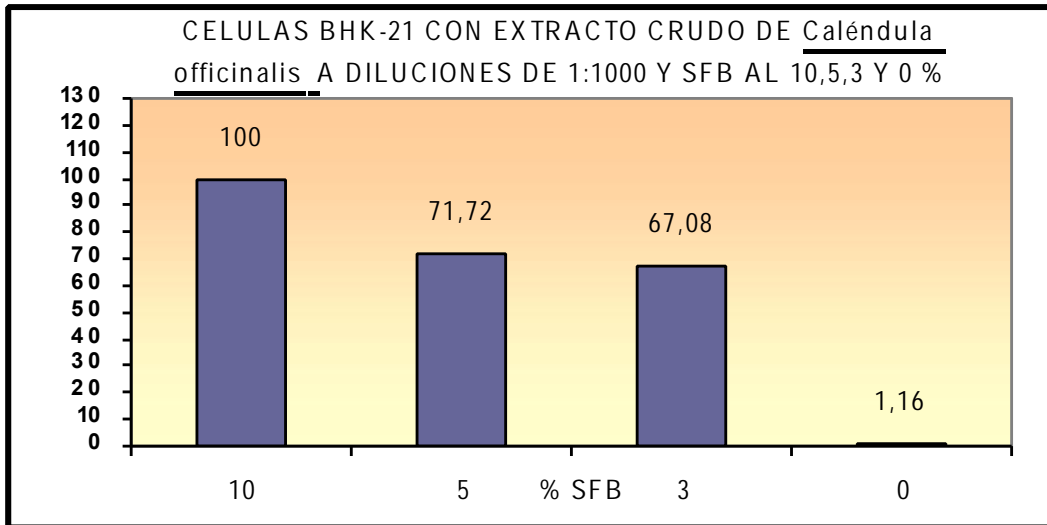
El tiempo de incubación varia para cada línea celular siendo de 24 horas para las células BHK-21, RD, HELA y BHK-21 para las células VERO de 72 horas.

Una vez que se observo una confluencia celular se procedió a retirar el medio por decantación. Después las microplacas se lavaron con PBS estéril, el cual se desecho de la misma manera repitiéndose el procedimiento hasta la eliminación total del medio, Se adicionaron 90 µL de PBS y 10 µl del MTT al 0.1% a cada pozo y se incubo por un lapso de 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se adiciono el reactivo de paro alcohol isopropílico (Ver apéndice sección preparación de reactivos). Para finalmente realizar la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm con un prefiltro de 590 nm.

Nota: Todo el procedimiento se realizo bajo condiciones de esterilidad (en cabina de flujo laminar)

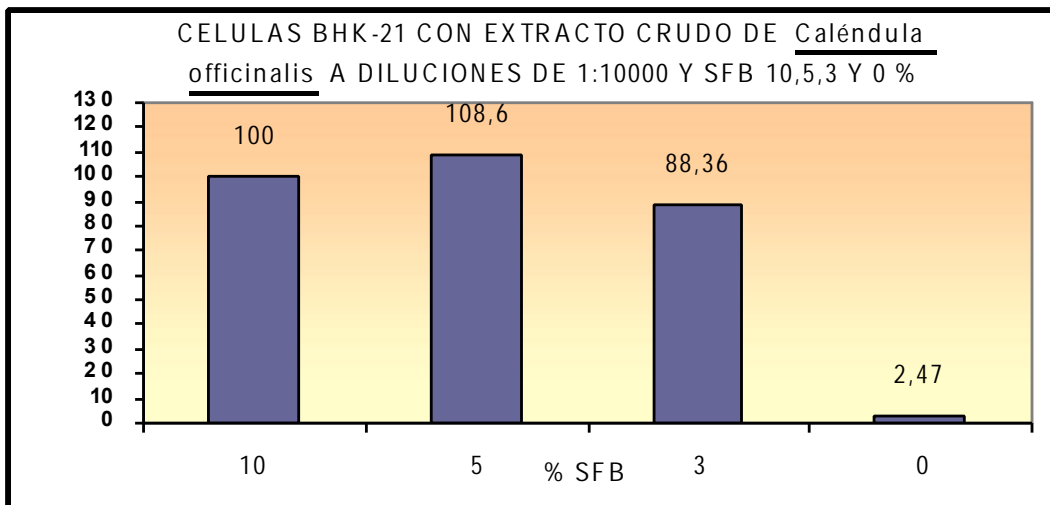
3.6 DIAGRAMA DE TRABAJO





□ ■■■■■■■■ Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:1000.

En cuanto a la dilución 1:1000, es muy similar el comportamiento del crecimiento celular con respecto a la anterior dilución con el SFB al 5% y 3% y casi nulo su crecimiento, cuando en la dilución solo esta presente la Caléndula officinalis.



□ ■■■■■■■■ Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10000.

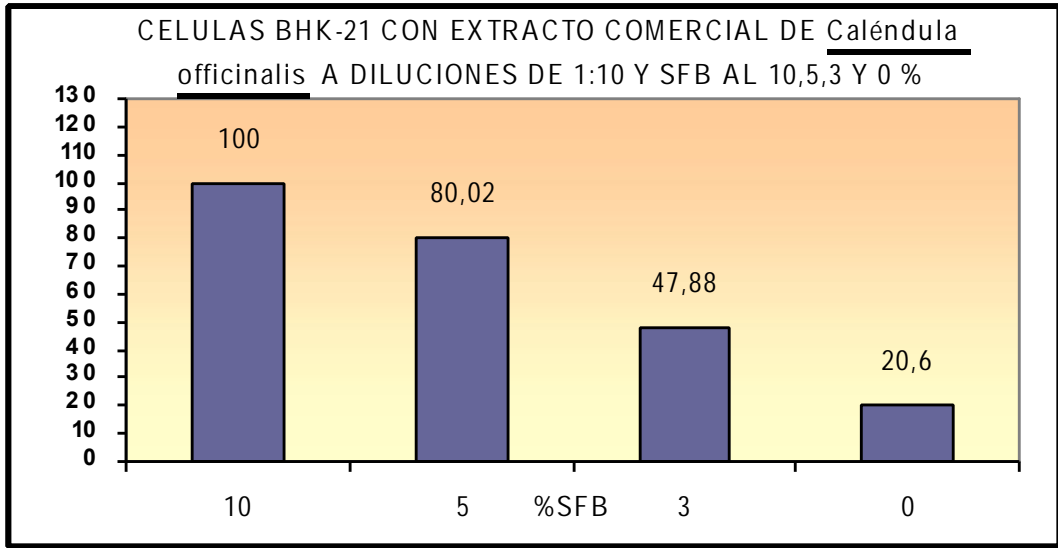
La gráfica 4 exhibe los resultados con la dilución de C. officinalis 1:10000, en la cual se observa la barra del 5% de SFB que muestra el 108% de crecimiento el cual supera el 100% cuya solución contiene el 10% de SFB.

En la tabla 3 se presenta la media aritmética de las absorbancias obtenidas al trabajar con células BHK-21 y extracto comercial, así como el por ciento de crecimiento. Cuyos resultados obtenidos sirvieron de comparación en la calidad del extracto crudo y comercial de Caléndula.

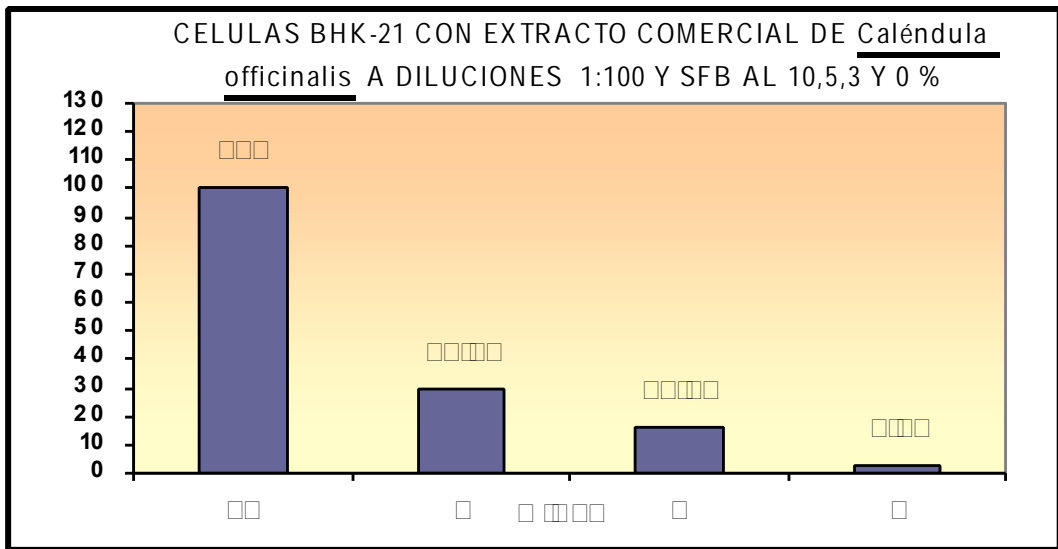
Promedio de absorbancias a una longitud de onda de 640 nm y porcentaje de crecimiento de células BHK-21 + SFB+ *C. officinalis* (extracto comercial)

<i>C. officinalis</i>				
	0.001	0.001	0.001	0.001
	0.002	0.002	0.002	0.002
	0.157	0.0637	0.187	0.228
	100	100	100	100
	0.127	0.188	0.164	0.152
	80.02	29.51	89.27	66.66
	5×10^{-3}	1×10^{-3}	1×10^{-3}	1×10^{-3}
	0.076	0.103	0.104	0.152
	47.88	16.27	56.99	66.88
	3×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}
	0.032	0.015	0.001	0.025
	20.60	2.35	0.680	11.05
	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-5}	1×10^{-4}

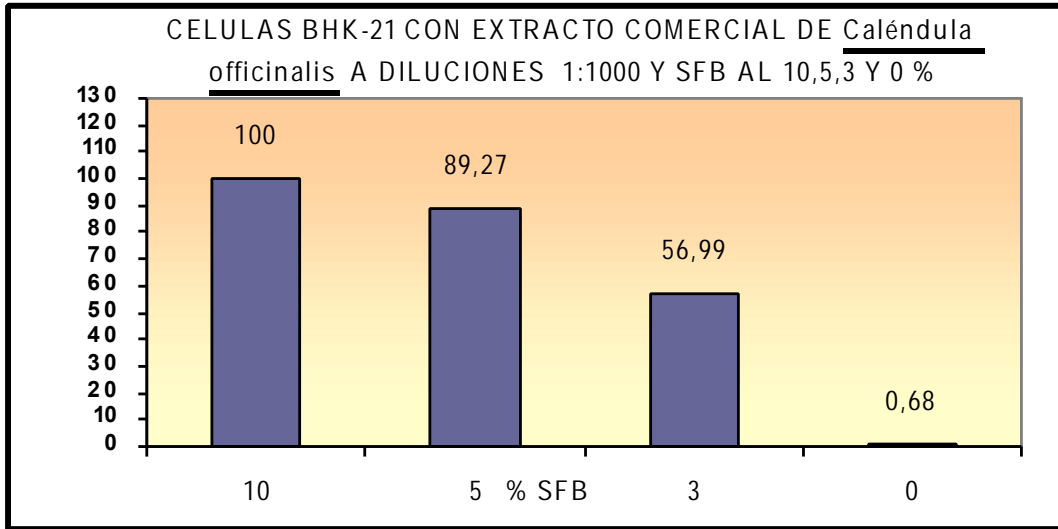
Los gráficos que representan los resultados con el extracto comercial de *C. officinalis*, y células BHK-21 se muestran a continuación.



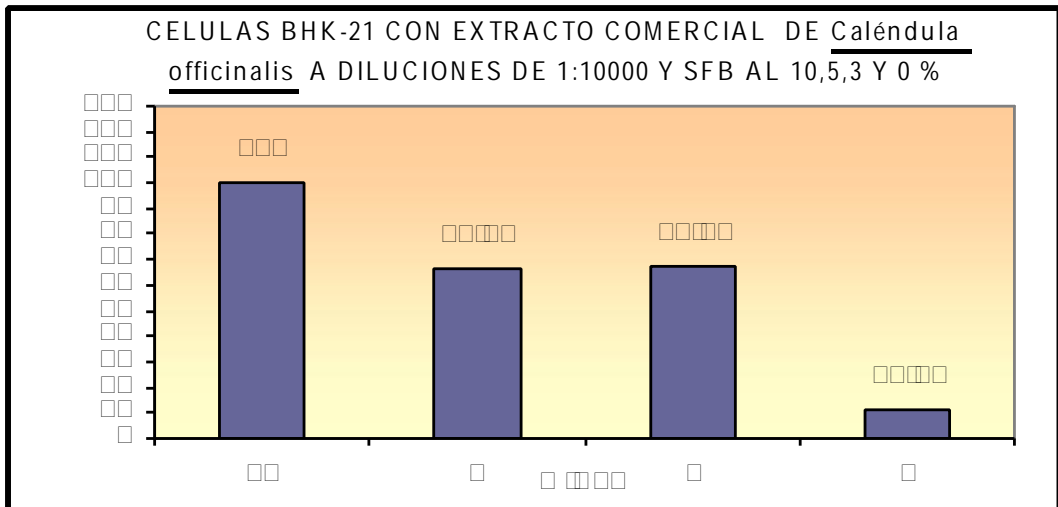
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:10. Obsérvese en esta dilución como nos muestra la gráfica que con el SFB al 5%, el crecimiento esta por debajo del control positivo, disminuyendo sucesivamente al ir disminuyendo el suero.



□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:100. En el grafico se observa que el crecimiento a esta dilución es mínimo, disminuyendo aun más al ir reduciendo consecutivamente el SFB y nulo en su ausencia.



□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:1000. En esta dilución observamos que con el 5% de SFB el crecimiento celular decrece, en comparación con el control positivo, y aun más con el 3% de suero, y sin este no hay proliferación celular.



□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ Porcentaje de crecimiento de células BHK-21, con respecto al por ciento de SFB; con extracto comercial de C. officinalis en una dilución 1:10000. En este grafico podemos resaltar que tanto al 5% como al 3% de sustitución del SFB el crecimiento es solo por arriba del 50%, y sin suero el crecimiento es muy poco apreciable.

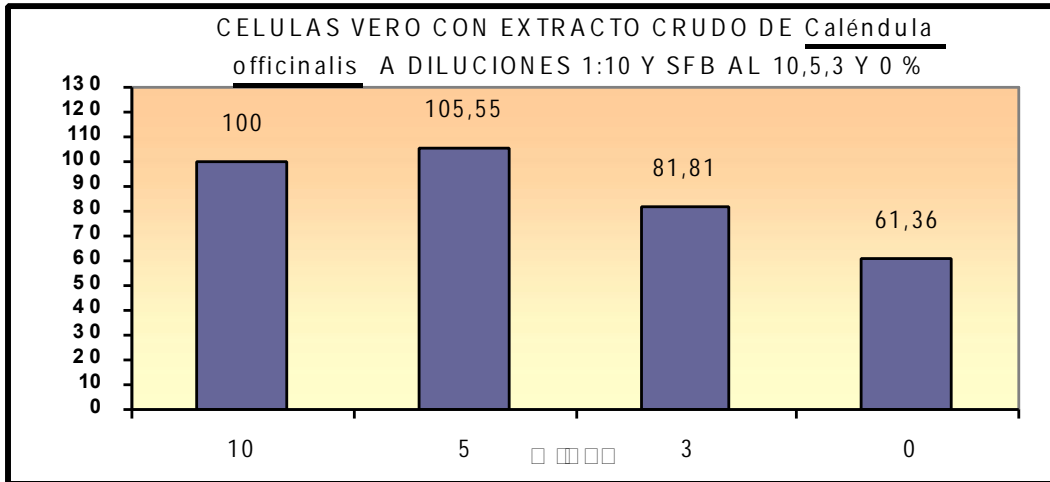
4.2 EFECTO DEL EXTRACTO (CRUDO Y COMERCIAL) DE *Caléndula officinalis* SOBRE CELULAS VERO.

En la tabla 4 se aprecian todos los resultados de las medias aritméticas de las absorbancias que se obtuvieron en los ensayos con la técnica cuantitativa de MTT. En la fila 4 y 5 se tienen la absorbancia y por ciento de crecimiento del control positivo que contiene SFB al 10%. Y de la fila 6 en adelante se muestran los resultados de absorbancia, su desviación estándar y el por ciento de crecimiento celular a las diferentes diluciones de *C. officinalis*, así como los porcentajes de sustitución del SFB.

□□□□□□ Promedio de absorbancias a una longitud de onda de 640 nm y porcentaje de crecimiento de células VERO + SFB+ *C. officinalis* (extracto crudo)

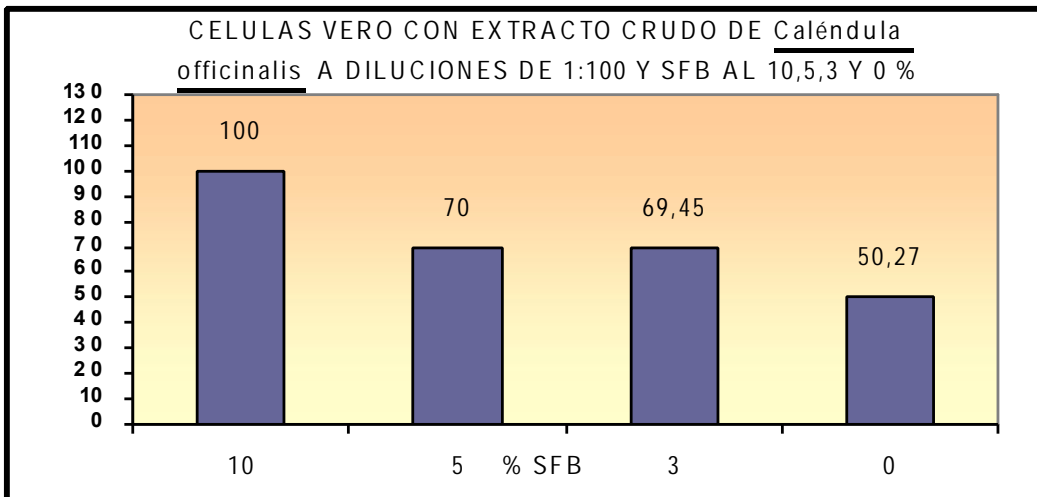
Diluciones de <i>C. officinalis</i>	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Absorbancia Blanco	0.001	0.001	0.001	0.001
Absorbancia control (-)	0.002	0.002	0.002	0.002
Absorbancia control (+)	0.198	0.185	0.162	0.138
% de crecimiento con SFB al 10%	100	100	100	100
Absorbancia de SFB al 5%	0.209	0.129	0.196	0.104
% de crecimiento con SFB al 5%	105.55	70.00	120.67	75.45
Desviación estándar	1 1x10 ⁻⁰³	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰⁴
Absorbancia de SFB al 3%	0.162	0.128	0.108	0.098
% de crecimiento con SFB al 3%	81.81	69.45	67.02	70.75
Desviación estándar	1x10 ⁻⁰³	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰⁵	1x10 ⁻⁰³
Absorbancia de SFB al 0%	0.121	0.093	0.084	0.096
% de crecimiento con SFB al 0%	61.36	50.27	52.25	69.31
Desviación estándar	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰³	1x10 ⁻⁰⁵	1x10 ⁻⁰³

A continuación los resultados son expresados en gráficos para una mayor apreciación de los resultados.



□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10.

La gráfica exhibe que la barra que representa el 5% de sustitución de SFB, supero el control positivo representado este por la barra de 10%, ahora bien con el 3% de suero disminuyo el crecimiento y más aun cuando no lo contiene, no tan drásticamente, ya que se encuentra por arriba del 50% de crecimiento.



□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ Porcentaje de crecimiento de células VERO, con respecto al por ciento de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:100.

Se muestra en la gráfica que a esta dilución de C. officinalis el crecimiento celular, con los diferentes porcentajes de sustitución del SFB, tienen un desarrollo similar ya que no hay una diferencia notoria respecto a los porcentajes de crecimiento.

Se reportan en la tabla 5 los resultados de la media aritmética de las absorbancias obtenidas en el ensayo con la técnica cuantitativa de MTT. En la fila 4 y 5 encontramos la absorbancia y por ciento de crecimiento del control positivo que contiene SFB al 10%.

De la fila 6 a la 14 se muestran los resultados de la media aritmética de las absorbancias, su desviación estándar y su por ciento de crecimiento celular a las diferentes diluciones de C. officinalis, así como los porcentajes de sustitución del SFB

□□□□□□ Promedio de absorbancias a una longitud de onda de 640 nm y porcentaje de crecimiento de células VERO + SFB+ C. officinalis (extracto comercial)

Diluciones de <u>C. officinalis</u>	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Absorbancia Blanco	0.001	0.001	0.001	0.001
Absorbancia control (-)	0.002	0.002	0.002	0.002
Absorbancia control (+)	0.157	0.145	0.139	0.140
% de crecimiento con SFB al 10%	100	100	100	100
Absorbancia de SFB al 5%	0.145	0.138	0.135	0.104
% de crecimiento con SFB al 5%	92.6	94.84	97.48	74.02
Desviación estándar	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰³	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰³
Absorbancia de SFB al 3%	0.102	0.186	0.134	0.128
% de crecimiento con SFB al 3%	65.28	127.83	96.76	91.45
Desviación estándar	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰³	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰⁴
Absorbancia de SFB al 0%	0.074	0.079	0.081	0.079
% de crecimiento con SFB al 0%	47.13	54.63	58.27	56.79
Desviación estándar	1x10 ⁻⁰³	1x10 ⁻⁰⁴	1x10 ⁻⁰³	1x10 ⁻⁰⁴

Los resultados mostrados en esta tabla se muestran en los siguientes gráficos, para una mejor evaluación de los mismos.

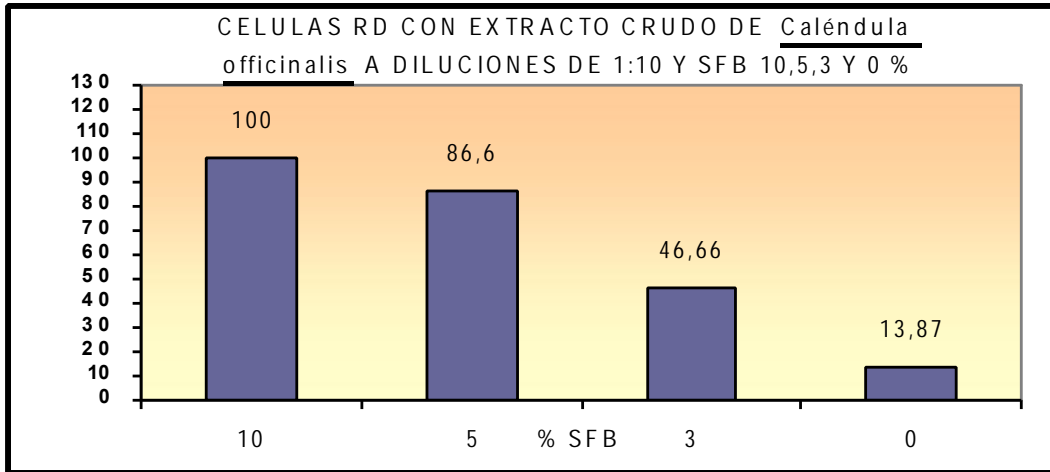
4.3 EFECTO DEL EXTRACTO (CRUDO Y COMERCIAL)
DE CALENDULA SOBRE CELULAS RD.

Tabla 6 se presentan las absorbancias que se obtuvieron al enfrentar las células RD a diferentes diluciones del extracto crudo de *C. officinalis* y variaciones en el porcentaje de SFB, lográndose solo un crecimiento significativo que se observa en las diluciones 1:10 y 1:1000 y con SFB al 5%.

Promedio de absorbancias a una longitud de onda de 640 nm y porcentaje de crecimiento de células RD + SFB+ *C. officinalis* (extracto crudo)

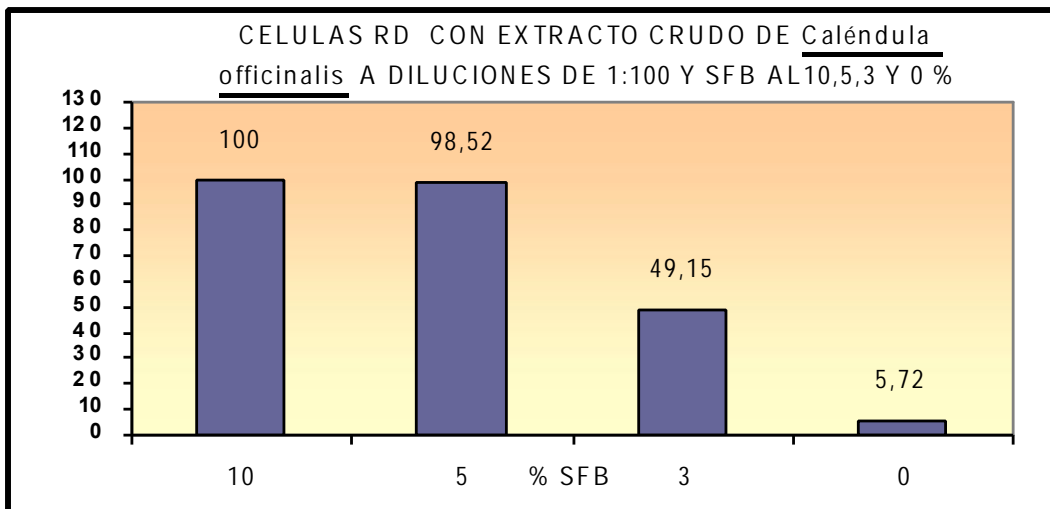
<i>C. officinalis</i>				
	0.001	0.001	0.001	0.001
	0.002	0.002	0.002	0.002
	0.349	0.365	0.516	0.300
	100	100	100	100
	0.302	0.359	0.430	0.238
	86.60	98.52	83.22	46.04
	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-03}
	0.163	0.179	0.289	0.219
	46.66	49.15	56.02	72.89
	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}
	0.048	0.020	0.051	0.077
	13.87	5.72	9.98	25.83
	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}

Enseguida se representan en gráficos, los resultados obtenidos con células RD con el extracto crudo expresados en la tabla anterior



□ Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al porcentaje de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:10.

Se observa en esta gráfica, que el crecimiento celular más notorio es con SFB al 5%, reduciéndose este al ir disminuyendo el suero, y casi por completo al no estar este presente.



□ Porcentaje de crecimiento de células RD, con respecto al porcentaje de SFB; con extracto crudo de C. officinalis en una dilución 1:100.

El crecimiento celular que se observa con SFB al 5%, es muy cercano al 100% control positivo, ahora bien con el suero al 3% el desarrollo se ve reducido en un cincuenta por ciento de lo esperado, y cuando solo se utiliza el extracto se aprecia que es mínimo.

Se muestra en la tabla 7 se muestran la media aritmética de las absorbancias obtenidas en los ensayos con la técnica cuantitativa de MTT. Se tiene en la fila 4 y 5 las absorbancias y por ciento de crecimiento del control positivo que contiene SFB al 10%. Y de la fila 6 en adelante se muestran los resultados de absorbancia, la desviación estándar y el por ciento de crecimiento celular a las diferentes diluciones de *C. officinalis*, así como los porcentajes de sustitución del SFB.

Promedio de absorbancias a una longitud de onda de 640 nm y porcentaje crecimiento de células RD + SFB+ *C. officinalis* (extracto comercial)

<i>C. officinalis</i>				
	0.001	0.001	0.001	0.001
	0.002	0.002	0.002	0.002
	0.523	0.582	0.580	0.484
	100	100	100	100
	0.482	0.474	0.474	0.324
	92.27	81.41	81.75	66.99
	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}
	0.337	0.249	0.386	0.392
	64.53	42.79	66.65	81.01
	1×10^{-04}	1×10^{-05}	1×10^{-04}	1×10^{-04}
	0.184	0.033	0.009	0.092
	35.25	5.68	1.67	19.10
	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}	1×10^{-04}

Los resultados presentados en esta tabla, son expresados a continuación en los gráficos siguientes.



La cosecha de la C. officinalis que se llevo a cabo en la FES-C-4, nos sirvió de materia prima para obtener su extracto y poder realizar este trabajo de investigación, y así mismo poder compararla con un producto que se vende al publico, elaborado por los Laboratorios SIMILIA. Posteriormente de obtener la C. officinalis en condiciones óptimas, se realizaron pruebas In Vitro con ambos extractos y diferentes líneas celulares empleadas.

Los productos comerciales son elaborados la mayoría con tallos, cabezuelas y pétalos, el extracto de C. officinalis hecho en FES-C esta elaborado solo con pétalos, lugar donde se encuentran los principios activos de esta planta. ^{43,47}

Se logro obtener un extracto crudo de C. officinalis con calidad microbiológica y libre de etanol, para realizar los ensayos In Vitro con las diferentes líneas celulares.

Al sustituir parcialmente el suero fetal bovino (SFB) por extractos de C. officinalis, se comprobó que efectivamente funcionan como promotores de crecimiento celular en algunas líneas celulares; ya que al trabajar bajo las mismas condiciones para lograr el crecimiento de cada una de estas, no se logro obtener resultados satisfactorios con HELA y HEP-2 caso contrario para BHK-21, VERO y RD, en las cuales si se obtuvo resultados alentadores.

La técnica de Mossman (MTT), propuesta para este trabajo nos permitió medir el crecimiento celular, ya que es un sistema que se utiliza habitualmente para determinar la proliferación celular, espectrofotometricamente por la absorbancia producida como una función de concentración del colorante convertido. ⁴⁴

CELULAS BHK-21

En la gráfica No. 4 se observa que con extracto crudo en la dilución 1:10000 de C. officinalis y un porcentaje de SFB del 5%, la absorbancia que exhibe de 0.252 nm, la cual es mayor comparada con el control positivo que tiene un valor de 0.232 nm; este control es nuestro punto de referencia del 100% de crecimiento celular detectando que el problema tiene un valor de 108.6%, considerando significativo ya que rebasa la expectativa de crecimiento celular. Lo cual nos dice que la C. officinalis tiene un efecto estimulante de la proliferación celular.

Sin embargo es importante mencionar que en ninguna otra dilución y porcentaje de sustitución del SFB, se observa un crecimiento mayor al control positivo con este extracto.

En cuanto al extracto comercial, el crecimiento celular en ningún ensayo en las diferentes diluciones ni porcentajes del SFB se observo algún resultado que superara el control positivo. Más bien un decremento del desarrollo celular que se ve mayormente reflejado en la dilución 1:100 mostrado en la gráfica 6, donde es mínimo el incremento en el número de células.

En cuanto al comportamiento con ambos extractos, los resultados más alentadores se dan con el porcentaje de sustitución de SFB del 5% y tendiendo a disminuir este al disminuir el suero; y con solo los extractos de C. officinalis el crecimiento es casi nulo.

Las diluciones de C. officinalis con ambos extractos y células BHK-21 muestran que cuando esta más diluida estimula mayormente el crecimiento celular es la de 1:10000 gráfica 4 y 7, lo cual significaría que a menor concentración estimula mayormente el crecimiento.

CELULAS VERO

Cuando el SFB, esta al 5% y la dilución de C. officinalis es de 1:10, con extracto crudo se obtiene la absorbancia de 0.209 nm, y esta representa el 105.55% de crecimiento celular, lo cual es mayor que el control positivo que es nuestro punto de referencia del 100%, con valor de 0.198 nm gráfica No. 9.

Con el mismo extracto y a la dilución 1:1000 con el mismo por ciento de SFB, el valor de la absorbancia fue de 0.195 nm equivalente al 120.67% de crecimiento celular, siendo superior al control positivo, gráfica No. 11, ambas con extracto crudo.

En el grafico 10 y 12 no se rebasó el 100% de crecimiento celular en estas diluciones, aunque si podemos destacar que el incremento fue del 50% o más, sobre todo cuando solo lo estimula el extracto, sin la adición de ninguna cantidad de SFB.

En el caso del extracto comercial con dilución 1:100 y SFB al 3%, el máximo valor obtenido fue de 0.186 nm que representa el 127.83% de crecimiento celular, superando el control positivo, el cual tiene una absorbancia de 0.145 nm gráfica No. 14.

Sin embargo cabe mencionar que con este extracto comercial con SFB al 3 y 5% obtuvimos varios resultados muy cercanos al 100%, gráfica 13, 15 y 16.

Se esperaba un crecimiento celular superior con el extracto crudo, lo cual no fue así y podríamos pensar que las características del mismo influyeron ya que existe evidencia de que a altas concentraciones la C.officinalis el efecto en vez de ser promotor es inhibidor, (citotóxico) y a concentraciones menores este extracto es un buen promotor de crecimiento celular.⁴⁶ Se piensa, que posiblemente el extracto comercial tenga alguna variante en cuanto a la cantidad de los

compuestos activos de la C. officinalis y estos se encuentren en menor o mayor cantidad en el mismo.

CELULAS RD

En cuanto a los resultados obtenidos cuando se trabajo con extracto crudo de C. officinalis con la línea celular RD, se obtiene que en la dilución 1:100 y SFB al 5%, presenta una absorbancia de 0.359 nm comparada con la del control positivo que es de 0.365 nm, por lo que al problema le corresponde el 98.52% de crecimiento celular comparado con el 100% de referencia, gráfica 18.

En tanto que en las diluciones 1:10, 1:1000 y 1:10000, las absorbancias obtenidas no rebasaron a su respectivo control positivo, y en algunos casos su crecimiento celular se ve reducido hasta en un cincuenta por ciento, gráfica 17, 19 y 20.

Ahora bien cuando los ensayos se realizaron con el extracto comercial, se exhibe que en la dilución 1:10 y SFB al 5%, se obtiene una absorbancia de 0.482 nm, mientras que en el control positivo es de 0.523 nm; por lo que el problema equivale al 92.27% de crecimiento celular, siendo muy cercano al control positivo, gráfica 21.

Mientras que en las diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000, con los porcentajes de SFB 5% y 3% no se obtienen valores mayores que sus controles positivos, reduciendo en estos casos su crecimiento en un porcentaje que va del 40 al 80%, gráfica 22, 23 y 24.

Los resultados con ambos extractos nos muestran que hubo un aumento considerable en el crecimiento celular, con el mismo porcentaje de sustitución de SFB el cual fue de 5% en estos mismos, aunque en diferentes diluciones, grafica 18, 21.

CELULAS HELA Y HEP-2

En cuanto a las líneas celulares HELA y HEP-2, con las cuales no se logro obtener ningún resultado alentador, puesto que no hubo indicios de crecimiento celular sino todo lo contrario se observa un efecto de citotoxicidad con ambos extractos (crudo y comercial). Confirmando bibliográficamente en efecto que la C. officinalis es citotóxica para algunas células como HEP-2 y otras.^{45, 46}

Aunque es toxica para algunas líneas celulares, puede promover la formación de otros tipos celulares, ya que se reporta actualmente evidencia de que la C. officinalis promueve la formación de hueso alveolar en conejo.⁵⁰

La citotoxicidad para unas líneas celulares y la promoción en otras podría, deberse a las diferencias en la organización y complejidad de los diferentes tejidos y órganos de los cuales provienen las líneas celulares.⁴⁹ Ya que las líneas de mejores resultados no son provenientes de carcinomas como la VERO y BHK-21, se originan del mismo órgano aunque de una diferente especie, siendo ambas monocapa de fibroblastos.

Sin embargo no podemos pasar por alto la composición de los extractos, ya que la respuesta final probablemente sea también el resultado de la concentración de los compuestos químicamente activos de la flor de la C. officinalis, ya que se menciona en estudios anteriores que si el extracto se emplea a concentraciones altas, el efecto en vez de ser promotor es inhibidor. Sin embargo a concentraciones menores este extracto es un buen estimulante del desarrollo celular,⁴⁸ pudiendo ser una posible causa del porque con el extracto crudo en las líneas celulares BHK-21 y VERO, los resultados fueron más alentadores.

Existen reportes sobre las propiedades del extracto de C. officinalis en la regeneración del epitelio de tejidos, donde se asume que este efecto es debido al aumento en el metabolismo de glicoproteínas, nucleoproteínas y colágeno,

durante el período regenerativo de los tejidos. Lo cual puede explicar el porque del efecto estimulante del crecimiento celular al enfrentarlo a los cultivos de células, sin embargo aun falta determinar cual es el compuesto o compuestos que provocan dicho efecto.^{52,53}

Por otro lado se han aislado polisacáridos de alto peso molecular los cuales indicaron actividad inmunoestimulante, señalando también su actividad antitumoral y citotóxica de extractos de C. Officinalis .⁵¹

□□□□ □□□□□□ □□□

- 1.-Se logro sustituir parcialmente el SFB por extractos de C. officinalis, en la elaboración de cultivos celulares en las líneas BHK-21, VERO y RD.
- 2.-El mejor porcentaje de sustitución de SFB por extracto crudo de C. Officinalis fue de un 50% en BHK-21 y RD.
- 3.-Con células VERO, el mayor porcentaje de sustitución de SFB por extractos crudo y comercial de C. officinalis fue de 30% y 50% en células VERO.
- 4.-La mejor dilución de los extractos de C. officinalis que promovió el desarrollo celular fue, para células BHK-21 de 1:10000, RD 1:100 y VERO 1:10, 1:100 y 1:1000.
- 5.-Se comprobó que ambos extractos de C. officinalis fueron citotóxicos para las líneas celulares HELA y HEP-2.
- 6.-Con la línea celular VERO se obtuvieron los mejores resultados, con ambos extractos de C. officinalis.
- 7.-No se puede sustituir en su totalidad el SFB, pero si se podría disminuir su volumen en el cultivo de células, ya que al emplear el extracto a las diluciones indicadas se logro obtener una confluencia celular igual e inclusive mayor que las se obtiene al usar SFB al 10%.

□□□□□□□□□□

Con el uso de una alternativa natural como *C. officinalis*, producto de bajo costo, sería importante seguir realizando estudios que involucren esta planta a otras diluciones y con otras líneas celulares, así como poder investigar el efecto en cultivo de virus.

Hacer una prueba de HPLC en ambos extractos, para determinar si hay variación en cuanto a los componentes y en que cantidad están presentes cada uno de estos.



7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Línea celular VERO

Línea celular RD

Línea celular BHK-21

Línea celular HEP-2

Línea celular HELA

Suero Fetal Bovino CELlect™ GOLD

Extracto comercial de *Caléndula officinalis*

Pétalos de flor de *Caléndula officinalis*

7.2 REACTIVOS

Agua destilada

Agua des-ionizada

MTT SIGMA M-2128

Colorante Azul de Tripán SIGMA

Tripsina 0.05%

Bicarbonato de sodio MONTERREY®

Solución salina fisiológica

Medio de cultivo D-MEM GIBCO®

Medio de cultivo 199 SIGMA

Medio L-15 SIGMA

Verseno 0.05%

Etanol (70% absoluto)

Agar Base Sangre MERCK®

PBS 1x

Fungi-bact solution (penicilina/estreptomicina) Irving Scientific

7.3 MATERIAL

Vasos de pp. KIMAX® de 1000, 500, 250 y 100 mL

Embudo de vidrio

Frascos de vidrio estériles

Tubos para centrifuga PIREX® No. 8082

Micro pipetas automáticas de 25, 50 y 100 microlitros BOECO®

Micro pipetas 40, 20, 10, 5 y 2µL OXFORD ®

Micro pipetas de 0.5 a 10 µL OXFORD ®

Matraces erlenmeyer KIMAX® de 50, 100 y 250 mL

Botellas Falcon® de 25 cm²

Microplacas de 96 pozos fondo plano. Comino, INC.

Puntas desechables para micro pipeta

Membranas milipore® de (0.22 y 0.45 µm)

Cajas de petri KIMAX®

Papel filtro No. 3 Wattman®

Soporte universal, malla de asbesto y pinza de nuez

Mechero bunsen y manguera de látex

Filtro milipore Corporation

Termómetro Viu & Ciencia

Gradilla

Mechero bunsen

Microplaca de 96 pozos de fondo plano. Comino, INC.

Tubos de ensayo

7.4 EQUIPO DE TRABAJO

Horno Pasteur Ríos S. A. modelo HS-41

Incubadora de CO₂

Cámara de Neubauer

Centrífuga Dynac®

Cabina de flujo laminar VECO®

Refrigerador IEM
Congelador American
Estufa Ríos Rocha S.A
Microscopio óptico Olympus® modelo CHS
Microscopio de luz invertido Zeis® IDO3
Autoclave All American Modelo 1925X
Rotavapor BUCHIR R-114, Waterbach B-480
Baño Maria Grant®
Balanza analítica
Balanza granataria Triple beam balance 700 series
Espectrofotómetro SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR RX
Parrilla con agitadores NOUVA II Stir Plate

7.5 PREPARACION DE REACTIVOS

AZUL DE TRIPAN AL 0.4 %

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

ETANOL AL 75%

Etanol puro	75 mL
Agua desionizada	c.b.p. 100 mL

MTT

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

Filtrar con membrana de 0.22 μ m. Conservar a una temperatura de 4°C.

TRIPSINA-VERSENO (0.05% - 0.05%)

Solución No. 1

Tripsina	0.05 g
----------	--------

PBS	c.b.p. 100 mL
Solución No. 2	
EDTA (Verseno) (J.T BAKER)	0.05 g
PBS	c.b.p 100 mL

De ambas soluciones se mezclan cantidades a la misma proporción, y la solución resultante se esteriliza con una membrana milipore de 0.22 μm . Se conserva en congelación.

MEDIO D-MEM

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

Al termino se ajusta a pH de 6.8 con HEPES y se prefiltra con membrana de 0.45 μm , para posteriormente terminar la esterilización con una membrana de 0.22 μm .

PBS 1x

NaCl (REPROQUIFIN)	8.0 g
KCl (J.T. BAKER)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (MONTERREY)	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Agua des-ionizada	c.b.p. 1000 mL

Ajustar el pH a 7.0 y esterilizar en Autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos. Conservar a 4°C.

SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA

- 1.- Por cada 100 mL de solución agregar 850 mg. de NaCl.
- 2.- Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 libras de presión, durante 15 minutos.

MEDIO L-15 (Leibovitz)

- 1.- 14.8 g. c.b.p 1000 mL.
- 2.- Ajustar pH 7 con bicarbonato de sodio
- 3.- Antibiótico, Antimicótico
- 4.- SFB. al 3% de mantenimiento
- 5.- SFB. al 10% de crecimiento

MEDIO 199

- 1.- 9.9 g c.b.p 1000 mL
- 2.- Ajustar pH a 7 con bicarbonato de sodio
- 3.- Antibiótico, antimicótico
- 4.- SFB. al 3% de mantenimiento
- 5.- SBF. al 10% de crecimiento

ALCOHOL ISOPROPÍLICO

- | | |
|---------------------------------------|---------------|
| HCl (MONTERREY) | 1.6 mL |
| Alcohol isopropílico (BAKER ANALYZED) | c.b.p. 100 mL |



TECNICAS REALIZADAS

□□ METODOS DE ESTERILIZACION

Calor húmedo: Mediante el empleo de autoclaves los cuales proporcionan una temperatura de 121°C y una presión de 15 lb. Utilizados para la esterilización de soluciones cuyos componentes no se degradan por éste método, material plástico y de vidrio y equipos de filtración.

Calor Seco: Lo constituye el uso de hornos a temperatura de 200°C por un espacio de 2 horas. Es empleado para la esterilización de material de vidrio particularmente.

Filtración: A través del uso de equipos con membrana de nitrocelulosa o acetato de celulosa con poro de 0.22µm de diámetro, mediante la aplicación de presión positiva o negativa. Por éste sistema se esterilizan la mayor parte de los medios de cultivo, suero, solución de antibiótico-antimicótico y suplementos.

□□ EXTRACCION

Es la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente sirviéndose de uno o varios disolventes.

Maceración: consiste en poner en contacto la droga seca triturada con el disolvente utilizado a temperatura ambiente con agitación, durante un tiempo generalmente días. Se utiliza generalmente mezclas hidroalcohólicas o agua. A continuación se decanta el conjunto obteniéndose por una parte el extracto líquido con los principios activos.

□□ TRIPSINIZACION DE CELULAS (PASE CELULAR)

Retirar el medio de cultivo de la botella confluyente.

Lavar con PBS.

Adicionar 3mL de PBS y dejar reposar por 10 minutos.

Retirar el PBS y adicionar 500 μ L de tripsina (la enzima no debe permanecer menos de un minuto en contacto con las células para evitar que se dañen).

Adicionar 1mL del medio propicio para cada línea celular y suero al 10% para obtener una suspensión celular.

De la suspensión celular tomar 500 μ L, y depositarlo en una botella Falcón de 25 cm^2 que contenga 4.5 mL de medio con suero al 10%.

Se puede aumentar o disminuir, el volumen de medio según convenga.

□□ CONGELACION DE CELULAS

Preparar la solución para congelar:

Medio D-MEM 15 mL

SFB 5 mL

DMSO 2 mL

Retirar el medio de una botella de no más de 48 hrs.

Lavar con PBS.

Seguir el procedimiento de Tripsinización antes mencionado.

Adicionar medio-SFB al 10%.

Centrifugar a 1250 rpm por 3 minutos

Resuspender las células con medio-SFB al 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.

Trypsinizar.

Colocar las células desprendidas en un tubo para centrifuga estéril y añadir 2 mL de D-MEM sin SFB.

Tomar 200 μ L de esta suspensión y colocarlos en un tubo Eppendorf.

A mismo tubo se le adicionan 200 μ L 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 cuatro para disminuir el rango de error.

El número de células por mililitro se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Célula/mL} = \frac{\text{\# de células contadas}}{\text{\# de cuadrantes contados}} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

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

□□□□□ □□ □□□□ □

□□□□□□□□□□

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.

□□□□□

□□□□□□□□□□

Célula cuyo número cromosómico difiere del número de cromosomas normal de la especie en uno o pocos cromosomas

□□□□□□□□ □□□□□

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.

□□□□ □□□□□□□

Sustancia que favorece la expulsión de gases.

□□□□□□□□□

Agente capaz de causar daño a las células.

□□□□□□□□

Sustancia que facilita la secreción de bilis.

□□□□□□□□□

Cantidad de células presentes en un cultivo celular.

□□□□□□□

□□□□□□□□□□

Sustancia que provoca un aumento de la sudoración.

□□ □□□□□□□□

Que estimula o favorece el flujo menstrual.

□□□□□□□□□□□□□□

Producto que se obtiene de un fármaco de origen vegetal sometiéndolo a la acción de un disolvente.

□□□ □□□□□□

Extremo superior de la planta con hojas y flores.

□□□□□□□□□□

Rama que sostiene una flor o inflorescencia.

□□□□□

Clase de partícula proteináceas que se creen responsables de enfermedades neurodegenerativas transmisibles, como la tembladera (scrapie) en el ganado ovino y el Kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en seres humanos. Dado que los priones carecen de ácido nucleico detectable, no son inactivados por los procesos usuales para destruir los virus.

□□□□□□□□

Sustancia glucosita de muchos vegetales soluble en agua, en muchas ocasiones con actividad química.



1. Correa Girón Pablo. *La encefalopatía Espongiforme de los Bovinos (Enfermedad de las vacas locas)* Folleto técnico No. 2 División Pecuaria. Febrero 1997, pág. 1-3.
2. *Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos*. 3ª. edición. México 1998, pág. 75.
3. Fogh, J. y Fogh H. *Procesos de Experimentación Biológica y Médica*. 1ª. edición. México. 1968, pág. 117:899.
4. Freshney. *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*. 2ª. edición Ed. Alan R. Liss. 1987, pág. 45-50.
5. Holbrock K.A. y Henning, H. Phenotypic Expresión of Epiderman Cell in Vitro A Review. 1983, pág 81.115-245.
6. John. L. Ingraham. *Introducción a la Microbiología*. Ed. Reverté S.A. España 1998. pág. 77-82.
7. Koneman, W. Elmer Estephen, D. Allen y Dowell V. R. *Diagnostico Microbiológico*". 5a. Edición, Ed. Panamericana. Argentina 1999, pág. 1197-1206.
8. González Aguilar María Francisca, ETAL. Noti Farma México. Nueva Época, Año cinco No. 8 Mayo-Junio de 1997, pág. 4-5.
9. Bruce Albert, Jonson Alexander, et. Al. *Biología Molecular de la Célula*. 4ª edición Ed. Omega, Barcelona España 2003, pág. 476.

-
10. Gacetas biomédicas.
[www.biomedicas.unam.mx/presenta_gaceta.asp? 08/03/2005](http://www.biomedicas.unam.mx/presenta_gaceta.asp?08/03/2005)
 11. Asociación Banco Argentino de Células.
<http://www.conmed.com.ar/sociedades/abac.org.or>
 12. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 1. Introducción al cultivo celular. www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.html
 13. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 2. El laboratorio de cultivo celular. www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap2.html
 14. Lidush Harvey, Berk Arnold, Zipursky Slawrence. *Biología Celular y Molecular*, 4ª edición. Ed. Panamericana, España enero 2002, pág. 184-186.
 15. Desarrollos Tecnológicos.
http://ww.encolombia.com/acovez24_desarrollos16.html
 16. Experimentación: falsos métodos alternativos.
<http://www.caf.Oguita.com.ar/articulos/suero.html>
 17. Cultivo celular ¿sin sufrimiento?
<http://www.ctv.es/USSERS/pdh5/CULTIVO-CELULAR.html>.
 18. Virología. *Cultivo de tejidos*. Ed. El Manual Moderno, México D. F. 1980, pág. 45-48.
 19. Correa Girón Pablo. Inifap. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Folleto técnico No. 2, División Pecuaria, febrero 1997, pág.1-5

-
-
20. Coll Morales Julio. *Técnicas de Diagnostico en Virología*. Ed. Díaz de Santos S. A. Madrid España 1993, pág. 144-152.
 21. Biblioteca Virtual en Salud.
http://www.bvsalud.org/php/decsws.php?tree_id=A11.436.955&Lang=pt 31k
 22. Te American Type Culture Collection Cell Lines and Hybridoma.
<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/CellBiology.cnf>
 23. Colecciones de células y material Biológico: ATCC/ECACC
http://www.wbc/recyrsis/colecciones_de_celulas.htm.
 24. Badillo Juscafresa. *Guía de la Flora Medicinal Toxica Aromática y Condomenticia*. Editorial Aedos Grupo Mundi-Prensa, Madrid España 1995, pág. 128.
 25. Ociosziynska Y. Study of the chemistry of C.officinalis influorescences. *Herba Pol* 1977; 23(3):191-9.
 26. Kaspezyk Z. Structure of a new triterpene triol form *C. Oficinalis* flowers. *Phytochemistry* 1973; 12(9):2999-3000.
 27. Vidal-Olliver F. Identification of Calendulocide F in *C. officinalis* flowers. *Planta Med.Phytother* 1988, 22(24):235-41.
 28. Marcial G. Data on the essential oil content and composition of *C. officinalis*. *Herba Hung* 1987; 26(23):179-189.
 29. Lastra Valdés Humberto y Piquet García Rosario. Artículos de Revisión. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. *C. officinalis*. *Rev. Cubana Farm.* 1999; 33 188-194.

-
-
30. Muñoz López de Bustamante Fernando. *Plantas Medicinales y Aromaticas. Estudio, Cultivo y Procesado*, Ed. Mundi Prensa, Barcelona España, pág. 125-128.
31. http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol33_3_99/far07399.htm
32. Dr. P. Font Quer. *Plantas Medicinales*, 6ª edición Ed. Labor S. A., Barcelona España, 1994, pág. 832-833.
33. Rojas Carlos. *Hierbas y Planas Medicinales*. Ed. Iberica Grafic, España 1997, pág.54-55.
34. Stern Claudia. *Remedios Florales de California*. 2ª edición. Ed. Lugo, Argentina 2001,pág. 53.
35. Cazón Daniel. *Plantas y Hierbas Medicinales*. Ed. Lidium, Argentina Buenos Aires, 1993, pág. 35.
36. Estrada Lugo Erick. *Plantas Medicinales de México*.4ª edición. Ed. Panamericana, México D. F. 1992, pág. 494-495.
37. Fitotem. [www. Natura/mar.com./fitotem.html](http://www.Natura/mar.com./fitotem.html).
38. Dumenil G. 1980. Evaluación of antibacterial properties of Calendula Officinalis Flowers And Mother homeopathic tinctures of C. Officinalis. Ann Pharm Fr. 38(6): 493-499.
39. Herbolaria. Plantas Medicinales.
[http:// www.buscajalisco. com/bj/salud/herbolaria.php?id=19](http://www.buscajalisco.com/bj/salud/herbolaria.php?id=19)
40. Plantas Medicinales: Antigua y Nueva Alternativa de Salud.
www.saludparati.com/caléndula.html.

-
-
41. *Manual Chino de Plantas Medicinales uso y dosificación*. Ed. Concepto S.A. México D.F. 1980.
42. enebro.pntic.mex.es/~gcorrali/calend.html.
43. www.sigma-aldrich.com.mx
44. Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983. 65, 55.
45. Lara Ochoa Francisco. *Plantas Medicinales de México (Composición, Usos, y Actividad Biológica)*. UNAM, México 1996, pág 69-76.
46. Ramos, A. Edreira, A. Vizoso. Genotoxicity of an extract of *Caléndula officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 1998, 61(1):49-55.
47. Akihisa Toshihiro, Yasukawa Ken. 1996 Triterpene Alcohols from the Flowers of Compositae And Their Anti- Inflammatory Effects." *Phytochemistry*", 43 (6), 1255-1260.
48. J.I. Pérez- Carreón, G. Cruz Jiménez, J.A. Licea Vega, E. Arce Popota, S. Fattel Fazenfa, S. Villa-Treviño. 2002. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Caléndula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol in Vitro*. 16(3), 253-258.
49. R. Elias, Olliver Vidal, et al. Antimutagenic activity of some saponins isolate from *Calendula Officinalis arvensis L. and Hedera Helix L.* *Phytopathology* 1976; 61(5) 327-331.
50. Sánchez CA, Ibarra MH, Inda CR, Ruíz OS. Acción del extracto de *Caléndula officinalis* en la formación de hueso alveolar post extracción en conejo. *Rev ADM* 1995; 52(2):84-94.
www.imbianet.com.mx/ADM/odv52n2/espanol/wod52-04

-
-
51. Wagner H. Immunostimulating polysaccharides from *Aralia mandchurica* and *C.officinalis Herbal*. Pol 1983; 29(2):151-5
 52. Rocaud Maitre A. Citotoxic and antitumoral activity of *Caléndula officinalis* extracts." Pharmazie 1998 43(3):220-1.
 53. Kloucheck Popota E., Popov A., Krusteva N. S.Influence of the physiological regeneration and ephitelization using fractions isolated from *Caléndula Officinalis*. Acta Physiol Pharmacol Bulg. 1982; 8(4): 63-67
 54. Kruglak Haym, Moore t. John. Matematicas Aplicadas a Ciencia y Tecnología Serie de Compendios Shaum, 1ª edición, Mexico D.F. 1972, pág.8-12.